



# Antígenos del líquido pseudocelómico de *Toxocara canis* identificados mediante la técnica de Electroinmunotransferencia utilizando anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus*

Seudocelómico fluid antigens of *Toxocara canis* identified by Immunoblott technique using antibodies produced in *Oryctolagus cuniculus*

Juan José Colina Venegas<sup>1</sup>, Deysi Leiva Varas<sup>1</sup>, Hermes Escalante Añorga<sup>2</sup> y César A. Jara<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Exalumno Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. <sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

## RESUMEN

Se identificó los antígenos del líquido pseudocelómico (LS) de *Toxocara canis* mediante la técnica de Electroinmunotransferencia o “Western Blot”, utilizando suero hiperinmune producido en *Oryctolagus cuniculus* inmunizado experimentalmente. El LS se obtuvo de ejemplares hembras del parásito obtenidos por desparasitación con Mebendazol de cachorros de *Canis familiaris* y se utilizó para inmunizar, junto con el adyuvante completo e incompleto de Freund, a un ejemplar de *O. cuniculus*, a fin de obtener el suero hiperinmune. La técnica de Western blot se hizo con LS tratado y no tratado con Dithiothreitol (DTT).

Los pesos moleculares, en kilodaltons (KDa) de los antígenos tratados con DTT fueron: 125.8; 97.7; 66.8; 64.6; 57.5; 44.8; 43.4; 41.7; 34.8; 25.1; 21.9; 18.2; 15.5; 15.1; 14.1 y 9.1 KDa, mientras que los que no fueron tratados presentaron los siguientes pesos: 125.8; 97.7; 66.8; 65.3; 64.6; 57.5; 45.2; 43.4; 35.1; 30.9; 24.5; 23.0; 21.9; 18.2; 17.4; 15.5; 14.1 y 9.1 KDa. Se concluye que el LS de *T. canis* contiene proteínas antigénicas que podrían ser de utilidad en pruebas diagnósticas.

**Palabras clave:** *Toxocara canis*; Líquido pseudocelómico; Electroinmunotransferencia

## ABSTRACT

Pseudocelomic Fluid (PF) Antigens of *Toxocara canis* by means of an Electro Immuno Transfer Blotting assay was identified using immune serum obtained in *Oryctolagus cuniculus* experimentally immunized. PF was obtained from adult female of *T. canis* obtained from nine dogs of *Canis familiaris*, desparasitized with mebendazole, which was used to immunized, with complete and incomplete Freund's adjuvant, a specimen of *O. cuniculus*, in order to obtain the immune serum, which was used to detected Pseudocelomic Fluid Antigens By means of Electro Immuno Transfer Blotting, of which a part of Pseudocelomic Fluid was treated with Dithiothreitol (DTT), whereas, the other part wasn't treated. Molecular weight of antigens treated with DTT

were: 125.8; 97.7; 66.8; 64.6; 57.5; 44.8; 43.4; 41.7; 34.8; 25.1; 21.9; 18.2; 15.5; 15.1; 14.1 y 9.1 KDa; whereas, antigens weren't treated with DTT were: 125.8; 97.7; 66.8; 65.3; 64.6; 57.5; 45.2; 43.4; 35.1; 30.9; 24.5; 23.0; 21.9; 18.2; 17.4; 15.5; 14.1 y 9.1 KDa. These results indicate that Pseudocelomic Fluid of *T. canis* contain antigenic proteins

**Keys words:** *Toxocara canis*, Pseudocelomic Fluid, Electro Inmuno Transfer Blotting

## INTRODUCCIÓN

La toxocariosis es una infección parasitaria de diversas especies de animales y del hombre causado por larvas de *Toxocara canis* y *T. cati*, ascaridios intestinales de perros y gatos, sus huéspedes definitivos naturales<sup>1</sup>. En el hombre esta parasitosis afecta diversos órganos tales como hígado, pulmones, cerebro y ganglios produciendo patologías denominadas: síndrome de larva migrans visceral, síndrome de larva migrans ocular, toxocariosis neurológica y toxocariosis encubierta<sup>2-4</sup>. Se ha determinado que se presenta principalmente en niños<sup>2,5</sup>; sin embargo, se han detectado casos en humanos adultos<sup>3,4,6</sup>.

