

**IDENTIFICACION DE ANTIGENOS DE *Toxocara canis* MEDIANTE LA TECNICA
DE WESTERN BLOT EN CONEJOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE**

OLGA LUCIA MORALES REYES

**Tesis para optar al título de
Magister en Infecciones y Salud en el Trópico**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE SALUD EN EL TROPICO
DEPARTAMENTO DE SALUD PUBLICA Y MEDICINA TROPICAL
UNIDAD DE PARASITOLOGIA
SANTAFE DE BOGOTA, D. C.**

1999

**IDENTIFICACION DE ANTIGENOS DE *Toxocara canis* MEDIANTE LA TECNICA
DE WESTERN BLOT EN CONEJOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE**

OLGA LUCIA MORALES REYES

Director

**Dra. MYRIAM CONSUELO LÓPEZ PAEZ
Bacterióloga M.Sc. Microbiología**

Co- director

**Dr. RUBEN SANTIAGO NICHOLLS
MD Cirujano M.Sc. Medicina Tropical**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE SALUD EN EL TROPICO
DEPARTAMENTO DE SALUD PUBLICA Y MEDICINA TROPICAL
UNIDAD DE PARASITOLOGIA
SANTAFÉ DE BOGOTÁ, D. C.**

1999

A mis padres Raúl y
Emperatriz, por su apoyo
incondicional y su fe
en mí.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a los Doctores Carlos Alberto Agudelo y Rubén Santiago Nicholls por su invaluable orientación. Agradezco muy especialmente a la Doctora Miryam Consuelo López por toda la ayuda, los conocimientos y el apoyo que me ha brindado durante el transcurso de este proyecto y porque sin su estímulo y motivación no hubiera logrado los resultados obtenidos.

Al Dr. Eduardo Umaña, Director del Bioterio Central de la Universidad Nacional, y a todo el personal que allí labora; por su colaboración durante todo el desarrollo del trabajo.

A las Doctoras Ligia Moncada, Elvia Cáceres y Patricia Reyes del Departamento de Parasitología U.N., por su colaboración y apoyo moral.

A los doctores (as) Manuel Vargas, del Departamento de Microbiología UN, Diana Díaz del Instituto Nacional de Inmunología y Silvia Lizeth Bustamante del Instituto de Biotecnología U.N., por su importante asesoría técnica, y al Fotógrafo Delio David Ortiz por su valiosa colaboración.

A Miguel Ospino, Carlos Velandia y a mis padres: Raúl Morales y Emperatriz Reyes, por su apoyo incondicional.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. TITULO DEL PROYECTO	2
2. OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GENERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	3
3. MARCO TEORICO	4
4. METODOLOGÍA	13
4.1 OBTENCION DE PARASITOS ADULTOS DE <i>Toxocara canis</i>	13
4.2 EMBRIONACION DE LOS HUEVOS DE <i>Toxocara canis</i>	14
4.3 ADMINISTRACION DEL INOCULO	14
4.3.1 Preparación del inóculo	15
4.3.2 Administración oral del inóculo	15
4.4 PRODUCCION DE ANTIGENO LARVAL EXCRETORIO- SECRETORIO	16
4.4.1 Descortezamiento de los huevos	16
4.4.2 Cultivo de larvas II de <i>Toxocara canis</i>	16
4.5 DIALISIS DEL ANTIGENO EXCRETORIO / SECRETORIO	17
4.6 DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY	18

4.7	DETECCION DE ANTICUERPOS TIPO IgG EN CONEJOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON <i>T. canis</i> POR LA TECNICA DE ELISA	18
4.8	WESTERN BLOT	19
4.8.1	Electroforesis en gel de poliacrilamida	20
4.8.2	Electrotransferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa	21
4.8.3	Coloración de la transferencia con Rojo Ponceau's	22
4.8.4	Inmunoblot	22
5.	RESULTADOS	24
5.1	DETERMINACION DE PROTEINAS POR LOWRY	24
5.2	ESTANDARIZACION DE LA PRUEBA DE ELISA PARA CONEJOS	24
5.3	DETECCION DE ANTICUERPOS Ig G EN SUEROS DE CONEJOS POR LA TECNICA DE ELISA	31
5.4	ESTANDARIZACION DEL WESTERN BLOT PARA <i>T. Canis</i>	34
5.5	IDENTIFICACION DE PROTEINAS ESPECIFICAS DE <i>T. canis</i> POR WESTERN BLOT	38
6.	DISCUSIÓN	49
7.	CONCLUSIONES	54
8.	RECOMENDACIONES	56
	BIBLIOGRAFÍA	57
	APENDICES	64
	ANEXO	80

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Absorbancias obtenidas con antígeno de <i>Toxocara canis</i> de 0.5 ug/ml	25
Tabla 2. Absorbancias obtenidas con antígeno de <i>Toxocara canis</i> de 0.75 ug/ml	26
Tabla 3. Absorbancias obtenidas con antígeno de <i>Toxocara canis</i> de 1.0 ug/ml	26
Tabla 4. Absorbancias obtenidas con antígeno de <i>Toxocara canis</i> de 5.0 ug/ml	27
Tabla 5. Absorbancias obtenidas con antígeno de <i>Toxocara canis</i> de 10 ug/ml	27
Tabla 6. Absorbancias obtenidas con antígeno de <i>Toxocara canis</i> de 20 ug/ml	28
Tabla 7. Resultados de absorbancias de los sueros de conejos, recolectados para determinación de anticuerpos contra <i>Toxocara canis</i> , durante un período de seis meses.	32

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Ciclos vitales alternativos de <i>Toxocara canis</i> .	6
Figura 2. Concentración de antígeno de <i>Toxocara canis</i> de 0.5 ug/ml	28
Figura 3. Concentración de antígeno de <i>Toxocara canis</i> de 0.75ug/ml	29
Figura 4. Concentración óptima de antígeno de <i>Toxocara canis</i> de 1.0 ug/ml	29
Figura 5. Concentración de antígeno de <i>Toxocara canis</i> de 5.0ug/ml	30
Figura 6. Resultados de la prueba de ELISA para la determinación de anticuerpos contra <i>Toxocara canis</i> en los conejos 1 al 5.	33
Figura 7. Resultados de la prueba de ELISA para la determinación de anticuerpos contra <i>Toxocara canis</i> en los conejos 6 al 13.	33
Figura 8. Comportamiento de la respuesta inmunitaria de los conejos frente a la infección experimental por <i>Toxocara canis</i> .	34
Figura 9. Estandarización de la concentración óptima del antígeno E/S de <i>Toxocara canis</i> para la prueba de Western blot.	37
Figura 10. Estandarización de las diluciones de suero y conjugado para Western blot. (I)	37
Figura 11. Estandarización de las diluciones de suero y conjugado para Western blot. (II)	39
Figura 12. Inmunoblot para el conejo N. 1	42

Figura 13. Inmunoblot para el conejo N. 2	42
Figura 14. Inmunoblot para el conejo N. 3	43
Figura 15. Inmunoblot para el conejo N. 4	43
Figura 16. Inmunoblot para el conejo N. 5	44
Figura 17. Inmunoblot para el conejo N. 6	44
Figura 18. Inmunoblot para el conejo N. 7	45
Figura 19. Inmunoblot para el conejo N. 8	45
Figura 20. Inmunoblot para el conejo N. 9	46
Figura 21. Inmunoblot para el conejo N. 10	46
Figura 22. Inmunoblot para el conejo N. 11	47
Figura 23. Inmunoblot para el conejo N. 12	47
Figura 24. Inmunoblot para el conejo N. 13	48

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Huevos de <i>Toxocara canis</i>	80

LISTA DE APENDICES

	pág.
APENDICE A. Reactivos para la obtención de huevos y larvas II de <i>Toxocara canis</i> .	70
APENDICE B. Reactivos para la diálisis del antígeno y determinación de Proteínas por el método de Lowry.	73
APENDICE C. Reactivos para la prueba de ELISA	76
APENDICE D. Reactivos para Western blot	78

RESUMEN

Se ensaya un sistema de inmunobloting para el diagnóstico de toxocariosis en conejos previamente infectados con *Toxocara canis*. Para esto se utilizó un antígeno excretorio/ secretorio (E/S) obtenido a partir un cultivo de de larvas II de *Toxocara canis*. Para medir los títulos de anticuerpos IgG presentes en los sueros de los conejos, se estandariza un inmunoensayo enzimático (ELISA), el cual emplea el mismo antígeno.

El Western Blot indica la presencia de cuatro bandas específicas al inicio de la infección (200kDa, 116kDa, 92kDa y 35kDa), y siete bandas características luego del primer mes de infección (92kDa, 80kDa, 66kDa, 45kDa, 35kDa, 31kDa y 28kDa). Se identificaron dos bandas que permanecen constantes durante todo el tiempo de estudio, la proteína de 92kDa y la de 35kDa.

INTRODUCCION

En Colombia, muchas enfermedades parasitarias son un problema de salud pública, la toxocariosis es una de ellas. Su agente causal es un ascarídeo que frecuentemente se presenta en los perros denominado *Toxocara canis*. La toxocariosis es una enfermedad cuyas manifestaciones clínicas son inespecíficas, caracterizada por la migración de larvas en los órganos internos del hombre y algunos animales. En ausencia de evidencia parasitológica de infección se requiere de métodos inmunológicos para su diagnóstico.

En la actualidad se emplea una técnica de ELISA para detectar anticuerpos IgG contra el parásito. Esta prueba utiliza un antígeno excretorio / secretorio y proporciona una alta sensibilidad; en este antígeno, se pueden identificar los determinantes antigénicos de *Toxocara canis* y para esto se hace necesaria la adaptación de una prueba que caracterice las proteínas implicadas en el desarrollo de la respuesta inmune.

Este trabajo incluye la detección de anticuerpos mediante la prueba de ELISA y la caracterización e identificación de los componentes antigénicos de *Toxocara canis* presentes en el antígeno excretorio / secretorio, utilizando la técnica de Western Blot.

1. TITULO DEL PROYECTO

IDENTIFICACION DE ANTIGENOS DE *Toxocara canis* MEDIANTE LA TECNICA DE WESTERN BLOT EN CONEJOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar los antígenos de *T. canis* reconocidos por sueros de conejos infectados experimentalmente, mediante la técnica de Western Blot.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1. Infectar conejos experimentalmente con huevos embrionados de *T. canis* obtenidos de formas adultas presentes en cachorros parasitados.

2.2.2. Extraer los antígenos secretor y excretor para su empleo en las técnicas de ELISA y Western Blot.

2.2.3. Detectar anticuerpos contra *Toxocara canis* en sueros de conejos, en diferentes períodos de tiempo durante la infección.

2.2.4. Verificar el reconocimiento de los antígenos de *T. canis* por los sueros de los conejos infectados experimentalmente con la técnica de Western Blot.

3. MARCO TEORICO

La Toxocariosis es una enfermedad zoonótica ampliamente distribuida y poco estudiada, causada por la infestación de larvas de *Toxocara canis* (*T. canis*), un helminto común en los perros (1). Los ascáridos de la familia Ascaridae, son nemátodos cuyo cuerpo es relativamente largo y que en sus etapas adultas evolucionan en el intestino delgado del huésped final. Existen tres especies que infectan perros y gatos: *T. canis* a perros y otros cánidos; *Toxocara cati* (*T. cati*) a gatos y otros felinos y *Toxascaris leonina* a perros, gatos y otras especies relacionadas.

Los adultos de *T. canis* tienen un promedio aproximado de vida de cuatro meses, el perro expulsa a la mayoría a los seis meses de contraída la infección. Una hembra puede producir hasta 200.000 huevos al día, por lo que solo un huésped común con una carga de varios cientos de gusanos puede contaminar el ambiente diariamente con millones de huevos. El promedio de vida adulta de *T. cati* es similar al de *T. canis* pero con una producción de huevos menor. Los huevos se expulsan con las heces y no son infectantes inmediatamente. La duración del desarrollo larval dentro del huevo hasta su etapa infectante, varía de acuerdo con la temperatura y la humedad relativa en el ambiente a temperaturas de 15 a 35 °C; la mayoría de los huevos de *Toxocara* se tornan infectantes en un período de dos a cinco semanas (2). Los perros y otros cánidos pueden infectarse con *T. canis* de las siguientes formas: a) por ingestión de huevos infectantes; b) ingestión de tejidos de huéspedes paraténicos que contienen

larvas; c) migración transplacentaria de larvas de la hembra preñada a sus fetos; d) pasaje transmamario de larvas contenidas en la leche de la hembra lactante; y e) ingestión de larvas de tercera etapa o de adultos inmaduros contenidos en el vómito o en las heces de los cachorros infectados. Cuando los perros ingieren huevos infectantes de *T. canis*, estos se eclosionan en el estómago y en el intestino delgado; las larvas invaden la mucosa intestinal y entran en la linfa y en los vasos sanguíneos, y la mayoría de ellas llega al hígado en un período de 24 a 48 horas. Estas larvas pasan luego al corazón y a los pulmones a través de los canales vasculares. Las larvas alojadas en los pulmones llegan a su período de desarrollo máximo entre tres y cinco días después de contraída la infección. Algunas larvas pasan a través de los bronquiolos a la tráquea y faringe en donde se degluten. Las larvas que sufren una migración traqueal sufren dos mudas adicionales y completan su desarrollo a gusanos adultos en el intestino delgado. Los huevos aparecen en las heces de cuatro a cinco semanas después de contraída la infección. Otras larvas que llegan a los pulmones no pasan a la tráquea sino que entran en la vena pulmonar y se distribuyen por el sistema circulatorio a todo el cuerpo (Véase Figura 1)

Los huevos de *T. canis* se eclosionan cuando son ingeridos por una variedad de especies no caninas. Las larvas invasoras no llegan al tracto digestivo y tampoco continúan su evolución pero pueden sobrevivir por años alojadas en los tejidos del huésped. A este fenómeno se le denomina paraténesis. Puede actuar como huésped paraténico de larvas de *T. canis* cualquiera de una amplia gama de animales incluyendo los roedores comunes de laboratorio, mono, ovinos, porcinos la lombriz de tierra, el hombre y el perro adulto(1,2).

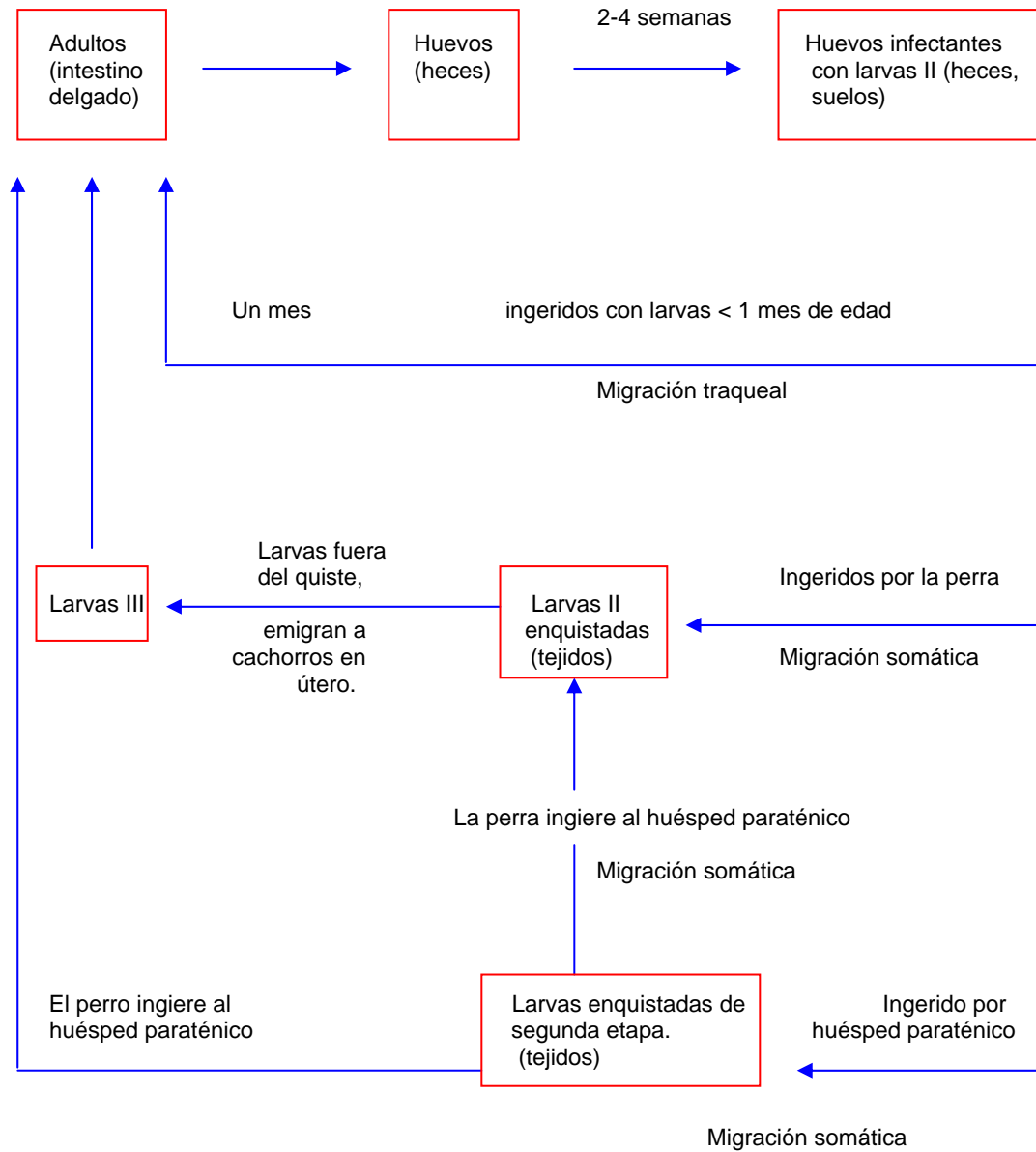


Figura 1. Ciclos vitales alternativos de *Toxocara canis*.

