



Artículo Original

Antígenos del líquido seudocelómico de *Ascaris suum* detectados por Western Blot utilizando IgY producidos en *Gallus gallus* var. Hisex Brown

Seudocelomic fluid antigens of *Ascaris suum* detected by Western Blot technique using IgY produced in *Gallus gallus* var. Hisex Brown

Mario D. Arteaga-García¹ y Cesar A. Jara²

¹Tesista de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. ²Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.

RESUMEN

La técnica de Western blot está siendo cada vez más usada en el diagnóstico de enfermedades parasitarias y la búsqueda de fuentes antigénicas para su aplicación constituye un campo de interés creciente. El presente trabajo estuvo orientado a identificar los antígenos en líquido seudocelómico (LS) de *Ascaris suum*, mediante la técnica de Western Blot utilizando IgY producidos en *Gallus gallus*. El LS se obtuvo de ejemplares hembras que fueron extraídas directamente del intestino de cerdos naturalmente infectados y sacrificados en el Camal Municipal de El Porvenir (Trujillo, Perú), el cual se utilizó para inmunizar, junto con el adyuvante completo e incompleto de Freud, a un ejemplar de *G. gallus* Hisex Brown, a fin de obtener IgY contenida en la yema de huevo. En el LS tratado con dithiothreitol (DTT) se encontró 12 bandas antigénicas, cuyos pesos moleculares fueron: 101.0, 94.9, 65.0, 61.1, 50.6, 45.0, 41.5, 34.6, 22.4, 16.3, 14.4 y 12.7-10.5 kDa; mientras que en el LS no tratado con DTT se encontraron 15 bandas antigénicas, cuyos pesos moleculares fueron: 101.0, 94.9, 65.0, 61.1, 50.6, 45.0, 41.9, 34.6, 27.0, 25.4, 21.5, 18.5, 16.3, 14.4 y 11.2 kDa. Se concluye que el LS de *Ascaris suum* es una buena fuente de proteínas antigénicas que podrían utilizarse en el diagnóstico de la ascariasis pulmonar.

Palabras clave: *Ascaris suum*, líquido seudocelómico, Western blot.

ABSTRACT

The Western blot technique is being increasingly used in the diagnosis of parasitic diseases and search for antigenic sources for application is a field of growing interest. The present study was designed to identify the antigens in pseudocelomic fluid (SF) of *Ascaris suum* by Western blotting technique using IgY produced in *Gallus gallus*. The SF was obtained from female specimens recollected directly from the intestine of naturally infected pigs slaughtered in the El Porvenir (Trujillo, Peru) Municipal Slaughterhouse. SF was used to immunize, with complete and incomplete Freud's adjuvant, to one specimen of *G. gallus* Hisex Brown, to obtain IgY contained in the egg yolk. In LS treated with dithiothreitol (DTT) was found twelve antigenic bands, whose molecular weights were: 101.0, 94.9, 65.0, 61.1, 50.6, 45.0, 41.5, 34.6, 22.4, 16.3, 14.4 and 12.7-10.5 kDa, while in the LS not treated with DTT were found fifteen antigenic bands, whose molecular weights were: 101.0, 94.9, 65.0, 61.1, 50.6, 45.0, 41.9, 34.6, 27.0, 25.4, 21.5, 18.5, 16.3, 14.4 and 11.2 kDa. It was concluded that the *Ascaris suum* LS is a good source of protein antigens that could be used in the diagnosis of pulmonary ascariasis.

Keywords: *Ascaris suum*, pseudocelomic fluid, Western



INTRODUCCIÓN

La ascariasis constituye una de las infecciones más frecuentes en comunidades donde la pobreza prevalece, las implementaciones de salubridad son deficientes y la educación adecuada sanitaria no ocupa un lugar preferente en el desempeño diario, con efectos negativos tales como: desnutrición, falta de crecimiento pondoestatural, deficiencias cognitivas e inmunológicas que conducen a procesos de asma y susceptibilidad a infecciones producidas por *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis* y el virus de la inmunodeficiencia adquirida^{1,2,3}. La prevalencia global de infección por *Ascaris* es de 1.4 billones y en el Perú, entre el 06 y 98%, con mayores porcentajes en poblaciones infantiles de la selva y ceja de selva^{4,5}.