El suelo juega un rol muy importante en la diseminación de esta zoonosis parasitaria, ya que, al tratarse de un geohelminto, necesita de este ambiente para lograr que los huevos inmaduros provenientes de las heces de perros parasitados, logren su estado infectivo. Esta característica ha conducido a la ejecución de una serie de investigaciones dirigidas a detectarlos en suelos principalmente de parques recreativos o patios traseros en el Perú<sup>7-9</sup>, así como en otros países como, Brasil<sup>10</sup>, Chile<sup>11</sup>, argentina<sup>12</sup>, México<sup>13</sup>, Venezuela<sup>14</sup>. También se ha realizado una investigación en la cual se evalúa la antigenicidad e infectividad de los huevos de *T. canis* después de un periodo de conservación<sup>15</sup>.

Actualmente, se debe tener en cuenta hasta cinco datos clínicos para catalogar una toxocariosis sintomática en humanos: las características de la historia del paciente, los signos y síntomas clínicos encontrados, una inmunoserología positiva, la presencia de eosinofilia y niveles incrementados de IgE total<sup>16</sup>. Entonces, el diagnóstico definitivo se logra mediante la detección de larvas en biopsias del tejido afectado o en necropsias<sup>16</sup>, debido a que no es posible utilizar métodos coproparasitológicos para detectar huevos en heces porque el parásito no desarrolla la forma adulta<sup>16,17</sup>; mediante imagenología<sup>16</sup> o mediante la detección del ADN del nematodo mediante técnicas moleculares como el PCR<sup>18</sup>. Sin embargo, estas técnicas o son caras y no están al alcance de la población afectada o son de difícil proceso. Ante esto, el uso de la serología constituye una herramienta útil para confirmar la sospecha clínica del paciente<sup>16</sup>.

Tanto para el diagnóstico clínico como para estudios epidemiológicos de la toxocarosis se ha utilizado diversas técnicas serológicas, dentro de las cuales la de ELISA con antígenos de excreción-secreción ha demostrado ser la más útil para la detección de anticuerpos por su elevada especificidad y sensibilidad en diferentes líquidos corporales<sup>3,16,19,20,21,22,23,24</sup>. Para incrementar la especificidad de la prueba se han desarrollado estrategias como la absorción previa de los anticuerpos inespecíficos con extractos antigénicos de *Ascaris suum*, o las pruebas de avidéz de los anticuerpos IgG, de tal manera que solo los anticuerpos específicos puedan ser detectados durante el ensayo inmunoenzimático<sup>3,5,21,26</sup> y la utilización tanto del ELISA-IgG y ELISA-IgG4, que ayudan a mejorar el serodiagnóstico<sup>27</sup>. Un resultado falso positivo puede darse en pacientes con ascariosis, strongiloidosis, triquinelosis, fasciolosis y otras helmintiasis relacionadas<sup>4,16,21,28</sup>.

La técnica de Electroinmunotransferencia, también denominada Western Blot, es otra técnica actualmente utilizada en la detección de anticuerpos anti-*T. canis* y es considerada, por su elevada especificidad, como una prueba de confirmación de la toxocariosis en humanos<sup>29-31</sup> y en cachorros de perro<sup>32</sup>. Los antígenos con los cuales se han trabajado esta técnica son: del extracto adulto de *T. canis* donde identificaron antígenos de 42, 58, 68 y 97 KDa<sup>33</sup>; antígenos de excreción-secreción de larvas infectivas siendo los pesos moleculares encontradas en este caso de 200, 80, 48, 43, 34, 33, 31, 27, 25 y 13 KDa<sup>34</sup>; y antígenos de excreción- secreción de larvas infectivas y tisulares, siendo los pesos moleculares de los antígenos para el primer caso de 12, 28- 30, 40, 42, 50, 55, 62, 66, 97, 102, 112, 116 y 132 KDa, y para el segundo caso de 15, 20, 32, 40, 50, 55, 66 y 132 KDa<sup>35</sup>. Esta técnica se ha utilizado también en la detección de anticuerpos inducidos por otros helmintos tales como *Ascaris suum*<sup>36</sup> *Cysticercus cellulosae*<sup>37</sup>, *Taenia solium*<sup>38</sup>, *Ecchinococcus granulosus*<sup>39</sup>, *Fasciola hepática*<sup>40</sup> e *Hymenolepis nana*<sup>41</sup>.