T. canis y *T. cati*, pueden infectar al hombre, pero por lo general las infecciones son causadas por *T. canis* por las siguientes razones: 1) La mayoría de las larvas encontradas en casos humanos se han identificado como *T. canis*; 2) Los huevos de *T. canis* se recuperan con mayor frecuencia en las muestras de tierra que los huevos de *T. cati*; 3) Los estudios epidemiológicos indican la exposición a perros pero no a gatos como importante factor de riesgo (2).

La toxocariosis humana se adquiere por la ingesta de huevos infectados del género *Toxocara*. La eclosión se lleva a cabo en el intestino delgado y las larvas (350-450 micras X 16-20 micras) penetran en la mucosa, migran al hígado por la vena porta, siguen los canales vasculares hacia los pulmones y luego entran hacia la circulación sistémica y a los tejidos somáticos. Las larvas migran por todo el cuerpo y pueden encontrarse en cualquier tejido u órgano, incluidos el hígado, los pulmones, el corazón y el cerebro. Las manifestaciones clínicas y patológicas son el resultado de los daños mecánicos ocasionados por las larvas migratorias y, con frecuencia, de una respuesta inmunológica grave que ha sido estimulada por la presencia de las larvas en el organismo. Los tejidos afectados muestran múltiples abscesos y granulomas eosinofílicos de tipo alérgico (3).

Las infecciones producidas por un número relativamente reducido de larvas, por lo general son asintomáticas. Existen dos expresiones clásicas causadas por la infección, el síndrome de larva migrans visceral y el síndrome de larva migrans ocular (4). El síndrome típico de larva migrans visceral (LMV) se diagnostica en niños de uno a cuatro años de edad con una historia de pica, por lo general geofagia (5). La mayoría de niños con LMV tienen elevados los títulos de isohemaglutininas Anti-A y Anti-B

porque las larvas de *T. canis* contienen antígenos de superficie que estimulan la producción de éstas (6). Los casos descritos han sido caracterizados por fiebre, leucocitosis, eosinofilia persistente, hipergamaglobulinemia y hepatomagalia. Es común que se afecte el pulmón que presenta síntomas de bronquiolitis aguda, asma o neumonitis (7).

Los raros casos fatales de toxocariosis usualmente resultan de extensiva afectación del miocardio o sistema nervioso central o de una exagerada respuesta inmune (8-10). La presencia de larvas y granulomas eosinofílicos en el SNC en biopsia o autopsia sugiere que los signos neurológicos resultan de la destrucción del tejido o de una reacción de secreción de antígenos (9,11,12). El líquido cefalorraquídeo (LCR) contiene un elevado número de eosinófilos.

El síndrome de larva migrans ocular (LMO) fue reconocido por Wilder (13), quien en 1950 observó larvas o desechos de *T. canis* en 24 de 46 pseudogliomas en ojos, que habían sido extraídos por endoftalmitis y presunto retinoblastoma. En 1951 Duguid (14) describe 28 casos de lesiones retinales granulomatosas centrales que parecen ser retinoblastoma pero donde fueron encontradas larvas de *T. canis*.

Las diferencias en el patrón de LMV y LMO son evidentes. La infección por *T. canis* raramente resulta en enfermedad ocular y sistémica al mismo tiempo; estas diferencias clínicas y epidemiológicas entre LMV y LMO pueden estar relacionadas con la dosis ingerida del organismo. Algunas personas con LMO son de edad avanzada y no tienen una historia de geofagia o exposición a cachorros, con este hecho puede afirmarse que la carga larval es relativamente pequeña en contraste con pacientes que ingieren tierra

y que presentan LMV, quienes pueden albergar en su hígado hasta 300 larvas por gramo de tejido (15). En perros infectados experimentalmente sin evidencia de previa exposición a ascáridos, la aparición de anticuerpos contra *T. canis* está relacionada con la dosis (16). Este estudio sugiere que bajas dosis de larvas de *T. canis* están asociadas con una mayor probabilidad de LMO que LMV. A medida que el número de larvas ingeridas incrementa, la probabilidad de LMO decrece y el riesgo de LMV aumenta.

En la toxocariosis las cifras precisas de incidencia aún no están disponibles, debido a que esta enfermedad no es de notificación obligatoria (2). Se han realizado estudios de prevalencia sobre la contaminación con huevos de *T. canis* en parques públicos y jardines en diferentes países, encontrándose un porcentaje del 2% a 87% (16-19). En estudios realizados en Inglaterra, se encontró alrededor de un 50% de pacientes con toxocariosis clínica que tenían contacto escaso con perros y gatos y sospecha el autor que la mayoría de estos casos se encontraban expuestos a huevos de *T. canis* a través de la tierra de los parques y otros lugares públicos (2).

En países de Centro América y Sur América como Brasil, Chile y Venezuela hay informes diagnósticos presuntivos de larva migrans visceral (2). En Colombia se han realizado estudios puntuales de toxocariosis; el primer caso fue descrito por Correa P. y col. (20), y la larva migratoria visceral de *T. canis* fue confirmada parasitológicamente en un paciente por Escobar-Melquizo y col. (21).

En un estudio de prevalencia realizado en un barrio de Bogotá (Colombia) se encontró una prevalencia de 47.50% de anticuerpos *T. canis* en una población de 207 sujetos y

un 43.6% de huevos del parásito fueron hallados a partir de muestras de materia fecal de cachorros (22).

Los signos clínicos y resultados de laboratorio asociados con LMV y LMO son inespecíficos y pueden reflejar una variedad de causas de infección. Como las larvas de *T. canis* no completan su ciclo vital en humanos nunca se pueden encontrar huevos en las heces y, por tanto, no se puede hacer un diagnóstico por medio de exámenes coproparasitológicos; además, a pesar que otros tejidos pueden contener numerosas larvas, la biopsia puede no tener éxito o estar contraindicada. Por consiguiente, en la práctica, el diagnóstico depende de los resultados clínicos y de la detección de anticuerpos específicos de *T. canis* en el suelo o en el líquido ocular (2).

El diagnóstico presuntivo puede basarse en signos clínicos, resultados de laboratorio, historia de geofagia y exposición a perros, especialmente cachorros. También se encuentra leucocitosis con predominio de eosinófilos. Los niveles totales de globulina tienden a ser elevados y los de albúmina más bajos; este hecho ocasiona que las proporciones de albúmina/globulina sean significativamente bajas (6).

Para el inmunodiagnóstico se han empleado múltiples pruebas que incluyen fijación de complemento (FC), floculación de bentonita (FB), precipitación larval, inmunodifusión (ID), precipitación en tubo capilar, hemoaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia (IFI) y radioinmunoensayo (RIA). Estas pruebas no proporcionan información confiable sobre la incidencia de la enfermedad aparente e inaparente y además varían en sensibilidad y especificidad por diferencias en el estado del antígeno

parasitario empleado (adulto o larva), la definición del título diagnóstico y las modificaciones en las técnicas del laboratorio (1).

La adaptación por Voller et.al. (23) de un procedimiento inmunoenzimático altamente sensible para el diagnóstico serológico de una variedad de enfermedades infecciosas, conduce al desarrollo de una técnica útil para confirmar la toxocariosis.

La prueba de ELISA fue adaptada para el diagnóstico de toxocariosis empleando un antígeno secretor/excretor (antígeno ES) de larvas de *T. canis* de segundo estado (24), obtenidas a partir de un cultivo *in vitro* en un medio químicamente definido de bajo peso molecular (25).

Recientemente se emplea en algunos países la técnica de Western Blot para el inmunodiagnóstico de la toxocariosis humana (26, 27). Esta técnica supera las pruebas utilizadas convencionalmente en cuanto a sensibilidad y especificidad y además permite la realización de estudios seroepidemiológicos en las diferentes regiones donde esta parasitosis es un problema de salud pública (28).

En la actualidad se están desarrollando investigaciones encaminadas hacia la búsqueda de los genes que codifican para las glicoproteínas de superficie de *T. canis* que inducen inmunidad en el huésped, y la caracterización y evaluación de dichas proteínas a nivel molecular por técnicas de PCR (29, 30).

En Colombia, no se han realizado estudios donde se identifiquen los determinantes antigénicos de *T. canis*, responsables de la respuesta inmune en el huésped. Por tal razón, esta investigación pretende identificar a nivel experimental los determinantes

específicos del parásito e instaurar las bases para la realización de nuevos estudios con el fin de mejorar la calidad del diagnóstico de la toxocariosis en humanos.

4. METODOLOGIA

Para el desarrollo del trabajo se realizaron los siguientes procedimientos de laboratorio:

4.1. OBTENCION DE PARÁSITOS ADULTOS DE *Toxocara canis*

Se adquirieron 27 perros de uno a tres meses de edad aproximadamente; estos fueron desplazados al área de cuarentena del Bioterio Central de la Universidad Nacional. Se sacrificaron con 5 ml intracardíacos de la solución para eutanasia, de sulfato de magnesio y potasio (Véase apéndice A).

A cada cachorro se le practicó una incisión en la pared abdominal y le fue extraído el intestino delgado; éste fue demarcado con seda de cirugía. El intestino se cortó cuidadosamente con tijeras y se extrajeron los parásitos adultos con ayuda de pinzas. Los gusanos se depositaron en solución salina 0.85% en un vaso de precipitados.

Luego de obtener la totalidad de los parásitos, estos se lavaron con agua corriente varias veces para dejarlos libres de desechos. Se suspendieron de nuevo en solución salina y se seleccionaron las hembras con ayuda de un estereoscopio, los machos son cortos (2-6 cm) y tienen una espícula; las hembras son más grandes (5-10 cm) y no presentan espícula.

4.2. EMBRIONACION DE LOS HUEVOS DE *T. canis*

Después de separar las hembras se desechan los machos y se procede a extraer los úteros grávidos. Cada hembra se sujeta con una pinza, se le cortan los extremos y con ayuda de otra pinza se hace presión a lo largo de todo el cuerpo hasta que salga su contenido completamente. Los úteros son depositados en una solución de pepsina ácida al 1%. El material obtenido se deja en agitación a 37°C por dos horas. Pasado este tiempo, se realizan tres lavados con agua destilada, centrifugando a 1500 r.p.m por 10 minutos cada uno.

Se prepara una solución de formalina 1% y se distribuye en fioles de 125 ml, agregando a cada una de estas 50 ml de la solución y aproximadamente 1ml del sedimento obtenido, las fioles se cubren con un material poroso para conservar la adecuada oxigenación y se dejan en una temperatura de 28°C por un período de 28 días, en presencia de luz y ligera agitación (cada 24 horas). La embrionación debe controlarse microscópicamente desde el día N° 20. Cuando se logra el 80% de embrionación, los huevos están listos para ser administrados a los conejos y además para continuar con la obtención de larvas II.

4.3. ADMINISTRACION DEL INOCULO

Pasados 28 días, un 95% de los huevos se encontraron embrionados en un 80% y estaban listos para su administración a los conejos. El indicador de embrionación es la larva móvil.

Los conejos utilizados para el estudio eran machos de raza Nueva Zelanda, de dos meses de edad; éstos fueron mantenidos en el Bioterio Central de la Universidad Nacional por un período de siete meses.

4.4. PRODUCCION DE ANTIGENO LARVAL EXCRETORIO - SECRETORIO

Las larvas para la producción del antígeno excretorio - secretorio fueron obtenidas a partir de huevos infectantes como lo describen Oaks y Kayes (33), y aisladas para cultivo siguiendo el método de Savigny (24).

4.4.1. Descortezamiento de los huevos. Los huevos que inicialmente se lavan con solución salina 0.85% , son nuevamente lavados con agua destilada otras tres veces a 1500 r.p.m. por 3 minutos. Luego se depositan en solución decorticadora en ligera agitación a 37°C por dos horas, revisando el proceso cada media hora en el microscopio. Esta solución decorticadora contiene hipoclorito de sodio al 2% para eliminar la cubierta protéica externa. Pasado este tiempo, se elimina la solución anterior y se lava la suspensión con agua destilada tres veces por cinco minutos a 4000 r.p.m. en centrífuga refrigerada. El último lavado se realiza con solución equilibrada de Hanks y se recolecta todo el sedimento en un tubo.

4.4.2. Cultivo de larvas II de *Toxocara canis*. El número de larvas por tubo se halló como lo describe Badley (34). El Medio de cultivo empleado fue Dulbeco's Modified Eagle's Medium SIGMA (DEM) con bicarbonato y antibióticos (penicilina y

estreptomycin) y el número de larvas fue de 10^4 / 10 ml de medio pH 7.2. Se obtuvieron 17 tubos con sus respectivos controles.

Los tubos se incubaron a 37° C en atmósfera de CO₂ al 10% con agitación cada tercer día. Semanalmente se realizaba el cambio de medio, retirando el sobrenadante (8 ml) y añadiendo la misma cantidad de medio fresco; adicionalmente se observaba en el microscopio de luz la viabilidad de las larvas y cada mes en microscopio invertido para apreciar con mayor exactitud el porcentaje de supervivencia de dichas larvas. El sobrenadante recolectado se almacenó a -20°C. Este procedimiento se practicó por un período de seis meses, hasta observar una mortalidad larvaria mayor al 50%, es decir, las larvas II de *T. canis* permanecieron viables por todo este tiempo, produciendo un antígeno de óptima calidad. Finalmente se obtuvieron 23 lotes de antígeno excretorio / secretorio.

4.5. DIALISIS DEL ANTIGENO EXCRETORIO - SECRETORIO (E/S)

Se le practicó la diálisis a un lote de antígeno como lo indica Scopes (35). Previamente se prepara la membrana de diálisis; se sumerge en agua destilada estéril a 56°C por tres segundos, se añade agua fría y se enjuaga con PBS. Se llena la membrana con el antígeno E/S y se cierra por ambos extremos, se introduce en la cantidad correspondiente de PBS estéril y se somete a agitación continua por 24 horas a 4°C. Se realizan recambios del PBS, tres o cuatro veces en el período de 24 horas. Pasado este tiempo se retira la membrana y se concentra lo que queda con Ficoll de peso molecular (PM) 400000, a 4°C. El dializado obtenido se extrae con una jeringa estéril,

se alicuota en volúmenes de 0.5 ml y se almacena a -20°C para la posterior determinación de proteínas con el método de Lowry.

4.6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL METODO DE LOWRY

La cuantificación de proteínas del antígeno E/S se realizó por el método de Lowry (31), el cual emplea el reactivo de Folin a una concentración de 0.15 a 0.18 M. El rango de sensibilidad de este método es de 50 - 500ug/ml. Las muestras analizadas fueron: antígeno sin dializar y antígeno dializado.

4.7. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG EN CONEJOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Toxocara canis* POR LA TECNICA DE ELISA

La detección de los anticuerpos se realizó siguiendo los lineamientos de Voller y Col. (23), y De Savigny y Col (25); y se adaptó en el laboratorio de Parasitología de la Universidad Nacional.

Procedimiento.

Adsorción pasiva del antígeno a la superficie plástica. Se adiciona 100ul de antígeno E/S sin dializar (crudo) diluido en buffer carbonato - bicarbonato, a cada pozo de la placa "Inmunolon I" en diferentes concentraciones (0.5, 0.75, 1.0, 5.0, 10 y 20 ul/ml). Esto se realiza por triplicado. Cada placa se incuba en cámara húmeda durante tres horas a temperatura ambiente. Finalizada esta incubación se lavan los pozos tres veces por cinco minutos con solución reguladora de fosfatos más Tween 20 al 0.05% (PBS - Tween).

Adición de las muestras. Se añade 100ul del suero diluido en solución PBS - tween 20 al 0.05% (1:400, 1:800, 1:1600 y 1: 3200) al pozo correspondiente y se incuban en cámara húmeda dos horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se realizan tres lavados con PBS-Tween durante 5 minutos cada uno, para eliminar los compuestos que no reaccionaron.

Adición del conjugado. Se agregan 100ul de conjugado (Anti- IgG de conejo unida a fosfatasa alcalina) diluido en PBS- Tween 20 al 0.05% (1:5000, 1:1000, 1:25000 y 1:50000) y se incuba por 18 horas a 4°C en cámara húmeda. Luego se lavan los pozos tres veces por 5 minutos cada una con PBS-Tween 20 al 0.05%.

Adición del sustrato. Para evidenciar la reacción se agregan 100ul de paranitrofenilfosfato en solución reguladora de pH 9.8 a cada pozo, en una concentración de 1mg/ml y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. La intensidad en el color es proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra. Se detiene la reacción con 25 ul de NaOH 3N por cada pozo.

Lectura. Finalmente se determina la absorbancia de las muestras a 405 nm en espectrofotómetro.

4.8. WESTERN BLOT

Se siguió la metodología de Magnaval y Col. (27), y se adaptó al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional.

4.8.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida. SDS- PAGE.