A. suum es uno de los parásitos más prevalentes en cerdos domésticos y es el único helminto frecuente en sistemas de producción masiva, las infecciones son más frecuentemente diagnosticadas por la presencia de las formas adultas en el intestino delgado en mataderos o por el hallazgo de los típicos huevos en muestras de materia fecal. Ambos métodos han sido ampliamente usados en estudios de prevalencia y han proveído información directa e indirecta, respectivamente, de la presencia de las formas adultas en el intestino delgado; sin embargo, no proveen información respecto del porcentaje de individuos que han experimentado infecciones pasadas o de los que tienen las larvas en fase migratoria^{6,7,8}.

La ascariasis pulmonar es producida tanto por *A. lumbricoides* como por *A. suum* y está relacionada con la ruptura de los capilares y de las paredes de los tabiques alveolares por las L3 y L4 con la presentación de diversas patologías directas e indirectas^{9,10,11}. Su diagnóstico se establece por la detección de anticuerpos o antígenos habiéndose empleado diversas técnicas, siendo ELISA la más frecuentemente utilizada, aunque, debido a su poca especificidad se está tratando de ser reemplazada o complementada con la técnica de Western Blot utilizando antígenos de excreción-secreción de las formas adultas o formas larvianas pulmonares^{12,13} o del líquido seudocelómico¹⁴.

Sin embargo, la obtención de anticuerpos en conejo para la técnica de Western blot trae consigo algunas dificultades relacionadas con el tiempo, el costo en manutención del animal y la muerte durante el sangrado. Ello condujo al uso de las inmunoglobulinas presentes en la yema de huevo de gallina (IgY) que, además, funcionalmente no interactúan con factores reumatoideos, de tal manera que la probabilidad de dar falsos-positivos en ensayos inmunoquímicos disminuye; no se unen a la proteína A estafilocócica ni a la proteína G ni al sistema de complemento humano y reconocen de preferencia proteínas de alto peso molecular (entre 46 y 77KDa); esto evidencia la ventaja de utilizar gallinas, las cuales proveen un repertorio de anticuerpos útiles, abundantes y baratos^{15,16}.

En el presente informe se presentan los resultados de una investigación a determinar los antígenos del líquido seudocelómico de *A. suum* detectados por Western Blot utilizando IgY producidos en *G. gallus* var. Hisex Brown, de tal manera que sirva de base y sustento para el desarrollo de técnicas de diagnóstico para la ascariasis pulmonar en humanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de formas adultas de *A. suum*

Ejemplares de *A. suum* fueron extraídos directamente del intestino de cerdos naturalmente infectados y sacrificados en el Camal Municipal de El Porvenir (Trujillo-Perú) e inmediatamente colocados en un frasco con solución salina fisiológica (SSF) tibia, previo lavado para eliminar la materia orgánica, y trasladadas al laboratorio de Helminología Parasitaria de la Universidad Nacional de Trujillo. Se diferenciaron las hembras de los machos por su tamaño y forma terminal de la cola.

Obtención del Líquido Seudocelómico de *A. suum* y determinación de la concentración de proteínas

Los 15 ejemplares hembras de *A. suum* fueron lavadas cuatro veces con SSF estéril y una con SSF más antibióticos (Gentamicina 0.5 ml/ 100 mL y Penicilina G sódica 0.5 mL/ 100 mL de 1,000,000 UI);



luego en condiciones de esterilidad y con la ayuda de una tijera estéril se procedió a realizar un corte en la parte final de la cola del parásito y de esta manera se recolectó el líquido pseudocelómico (LS) en un frasco estéril; el cual fue conservado en refrigeración a -20°C hasta ser utilizado. Posteriormente, fue centrifugado a 10,000 rpm por 10 minutos, luego se eliminó el sedimento y se utilizó el sobrenadante para determinar la concentración de proteínas por el método colorimétrico de Bradford¹⁷.