Considerando que la toxocariosis se desarrolla en forma asintomática por varios años, llegando a manifestarse tardíamente a nivel ocular y neuronal, que el potencial de riesgo de contraer la toxocariosis en nuestro país es alto y que los trabajos son escasos. Además, que el diagnóstico clínico de la infección por *T. canis* resulta dificultoso, debido a, su sintomatología similar a otras patologías, que no se pueden encontrar huevos en heces y que el hallazgo de larvas en tejidos mediante biopsias de los granulomas es un hecho excepcional, la demostración de anticuerpos en suero es la única herramienta útil y confiable; asimismo, considerando que la obtención del antígeno para dichas pruebas es muy laborioso y por tanto costoso se hace necesario buscar fuentes de antígenos tan útiles como las disponibles y de modo menos laborioso, pudiendo ser una de esas fuentes el líquido pseudocelómico, teniendo en cuenta que puede obtenerse en mayores cantidades, en menos tiempo y con menores costos que los mencionados antígenos de excreción-secreción que son los más usados. Para ello, es necesario determinar si dicho Líquido tiene naturaleza antigénica.

En este informe se presentan los resultados de una investigación que estuvo dirigida a identificar a los antígenos presentes en el líquido pseudocelómico de *T. canis* mediante la técnica de Electroinmunotransferencia utilizando suero inmune contra el Líquido Pseudocelómico de *T. canis* obtenidos en *Oryctolagus cuniculus* inmunizado experimentalmente.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### **Obtención de las formas adultas de *T. canis***

Se obtuvieron mediante la desparasitación de los ejemplares de *Canis familiaris*, mediante la administración, vía oral, de mebendazol (200 mg/ 10 mL), parasitados naturalmente y verificado este fenómeno mediante el análisis de muestras fecales. Los ejemplares adultos del parásito se recolectaron en un frasco con Solución Salina Fisiológica (SSF), previo lavado para eliminar la materia orgánica.

### **Obtención del líquido pseudocelómico (LSTc).**

Los ejemplares hembras de *T. canis* obtenidos fueron lavados cinco veces con SSF estéril y una con SSF más antibióticos (Gentamicina 0.5 ml/100mL y Penicilina G sódica 0.5 mL/100mL 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 se recolectó el Líquido Pseudocelómico en un vial estéril; el cual fue conservado en refrigeración a -20 °C hasta ser utilizado.

### **Determinación de concentración de proteínas**

El Líquido Pseudocelómico fue centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos a 4 °C, luego se determinó la concentración de proteínas por el método colorimétrico de Bradford<sup>42</sup>.

### **Obtención del suero anti-líquido pseudocelómico de *T. canis* en *O. cuniculus***

Se utilizó un conejo obtenido del Bioterio del Instituto Nacional de Salud del Perú (INS), al cual se le inmunizó con 1 ml de líquido Pseudocelómico y 1 ml adyuvante completo de Freund la primera inmunización y las tres restantes con adyuvante incompleto; se le inoculó vía subcutánea en cada una de las caras externas e internas de las patas posteriores y en el lomo, cada 7 días. Previo a esto se obtuvo sangre mediante punción cardiaca para la obtención del suero preinmune. A las cinco semanas de la primera inmunización se obtuvo una muestra de sangre del conejo por punción cardiaca, la cual fue centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos para obtener el suero inmune que fue conservado a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