Preparación del gel de separación. Se ensambla el sandwich (separadores, vidrios, clamps) y se coloca sobre el stand a nivel asegurándolo con los sujetadores. Se preparan aproximadamente 10ml del gel al 12% sin aplicar persulfato ni temed, según la tabla de preparación (Véase apéndice D). Si es necesario, se retira 1ml para preparar gel sellador. Cuando polimerice el gel de sellado, se completa la preparación del gel de separación aplicando el persulfato y el temed, se vierte en el sandwich e inmediatamente se agrega etanol o agua saturada con butanol para que se forme una interfase líquido-gel. Se deja polimerizando aproximadamente por 30 minutos. El gel se prepara en una concentración del 10% para que las proteínas se separen adecuadamente (27).

Preparación del gel de stacking. En este gel se va a depositar la muestra, la cual tiene un tratamiento previo a su uso (Véase apéndice D). Se vierte sobre el gel de separación y se introduce el diente teniendo cuidado de no atrapar burbujas de aire que inhiben la polimerización y causan distorsión local en el gel del piso de las celdas. Se deja en reposo aproximadamente por 30 minutos.

Preparación de la muestra. Se combinan partes iguales de la muestra con buffer Laemmli 2X (si es 4X se aplican 3/4 partes de la muestra por 1/4 parte de buffer) y se mezcla en un tubo. Este tubo se somete a ebullición por 5 minutos; la muestra tratada se puede guardar en congelación para corridas posteriores.

En el tanque se coloca el sandwich y se llena con buffer de corrido. Las muestras se aplican con una micropipeta en los respectivos carriles.

Corrido del gel. Se colocan los electrodos en su respectivo sitio, asegurándose que el cátodo quede en la parte superior. La fuente de poder se adapta para corriente constante. Se corre a 30 mA/1.5 mm del grosor del gel. El voltaje debe iniciar cerca de 70 -80 voltios (V). El corrido se efectúa inicialmente a 75V , mientras pasa el gel de stacking, luego cuando entre al gel de separación se incrementa el voltaje a 125V. Cuando el corrido alcance el final del gel de separación se apaga la fuente de poder y se desconectan los cables. El gel está listo para coloración, transferencia, etc.

4.8.2. Electrotransferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa. El papel de nitrocelulosa debe manipularse con mucho cuidado para evitar que se ensucie. El procedimiento se inicia inmediatamente después que termine la electroferesis para disminuir la difusión de bandas. La cámara de electrotransferencia se llena con cantidad suficiente de buffer de transferencia, el gel se desmonta sobre una de las hojas de papel Whatman o filtro previamente humedecido con el buffer y se coloca sobre una de las rejillas con espuma. El papel de nitrocelulosa se coloca sobre el gel y encima de éste, la otra hoja de papel Whatman, luego con un tubo de ensayo limpio, se hace presión sobre el papel para retirar todas las burbujas que quedaron atrapadas. Finalmente se coloca encima la otra espuma y la otra rejilla y se asegura el montaje, el montaje se coloca en la cámara de electrotransferencia dejando hacia el ánodo (+) el papel de nitrocelulosa.

4.8.3. Coloración de la transferencia con rojo de Ponceau. Luego de la electrotransferencia, la membrana de nitrocelulosa se coloca en suficiente rojo de Ponceau para observar la eficiencia de transferencia. Se agita por 5 minutos y luego se devuelve el colorante al envase. Se decolora con agua destilada o con solución para lavados y se visualizan las bandas. Ahora la membrana está lista para el bloqueo. Si no se procede al inmunoblot inmediatamente, la membrana puede guardarse en el congelador protegida con papel filtro y papel aluminio. El gel puede colorearse con azul de Coomassie para verificar si la transferencia fue completa.

4.8.4. Inmunoblot. Una vez decolorada la transferencia, se cortan las partes a utilizar en tiras de aproximadamente 0.5cm de ancho. Se marcan con lápiz en alguno de los extremos y se depositan en la bandeja con pozos o en tubos de ensayo.

Bloqueo de la actividad endógena del antígeno. Las tiras son colocadas en solución bloqueadora de actividad endógena de fosfatasa por una hora, se lava con PBS-Tween 20 al 0.05% o solución de lavados tres veces, por cinco minutos cada una.

Bloqueo de sitios inespecíficos de unión. Se colocan las tiras en solución bloqueadora de sitios inespecíficos de unión (SBSIU) y se dejan a 4°C durante toda la noche, o una hora a temperatura ambiente. Esto permite que se peguen las proteínas de la leche a los espacios que no reaccionaron.

Incubación con sueros. Las muestras (suero) se agregan a la solución bloqueadora de sitios inespecíficos de unión (SBSIU) en diferentes diluciones; la dilución del suero depende de la concentración de anticuerpos del mismo y de la concentración de

proteínas en la transferencia por lo que se debe probar inicialmente con diferentes diluciones (1:50, 1:100, 1:150 y 1:200). Se incuba a temperatura ambiente por una hora y luego se realizan cinco lavados con PBS-Tween 20 al 0.05%, por 5 minutos cada uno.

Incubación con conjugado. El conjugado (Anti IgG de conejo unido a fosfatasa alcalina) se diluye en la SBSIU (1:5000, 1:10000, 1:25000 y 1:50000). Se incuba una hora a temperatura ambiente y luego se realizan 5 lavados de cinco minutos cada uno.

Revelado. El último lavado se realiza con solución TRIS Mg Cl₂ por 10 minutos a 37°C idealmente, para activar la enzima. Posteriormente se adiciona la solución reveladora 1.5 ml y se deja en incubación a temperatura ambiente por 15 minutos. La reacción se detiene lavando con agua destilada hasta eliminar por completo el sustrato.

5. RESULTADOS

5.1. DETERMINACION DE PROTEINAS POR LOWRY

Se analizaron muestras de antígeno excretorio - secretorio de *T. canis* dializadas y sin dializar (antígeno crudo). En las muestras no dializadas la concentración proteica fue cercana a 0, por tanto este antígeno fue descartado. El antígeno crudo presentó una concentración de proteínas de 1.0 mg / ml.

5.2. ESTANDARIZACION DEL ELISA PARA CONEJOS

Condiciones del experimento.

Antígeno: 1.0 mg/ml. Lote 16

Concentración óptima del antígeno

El antígeno fue ensayado en diferentes concentraciones: 0.5, 0.75, 1.0, 5.0, 10 y 20ug/ml. La concentración óptima fue de 1.0ug/ml.

Dilución óptima de los sueros de conejos infectados con *T. canis*

Los siguientes fueron los sueros de conejo empleados en diluciones de: 1:400, 1:800, 1:1600 y 1:3200.

Control positivo: 1-9

Control negativo: 13-8

La dilución óptima fue finalmente de 1:800.

Conjugado

El conjugado Anti IgG-Rabbit AP Lote 057H8810 se ensayó en las siguientes diluciones: 1:5000, 1:10000, 1:25000, 1:50000. La dilución óptima fue 1:1000.

Lectura

Las lecturas de las absorbancias se realizó en espectrofotómetro a 405 nm.

En los siguientes cuadros y curvas se puede apreciar cómo se estableció la concentración óptima del antígeno de *T. canis*, y las diluciones óptimas de las muestras y del conjugado (Véase Tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y Figuras 2, 3, 4,5)

Tabla 1. Concentración de antígeno de *T. canis* de 0.5 ug/ml

Dilución del conjugado	Diluciones de los sueros controles positivo y negativo							
	400 (+)	800 (+)	1600 (+)	3200 (+)	400 (-)	800 (-)	1600 (-)	3200 (-)
5000	1,647	1,501	1,17	1,011	0,116	0,055	0,004	0,001
10000	1,206	1,115	0,931	0,789	0,057	0,007	0,001	0,007
25000	0,794	0,754	0,597	0,584	0,012	0,001	0,018	0,002
50000	0,501	0,463	0,383	0,383	0,037	0,052	0,012	0,023

Tabla 2. Concentración de antígeno de *T. canis* de 0.75 ug/ml

Dilución del conjugado	Diluciones de los sueros controles positivo y negativo							
	400 (+)	800 (+)	1600 (+)	3200 (+)	400 (-)	800 (-)	1600 (-)	3200 (-)
5000	1,395	1,167	0,944	0,661	0,02	0,002	0,01	0,004
10000	1,045	0,873	0,705	0,445	0,019	0,004	0,043	0,036
25000	0,682	0,645	0,447	0,334	0,001	0,001	0,031	0,025
50000	0,868	0,813	0,802	0,582	0,027	0,006	0,025	0,023

Tabla 3. Concentración óptima de antígeno de *T. canis* 1.0 ug/ml

Dilución del conjugado	Diluciones de los sueros controles positivo y negativo							
	400 (+)	800 (+)	1600 (+)	3200 (+)	400 (-)	800 (-)	1600 (-)	3200 (-)
5000	1,766	1,362	1,2	1,014	0,081	0,01	0,083	0,068
10000	1,421	1,231	0,996	0,794	0,076	0,076	0,073	0,079
25000	0,948	0,862	0,627	0,503	0,063	0,028	0,038	0,07
50000	0,737	0,58	0,492	0,419	0,098	0,092	0,035	0,065

En esta tabla se pueden apreciar las diluciones óptimas de suero (1:800) y conjugado (1:10000) con la concentración del antígeno de 1.0 ug/ml.

Tabla 4. Concentración de antígeno de *T. canis* de 5 ug/ml

Dilución del conjugado	Diluciones de los sueros controles positivo y negativo							
	400 (+)	800 (+)	1600 (+)	3200 (+)	400 (-)	800 (-)	1600 (-)	3200 (-)
5000	2	2	2	2	0,036	0,025	0,006	0,071
10000	2	2	2	2	0,005	0,065	0,001	0,008
25000	1,979	1,787	1,526	1,274	0,012	0,043	0,001	0,032
50000	1,114	0,992	0,926	0,789	0,003	0,001	0,001	0,029

Tabla 5. Concentración de antígeno de *T. canis* de 10 ug/ml

Dilución del conjugado	Diluciones de los sueros controles positivo y negativo							
	400 (+)	800 (+)	1600 (+)	3200 (+)	400 (-)	800 (-)	1600 (-)	3200 (-)
5000	2	2	2	2	0,03	0,007	0,012	0,018
10000	2	2	2	2	0,027	0,004	0,027	0,001
25000	2	2	1,766	1,429	0,005	0,046	0,001	0,001
50000	1,396	1,361	1,25	1,319	0,003	0,027	0,017	

Tabla 6. Concentración de antígeno de *T. canis* de 20 ug/ml

Dilución del conjugado	Diluciones de los sueros controles positivo y negativo							
	400 (+)	800 (+)	1600 (+)	3200 (+)	400 (-)	800 (-)	1600 (-)	3200 (-)
5000	2	2	2	2	0,125	0,038	0,015	0,034
10000	2	2	2	2	0,068	0,023	0,021	0,025
25000	2	2	2	1,893	0,004	0,025	0,026	0,015
50000	1,357	1,363	1,25	1,228	0,003	0,045	0,002	0,029

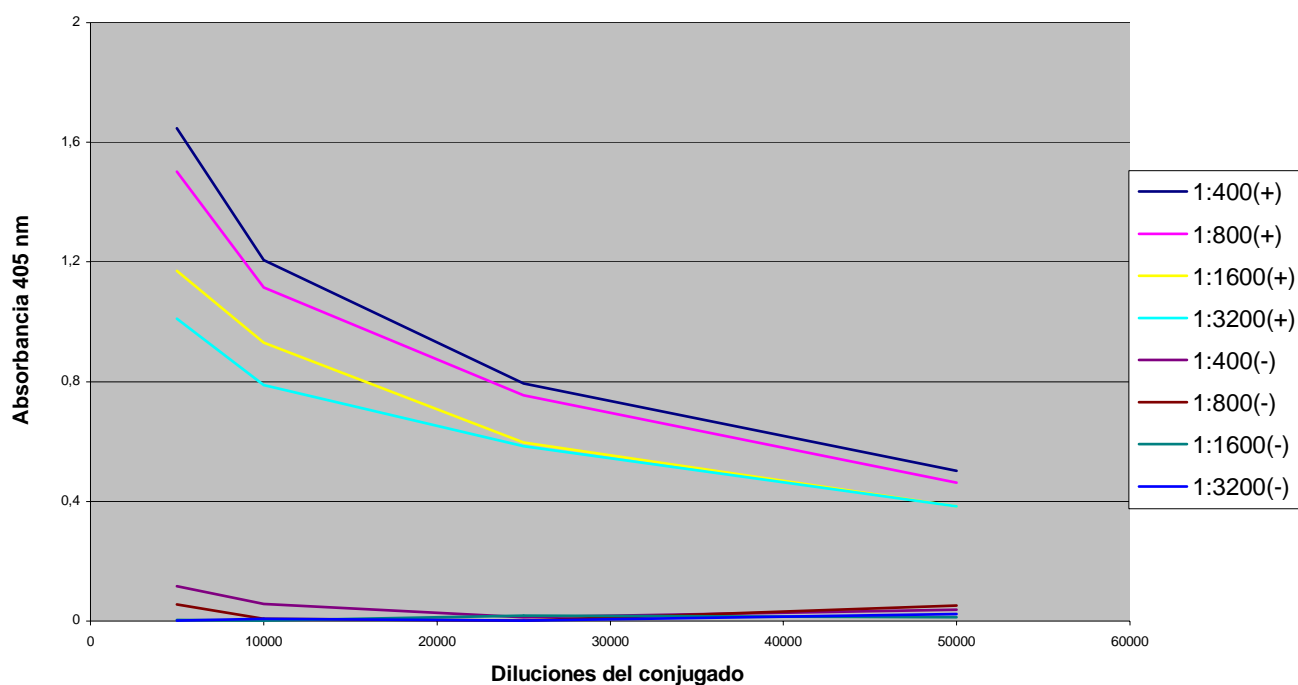
Figura 2. Concentración de antígeno de *T. canis* de 0.5ug/ml