Inmunización de *G. gallus* y Obtención de Anticuerpos IgY¹⁵

Para la obtención de anticuerpos, el LS fue inoculado en cuatro ocasiones, cada siete días, a un ejemplar de *G. gallus* var. Hisex Brown, hembra, por vía subcutánea; la primera inoculación se realizó mezclando 1 mL de adyuvante completo de Freund (que favorece el depósito del antígeno en el sitio de inoculación y potencia la inmunogenicidad) con 1 mL de LS a una concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (dilución de 0.09 mL del LS con 3.91 mL de SSF), esta concentración fue obtenida teniendo en cuenta el resultado de la medición de proteínas por el método de Bradford; los componentes fueron depositados en un frasco de penicilina estéril colocado sobre un depósito con hielo y la emulsión fue obtenida de la agitación de ambos, a la mezcla se le consideró óptima cuando el agua ya no la dispersaba; ya obtenida la emulsión se procedió a la inmunización, para la segunda, tercera y cuarta inoculación también se obtuvo una emulsión, pero con 1 mL de adyuvante incompleto de Freund y de 1 mL antígeno.

En efecto, se utilizaron los huevos obtenidos del ejemplar cuatro días previos a la primera inoculación (para usarlos como controles negativos) y los recolectados post cuarta inoculación hasta el noveno día (30 días posteriores a la primera inoculación), esto debido a que los anticuerpos aparecen a partir de la segunda o tercera semana después de iniciada la inmunización y se mantienen constantes y elevados hasta la doceava semana. Para ello, primero, se liberó a la yema de la ovoalbúmina y de la membrana que la recubría, manualmente; luego se les pesó por separado y se les agregó el doble de volumen de PBS estéril a $1 \times 0.01\text{M}$, pH 7.2 y homogeneizó cuidadosamente; e inmediatamente, 5 mL del homogeneizado se colocó en tubos de ensayo y se agregó 5 mL de cloroformo en constante agitación, luego se dejó en reposo durante una hora para, finalmente, centrifugar a 4500 rpm, por 15 minutos, obteniendo una solución con tres fases de las que se separó el sobrenadante, y en donde se hallaron los anticuerpos requeridos; este sobrenadante fue conservado a -20°C hasta su uso.

Técnica de Western Blot¹⁸

La ejecución de la técnica de Western Blot y la preparación de los reactivos se efectuó siguiendo las indicaciones sugeridas por Escalante y col³², con las siguientes particularidades: (i) los antígenos de LS fueron preparados a las concentraciones de 0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, una parte de estas concentraciones de Líquido Seudocelómico fueron tratadas con Dithiothritol (DTT), 0.1% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 6% de glicerol y 0.025% de azul de bromofenol y las partes restantes se prepararon sin DTT; luego, se calentó a 65°C por 20 minutos, dejándose enfriar a temperatura de laboratorio ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$) antes de su uso. (ii) la SPS-PAGE se realizó a la concentración del 15% de acrilamida del gel separador y al 3% del gel concentrador, colocando 15 μL de antígeno en cada uno de los pocillos del gel concentrador, a 60V en el gel de apilamiento por 10 minutos y a 200V en el gel separador por 50 minutos, hasta que el colorante trazador, azul de bromofenol, alcanza el extremo inferior del gel, (iii) la transferencia se hizo en una cámara de electroforesis horizontal (TRan- Blot Cell, Bio Rad) a 100V por espacio de dos horas y a 4°C , utilizando un buffer de transferencia constituido por 0.2 mL Tris/HCL pH 8; 20% de metanol y agua destilada y (iv) los pesos moleculares se determinaron por comparación con el marcador de bajo peso molecular conocido (Low Range, Ewigh Standard; Bio Rad), el cual incluye las siguientes proteínas: Fosforilasa b (97.4 KDa), albúmina sérica (66.2 KDa), ovo albúmina (45.0 KDa), anhidrasa carbónica (31.0 KDa), inhibidor de la tripsina (21.5 KDa) y lisozima (14.4 KDa); de esta manera se determinó el peso molecular relativo de los antígenos, para lo cual se encontró la movilidad relativa (Rf) del marcador y de los antígenos en estudio.