#### **Determinación de los pesos moleculares de los antígenos del líquido pseudocelómico (LS) por la técnica de Electroinmunotransferencia.**

La ejecución de la técnica de la Electroinmunotransferencia y la preparación de los reactivos se realizó siguiendo las indicaciones sugeridas por Escalante y cols<sup>38</sup>, con las siguientes particularidades: (i) los antígenos del LS fueron preparados a la concentración de 0.05 ug/uL, una parte de los antígenos fueron tratados con dithiothreitol (DDT), 1% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 6% de glicerol y 0.025% de azul de Bromofenol y la parte restante se preparo sin DDT, (ii) la SPS-PAGE se realizó a la concentración del 15% de acrilamida del gel separador y al 3% del gel concentrador, colocando 15ul 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, alcance el extremo inferior del gel, (iii) la transferencia se hizo en una cámara de electroforesis horizontal (Trans- Blot Cell, Bio Rad) a 100V por espacio de una hora y a 4°C, utilizando un buffer de transferencia constituido por 0.2M 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 (SDS- PAGE Molecular Weight Standards Low Range), hallándose la movilidad relativa (Rf) del marcador y de los antígenos en estudio.

## **RESULTADOS**

Se obtuvo 1.5 mL de LS de 50 ejemplares hembras de *T. canis*, la cual tuvo una concentración de proteínas de 8500 mg/mL.

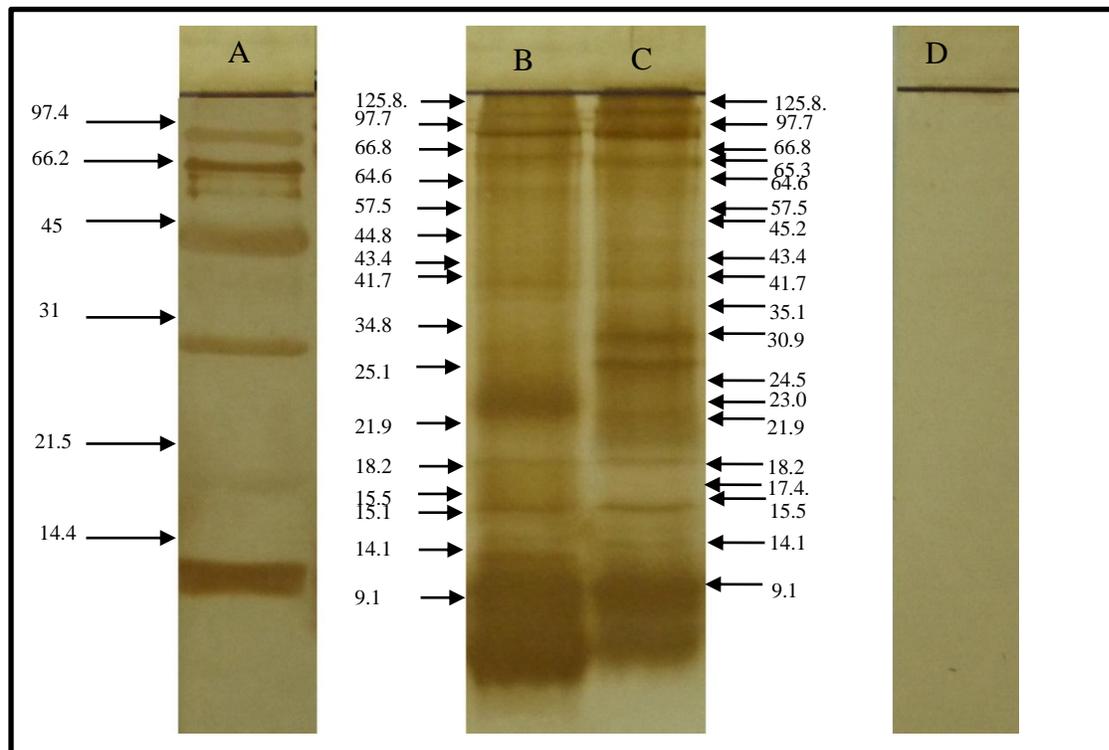
Los pesos moleculares de los antígenos del LSTc. obtenidos a la concentración de 0.05 ug/uL tratados con DTT fueron: 125.8; 97.7; 66.8; 64.6; 57.5; 44.8; 43.4; 41.7; 34.8; 25.1; 21.9; 18.2; 15.5; 15.1; 14.1 y 9.1 KDa.; mientras que, los pesos moleculares de los antígenos del Líquido Pseudocelómico que no se trataron con DTT fueron: 125.8; 97.7; 66.8; 65.3; 64.6; 57.5; 45.2; 43.4; 35.1; 30.9; 24.5; 23.0; 21.9; 18.2; 17.4; 15.5; 14.1 y 9.1 KDa (Fig 1).