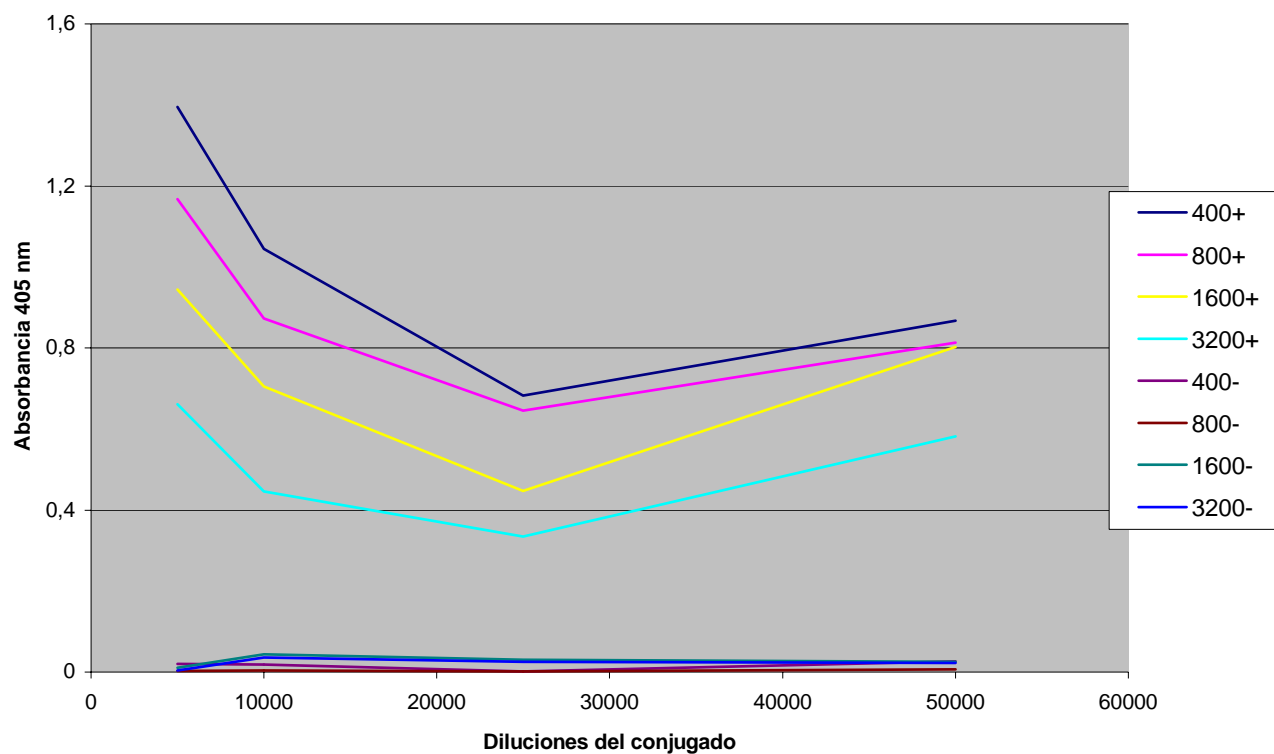
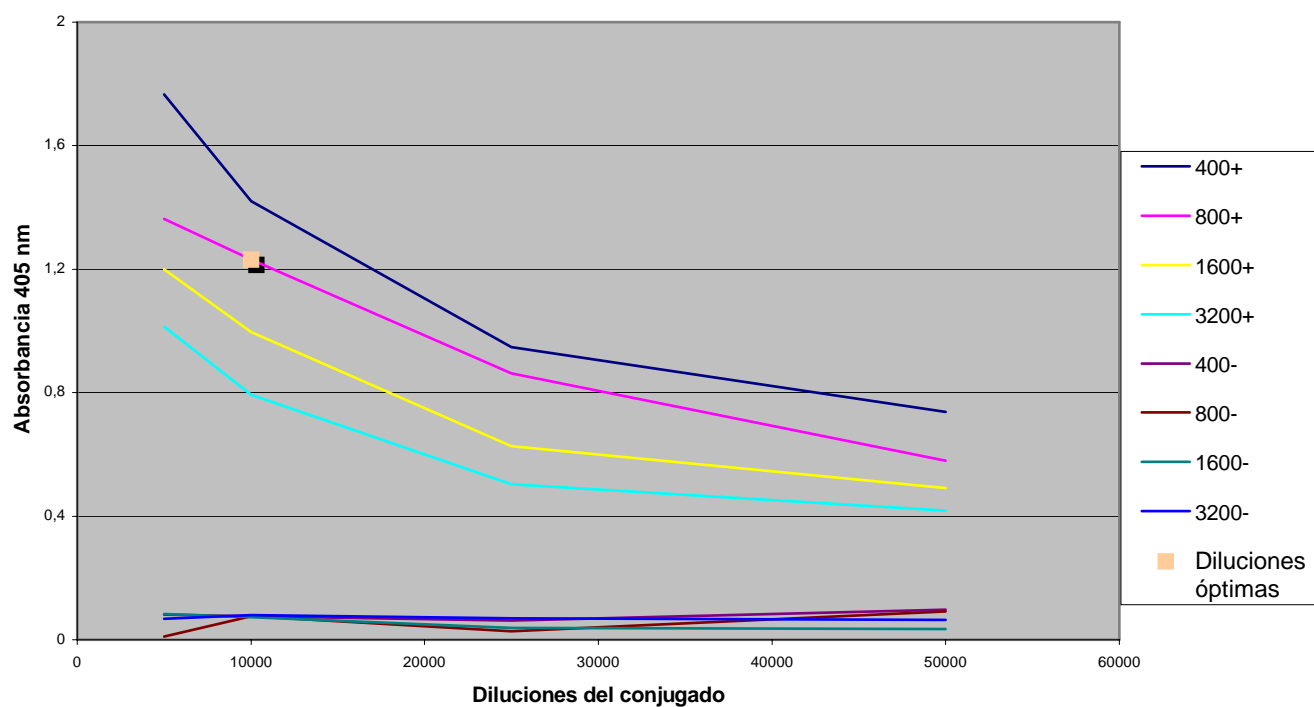
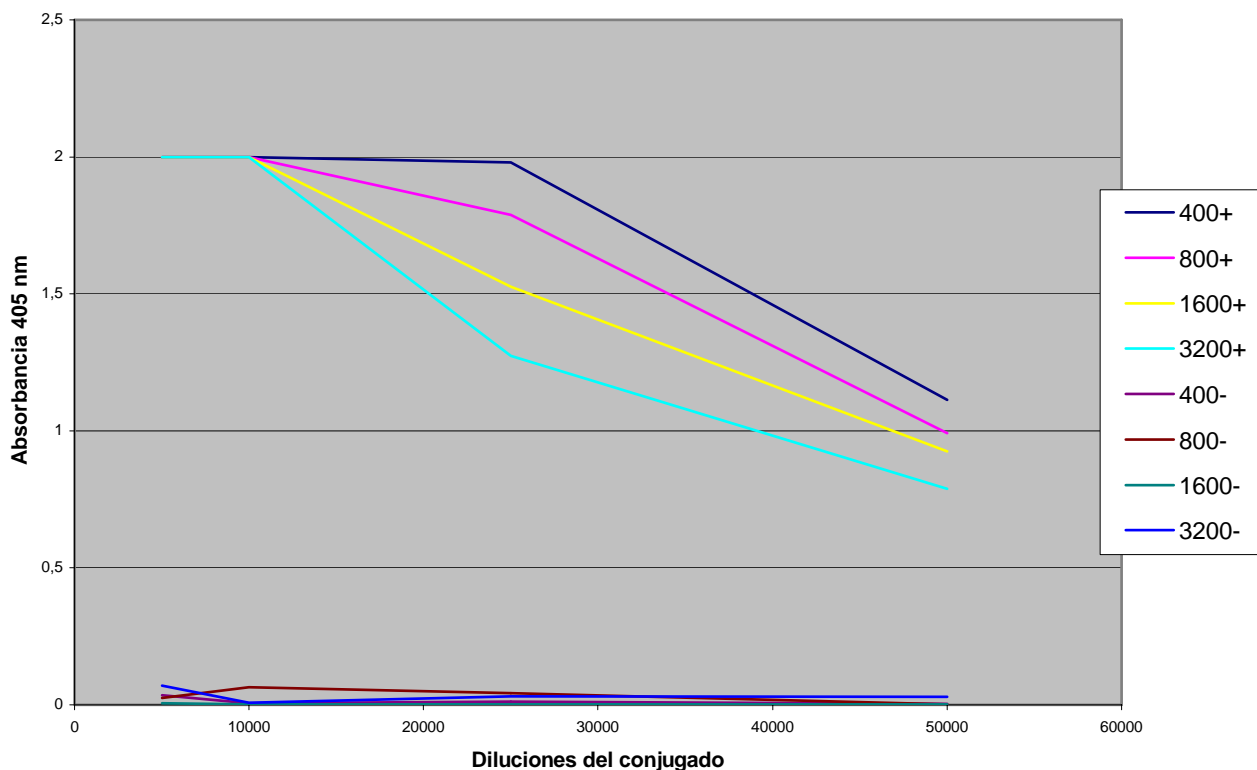
Figura 3. Concentración de antígeno de *T. canis* de 0.75ug/mlFigura 4. Concentración de antígeno de *T. canis* de 1.0 ug/ml

Figura 5. Concentración de antígeno de *T. canis* de 5ug/ml

Las diluciones óptimas del suero y del conjugado, así como la concentración óptima del antígeno, se definen por la mayor diferenciación entre el suero control positivo y el suero control negativo con respecto a la dilución o concentración anterior respectivamente. Según estos resultados, la concentración óptima de antígeno es de 1ug/ml, y las diluciones óptimas de conjugado y suero son 1:10000 y 1:800 respectivamente.

Para la realización de los posteriores experimentos se utilizaron dichas condiciones. Las tablas de absorbancias para las concentraciones de antígeno de 10 y 20ug/ml, no

se elaboraron por que no permitían apreciar claramente las diferencias de los resultados.

5.3. DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI - Ig G EN SUEROS DE CONEJOS POR LA TECNICA DE ELISA

Condiciones de los experimentos.

Antígeno: 1mg/ml. Lote 16 de Abril 21 de 1998.

Concentración de trabajo: 1ug/ml

Dilución de los sueros: 1:800

Suero control Positivo: 1-9

Suero control negativo: 13 - 8

Dilución del conjugado: 1:10000

Se determinaron anticuerpos por la técnica de ELISA a cada uno de los sueros obtenidos, es decir, a las 15 sangrías realizadas a cada conejo durante los seis meses (Véase Tabla 7). Para efectuar cada montaje se emplearon diferentes controles positivos y negativos, verificando así la reproducibilidad de la técnica.

Tabla 7. Resultados de absorbancias de los sueros de conejos recolectados para la determinación de anticuerpos contra *T. canis* en seis meses

SAN-GRIA #	TIEM-PO (días)	CON.1	CON.2	CON.3	CON.4	CON.5	CON.6	CON.7	CON.8	CON.9	CON.10	CON.11	CON.12	CON.13
1	0	0,031	0,022	0,056	0,046	0,032	0,022	0,008	0,047	0	0	0,003	0,013	0,027
2	7	0,049	0,012	0,118	0,021	0,002	0,007	0,086	0,11	0,026	0,1	0,024	0,011	0,016
3	14	0,344	0,637	0,843	0,83	0,166	0,538	0,438	0,599	0,321	0,372	0,02	0,03	0,024
4	21	0,544	0,763	1,018	1,078	0,36	0,63	0,449	1,035	0,409	0,566	0,034	0,033	0,04
5	28	0,855	0,723	1,246	0,944	0,344	0,575	0,527	1,222	0,493	0,674	0,029	0,072	0,002
6	43	1,073	1,21	0,944	0,911	0,583	0,899	0,668	1,447	0,899	0,525	0,018	0,036	0,037
7	58	1,291	1,051	1,426	1,144	0,748	0,894	0,706	1,542	0,868	0,561	0,029	0,054	0,001
8	70	1,45	1,153	1,674	1,143	0,938	1,182	0,766	1,514	0,866	0,861	0,025	0,141	0,048
9	85	1,614	1,266	1,653	1,129	0,905	0,939	0,762	1,414	0,868	0,76	0,057	0,045	0,002
10	100	1,567	1,321	1,618	1,17	0,968	0,967	0,93	1,084	0,901	0,887	0,02	0,121	0
11	115	1,52	1,789	1,44	1,264	1,033	0,831	0,747	1,034	0,812	0,938	0,026	0,009	0
12	130	1,589	1,876	1,39	1,23	1,115	0,917	0,894	1,25	1,002	0,859	0,038	0,024	0,024
13	145	1,889	1,671	1,546	1,09	0,849	0,917	0,825	0,991	0,912	0,919	0,027	0,12	0,029
14	175	1,877	1,644	1,647	1,138	1,335	1,246	1,023	0,968	1,024	0,922	0,025	0,015	0
15	205	1,13	0,834	1,204	0,816	1,379	1,101	1,104	1,406	1,229	1,126	0,128	0,154	0,147

Los títulos de anticuerpos se detectaron a los 15 días de la inoculación de los huevos embrionados (5000 huevos / conejo). El punto de corte fue 0.30; la media de los títulos para las serologías de los conejos control fue 0.039 con un rango entre 0 y 0.154. Los conejos infectados presentaron títulos altos, encontrándose en el rango entre 0.344 y 1.889. Durante el transcurso de la infección los títulos positivos aumentaron rápidamente desde el día 21 hasta el día 58, de ahí en adelante presentaban ligeras variaciones pero en términos generales permanecieron elevados y constantes (Véase Figuras 6 y 7).

Figura 6. Resultados de la prueba de ELISA para determinación de anticuerpos contra *T. canis* de los conejos 1 a 5 en un período de seis meses

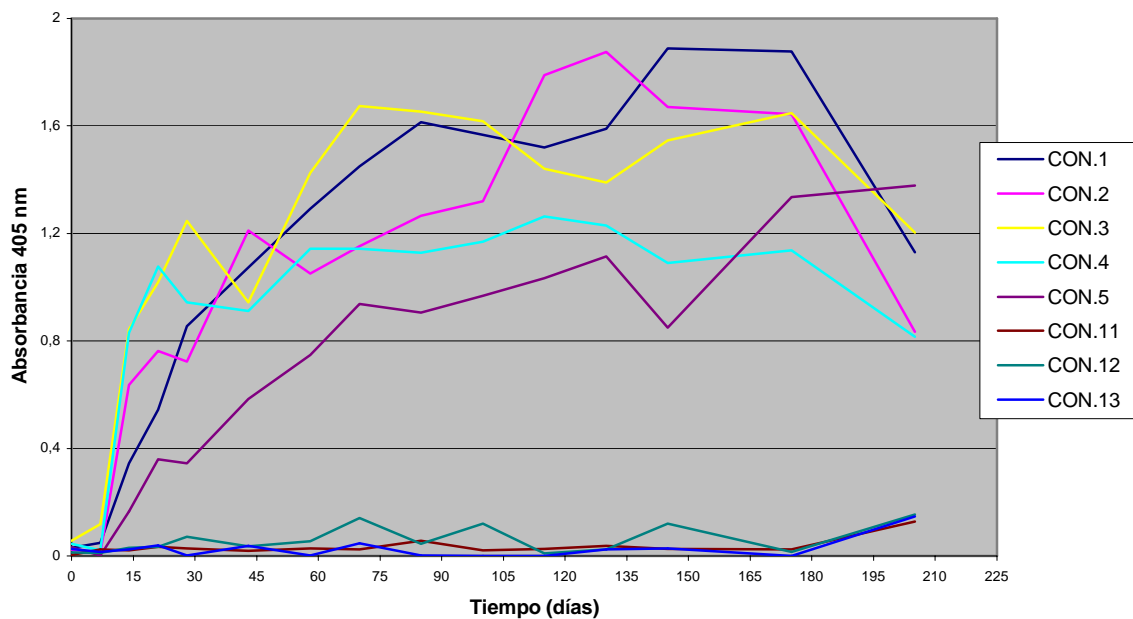
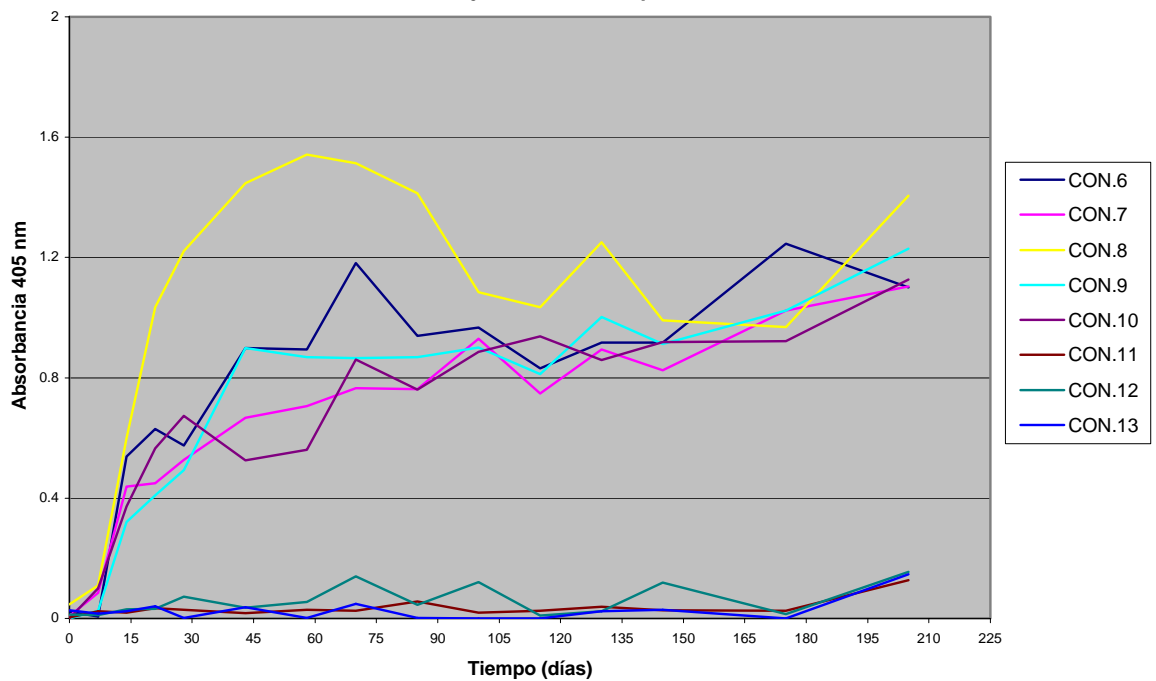
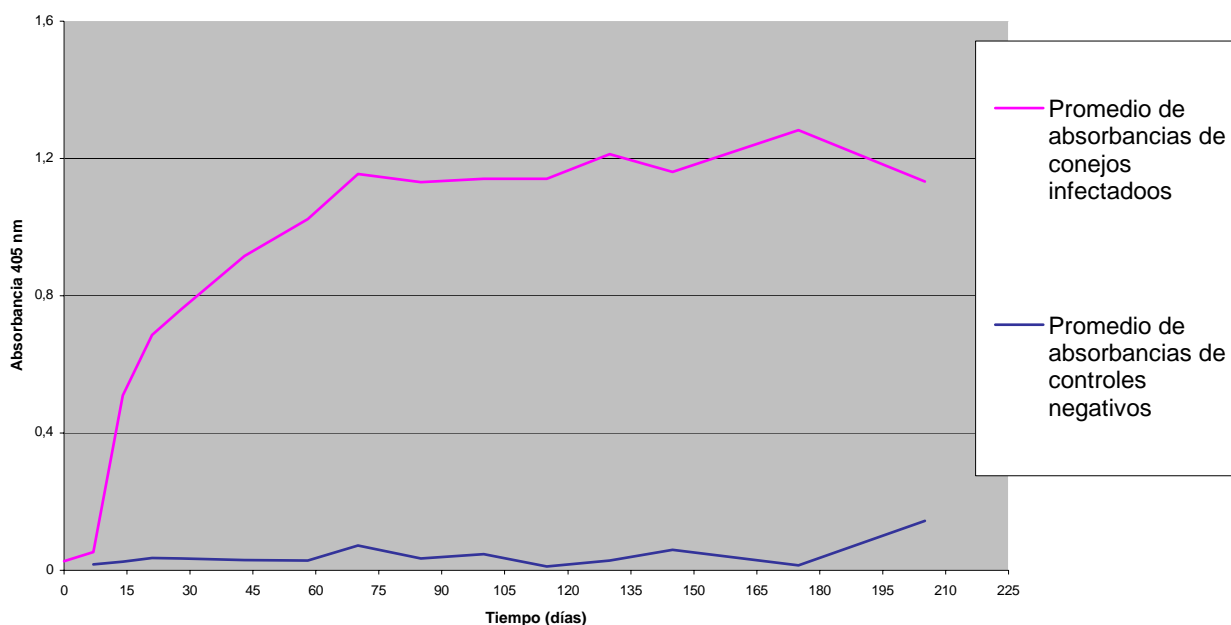


Figura 7. Resultados de la prueba de ELISA para determinación de anticuerpos contra *T. canis* de los conejos 6 a 13 en un período de seis meses



Al promediar las absorbancias obtenidas para cada sangría, de los sueros de conejos infectados y de conejos controles, se puede apreciar el comportamiento de la respuesta inmune humoral frente a la infección por *T. canis*. Al inicio de la infección el título de anticuerpos tiende a subir rápidamente y se observa una estabilización hacia el día 60 (Véase Figura 8)

Figura 8. Curso de la respuesta inmune de los conejos en el período de seis meses



5.4. ESTANDARIZACION DEL WESTERN BLOT PARA *T. canis*.

Los equipos y reactivos utilizados en la electroforesis, la transferencia y el inmunoblot son productos de laboratorios Bio-Rad y SIGMA.

