

Estandarización de la técnica de ELISA para el diagnóstico de Toxocariasis humana

YRMA ESPINOZA^{1,2}, PEDRO HUAPAYA¹, ROXANA SUÁREZ †^{1,2}, VICTORIA CHÁVEZ⁴, CARLOS SEVILLA², ELIZABETH DÁVILA¹, ALINA HUIZA^{1,2}, CÉSAR NÁQUIRA^{1,3}, PILAR ALVA²

¹Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión", UNMSM. ²Departamento Académico de Microbiología Médica - Facultad de Medicina, UNMSM. ³Instituto Nacional de Salud.

⁴Hospital Nacional "Edgardo Rebagliati Martins"- EsSalud, Servicio de Laboratorio.

RESUMEN

OBJETIVO: Estandarizar la técnica ELISA para el diagnóstico de infección humana por *Toxocara canis* con antígeno excretado-secretado preparado en nuestro medio. **MATERIAL Y MÉTODOS:** Se colectó huevos de *T. canis* y se les incubó con formol (2%) a 28°C hasta obtener larvas de tercer estadio, las que luego de ser liberadas fueron incubadas en RPMI a 37°C por 7 días; se reemplazó el medio por otro similar y almacenó a -20°C. Se concentró el antígeno y se dosó proteínas. Para la técnica de ELISA se utilizó sueros de pacientes con toxocariasis y de niños recién nacidos, como controles positivos y negativos, respectivamente, diluidos desde 1/4 hasta 1/1024. Se sensibilizó placas de poliestireno con varias concentraciones de antígeno, utilizándose conjugado de peroxidasa e IgG de carnero anti IgG humana y sustrato OPD. Se realizó lectura de absorbancia a 492 nm con espectrofotómetro (Multiskan plus labsystems), siendo el punto de corte el promedio aritmético de la absorbancia de los sueros negativos más 3 desviaciones estándar. **RESULTADOS:** La concentración óptima del antígeno fue 50 ug/mL, la dilución del suero 1/128, la dilución del conjugado 1/1000 con densidad óptica mayor a 0,241. **CONCLUSIONES:** La técnica de ELISA para diagnóstico serológico de infección humana por *Toxocara canis* podría ser utilizada en estudios epidemiológicos en nuestro país. Queda pendiente la evaluación de su eficacia en futuros estudios.

Palabras clave: *Toxocara canis*; toxocariasis; serología; ELISA.

ELISA TECHNIQUE STANDARDISATION FOR HUMAN TOXOCARIASIS DIAGNOSIS SUMMARY

OBJECTIVE: To standardise ELISA technique for *Toxocara canis* human infection diagnosis by using excreted-secreted antigen prepared in our country. **MATERIAL AND METHODS:** *T. canis* eggs were collected by incubation with formalin (2%) at 28°C in order to obtain third stage larvae that were freed and incubated in RPMI at 37°C for 7 days; the medium was replaced by a similar one and stored at -20°C. Antigen was concentrated and protein dosage was made. Sera from patients with toxocariasis and newborns were used as positive and negative controls by ELISA technique, dilutions 1/4 to 1/1024. Polystyrene plates were sensitised with antigen in several concentrations and conjugated peroxidase with horseradish IgG, anti human IgG and substrate OPD were used. Absorbance was read with spectrophotometer (Multiskan plus labsystems) at 492 nm. Cut off point was determined by negative sera absorbencies arithmetic mean plus 3 standard deviations. **RESULTS:** Antigen concentration was 50 ug/mL, sera dilution 1/128, conjugate dilution 1/1000 with optical density above 0,241. **CONCLUSIONS:** ELISA technique for serologic diagnosis of human infection by *Toxocara canis* could be used in epidemiological studies in our country. Its efficacy will be determined in future studies.

Key words: *Toxocara canis*; toxocariasis; serology; enzyme-linked immunosorbent assay.

Correspondencia:

Bióloga Yrma Espinoza Blanco
Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión"
UNMSM - Sección de Parasitología.
Jr. José Santos Chocano 199. Urb. San Joaquín
Bellavista, Callao 02
E-mail: yaeb23@yahoo.es

INTRODUCCIÓN

La toxocariasis es una enfermedad parasitaria accidental del ser humano, causada por un nemátodo ascarídeo del género *Toxocara*, siendo el *Toxocara canis*, parásito del perro doméstico, el que provoca infección humana con mayor frecuencia (1-3).