RESULTADOS

Del Líquido seudocelómico de 15 ejemplares hembras que fue centrifugado a 10,000 rpm por 10 minutos, se obtuvo 7.5 mL de sobrenadante, el cual tuvo una concentración de proteínas de 10,700 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Los pesos moleculares de las proteínas de *A. suum* obtenidas a las concentraciones de 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y tratadas con DTT fueron: 101.0, 94.9, 65.0, 61.1, 50.6, 45.0, 41.5, 34.6, 22.4, 16.3, 14.4, 12.7-10.5 KDa; mientras que, los pesos moleculares de las proteínas a las concentraciones de 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ que no se trataron con DTT fueron: 101.0, 94.9, 65.0, 61.1, 50.6, 45.0, 41.9, 34.6, 27.0, 25.4, 21.0, 18.5, 16.3, 14.4, 11.2 KDa. (Fig 1)

DISCUSIÓN

La utilización de *G. gallus* como modelo experimental para la producción de anticuerpos anti-antígenos de Líquido Seudocelómico de ejemplares hembras de *A. suum* representa una alternativa interesante para la obtención de anticuerpos a partir de la yema de huevo; debido a que la ventaja de este método es que una vez inmunizada la gallina se cuenta con una fuente consistente de anticuerpos frescos durante todo el ciclo de postura del animal; esto debido a que el comportamiento inmunológico de las aves es más uniforme que el de los mamíferos (conejos, cobayos, etc); porque siempre muestran niveles relativamente elevados de anticuerpos para el caso de inmunógenos peptídicos, lo cual ha sido comprobado por otros autores, por lo tanto esto representa una manera práctica y económica para la obtención de anticuerpos^{15,16}.

El volumen de antígenos depende del tamaño y cantidad del parásito, cuando se utilizan como fuente larvas para obtener productos de excreción-secreción se requiere miles de larvas, mientras que al usar las formas adultas se requiere de menor cantidad; sin embargo, la cantidad producida es escasa; frente a esto el uso de líquido seudocelómico resulta ventajoso, porque, se necesitan pocos ejemplares adultos y se obtiene una mayor cantidad de volumen³⁴. Otro aspecto a mencionar, es que los productos de excreción-secreción necesitan de un medio mínimo esencial, una incubadora, la cantidad de tiempo en el que se dispone y por último la sonificación con un sonicador para la obtención de los antígenos totales; por el contrario el líquido seudocelómico se obtiene como tal y solo se requiere centrifugar^{15,16}.

La inmunización se realizó por medio de la vía subcutánea teniendo en cuenta estudios anteriores donde se compararon la producción de anticuerpos al realizar inmunizaciones tanto en vía subcutánea como por vía intramuscular, en donde demostraron que no existen diferencias entre estas vías de inmunización^{20,21,22}.

Se utilizó el adyuvante completo de Freund en la primera inmunización, y el adyuvante incompleto de Freund en las tres restantes para potenciar la inmunogenicidad de la gallina durante la inmunización experimental^{21, 22}. De esta manera se hace más efectiva la respuesta inmune, asegurando un mayor nivel de producción de anticuerpos específicos para obtener buenas lecturas en el resultado²³.