Concentración óptima del antígeno.

Para estandarizar la concentración óptima del antígeno, se ensayaron diferentes concentraciones a partir de 1000 ug/ml; 150, 200, 250 y 300 ug/ml. El corrido se realizó a 75 V por 15 minutos y 125 V por 75 minutos y la transferencia al papel de nitrocelulosa a 200 mA por 75 minutos y 300 mA por 75 minutos. El gel se preparó en una concentración de 12% porque se esperaba la presencia de proteínas de alto y bajo peso molecular, es decir entre 12 kDa y 200 kDa. El suero se utilizó en una dilución de 1:100, recomendada por algunos autores, mientras se estandarizaba la dilución óptima. Del mismo modo, la dilución del conjugado (1:10000) fue escogida según ensayos previos y según los datos ofrecidos por la casa comercial. El substrato se deja reaccionar por 15 minutos.

En todas las concentraciones de antígeno ensayadas se logran apreciar las bandas correspondientes a las proteínas de *T. canis*, sin embargo en la concentración de 250 ug/ml pueden visualizarse con mucha nitidez siete bandas que concuerdan con los hallazgos de otros autores. Por lo tanto esta concentración fue utilizada en todas las pruebas siguientes incluyendo la estandarización de las diluciones óptimas de suero y del conjugado (Véase Figura 9).

Determinación de las diluciones óptimas de suero y conjugado.

Para determinar las diluciones óptimas de suero y conjugado, se realizaron diferentes ensayos. Inicialmente se probaron diferentes diluciones de suero: 1:50, 1:200, 1:400 y 1:800 con el antígeno de 250 ug/ml. De igual forma, se ensayó el conjugado con diluciones desde 1:5000, 1:15000 y 1:30000. Las condiciones de corrido y transferencia permanecieron iguales. Aparecen siete bandas nítidas de diferente

intensidad, y se evidencian mejor en las diluciones de suero 1:50 y 1:200 y las diluciones de conjugado 1:5000 y 1:15000 .(Véase Figura 10).

Estos hallazgos sugieren realizar nuevas diluciones intermedias de suero y conjugado para establecer finalmente las diluciones óptimas respectivas, además se utiliza un suero negativo como control de la prueba y los controles respectivos de antígeno y conjugado. En un siguiente experimento se probaron diluciones de suero positivo y negativo: 1:50, 1:100 y 1:150 y de conjugado, 1:5000 y 1:10000. Las condiciones de transferencia se modificaron para lograr una mayor nitidez en las bandas, la primera hora se transfirió a 200 mA y las dos siguientes a 300 mA. Los resultados muestran de nuevo las siete bandas características en todas las diluciones del suero positivo, por el contrario, en el suero control negativo se puede apreciar la ausencia de reacción al igual que en los controles de antígeno y conjugado. Finalmente se establecen las diluciones óptimas para las pruebas siguientes, 1:100 para el suero y 1:10000 para el conjugado (Véase Figura 11).

Estimación de pesos moleculares.

Para la estimación de los pesos moleculares se utilizó un estándar de peso molecular de amplio rango que incluye las siguientes proteínas: miosina, 200kDa; B-galactosidasa, 116kDa; fosforilasa B, 97kDa; seroalbúmina bovina, 66kDa; ovoalbúmina, 45kDa; anhidrasa carbónica, 31kDa; inhibidor de tripsina de soja, 21kDa; lisozima 14kDa e inhibidor de tripsina pancreática bovina 6.5kDa.

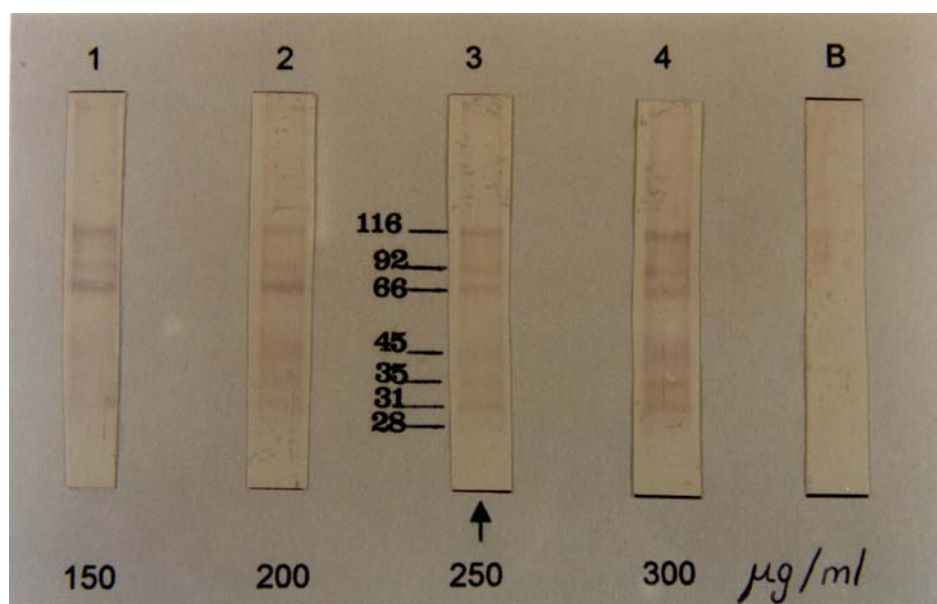


Figura 9. Estandarización de la concentración óptima del antígeno E/S de *Toxocara canis*. En la parte inferior se indican las concentraciones del antígeno. Se visualizan claramente las siete bandas en 250 $\mu\text{g/ml}$.

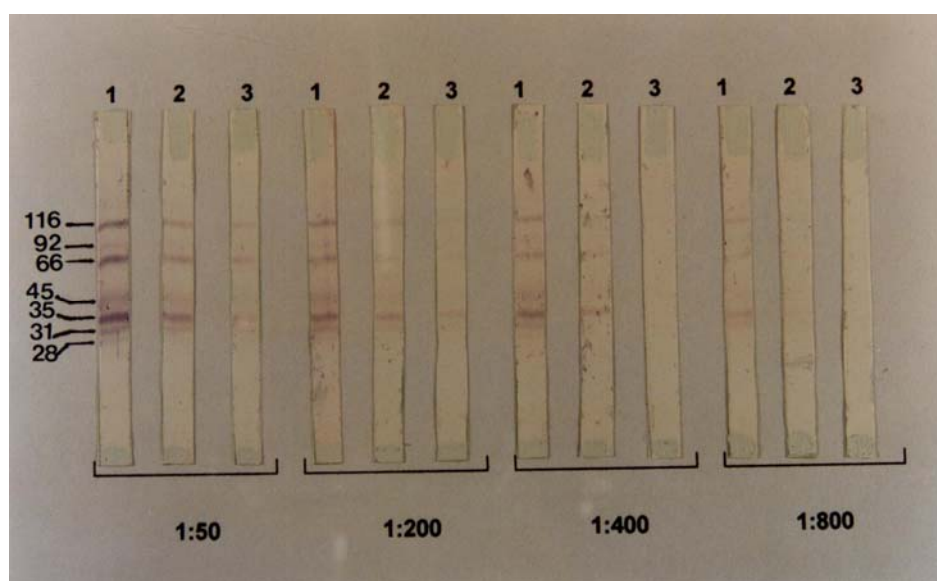


Figura 10. Estandarización de las diluciones óptimas de suero y conjugado. En la parte inferior se indican las diluciones del suero y en la parte superior las diluciones del conjugado, 1:5000 (1); 1:15000 (2) y 1:30000 (3)

5.5. IDENTIFICACION DE PROTEINAS ESPECIFICAS DE *T. canis* POR WESTERN BLOT

A todas las muestras de sueros se les practicó el inmunoblot. Las condiciones de los experimentos fueron:

Antígeno: Lote 16; 1000 ug/ml

Concentración de trabajo: 250 ug/ml

Dilución del suero: 1:100

Dilución del conjugado: 1:10000

Corrido en gel de poliacrilamida: 75 V por 15 minutos y 125 V por 75 minutos.

Transferencia al papel de nitrocelulosa: 200 mA por 90 minutos y 300 mA por 60 minutos.

Substrato: NBT/BCIP

El inmunoblot para detectar anticuerpos anti- IgG se realizó a todos los sueros de conejos recolectados durante el transcurso de seis meses, es decir, a partir de la sangría 1 hasta la sangría 15. Por lo tanto en cada conejo se pudo evaluar el comportamiento de la respuesta inmune contra los determinantes antigénicos de *T. canis*.

Durante el transcurso de la infección se puede observar que los determinantes antigénicos que reaccionan con los anticuerpos son diferentes, es decir, al comienzo

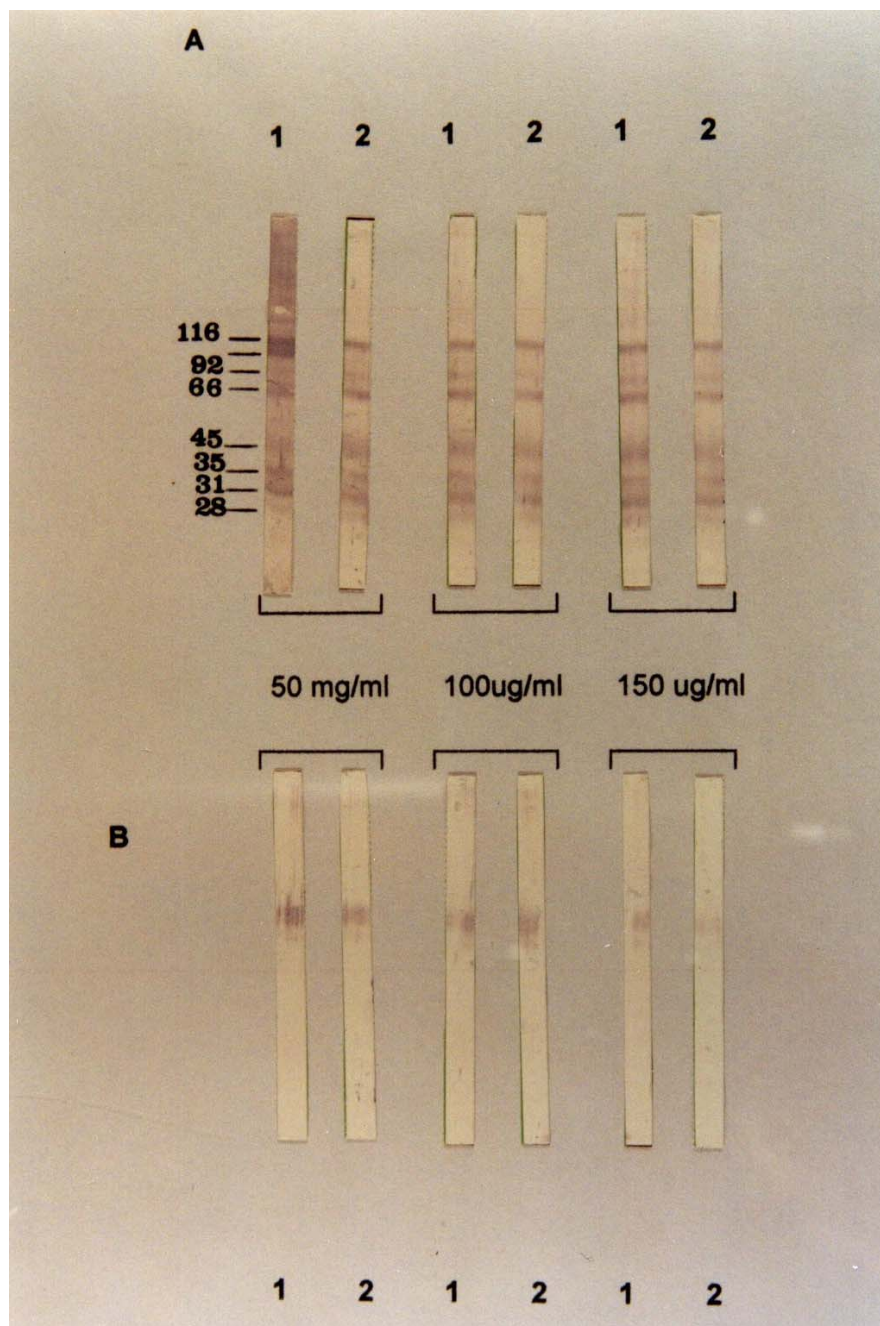


Figura 11. Estandarización de las diluciones óptimas de suero y conjugado. Suero positivo (A) y suero negativo (B). Las diluciones de conjugado ensayadas son 1:5000 (1) y 1:10000 (2).

de la infección reaccionan fuertemente cuatro proteínas de pesos moleculares 200 kDa, 116 kDa, 92 kDa y 35 kDa; hacia el primer mes ya se hacen evidentes las siete bandas características de pesos moleculares 92 kDa, 80 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 31 kDa y 28 kDa, además se identificaron dos bandas que permanecen constantes durante todo el tiempo de estudio, la proteína de 92 kDa y la de 35 kDa (Véase Figuras 12 a la 21). Este patrón permaneció constante para todos los conejos infectados previamente. Por el contrario, los sueros negativos no presentaron reacción (Véase Figuras 22 y 24), excepto el suero del conejo número 12 que muestra una ligera banda desde la sangría cinco hasta la 10 (Véase Figura 23). Esto puede sugerir que en algún momento hubo contacto con el parásito, aunque las absorbancias obtenidas en la prueba de ELISA, muestran total negatividad.

Las condiciones estandarizadas para el Western blot se tuvieron en cuenta para todos los experimentos, aunque en ocasiones se hicieron algunas modificaciones para mejorar la calidad del ensayo. Los parámetros de corrido y transferencia se modificaron en ciertas oportunidades; inicialmente el corrido se efectuaba a 75 V por 15 minutos y 125 V por el tiempo necesario para que el frente de corrido llegara al punto de destino, algunas bandas se observaban distorsionadas y se atribuyó al cambio brusco de voltaje; por este motivo, en una ocasión se mantuvo el voltaje en 100V durante todo el corrido. Los resultados de esta modificación no fueron significativos puesto que las bandas permanecieron iguales. El amperaje de la transferencia a la membrana de nitrocelulosa también fue ajustado, para obtener una mayor nitidez en las bandas. En unas oportunidades se aumentó de 200mA a 300mA, sin evidenciarse mejoría en la calidad de transferencia, así que finalmente se seleccionó 250 mA por las dos horas de transferencia.

Los reactivos empleados se cambiaron periódicamente para descartar errores inherentes a la técnica.