El *Toxocara* es un nemátodo cosmopolita, cuya presencia y capacidad parasitaria al ser humano han sido confirmadas en áreas de clima templado y tropical de todos los continentes, considerándose a los habitantes de áreas periurbanas y rurales con deficientes condiciones sanitarias y que no desparasitan a sus mascotas como población de riesgo (1,2).

El parásito desarrolla un ciclo intestinal en los cachorros y un ciclo visceral en los animales adultos, ocurriendo esto último en alguna forma en el ser humano cuando es infectado (1,2).

La infección se adquiere fácilmente, pues los huevos pueden persistir como infectantes hasta años en suelo húmedo y temperatura templada; también soportan la desecación por su cubierta muy resistente (2). Luego de la ingestión accidental de los huevos, se produce migración de las larvas a diferentes tejidos, causando hemorragia, necrosis, reacción inflamatoria eosinofílica y eventualmente la formación de granulomas. Una gran proporción de infecciones por *T. canis* es asintomática (2). Los órganos más frecuentemente involucrados son hígado, pulmones, cerebro, ojos, corazón y músculos esqueléticos (1,2).

La larva *migrans* oftálmica es la forma más frecuente (2,4) y severa de la enfermedad, causando endoftalmitis (5); ésta puede ser confundida con un tumor maligno conocido como retinoblastoma (1,6).

Leucocitosis y eosinofilia pueden permanecer como secuelas (2,7). La respuesta inmunológica puede ser intensa, los niveles de anticuerpos permanecen altos durante varios años. Las isohemaglutininas anti A y anti B también permanecen altas (1).

En el Perú, Guerrero, en 1975 (8), encontró 24% de 12 parques de Lima contaminados con huevos de *Toxocara sp.* García, en 1976 (9), hizo un estudio de prevalencia de helmintos intestinales de perros de un distrito de Lima (San Juan de Lurigancho), encontrando 27,7% en 112 animales estudiados. Cevallos, en 1991 (10), encontró 31,9% de perros parasitados con *T. canis*, y en 8 de 10 parques de diferentes distritos de la ciudad de Lima había presencia de huevos de *Toxocara sp.* También realizó un estudio seroepidemiológico con el método de ELISA y encontró 7,38% de positividad a una prueba de inmunoensayo en 1023 sueros (10).

En 1997, Miranda (11) señaló en un estudio retrospectivo 21 casos de toxocariasis diagnosticados en Lima.

Estudios en otros países muestran que es más difícil encontrar los huevos en arena (12) que en tierra fértil (13-16), con porcentajes variables entre 15% a más de 60%. Por lo que se debe considerar la contaminación en parques públicos como un importante factor de riesgo. Además, el consumo de verduras contaminadas también debe ser tomado en cuenta (17). Asimismo, revisando reportes de la frecuencia de infección humana, encontramos que puede variar alrededor de 40% (18-21), especialmente en zonas empobrecidas.

Los estudios efectuados en el país indican que la toxocariasis debe ser más frecuente de lo que habitualmente ha sido indicada, pues el diagnóstico directo es difícil de ser realizado en los casos clínicos sospechosos (mediante biopsia); de allí que la demostración indirecta del parasitismo mediante pruebas inmunológicas es importante (22,23).

El diagnóstico de esta patología actualmente se basa en la sospecha clínica, antecedentes de geofagia y contacto con caninos, un cuadro clínico compatible, leucocitosis y eosinofilia, la cual no siempre existe (22,23).

Hasta el momento, la prueba de ELISA que utiliza como antígeno el secretado-excretado de

las larvas del parásito constituye una prueba de alta confiabilidad en la literatura mundial^(16,22,24,25).

El propósito del presente trabajo es preparar antígeno excretado-secretado de larvas de *T. canis* aisladas en nuestra institución y con este antígeno elaborar una prueba de ELISA que permita el diagnóstico apropiado en nuestro medio, tanto en casos clínicos sospechosos como en estudios epidemiológicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se preparó el antígeno según el método de Saving⁽²⁶⁾, con algunas modificaciones:

- Obtención de ejemplares adultos hembras vivas de *Toxocara canis* a partir de necropsias de canes menores de seis meses, provenientes del Centro Antirrábico de Chacra Ríos en Lima y otros capturados en comunidades urbano marginales del Callao; también mediante la administración de antiparasitarios a perros mascotas. Con la finalidad de obtener mayor cantidad de vermes, se infectó experimentalmente a perros menores de un mes de edad, los que fueron mantenidos en el Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión" durante más de 2 meses, para luego ser sacrificados y obtener los parásitos del intestino.
 - Obtención de larvas de *Toxocara canis* a partir de las hembras adultas. Se disecó vermes adultos hembras para obtener el útero y colectar huevos, que fueron colocados en recipiente de vidrio con formol al 2% con tapa de algodón, por 30 a 40 días a 28°C, agitando por lo menos 1 vez al día. Se logró la formación de embriones de los huevos, los que fueron recolectados y lavados por centrifugación 3 a 4 veces, con agua destilada. Se procedió a la liberación de las larvas de tercer estadio; para ello se suspendió los huevos en solución de lejía al 5%, para reblandecer la membrana; luego se los colocó en recipientes con perlas de vidrio, que fueron agitados periódicamente para facilitar que las membranas se rompieran y se produjera la liberación de las larvas, las que fueron recuperadas mediante la técnica de Baerman.
 - Las larvas obtenidas previamente fueron colocadas en tubos conteniendo medio líquido para cultivo celular RPMI (Sigma ©), con antibióticos (penicilina 1,000 UI/mL y estreptomycin 250 mg/mL), y fueron incubadas a 37°C durante 7 días. Se observó al microscopio invertido cada 3 días, para verificar la movilidad de las larvas y descartar una posible contaminación bacteriana y/o fúngica. Después de 7 días, se centrifugó y colectó el sobrenadante, se reemplazó el medio en forma aséptica por otro volumen de composición similar al inicial y se repitió el proceso de incubación de la misma forma. El medio líquido colectado, que contenía el antígeno excretado-secretado o ES, fue almacenado a -20°C, hasta obtener un volumen de 200 mL, para luego concentrar el material. Para ello, el antígeno fue colocado en membranas de diálisis que fueron cubiertas con aquacil, durante seis a doce horas, hasta retirar la mayor cantidad de líquido posible. Luego se procedió a dosaje de proteínas del material concentrado mediante el método de Lowry.
 - Se estandarizó la prueba de inmunoadsorción asociada a enzimas (ELISA) para detectar anticuerpos de tipo IgG contra *T. canis* en sueros de pacientes con toxocariasis, procedentes del laboratorio del Hospital Calvo Mackenna de Santiago de Chile, siguiendo la metodología descrita por Glickman y col.⁽²⁷⁾ con algunas modificaciones.
- Se sensibilizó placas de poliestireno con pocillos de fondo plano con 100 uL de diferentes concentraciones de antígeno ES de *T. canis* (de 6,25 a 100 ug/mL) diluidos en buffer o tampón carbonato-bicarbonato a pH 9,6. Se incubó a 4°C durante 18 horas.
- Se lavó tres veces con 100 uL por pocillo de una solución de suero fisiológico y Tween 20

(0,05%), durante 5 minutos cada vez. Se bloqueó los sitios de unión inespecíficos con solución de tampón fosfato y albúmina al 1% (PBS-BSA) (100 uL), incubando a 37°C durante 1 hora. Se lavó siguiendo el procedimiento ya descrito. Los sueros de referencia o controles (positivos y negativos) fueron diluidos en PBS-BSA en diluciones seriadas de 1:4 a 1:1024. Se colocó 100 uL de cada dilución en pocillos sucesivos y se incubó a 37°C durante 1 hora. Se lavó como ya se ha descrito, se agregó 100 uL de conjugado de IgG de carnero anti IgG humana y peroxidasa de rábano picante a diferentes diluciones (1:1000 y 1:2000) y se incubó a 37°C durante una hora. Se lavó nuevamente, se añadió 100 uL del sustrato orto-fenil-dietnolamina u OPD 0,04% en tampón citrato pH 5,0 y peróxido de hidrógeno 0,03% y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se detuvo la reacción enzimática con 100 uL de ácido sulfúrico 2N, realizándose la lectura de absorbancia a 492 nm, utilizando un espectrofotómetro o lector de ELISA (*Multiskan plus labsystems*).

La titulación fue realizada mediante el método de tablero de damas; para ello se utilizó 8 muestras de suero de niños recién nacidos y de 8 pacientes con diagnóstico serológico de toxocariasis, como controles negativos y positivos, respectivamente. El objetivo era determinar la mejor concentración de antígeno para sensibilizar las placas; además, las diluciones óptimas de suero y conjugado.

El valor de corte fue determinado por el promedio aritmético de la absorbancia de las muestras de sueros negativos más 3 desviaciones estándar.

RESULTADOS

Con respecto a la obtención del antígeno, luego de 7 días del cultivo de las larvas de *T. canis* al 5% en medio RPMI 1640 – HEPES, se obtuvo material producto del metabolismo de los parásitos que, al ser concentrado 10 veces

con azúcar y/o aquacil, presentó valores de 19,9 mg/mL de proteínas.