## **DISCUSIÓN**

Los huevos de *T. canis* encontrados en las heces de los ejemplares de *C. familiaris* se reconocieron por la presencia de numerosas focetas, característica que lo diferencia claramente de los huevos de otras especies de helmintos parásitos del perro, sobre todo de la especie del género *Toxascaris*, *T. leonina*<sup>43</sup>. Este aspecto resulta de suma importancia porque asegura que se está trabajando con la especie elegida convalidando los resultados. La identificación de *T. canis* se refuerza, finalmente, cuando se dispone del estado adulto y al observar las aletas cervicales, se aprecia que son poco prominentes y no continuas comparadas con las de *Toxascaris leonina*<sup>43</sup>.

Un aspecto de suma importancia en investigaciones de naturaleza semejante a la presente es evaluar la fuente de antígeno y, en consecuencia, la naturaleza de la contraparte del sistema inmunológico: los anticuerpos. Al respecto, se ha verificado que, en primer lugar, el volumen del antígeno depende del tamaño y de la cantidad de parásitos; así, por ejemplo, cuando se utiliza

como fuente de antígeno a las larvas para obtener los denominados productos de excreción-secreción, se requiere miles de larvas <sup>29; 34; 35</sup>, mientras que al utilizar la forma adulta para el mismo propósito se utilizan menos<sup>44</sup>; sin embargo, en ambos casos la cantidad de proteínas



**Fig 1.** Pesos moleculares de bandas antigénicas del Líquido Pseudocelómico de ejemplares hembras de *Toxocara canis* detectadas por suero inmune producidos en *Oryctolagus cuniculus* mediante la técnica de Electroinmunotransferencia.  
A: PM (KDa)  
B: Antígenos del líquido pseudocelómico con Dithiothreitol  
C: Antígenos del líquido pseudocelómico sin Dithiothreitol  
D: Control con suero preinmune

obtenidas (los probables antígenos) es generalmente escasa, lo que conduce a repetir la obtención de los mencionados productos de excreción-secreción, con una mayor demanda de tiempo y dinero, ya que tal obtención se hace en un medio mínimo esencial compuesto solamente por aminoácidos como fuente de alimento <sup>29; 34; 35; 44</sup>. Frente a esto, resulta ventajoso el uso del LS que se obtiene de pocos ejemplares (50 ejemplares) y en mayor volumen cuando las hembras alcanzan mayor tamaño.

Otro aspecto que merece atención respecto de la fuente de antígeno, es el tiempo y la cantidad en el que se dispone. En efecto, como ya se ha mencionado, para obtener antígenos totales se requiere de un sonicador, ya que la sonicación es la mejor manera de su obtención comparada con otros mecanismos <sup>36; 44</sup> y cuando se quiere obtener los productos excretados- secretados se requiere del medio de cultivo mínimo esencial, de una incubadora y por lo menos 18 horas <sup>29; 35</sup>. Por el

contrario, el LS se obtiene como tal y solo requiere centrifugar, igual que en los otros casos, además, se puede obtener de nematodos recientemente muertos.