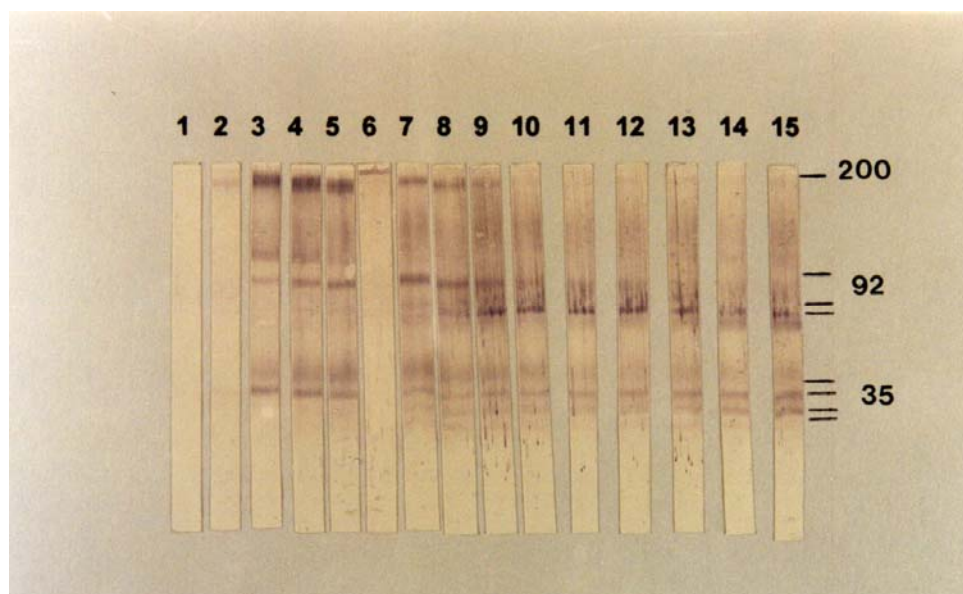


Figura 12. Inmunoblot conejo 1

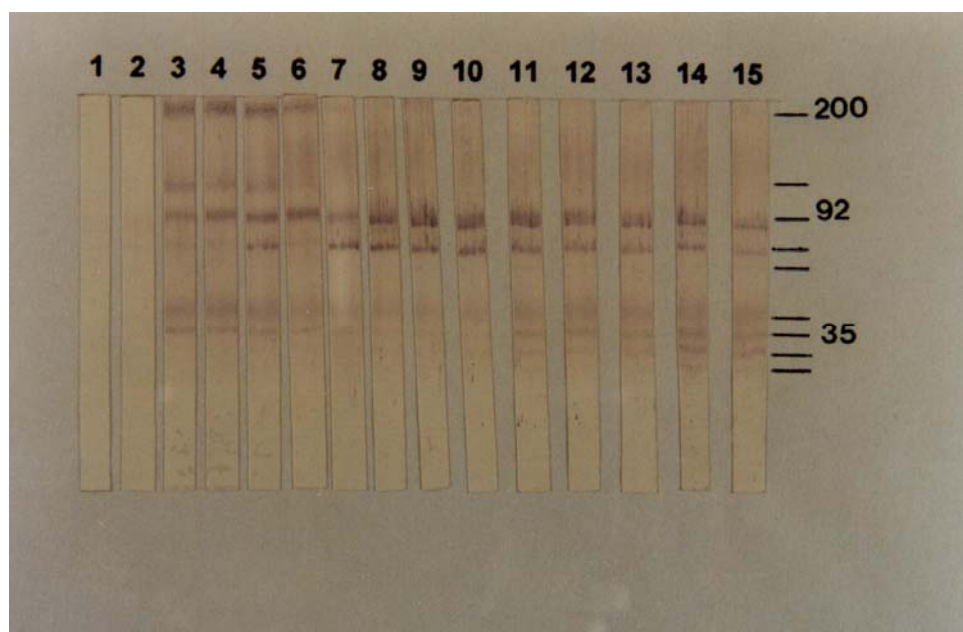


Figura 13. Inmunoblot conejo 2

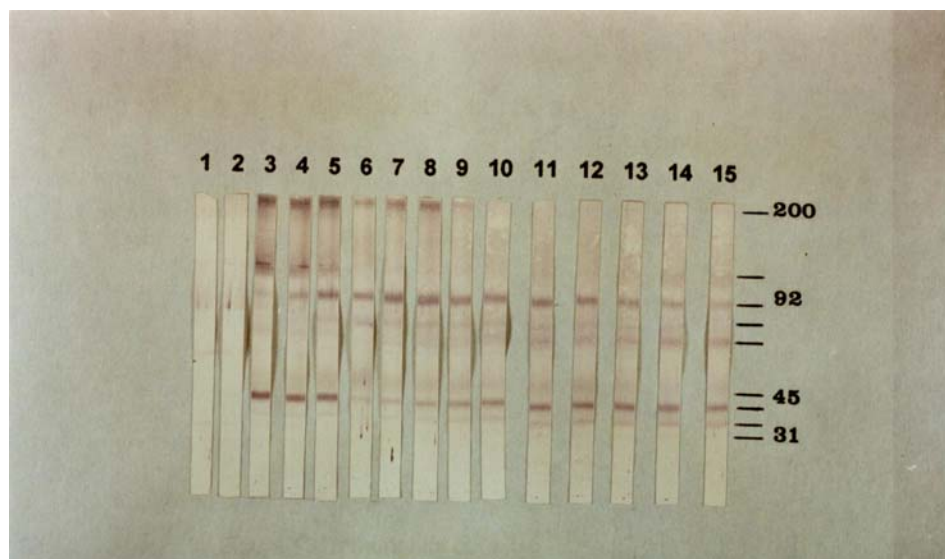


Figura 14. Inmunoblot conejo 3

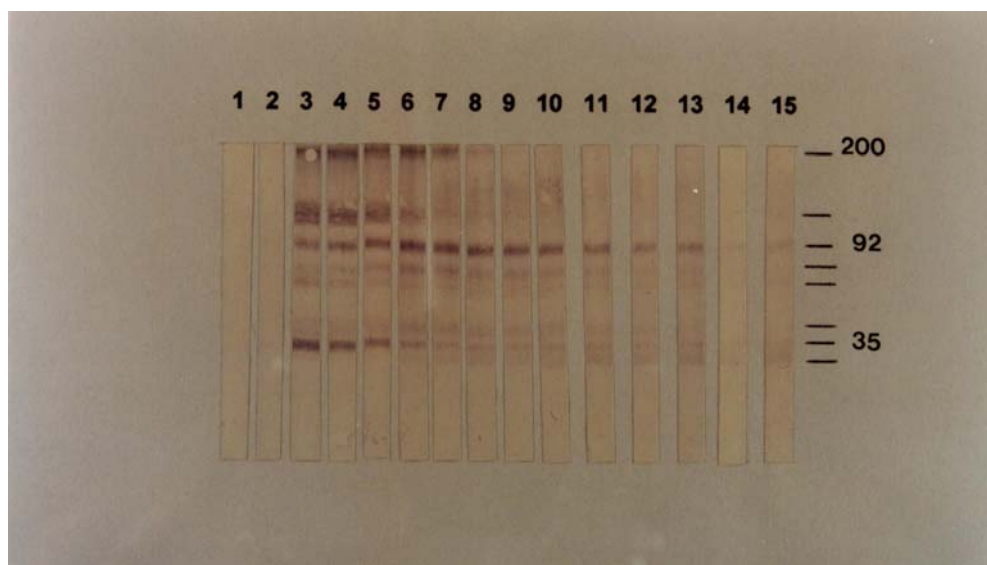


Figura 15. Inmunoblot conejo 4

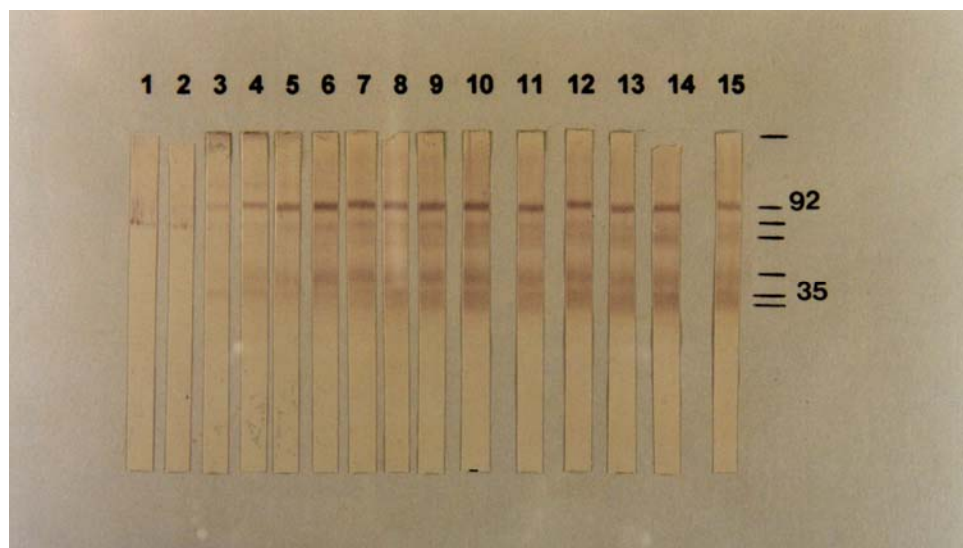


Figura 16. Inmunoblot conejo 5

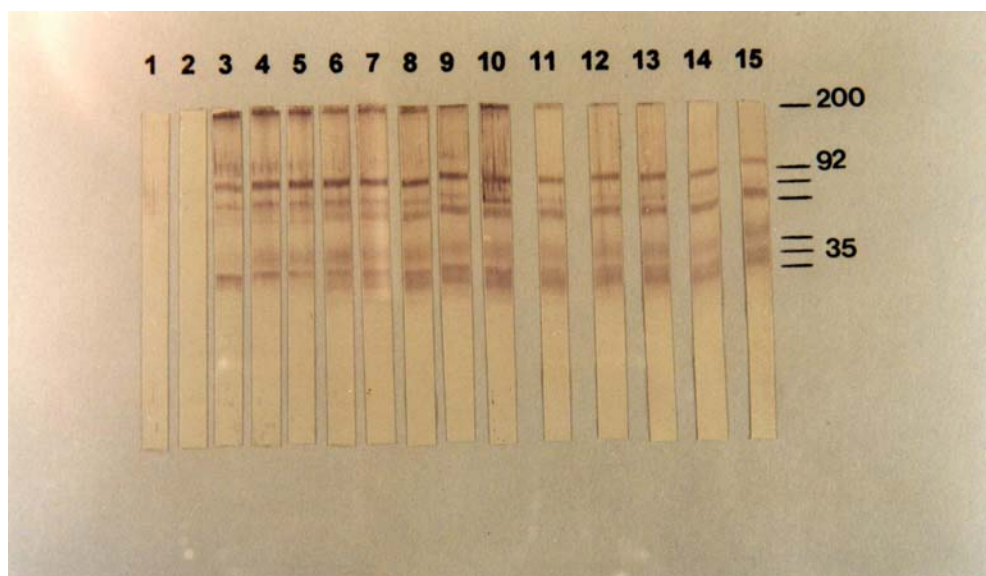


Figura 17. Inmunoblot conejo 6

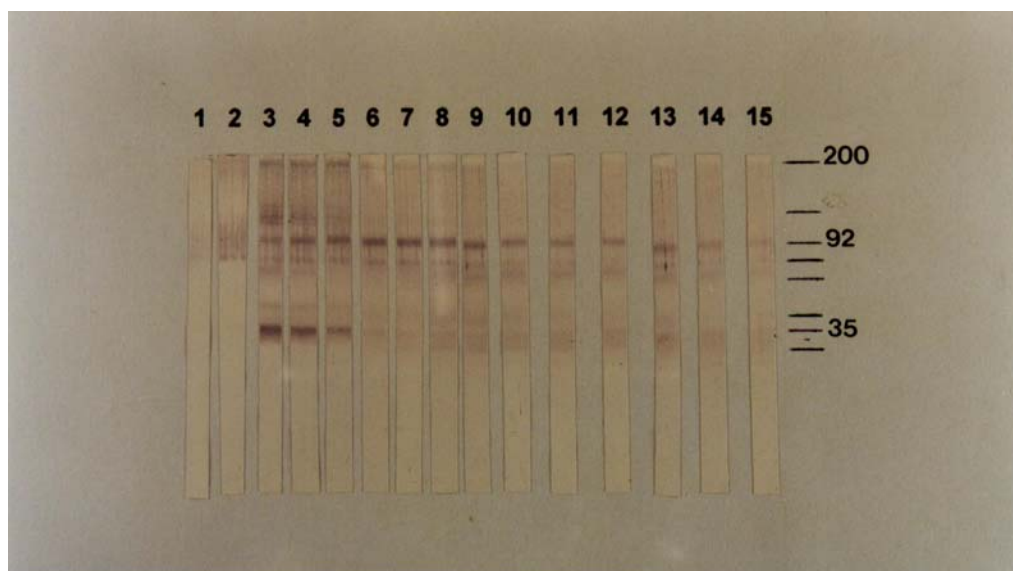


Figura 18. Inmunoblot conejo 7

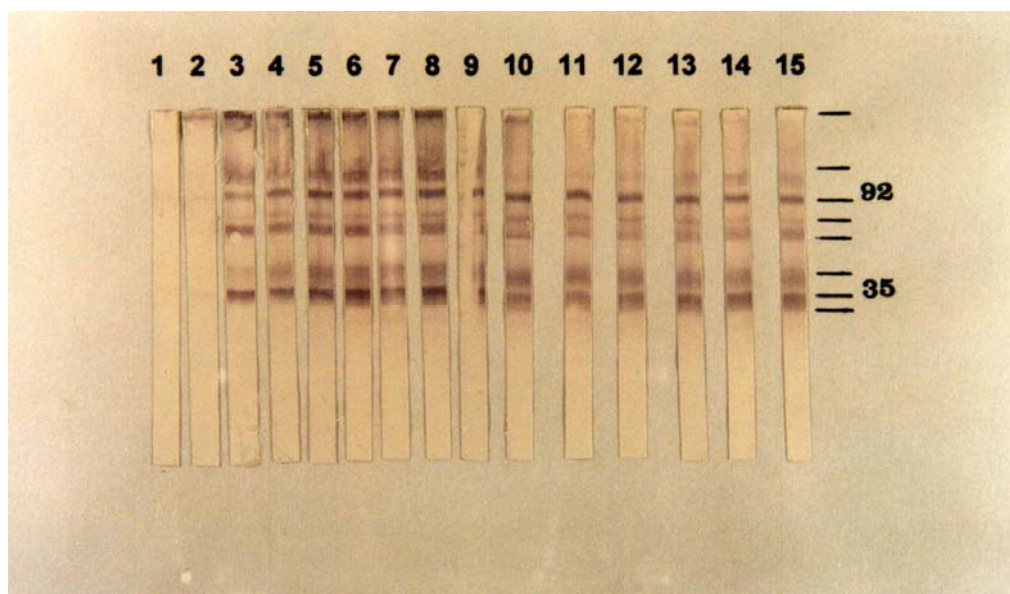


Figura 19. Inmunoblot conejo 8

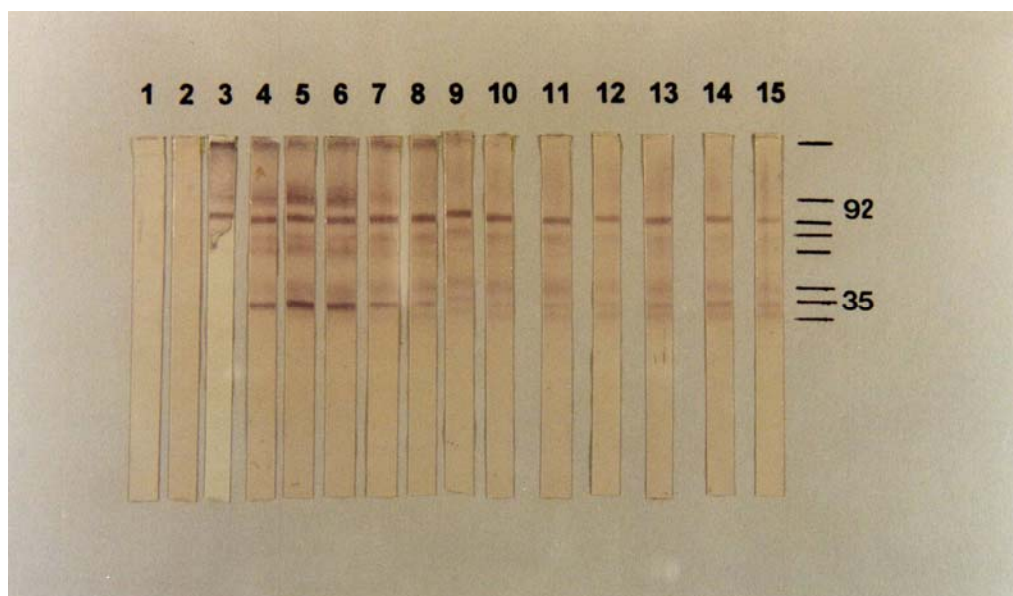


Figura 20. Inmunoblot conejo 9

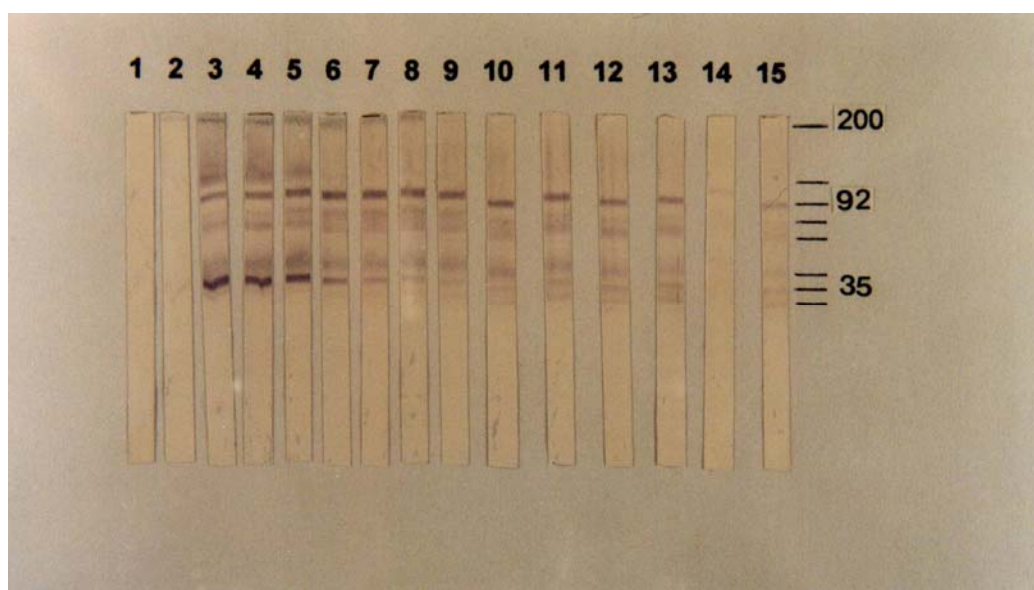


Figura 21. Inmunoblot conejo 10

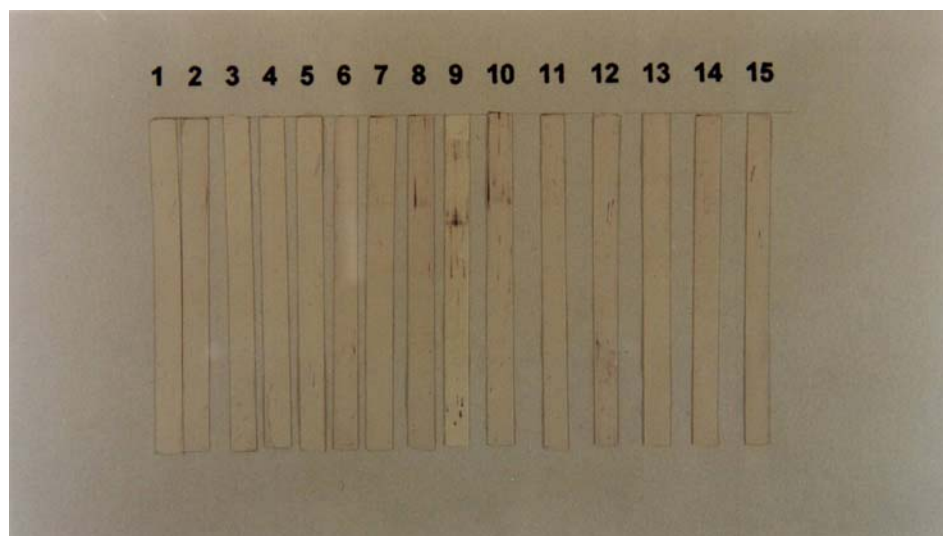


Figura 22. Inmunoblot conejo 11

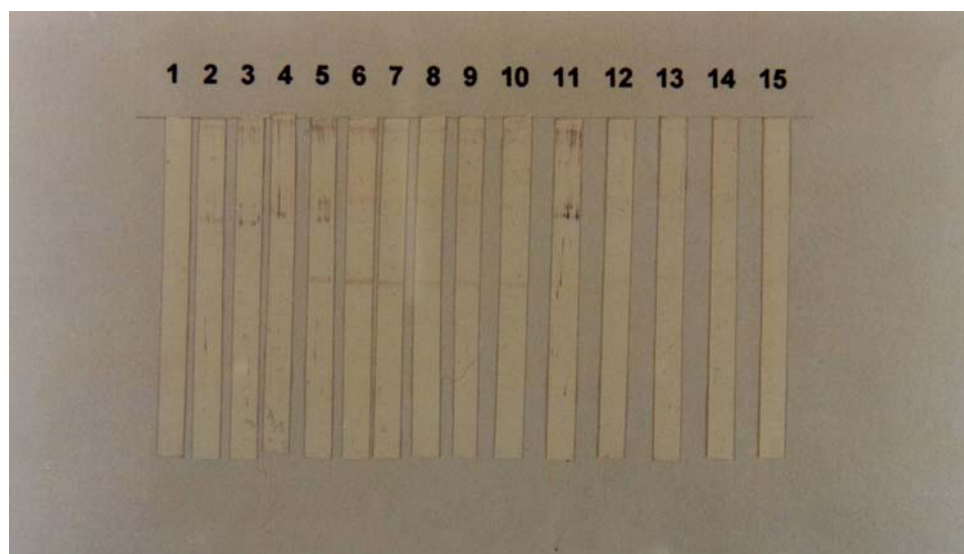


Figura 23. Inmunoblot conejo 12

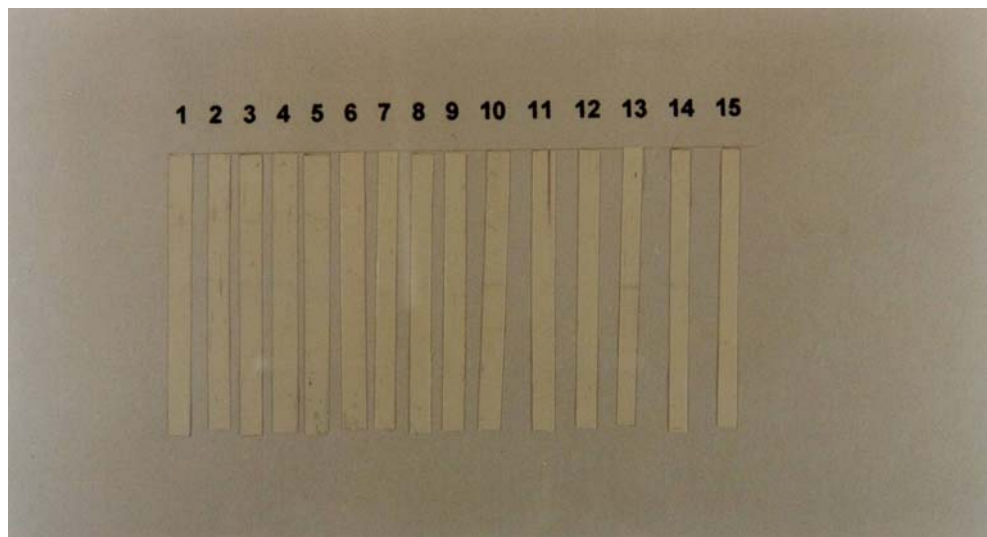


Figura 24. Inmunoblot conejo 13

DISCUSION

T. canis, es un parásito excepcional entre los nemátodos por su capacidad para sobrevivir *in vitro* por mucho tiempo en estado larvario. En el cultivo, el parásito se encuentra en un estado infectante para el hombre y secreta abundantes cantidades de glicoproteínas antigénicas (43), las cuales son invaluable para el inmunodiagnóstico (1,25). Esta estabilidad *in vitro*, ha permitido coleccionar los antígenos secretados (E/S) en cantidades apreciables para análisis inmunológicos y bioquímicos (38,43) y el empleo de *T. canis* como modelo de expresión antigénica en parásitos nemátodos.

El porcentaje de embrionación de huevos de *T. canis* obtenidos previamente a partir de hembras maduras del parásito, fue alrededor del 95% a los 28 días de permanecer en condiciones artificiales de embrionación; una parte de estos huevos se destinó para la infección oral de conejos y la otra parte para la obtención de larvas II. Este grado de embrionación fue significativamente alto ya que no siempre se consigue acercarse al 100%.

A partir de una cantidad de huevos embrionados se alcanzó un 90% de larvas eclosionadas, destinadas posteriormente a la producción de antígeno E/S. Estas larvas se depositaron directamente en el medio de cultivo (DEM) sin retirar previamente los restos de los huevos. Este hecho no afectó en absoluto el óptimo mantenimiento del cultivo. Algunos autores (24, 38) utilizan el método de Baermann

para separación de larvas. Aguila de la Puente (44) consigue un 89% de larvas eclosionadas mediante purificación en gradiente de sacarosa.

La producción de anticuerpos contra *T. canis* fue llevada a cabo en conejos Nueva Zelanda machos, infectados previamente con 5000 huevos embrionados / ml, encontrando una buena respuesta inmunológica y sin evidencia de manifestaciones clínicas atribuibles a la infección. Maizels et.al. (45), administra 20000 huevos embrionados de *T. canis* a conejos de la misma raza y los sangra semanalmente después de 35 días, es decir, cuando los anticuerpos han alcanzado una concentración más o menos estable.

La producción de antígeno E/S en medio Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DEM) adicionado de penicilina, estreptomycin y bicarbonato, se llevó a cabo durante seis meses, es decir, fue evidente la notable capacidad de *T. canis* para sobrevivir *in vitro* por extensos períodos manteniendo una alta tasa de secreción. Satisfactoriamente los cultivos no presentaron contaminación durante el transcurso del estudio y además no hubo una mortalidad larvaria significativa, obteniendo así un antígeno de muy buena calidad y con una elevada y estable concentración protéica. Igualmente Boyce et. al. (42) utiliza el mismo medio y con las mismas condiciones de incubación.

De Savigny (20, 40), utiliza el medio Mínimo Esencial de Eagle con sales de Hanks (HMEM) adicionado con penicilina y estreptomycin, y mantiene un cultivo viable de larvas II de *T. canis* por un período de 18 meses, luego lo purifica por ultracentrifugación y finalmente lo liofiliza para su posterior empleo en pruebas

inmunoenzimáticas. Maizels et. al. (38) cultiva larvas de II estadio en Eagle's MEM no suplementado o en RPMI 1640 con HEPES, penicilina, estreptomina y glucosa al 1%; estos cultivos tienen una concentración larvaria de 4000 y 10000 larvas / ml. Más adelante, en un estudio realizado con el fin de determinar epítopes comunes y específicos de especie (45), utiliza el medio RPMI 1640 con una concentración de 5000 larvas / ml y en el siguiente año (46), emplea las mismas condiciones para 4000 larvas / ml y mantiene el cultivo larvario por ocho meses. Aguila de la Puente et. al.(44) utiliza el MEM adicionado de sales de Earle y mantiene un cultivo de larvas II por 18 meses.

Es importante señalar que el antígeno E/S se empleó en ambas pruebas inmunológicas "sin dializar", debido a que la concentración de proteínas del dializado inicial fue 0. Esto posiblemente fue resultado de la utilización de una membrana de diálisis con un poro de diámetro superior a las moléculas protéicas que se pretendían identificar. Aún así los resultados obtenidos fueron satisfactorios y algo relevante fue la estabilidad que presentó este antígeno hasta el último día de su utilización. Todos los autores consultados utilizan la diálisis y métodos de concentración con el antígeno E/S).

Cabe resaltar que la concentración de proteína obtenida en el antígeno fue de 1000 ug/ml utilizando el medio de Eagle modificado por Dulbecco con bicarbonato, penicilina y estreptomina y, un número de 10000 larvas / ml, mientras que Aguila de la Puente et. al. (44) consigue una concentración protéica de 100 ug/ml en el medio mínimo esencial de Eagle con sales de Earle, suplementado con glutamina 1%, 5-fluorocitosina y gentamicina, igualmente con 10000 larvas / ml. Posiblemente la composición del medio utilizado sea un factor determinante en la concentración protéica del antígeno.

En la preparación del antígeno no se utilizaron inhibidores de proteasas, sin embargo el antígeno obtenido fue de óptima calidad y permaneció estable durante todo el tiempo. Robertson y col. realizan un estudio sobre las enzimas proteolíticas secretadas por las larvas de *T. canis* cultivadas *in vitro* y afirman que varias especies de nemátodos incluyendo *Toxocara* presentan actividad proteasa en los productos de excreción y secreción, además que en condiciones naturales intervienen en la invasión y migración en el huésped humano. Adicionalmente estas proteasas secretadas *in vitro* son capaces de degradar componentes del antígeno y este a su vez pierde la capacidad de reacción en las pruebas inmunológicas.