Con relación al ELISA, después de la titulación, los mejores resultados se obtuvieron al emplear antígeno ES a una concentración proteica en 50 µg/mL; la dilución del suero fue 1/128 y la del conjugado 1/1000.

Se determinó el punto de corte en 0,241, luego de promediar las lecturas de densidad óptica de las diluciones de tres sueros negativos menores a la dilución de corte (1/128), siendo el promedio 0,052 y la desviación estándar de 0,063 DO. Los valores comprendidos entre $X + 2 DE$ y $X + 3 DE$ (0,178 y 0,241) fueron considerados como indeterminados.

DISCUSIÓN

El diagnóstico de toxocariasis humana se basa en la detección de anticuerpos específicos anti-*Toxocara* en humanos y animales en experimentación^(28,29). El método recomendado para el diagnóstico serológico es el método de ELISA, el cual es una prueba de alta sensibilidad y especificidad^(23,24). Las placas fueron sensibilizadas con 50 µg/mL, teniendo resultados comparables con los del Laboratorio de Inmunología del Hospital Calvo Mackenna de Santiago de Chile, que es considerado como centro de referencia.

La reactividad al antígeno de *Toxocara* en sueros de pacientes con otras infecciones parasitarias ha sido reportada principalmente a la causada por *A. lumbricoides*, nemátodo que comparte antígenos comunes con *Toxocara*^(20,21,24,27). No hemos evaluado sueros de pacientes que sólo tuvieran infección por *A. lumbricoides*. Para disminuir la reactividad cruzada, se recomienda la adsorción del suero a evaluar con antígenos de *A. suun*⁽²⁹⁾, hecho que no se realizó en el presente trabajo y que se efectuará posteriormente.

Es importante completar este estudio evaluando un mayor número de muestras de suero posi-

tivo y negativo, para poder tener una mejor idea de la eficacia de ELISA como método de diagnóstico y/ tamizaje que, en caso de ser adecuada, permitiría su uso en estudios epidemiológicos.