La vía utilizada para inmunizar al conejo con los antígenos del LSTc. en el presente trabajo, así como en otros de su naturaleza<sup>29; 34; 36; 44</sup>, fue la vía subcutánea; debido a que, es la más adecuada para desencadenar una respuesta inmune eficiente y como consecuencia la mayor producción de anticuerpos en relación con otras vías como la intravenosa y oral<sup>45</sup>. La dosis de inmunización también fue la adecuada, ya que para lograr una buena respuesta inmune en el conejo se necesita una concentración entre 50 y 1000 ug/ mL<sup>46</sup>. Al mismo tiempo, al no conocer la naturaleza antigénica del LSTc. y para una buena producción de anticuerpos fue necesario el uso del adyuvante de Freund, ya que, actúa como potenciador de la respuesta inmune<sup>47</sup>, en cuatro inoculaciones: como adyuvante completo la primera inmunización e incompleto las tres restantes. Este protocolo también resultó eficaz en otras investigaciones<sup>34; 35; 36</sup>.

La técnica de Electroinmunotransferencia, que es la combinación de la electroforesis y la técnica de ELISA<sup>47</sup>, usada en la presente investigación posee una elevada especificidad y sensibilidad, por lo cual es utilizada para diagnosticar una serie de parasitosis<sup>30; 32; 37; 38</sup>. Sin embargo, también se utiliza para evaluar la eficacia de los antígenos a través de su especificidad y sensibilidad, que es el primer paso para determinar si es o no de utilidad en el diagnóstico; así se ha seguido en el proceso para disponer finalmente de un kit, como es el caso de la cisticercosis, hidatidosis y fasciolosis.

Los antígenos deben mezclarse con Dodecilsulfato de Sodio (SDS), que carga negativamente a las proteínas para que migren al ánodo durante el proceso de corrido, además, una parte del LSTc. mezcló, también con DTT, que transforma a las proteínas de estructura compleja a simples<sup>48; 49</sup>; sin embargo al procesar las proteínas del LSTc. tanto reducidos como sin reducir se obtuvo que las últimas resultaron mejor definidas; esto significa que los antígenos presentes son mayormente proteínas simples.

La evidencia o ausencia de algunas de las bandas antigénicas puede deberse a la acción desnaturalizante del DTT, ya que afecta a las proteínas, exponiendo sus epítopes, para facilitar su interacción con los anticuerpos, teniendo como consecuencia la aparición de nuevas bandas antigénicas; o simplemente puede alterar los epítopes de las proteínas y por ende desaparecer la banda antigénica al ser revelado<sup>50</sup>.

En trabajos anteriores, utilizaron la Electroinmunotransferencia para poder detectar anticuerpos contra la toxocarosis humana, utilizando antígenos de excreción- secreción y somáticos de estadios adultos de *T. canis*; y sueros de conejos inmunizados experimentalmente, se obtuvieron 10 bandas antigénicas de las cuales cinco eran comunes con bandas que reaccionaron con suero de humanos. Los antígenos de peso molecular 35.1 y 30.9 KDa detectados en la presente investigación, coinciden con antígenos similares de dicho trabajo. Además, el antígeno de 30.9 KDa al ser similares al antígeno de 30.5 KDa, que apareció tanto en los antígenos somáticos como en los antígenos de excreción secreción<sup>44</sup>, se podría sugerir que parte del Líquido Pseudocelómico conforma los productos de excreción. Las bandas de 66.8 y 97.7 KDa al ser cercanas se relacionarían estrechamente con las bandas de 68 y 97 KDa detectadas en otra investigación donde utilizaron como antígenos extracto crudo de la forma adulta del parásito<sup>33</sup>.