Todos los sueros de conejos fueron ensayados para la determinación de anticuerpos por la técnica de ELISA. Los resultados permiten apreciar claramente el comportamiento de la respuesta inmune en los conejos infectados, pasados ocho días después de la administración de los huevos embrionados, se hace posible detectar la presencia de anticuerpos IgG, con un aumento progresivo de estos títulos hasta el día 60, donde tienden a estabilizarse hasta el sexto mes. Hubiera sido ideal continuar con el estudio por más tiempo para determinar en qué momento disminuyen los títulos y así mismo para evidenciar en el inmunoblot la aparición de nuevas bandas o la desaparición de alguna de ellas, pero por razones económicas fue imposible continuar.

Las preparaciones de antígeno excretorio / secretorio (E/S) aparentemente varían en complejidad y composición entre laboratorios, sin embargo, los componentes antigénicos detectados por el inmunoblot muestran gran similitud. Pueden observarse claramente los dos grupos de bandas que aparecen en las infecciones por *T. canis*, la fracción de bajo peso molecular que oscila entre el rango de 28 kDa y 45 kDa y la

fracción de alto peso molecular entre 66 y 200kDa. No obstante estas proteínas no son reconocidas durante toda la infección, sino solamente unas cinco semanas después de ésta. Al inicio de la infección hay evidencia de solo cuatro bandas (200, 116, 92 y 35kDa). Estos datos concuerdan con los reportes de la literatura; aplicando un procedimiento de Western Blot a sueros de conejo infectados, Akao et. al. (36) identifica ocho bandas, Speiser & Gottstein (37) encuentran de 10 a 14 bandas utilizando suero humano, Badley et. al. (34) detecta 15 bandas empleando sueros de conejos, monos y pacientes que presentan LMV y LMO. En un análisis por Western Blot de antígeno E/S marcado con ^{125}I , Maizels et.al. (38) encuentra cinco componentes y los separa en dos grupos, la fracción de bajo peso molecular (35 kDa) y la de alto peso molecular (120kDa). Magnaval et.al. (27) encuentra también siete bandas y las agrupa en dos fracciones, una de bajo peso molecular (24, 28, 30 y 35kDa) y otra de alto peso molecular (132, 147 y 200 kDa).

CONCLUSIONES

Los resultados de este experimento permiten demostrar la producción de anticuerpos frente a la infección con huevos embrionados de *T. canis*.

La identificación de los antígenos específicos de *Toxocara canis* fue posible utilizando la técnica de Western Blot, además se lograron establecer los pesos moleculares aproximados de cada uno de ellos, al igual que la frecuencia de aparición de bandas según el estadio de la infección.

Las pruebas de ELISA y Western Blot muestran concordancia entre sí, ya que todos los sueros positivos para ELISA, lo estaban para el Western Blot. Igualmente los sueros de controles negativos resultaron serlo para ambas pruebas. Por esta razón, no pueden establecerse diferencias en cuanto a sensibilidad y especificidad de las dos técnicas.

El hecho de utilizar el antígeno excretorio / secretorio sin dializar demuestra que la diálisis no es un procedimiento indispensable para la obtención de este tipo de antígeno, y que por el contrario, su omisión ofrece resultados confiables, muy similares a los publicados por otros autores y además se reducen ampliamente los costos de la prueba.

El Western Blot es una prueba de diagnóstico muy específica ampliamente difundida

en muchos países, que vale la pena implementar en Colombia; con este procedimiento, sería posible identificar si existe infección reciente o si por el contrario es antigua.

RECOMENDACIONES

Un futuro estudio consiste en la identificación de anticuerpos IgG contra antígeno E/S, en los humores vítreo y acuoso de los conejos infectados previamente con *T. canis*, mediante las pruebas de ELISA y Western blot. Adicionalmente, se examinarían los ojos enucleados de éstos conejos por medio de ecografía y patología para verificar la presencia de larvas de *T. canis* en dicho órgano.

Aunque puede hacerse una extrapolación en humanos de los resultados obtenidos, en el País se hace necesaria la estandarización e implementación del Western blot como prueba de diagnóstico de la toxocariosis humana.

Se sugiere realizar estudios de caracterización y evaluación química de los determinantes antigénicos identificados, específicos durante la infección, para realizar una aproximación al diseño de vacunas para la población.

Desarrollar técnicas moleculares como PCR y realizar análisis epidemiológicos para tener una aproximación de la incidencia actual de la toxocariosis humana en el país.

BIBLIOGRAFIA

1. Glickman LT, Schantz PM. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiol Rev* 1981; 3:230-50.
2. Schantz PM Glickman LT. Ascaridios de perros y gatos un problema de Salud Pública y de Medicina Veterinaria. *Bol Of Sanit Panam* 1983; 91: 571- 85.
3. Areal VM, Crandal CH. Toxocariasis , the pathology of protozoal and helminthic diseases with clinical correlation. In: RA Marcial –Rojas, ed. Baltimore: Williams and Wilkins 1971;802-42.
4. Zinkham WH. Visceral larva migrans. *Am J Dis Child* 1978;132:627- 33.
5. Mok CH, Visceral larva migrans discussion based on review of the literature. *Clin Pediatric* 1968;7: 565- 73
6. Huntley CC, Costas MC, Lyerly A. visceral larva migrans syndrome: clinical characteristic and immunologic studies in 51 patients. *Pediatric* 1965; 36:523-36.
7. Behear JR, Hendley JO Severe pulmonary involvement in visceral larva migrans. *Am J Child* 1973;125:599-600.

8. Friedman S, Hervada AR .Myocarditis with recovery in a child with visceral larva migrans. J Pediatr 1960; 56:91.
9. Schochet SS. Human *Toxocara canis* encephalopathy in a case of visceral larva migrans. Neurology 1967; 17:227-9.
10. Snyder CH. Visceral larva migrans. Pediatrics 1961; 28:85-91
11. Mikhael NZ, Monpetit VJA, Orizaga M, et.al. *Toxocara canis* infestation with encephalitis. Can J Neurol Sci 1974; 1:114-20.
- 12 Kapur S. Sawhney BB, Pal SR, et.al. Visceral larva migrans encephalopathy. Neurology India 1976; 24:104-7.
13. Wilder HC. Nematode endophthalmitis. Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol 1950; 55:99-109.
14. Duguid IM. Features of ocular infestation by *Toxocara*. B.J. Ophthalmol 1961; 45:789-96
15. Beaver PC. Zoonoses with particular reference to parasites of veterinary importance. In; Soulsby E.J.L. Ed Biology of Parasites. New York: Academic Press 1951; 215-27.
16. Ludlam KE, Platt T. The relationship of park maintenance and accessibility to dogs

in the presence of *Toxocara* spp. Ova in the sal. Am J Public Health 1989; 79:6033-34.

17. Child JE. The prevalence of *Toxocara* species ova in backyards and gardens of Baltimore, Maryland. Am J Public Health 1985; 75:1092-94.

18. Duwel D. The Prevalence of *Toxocara* eggs in the sand in children's playgrounds in Frankfurt/M. Ann Trop Med Parasitol 1984; 533-36.

19. Uga S, Kataoka N, Mauseres to control *Toxocara* egg. Contamination in sandpits of public parks. Am J Trop Med Hyg 1995; 52:21-24.