La IgY es una inmunoglobulina presente en cantidades significativas en la yema de huevo; estas proteínas son transportadas desde el suero durante la maduración de la yema en el oviducto por un mecanismo similar a la transferencia placentaria que ocurre en los mamíferos; esto resulta en mayores concentraciones de IgY en la yema que en el suero de la gallina; las ventajas del uso de la IgY frente a la IgG, es que no producen daño en el animal para su formación y es de fácil extracción debido a que se encuentran en mayor cantidad que otras proteínas en la yema, entonces no es necesario el uso de sulfato de amonio para precipitar las proteínas³⁶. El método de deslipidación empleado es eficiente debido a que no produce daño alguno sobre las proteínas, tampoco requiere ambientes exigentes porque el volumen empleado de cloroformo es bajo^{15,16,19}.

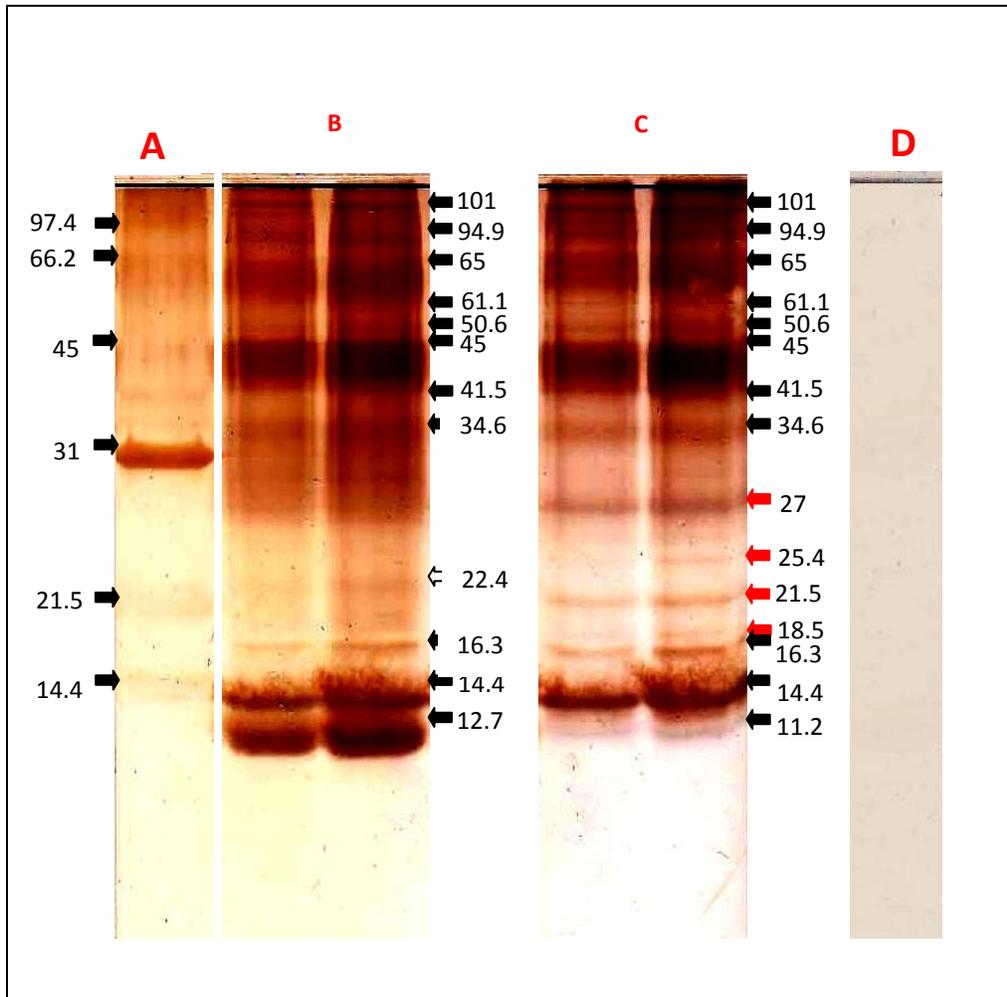


Fig 1. Pesos moleculares de bandas antigénicas del líquido seudocelómico (LS) de ejemplares hembras de *Ascaris suum* detectadas por IgY producidas en *Gallus gallus* Hisex Brown mediante la técnica de Western Blot.