En conclusión, el cultivo de 7 días con RPMI – Hepes de larvas al 5% es un método de cultivo que permite obtener material rico en proteínas y antígeno, posible de ser empleado para realizar pruebas serológicas. En nuestro medio, el valor de corte a emplearse debe de ser la densidad óptica mayor a 0,142 para la dilución 1/128, toda vez que diluciones menores no tienen carácter discriminante entre los sueros positivos y negativos. La mejor concentración de antígeno utilizado para la sensibilización de las placas es de 50 µg/mL. Debido a que no tenemos certeza de las reacciones cruzadas y por el alto grado de parasitismo por helmintos en nuestro país, sería conveniente realizar la adsorción de los sueros con antígeno de *Ascaris suum* antes de aplicar ELISA. Queda pendiente la evaluación de la eficacia de la técnica en futuros estudios, antes de recomendar su uso como método de diagnóstico y/o tamizaje en nuestro país.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Consejo Superior de Investigación de la UNMSM. Código: 90101251.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Taranto N, Passamonte L, Marincon R, de Marzi M, Cajal S, Malchiodi E.** Parasitosis zoonóticas transmitidas por perros en el Chalco salteño. *Medicina* 2000; 60(2): 217-20.
2. **Flores A.** Toxocariosis: zoonosis por nematodos. *Rev Nuestros Perros*, Madrid, España, Nº 5, abril 1992.
3. **Schenone H.** Parasitosis humanas que pueden ser causadas o transmitidas por mascotas domésticas en Chile. *Bol Chil Parasitol* 1987; 42: 16-23.
4. **Nichols R.** The etiology of visceral larva migrans. *J Parasitol* 1956; 42: 349-62.
5. **Wilder H.** Nematode endophthalmitis. *Amer Acad Ophthalmol* 1950; 55: 99-109.
6. **López-Vélez A, Suárez M, Jimeno L, García-Camacho A, Fenoy S, Guillen J, Castellote L.** ¿Toxocariosis ocular o retinoblastoma?. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995; 13: 4.
7. **Beaver P, Snyder H, Carrera G, Dent J, Lafferty J.** Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. *Pediatrics* 1952; 9: 7-19.
8. **Guerrero M.** Estudio de la contaminación de parques públicos de Lima Metropolitana con huevos de *Toxocara sp.* *Tesis de Bachiller en Medicina Veterinaria, Universidad de San Marcos, Lima - 1975.*
9. **García E.** Prevalencia de helmintos gastrointestinales en *Canis familiaris* en el distrito de Lurigancho, Chosica, Departamento de Lima. Tesis de Bachiller en Medicina Veterinaria Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 1976.
10. **Zevallos L.** Estudio epidemiológico da Toxocariase na area Urbana de Lima, Perú. Tesis para optar el titulo de Master en Parasitología. Universidad de Sao Paulo. 1991.
11. **Miranda J, Sousa A, Alzamora B, Maquiña C, Tobaru L, Yarleque C, Terashima A y Gottuzo E.** Primer reporte en el Perú de toxocariasis ocular: análisis de 21 casos. *Bol Soc Per Med Interna* 1999; 12: 20-8.
12. **Nunes C, Pena F, Negrelli G, Anjo C, Nakano M, Stobbe N.** Ocorrência de larva migrans na aerina de areas de lazer das escolas municipais de encino infantil, Araçatuba, SP, Brasil. *Rev Saúde Pública* 2000; 35(6).
13. **Ribeiro F, Crocci A, Carneiro R, Silva J, Miyoshi M, Pessoa F, da Silva M y Lima M.** Contaminação de praças públicas de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, por ovos de *Toxocara* e *Ancylostoma* em fezes de cães". *Rev Soc Bras Med Trop* 1999; 32(5), Uberaba.
14. **Vásquez O, Ruiz A, Martínez I, Merlin P, Tay J, Pérez A.** Contaminación de suelos por huevos de *Toxocara sp.* en parques públicos y jardines de casas habitación de la ciudad de México. *Bol Chil Parasitol* 1996; 51: 54-8.
15. **Laird R, Carballo D, Reyes E, García R, Prieto V.** *Toxocara sp.* en parques y zonas públicas de Ciudad de la Habana, 1995. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2000; 38(2): 112-6.
16. **Jiménez J, Valladares B, Fernández J, Armas F, del Castillo A.** A serologic study of human toxocariasis in the Canary Islands (Spain): Environmental influences. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56(1): 113-5.
17. **Vásquez O, Martínez I, Tay J, Ruiz A, Pérez A.** Verduras de consumo humano como probable fuente de infección de *Toxocara sp.* para el hombre. *Bol Chil Parasitol* 1996; 51: 47-50.
18. **Agudelo C, Villareal E, Cáceres E, López C, Eljach J, Ramírez N, Hernández C, Corredor A.** Human and dogs *Toxocara canis* infection in a poor neighborhood in Bogota. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1990; 85(1): 75-8.
19. **Alonso J, Bojanich M, Chamorro M, Gorodner J.** *Toxocara* seroprevalence in children from a subtropical city in Argentina. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2000; 42(4), Sao Paulo.

20. **Moreira S, Leao M, Mendonca H, Pereira F.** Prevalence of anti-*Toxocara* antibodies in a random sample of inpatients at a Children´s hospital in Vitoria, Espírito Santo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1998; 40 (4): 259-61.
21. **Triviño X, Bedregal P, Torres M, Canales M, Alvarado C, Hernández R.** Toxocariosis en Chile: serie clínica en un centro de pediatría ambulatoria. *Parasitología al día* 1999; 23(3-4).
22. **Minvielle M, Niedfeld M, Ciarmela M, Basualdo J.** Toxocariosis causada por *Toxocara canis* aspectos epidemiológicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999; 17: 300-6.
23. **Noemí J, Viovy A, Cerva J, Gottlieb B, Roncone E, Quera R, Soto S, Herrera A, Fierro O, Fuentealba M, Contreras A, Berrios R.** Perfil clínico de la Toxocariasis en pediatría. *Parasitología al día* 1992; 16: 91-7.
24. **de Savigny D, Voller A, Woodruff W.** Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J Clin Pathol* 1979; 32: 284-8.
25. **Nunes C, Tundisi R, Heinemann M, Richtzenhan L.** Toxocariasis: serological diagnosis by indirect antibody competition ELISA. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1999; 41(2): 95-100.
26. **de Savigny D.** In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigens for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *J Parasit* 1975; 61: 781-2.
27. **Glickman L, Schantz P, Dombroske R, Cypess R.** Evaluation of serodiagnostic test for visceral larva migrans. *Am J Trop Med Hyg* 1978; 27(3): 492-8.
28. **Chieffi P, Peres B, de Mello E, Kabanura H, Brandao M.** Persistence of specific antibody response in different experimental infections of mice with *Toxocara canis* larvae. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1995; 37(3).
29. **Cevallos S.** *Toxocara canis* resposta de anticorpos Ig G na infeccao murina experimental e na co-infeccao com outros parasitos. Sao Paulo, 1998. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1998; 40(6): 350.