20. Correa P, González ML, D'Alessandro A. Primer caso colombiano de Toxocariasis. Breve actualización del síndrome de la larva migrans visceral. Antioquia Med 1966, 16:489-97.

21. Escobar-Melquizo JA, Little MD. Caso clínico con confirmación en parasitología de larva migratoria visceral por *T. canis* en Colombia. Antioquia Med 1966; 16:499-507.

22. Agudelo C, Villarreal E, Cáceres E, López MC, Eljach J, Ramírez N, Hernández E, Corredor A. Human and Dogs *Toxocara canis* infection in poor neighborhood in Bogotá, Mem. Inst Oswaldo Cruz Río de Janeiro 1990; 85:75-8.

23. Voller A, Bidwell DE, Barlett A. Enzyme immunoassays diagnostic medicine; theory and practice. Bull WHO 1976; 53:55-6.

24. De Savigny D.A. In vitro maintenance of *T. canis* larvae and a simple method for the production. Of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic test for visceral larva migrans J Parasitol 1975; 61:781-782.
25. De Savigny DH, Voller A, Woodruff AW. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. J Clin Pathol 1979; 32:284-88.
26. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Nat Acad Sci 1979; 76:4350-54.
27. Magnaval JF, Fabre R, Maurières P, Charlet JP, de Larrad B. Application of the western-blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. Parasitol Res 1991; 77:697-702.
28. Jiménez JF, Valladores B, Fernández – Palacio JM, de Armas F, del Castillo A. A serologic study of human toxocariasis in the Canary Islands (Spain): environmental influences. Am J Trop Med Hyg 1997; 56:113-5.
29. Gems D, Robertson BD, Ferguson CJ, Nieves R, Page AP, Blaxter ML, Maizels RM. An abundant trans – spliced mRNA from *Toxocara canis* infective larvae encodes a 26-K Da protein with homology to phosphatidylethanolamine binding protein. J Biol Chem 1995;270:18517-522.
30. Gems D, Maizels RM. An abundantly expressed mucinlike protein from *Toxocara*

canis infective larvae: the precursor of the larval surface coat glycoproteins. Proc Nat Acad Sci 1996; 93:1665-70.

31. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265-75.

32. COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD. Resolución 008430 de 1993 sobre Normas Científicas Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud.

33. Oaks JA and Kayes SG. Artificial hatching and culture of *Toxocara canis* second stage larvae. J Parasit 1979; 65: 969 - 70.

34. Badley JE, Grieve RB, Bowman DD, Glickman LT, Rockey JH. Analysis of *Toxocara canis* larval excretory - secretory antigens: Physicochemical characterization and antibody recognition. J Parasit 1987; 73: 593 - 9.

35. Scopes, Robert K. Protein purification. Principle and practice. En: _____. The protein purification laboratory. 3ª ed. 1994. p. 13-21.

36. Akao N, Kondo K, Yoshimura H. Antigenic analysis of excretory-secretory products of 2nd stage larvae of *Toxocara canis* and the antigen recognition in the course of infection. Jpn J Parasitol 1983; 32:551-8.

37. Speiser F, Gottstein B. A collaborative study on larval secretory-excretory antigens of *Toxocara canis* for the immunodiagnosis of human toxocariasis with ELISA.

Acta Trop (Basel) 1894; 41:361-72.

38. Maizels RM, De Savigny DH, Ogiivie bm. Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. Parasit Immunol 1984; 6:23-7

39. Welch JS, Symons MH, Dobson Colin. Immunodiagnosis of parasitic zoonoses: Purification of *Toxocara canis* antigen by affinity chromatography. Int J Parasit 1983; 13:171-8

40. De Savigny DH, Tizard IR. Toxocaral larva migrans: The use of larval secretory antigens in haemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody test. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1977; 71:501-7

41. Magnaval JF, Fabre R, Maurières P, Charlet JP, De Larrad B. Evaluation of an immunoenzymatic assay detecting specific anti-*Toxocara* immunoglobulin E for diagnosis and posttreatment follow-up of human toxocariasis. J Clin Microbiol 1992; 30:2269-74.

42. Boyce WM, Branstetter BA, Kazacos KR. Comparatyve analysis of larval excretory - secretory antigens of *Baylisascaris procyonis*, *Toxocara canis* and *Ascaris suum* by Western blotting and enzyme immunoassay. Int J Parasit 1998; 18: 109 - 13.

43. Meghji M. and Maizels RM. Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. Mol Biochem Parasitol 1986;

18:155.

44. Aguila de la Puente C, Cuellar del Hollo C, Guillén Llera JL. Anticuerpos monoclonales frente al antígeno secretor/excretor de *Toxocara canis*. Rev Iber Parasitol 1988; 48: 209 -20.

45. Kennedy MW, Maizels RM, Meghji M, Young L, Qureshi F, Smith HV. Species - specific and common epitopes on the secreted and surface antigens of *Toxocara cati* and *Toxocara canis* infective larvae. Parasite Immunol 1986; in Press.

46. Maizels RM, Kennedy MW, Meghji M, Robertson BD, Smith HV. Shares carbohydrate epitopes on distinct surface and secreted antigens on the parasitic nematode *Toxocara canis*. J Immunol 1987; 139: 207 - 14.

47. Robertson BD, Bianco AT, Mc Kerrow JH, Maizels RM. *Toxocara canis* proteolytic enzymes secretades by the infective larvae *in vitro*. Exp Parasitol 1989; 69: 30 - 6.

APENDICES

A. REACTIVOS PARA LA OBTENCIÓN DE HUEVOS Y LARVAS DE *T. canis*

1. SOLUCION DE EUTANASIA

Sulfato de Magnesio	250g
K - Trol x 10cc	5 ampollas
Agua destilada	400 ml

Disolver el sulfato de magnesio en el agua caliente, dejar enfriar y añadir las 5 ampollas de K - Trol. Proteger de la luz.

La cantidad para eutanasiar a un animal de 1Kg de peso es de 5ml de la solución, preferiblemente vía intracardíaca.

2. SOLUCION DE PEPSINA ACIDA

Pepsina	1g
HCl	5ml
Agua destilada	Completar a 100ml

3. SOLUCION DECORTICADORA

Na OH	2g
Hipoclorito de sodio	6ml
Agua destilada	Completar hasta 100ml

4. SOLUCION EQUILIBRADA DE HANKS

NaCl	8g
KCl	0.4g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0.15g
KH ₂ PO ₄	0.06g
NaHCO ₃	0.35g
Glucosa	10g
Agua destilada	Completar a 1000ml

5. MEDIO DE CULTIVO

Dulbeco's Modified Eagle's Medium (MEM)

MEM (SIGMA)	13.5g
H ₂ O destilada estéril	Completar a 1000ml

Preparar y guardar en refrigeración.

6. SOLUCION DE BICARBONATO ESTERIL

Na H CO ₃	0.22g
Agua destilada estéril	100ml

7. ANTIBIOTICOS

Penicilina	Estreptomina	Medio (ml)
6.0mg	2.5mg	100ml
4.5mg	1.87mg	75ml
3.0mg	0.125mg	50ml
1.5mg	0.0625mg	25ml

B. REACTIVOS PARA LA DIALISIS DEL ANTIGENO Y DETERMINACION
DE PROTEINAS POR LOWRY

1. SOLUCION REGULADORA DE FOSFATOS (PBS) PARA DIALISIS pH 7.2

NaCl	7.65g
Na ₂ HPO ₄	0.724g
KH ₂ PO ₄	0.21g
Agua destilada estéril	Completar a 1000ml

Puede prepararse una solución 10X ó 20X y almacenarse en refrigeración. No se necesita chequear el pH.

2. DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY

Este método se recomienda para hallar proteínas de alto peso molecular, como las de antígenos totales.

ALBUMINA BOVINA FRACCION 5 (1g/ml)

Albúmina	10mg
Solución Salina estéril (0.85%)	10 ml

Preparar alícuotas de 0.5ml o 1.0ml y almacenar a -20°C.

REACTIVO A

Tartrato de sodio y potasio	2g
Carbonato de sodio	100g
NaOH 1N	500ml
Agua destilada estéril	Completar a 1000ml

Almacenar a temperatura ambiente.

REACTIVO B

Tartrato de sodio y potasio	2g
Sulfato de cobre	1g
Agua destilada estéril	90ml
NaOH 1N	10ml

REACTIVO C

Reactivo de Folin en una concentración de 0.15 a 0.18 N diluido con agua destilada estéril. Si el Folin es viejo, se toma como 0.18N y si es nuevo, 0.15N.

El reactivo viene en una concentración 1N.

Procedimiento:

Elaborar la curva patrón de albúmina utilizando diferentes concentraciones, la albúmina se diluye en solución salina 0.85%.

1. Cada tubo de la curva se trabaja como una muestra independiente.

Se colocan 400ul de la muestra y se preparan diluciones al doble: 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 con solución salina 0.85%.

2. Agregar a cada tubo 900ul de reactivo A

3. Incubar a 50°C por 10 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente.

4. Agregar 100ul de reactivo B

5. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente

6. Agregar 3ml de reactivo C, mezclar inmediatamente para evitar la precipitación.

7. Incubar a 50°C durante 10 minutos. Dejar reposar a temperatura ambiente.

8. Leer en espectrofotómetro a 650nm.

C. REACTIVOS PARA LA PRUEBA DEELISA

1. SOLUCION CARBONATO / BICARBONATO pH 9.6

Na_2CO_3	0.159g
NaHCO_3	0.293g
Agua destilada	100ml

Preparar y utilizar el mismo día.

2. SOLUCION REGULADORA DE FOSFATOS (PBS-TWEEN)

NaCl	8g
KCl	0.2g
KH_2PO_4	0.15g
Agua destilada	1000ml
Tween 20	0.5ml

Ajustar pH a 7.2 - 7.4

Puede prepararse 10X o 20X. Almacenar en refrigeración.

3. SOLUCION REGULADORA DE DIETANOLAMINA pH 9.8

Dietanolamina	97ml
Agua destilada	800ml
MgCl ₂ . 6H ₂ O	40mg
Ajustar el pH a 9.8 con HCl puro (37%)	
Agua destilada	Completar a 1000ml

D. REACTIVOS PARA WESTERN BLOT

1. SOLUCION A (Solución de monómero para el gel de separación)

[30.8 T 2.6% bis]

Acrilamida		30.0 g
N,N - metilen-bisacrilamida		0.8 g
Agua destilada	hasta	100.0 ml

Si la acrilamida utilizada no es de alta pureza, adicionar carbono activado (1 g/ 100ml) y agitar toda la noche. Filtrar con papel Wathman 3x hasta que quede libre de residuos de carbono activado. Almacenar la solución a 4°C protegida de la luz. Descartar la solución después de 30 días ya que la acrilamida se hidroliza a ácido acrílico y amonio.

Precaución : los monómeros de acrilamida son neurotóxicos , deben ser manejados con las debidas precauciones.

2. SOLUCION B (Buffer de gel de separación)

[TRIS-Cl 1.5M pH 8.8, SDS 0.4%]

TRIS		18.17 g
SDS 20% [en agua destilada]		2.0 ml
Agua destilada	hasta	100.0 ml

Ajustar a pH 8.8 con HCl 6N . Guardar a 4°C

3. SOLUCION C (Monómero de acrilamida para el gel stacking)

[31.6% T 5%bis]

Acrilamida	30.0 g
N,N-metilen-bisacrilamida	1.6 g
Agua destilada	hasta 100.0 ml

Preparar como la solución A. Usar y guardar a 4°C.

4. SOLUCION D (Buffer para gel de stacking)

[TRIS-Cl 0.5M pH 6.8 SDS 0,4%]

TRIS	6.06 g
SDS 20%	2.0 ml
Agua destilada	hasta 100 ml

Llevar a pH 6.84 con HCl 6N Es preferible dejar el pH en 6,82, 6.83, evitar cuadrarlo con NaOH. Si se pasa el pH es recomendable preparar el doble de la solución.

PREPARACION DE GELES Y BUFFERS

5. GEL DE SELLADO (para un gel pequeño)

Gel de separación sin persulfato ni TEMED	1.0 ml
---	--------

Persulfato 2% 100 ul

TEMED 2.5 ul

6. GEL DE CORRIDO O SEPARACION (Véase cuadro)

Concentración del gel	7.5%		8.0%		10.0%		12.0%		15.0%	
	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10
Agua destilada ml	10.0	5.0	9.7	4.85	8.4	4.2	7.2	3.6	5.1	2.55
Solución A ml	5.0	2.5	5.3	2.65	6.6	3.3	7.8	3.4	9.9	4.95
Solución B ml	5.0	2.5	5.0	2.5	5.0	2.5	5.0	2.5	5.0	2.5
Persulfato 2% ul	300	150	300	150	300	150	300	150	300	150
TEMED ul	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10

7. GEL DE STACKING [T 4.5% Cbis 5%]

	10 ml	5ml	2.5ml
Agua bidestilada	6.3 4ml	3.17	1.57
Solución C	1.5 ml	0.75	0.375
Solución D	2.5 ml	1.25	0.625
Persulfato 2%	150 ul	75ul	37.5ul
TEMED	20 ul	10ul	5ul

8. (4X) BUFFER LAEMMLI O BUFFER DE LA MUESTRA

[TRIS Cl 0.125M, pH6.8, SDS 5.1%, glicerol 20%, EDTA 0.01M, B-mercaptoetanol 10%, Bromofenol 0.04%]

Solución D	2.5 ml
SDS 20%	2.5 ml
Glicerol	2.0 ml
EDTA 0.1M	0.1 ml
b- mercaptoetanol	1.0 ml
Azul de bromofenol 0.4% (w/v)	1.0 ml
Agua destilada	hasta 10 ml

Mezclar los componentes y almacenar alicuotado (100ul) en congelador (hasta seis meses).

9. BUFFER DE CORRIDO

[TRIS 0.025M, Glicina 0.192 M, pH 8.3, SDS 0.1%]

TRIS	3.029 g
Glicina	14.41 g
SDS	1.0 g
Agua bidestilada	hasta 1000.0 ml

Mezclar los reactivos. El pH (8.3- 8.5) no necesita ser chequeado. Puede reutilizarse 4-5 veces.

10. BUFFER DE TRANSFERENCIA

TRIS	3.029 g
glicina	14.4 g
Metanol	200 ml
agua destilada	hasta 1000ml

Se puede reutilizar 4-5 veces.

11. COLORACION CON AZUL DE COOMASSIE

Metanol	300ml
Acido acético	72ml
Azul de Commassie	0.9g
Agua destilada	Completar a 600ml

Depositar el gel en esta solución por 20 minutos. El colorante puede reutilizarse.

Solución decolorante fuerte:

Metanol	500ml
Acido acético	70ml
Agua destilada	Completar a 1000ml

Dejar el gel de 1 - 12 horas en continua agitación.

Solución decolorante débil:

Metanol	250ml
Acido acético	70ml
Agua destilada	Completar a 1000ml

En esta solución se puede dejar el gel por tiempo indefinido.

12. COLORACION DE TRANSFERENCIA DE PONCEAU

Ponceau (rojo de Ponceau 0.5% w/v Acido acético 1%)

Rojo de Ponceau	0.5 g
Acido acético glacial	1.0 ml
Agua destilada	98.5ml

PROCEDIMIENTO

Coloque la transferencia en una refractaria limpia.

Lave la membrana de nitrocelulosa con agua destilada

Añada rojo de Ponceau en cantidad suficiente para que cubra la transferencia por 5 min.

Decolore con agua destilada o el buffer con el que hará los lavados de la membrana hasta que las bandas desaparezcan completamente.

REVELADO CON FOSFATASA ALCALINA

13. SOLUCION BLOQUEADORA DE ACTIVIDAD ENDOGENA

(TRIS 0.020 M pH 7.4, NaCl 0.500M, metanol 2%, HCl 12N 1%)

TRIS 0.5M	4ml
NaCl 2.0M	25ml
Metanol	2.0ml

HCL 12N (37%)	1.0ml
Agua destilada	Completar a 100ml

14. SOLUCION PARA LAVADOS

(TRIS 0.020M, pH 7.4, NaCl 0.500M, Tween 20 3%)

TRIS 0.5M	20ml
Na Cl 2.0M	125ml
Tween 20	0.5ml
Agua destilada	Completar a 500ml

Almacenar en refrigeración. Los lavados también pueden realizarse con PBS-Tween (ELISA).

15. SOLUCION BLOQUEADORA DE SITIOS INESPECIFICOS DE UNION

(TRIS 0.020M, pH 7.4, NaCl 0.500M, Tween 20 3%, Leche descremada 5%, Suero de cabra 1%)

TRIS 0.5M	4.0ml
NaCl 2M	25ml
Tween 20	0.1ml
Leche descremada	5.0g
Agua destilada	Completar a 100ml

ANTICUERPOS CONJUGADOS CON FOSFATASA ALCALINA

16. SOLUCION ACTIVADORA DE LA FOSFATASA

(TRIS 0.050M, MgCl₂ 0.004M pH9.8)

TRIS 0.5M 50ml

MgCl₂ 0.1M 20ml

Agua destilada Completar a 500ml

Austar el pH a 9.8 con HCl 6N

17. SOLUCION REVELADORA (NBT + BCIP) [50ug/ml]

Por cada 10ml de solución activadora de la fosfatasa, agregar 33ul de BCIP y 66ul de Nitro azul de Tetrazolio (NBT).

ANEXO A

Huevos embrionados de *Toxocara canis* : a. Huevo sin embrionar;
b. Huevo embrionado.