A: PM (KDa)

B: suero hiper-inmune + LS tratado con Dithiothreitol (DTT)

C: suero hiper-inmune + LS sin tratar con Dithiothreitol (DTT)

D: suero pre-inmune (control)

La técnica de Western Blot tiene elevada sensibilidad (93%), porque detecta los complejos antígenos-anticuerpos mediante la técnica de Elisa; y también presenta elevada especificidad (100%) debido a que fracciona los componentes proteínicos del antígeno^{37, 38}. Debido a estas razones, esta técnica ha sido utilizada para determinar los antígenos producidos de varios helmintos como por ejemplo: *Taenia solium*¹⁸, *Toxocara canis*²⁰, *Cysticercus tenuicollis*¹⁶, *Hymenolepis nana*²¹ y *Fasciola hepatica*²³.

Se utiliza SDS (duodecil sulfato) que es una sal sódica que se une a las proteínas y les confiere carga negativa, betamercaptoetanol que reduce cualquier puente disulfuro, glicerol que aumenta la densidad y ayuda a mantener estable la muestra, y azul de bromofenol que es el marcador y tiene movilidad superior a las proteínas de la muestra, se utiliza como marcador del frente de la electroforesis, que en principio garantiza que por detrás se encuentren las proteínas e indica cuando se debe de interrumpir la electroforesis²⁴.

El líquido seudocelómico fue sometido a un tratamiento con un agente reductor, Dithiothreitol (DTT), de puentes disulfuro; esto con la finalidad de desnaturalizar las proteínas y transformar las



estructuras complejas en estructuras simples. Sin embargo al procesar las proteínas del Líquido pseudocelómico sin DTT se obtuvo bandas mejor definidas que las bandas del líquido pseudocelómico con DTT; esto significa que los antígenos del Líquido pseudocelómico del parásito son mayormente proteínas simples²³. La evidencia ausencia de algunas de las bandas antigénicas al utilizar las mismas concentraciones puede deberse a la acción desnaturizante del DTT, ya que afecta a las proteínas, exponiendo sus epitopes, para facilitar su interacción con los anticuerpos, teniendo como consecuencia la aparición de nuevas bandas, o simplemente pueden alterar los epitopes de las proteínas y por ende desaparecer la banda antigénica al ser revelada¹⁶.

De las bandas determinadas, algunas de ellas han sido detectadas o están estrechamente relacionadas con otras investigaciones. El antígeno de peso molecular 14.4 KDa es una proteína compartida con *A. lumbricoides* ya sea utilizando la forma adulta o el extracto de sus órganos reproductores como fuente de antígenos¹⁴, o bien estrechamente relacionada con el antígeno 14.9 KDa presente en las larvas pulmonares²¹. Sin embargo no es una proteína específica de *A. suum* porque se le ha detectado también en investigaciones realizadas con *Toxocara canis* (14.1 KDa)²⁰. La banda de 16.3 KDa es similar a la de 16KDa presente en el estadio larvario tres, para la cual se ha creado un recombinante AS16 reportándose como protector contra la migración de L3¹³. Las proteínas de 21.5, 50.6 KDa coinciden con otra investigación donde se ha trabajado con extractos de órganos reproductores y cutícula de *A. suum*^{14,26}, y las bandas de 18.5, 25.4 KDa coinciden con los antígenos de excreción-secreción determinados por Ramirez L¹². La banda cuyo peso es de 34.6 KDa ha sido detectada como antígeno de excreción-secreción de larvas de estado tres y también en antígenos somáticos¹³. Los antígenos de peso de 41.9 y 45 KDa están dentro del rango de los antígenos cuticulares de *A. suum* los cuales están comprendidos entre 36 a 47 KDa⁴². Sin embargo, los antígenos de peso de 22 y 27KDa son proteínas que no son específicas de *A. suum*, porque otros autores las han determinado en infecciones producidas por *Anisakis simplex*, por lo tanto su detección tiene muy poco valor en el diagnóstico porque podría dar lugar a reacciones cruzadas²⁵. Igualmente las proteínas de 61.1 y 65.0 KDa son responsables de reacción cruzada con *T. canis*, porque se encuentran dentro del rango 55-66 KDa, el cual ha sido determinado por el trabajo de Nunes y col⁴⁵; otros autores también han mencionado que estos dos helmintos tienen varias bandas antigénicas comunes como Espinoza y col²⁷.

La no presencia de bandas antigénicas al hacer la evaluación pre-inmune se debe a que los anticuerpos anti-antígenos no están presentes en ese fluido y por lo tanto cuando se enfrentan a los antígenos de líquido pseudocelómico no se produce reacción antígeno-anticuerpo⁴⁷. Las bandas encontradas que solo aparecen en otros trabajos es debido a que los sueros con los que trabajan solo contienen algunas fracciones de antígenos de parásito y cada individuo tiene una respuesta inmune diferente, las condiciones del trabajo, al marcador de peso y a otros factores inherentes¹⁶.

CONCLUSIÓN

El líquido pseudocelómico de *Ascaris suum*, sin tratar con Dithiothreitol, presenta 15 bandas antigénicas, cuyos pesos en Kilodaltons (KDa) son: 101.0, 94.9, 65.0, 61.1, 50.6, 45.0, 41.9, 34.6, 27.0, 25.4, 21.0, 18.5, 16.3, 14.4 y 11.2 detectadas mediante la técnica de Western blot.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pullan RL, Brooker SJ. The global limits and populations at risk of soil-transmitted helminth infections in 2010. *Parasites & Vectors* 2012; 5: 81
2. Walker M, Hall A, Basáñez M-G. Individual predisposition, household clustering and risk factors for human infection with *Ascaris lumbricoides*: new epidemiological insights. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012; 5(4): e1047



3. Cooper PJ. Interactions between helminth parasites and allergy. *Curr Opin Allergy Immunol*, 2011; 9(1): 29-37
4. Scott ME. *Ascaris lumbricoides*: Una revisión de su epidemiología y su relación con otras infecciones. *Ann Nestle*, 2008; 66: 7-22.
5. Machiacado RJ, Marcos RL, Canales M, Terashima A, et al. Prevalencia de parasitosis intestinal en el Perú (2000-2010). *Re peru parasitol*, 2010; 18(Supl): s13
6. Sánchez J. Etiología y epidemiología de la ascariosis porcina. *Mundo ganadero*. 2002; 145: 42-48.
7. Boes J, Medley GF, Eriksen L, Roepstorff A, Nansen P. Distribution of *Ascaris suum* in experimentally and naturally infected pigs and comparison with *Ascaris lumbricoides* infections in humans. *Parasitology* 1998; 117: 589-596.
8. Roepstorff A. Natural *Ascaris suum* infections in swine diagnosed by coprological and serological (ELISA) methods. *Parasitol Res*. 1998; 84(7): 537-543.
9. Pérez ME, Gonzales AJ. Relación de Neumonía y Parasitosis de ciclo pulmonar en niños de 1 a 12 años en el Hospital Central "Antonio María Pineda" Barquisimeto-Venezuela. *Bol Med Postgrado*. 1994; 10(3): 192-195.
10. Alparó I, Tamayo L. Síndrome de Loeffler: Presentación de un caso. *Cuad Hosp Clin*. 2005; 50(2): 69-73.
11. Inatomi Y, Murakami T, Tokunaga M, Ishiwata K, Nawa Y, Uchino M. Encephalopathy caused by visceral larva migrans due to *Ascaris suum*. *J Neurol Sci*. 1999; 164(2): 195-199.
12. Ramírez L. Antígenos de excreción/secreción de *Ascaris lumbricoides* var *sum* detectados por Western Blot usando suero de *Oryctolagus cuniculus* "conejo" inmunizado experimentalmente. [Tesis Biólogo-Microbiólogo]. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú. 2002.
13. Escalante H, Liñán R, Díaz E, Davelois K, Huamánhay O. Antígenos de larvas pulmonares de *Ascaris suum* reconocidos por anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus*. *Parasitol Latinoam*. 2005; 60(3-4): 132-137.
14. Leiva D, Colina JC, Escalante H, Jara CA. Antígenos de líquido pseudocelómico de *Ascaris suum* detectados por la técnica de Western Blot utilizando IgG producida en *Oryctolagus cuniculus* inmunizado experimentalmente. *REBIOL* 2012; 32(1): 49-57
15. Pauly D, Chacana PA, Calzado EG, Brembs B, Schade R. IgY Technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polythyleneglicol (PEG) precipitation. *J Vis Exp*. 2011; (51): 235-254.
16. Cabrera JA, Castillo EE, Colina JC, Guzmán JA, Jara CA. Antígenos de fluido vesicular de *Cysticercus tenuicollis* detectados mediante la técnica de Western blot utilizando anticuerpos IgY e IgG. *REBIOL*. 2009; 29(1).
17. Bradford M. A rapid sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-254.
18. Escalante H, Davelois K, Torres P. Antígenos específicos de *Taenia solium* detectados por Western Blot usando suero de paciente con parasitosis confirmada. *SCIENDO*. 1999; 2 (1-2): 33-39.
19. Montes RC, Murcia C, Zarco L. Producción de anticuerpos antiprogesteroa a partir de la yema de huevo de gallinas y del suero sanguíneo de conejos, para ser utilizados en radioinmunoanálisis. *Vet Mex*. 1994; 25(2): 117-125.
20. Colina J, Leiva D, Escalante H, Jara CA. Antígenos del líquido pseudocelómico de *Toxocara canis* identificados mediante la técnica de Electroinmunotransferencia utilizando anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus*. *REBIOL*. 2011; 31(2).
21. Chávez F, Vásquez O, Escalante H. Evaluación de la técnica de Western Blot para la detección de antígenos de *Hymenolepis nana*. *Rev Peru Biol*. 2007; 14(2): 283-286.
22. De la Fuente A, Rodríguez J, Fonseca E. Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western Blot). *Piel*. 2007; 22(5): 252-258.
23. Escalante H, Davelois K, Ortiz P, Rodríguez H, Díaz E, Jara CA. Estandarización de la técnica de Western blot para el diagnóstico de la fasciolosis humana utilizando antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepática*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 2011; 28(3): 454-461
24. Frontera E, Serrano FJ, Carrón A, Mora JA, Pérez JE, Reina D. Caracterización antigénica de *Ascaris suum* mediante SDS-PAGE y Western blotting. *Invest Agr: Prod Sanid Anim*. 2001; 16(1): 153-163.
25. Ortega E, Cespon C, Bootello A, Moneo I, Gonzales P. Aislamiento y caracterización de antígenos principales de *Anisakis simplex*. *Alergol Inmunol Clin*. 2000; 15: 262-266.
26. Nunes CM, Tundisi RN, Garcia JF, Heinemann MB, Ogassawara S, Richtzenhain LJ. Cross-reactions between *Toxocara canis* and *Ascaris suum* in the diagnosis of visceral larva migrans by Western blotting technique. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1997; 39(5): 253-256.
27. Espinoza Y, Huapaya P, Suarez R, Chávez V, Sevilla C, Dávila E et al. Estandarización de la técnica de ELISA para el diagnóstico de Toxocariasis humana. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2003; 64(1): 7-12.