Los antígenos obtenidos del LSTc. también coinciden con antígenos de excreción- secreción de estadios larvarios; así tenemos que, las proteínas de 35.1 y 30.9 KDa están relacionadas con las proteínas de 35 y 30 KDa detectadas en otra investigación, donde se sugirió que, la proteína de 35 KDa era altamente específica para la infección con *T. canis*<sup>31</sup>. En otro estudio, se utilizó suero de

conejos inmunizados, también, con antígenos de excreción- secreción de larvas de *T. canis*, se obtuvieron antígenos de 92, 80, 66, 45, 35 y 28 KDa, de las cuales, tres de ellas, coinciden con antígenos del Líquido Pseudocelómico (66.8, 45.2 y 35.1 KDa) del presente trabajo; además en el mismo trabajo se identificaron dos bandas que se mantienen durante todo el curso de la infección por *T. canis*, 92 y 35 KDa, siendo esta última similar al antígeno de 35.2 KDa identificada en la presente investigación<sup>29</sup>.

Algunos de los antígenos hallados también tienen una estrecha relación con antígenos de excreción- secreción que reaccionaron con sueros de pacientes con toxocariosis, así, las bandas de 66.8, 57.4, 43.4, 30.9 y 23.0 KDa encontradas coinciden con las bandas de dicha investigación (67.6, 55.6, 43.9, 32.4, 26.6 y 23.4 KDa)<sup>30</sup>. Otros autores, utilizando antígenos de excreción- secreción, hallaron bandas de 29-38, 48- 54, 95- 116, 121- 162 y mayor a 205 KDa, las que se pueden comparar con las bandas de 30.9, 35, 97.78 y 125.8 KDa<sup>51</sup>.

La Electroinmunotransferencia también ha sido utilizada para detectar anticuerpos en sueros de perros con toxocariosis. Es así que, en una investigación se obtuvo tres grupos de bandas antigénicas el primero incluyó siete de bajo peso molecular (16, 20, 23, 24, 28, 32 y 38 KDa); el segundo, tres de alto peso molecular (400, 200 y 120 KDa) y el tercero, antígenos de peso molecular intermedio (86, 74, 66 y 47); siendo los más reconocidos los antígenos de 32, 38, 66, 120 y 200 KDa, de las cuales los antígenos de 32 y 66 KDa son similares a las identificadas en este trabajo (30.9 y 66.8 KDa)<sup>32</sup>. En otro trabajo, detectaron 11 bandas cuyos pesos moleculares fueron: 200, 80, 60, 48, 43, 34, 33, 31, 27, 25 y 13 KDa, los cuales se observaron mejor sin reducir; lo que es similar al presente trabajo donde se detectaron bandas de 43.4, 35.1, 30.9 y 14.1 KDa, que por ser cercanas con las reportadas están estrechamente relacionadas con dichas bandas<sup>34</sup>.

El LSTc. estuvo conformado por tres grupos de antígenos, los cuales serían antígenos de bajo peso molecular, de peso molecular intermedio y antígenos de alto peso molecular; esto concuerda con otros autores que clasifican a los antígenos de *T. canis* también en estos grupos<sup>26; 29; 32</sup>. Pero se sugirió que los antígenos de alto peso molecular pueden causar reacciones cruzadas y los antígenos de bajo peso molecular serían más específicos para *Toxocara*<sup>26; 31</sup>.

El número de bandas, así como el tamaño exacto de las bandas antigénicas, varía de una publicación a otra, las diferencias se pueden atribuir a las condiciones de marcha, la fuente de marcadores de peso molecular y otros factores inherentes múltiples para el ensayo<sup>31</sup>.

El LSTc. podría actuar como una fuente de antígeno, ya que, comparte bandas similares con los antígenos del estadio larvario así como del estadio adulto, y ser usada con una técnica eficiente y confirmatoria para poder diagnosticar la toxocariosis humana, sobre todo si se halla a nivel cerebral u ocular donde se podrían confundir con otras patologías, como la cisticercosis cerebral. Además, serviría para diagnosticar la toxocariosis en caninos, especialmente en cachorros mayores de tres meses o en adultos, en los cuales ya no se encuentra la forma adulta, y por tanto no se detectan huevos en heces.

## CONCLUSIÓN

El Líquido Pseudocelómico contiene proteínas antigénicas, siendo los pesos moleculares de los que fueron tratados con DTT: 125.8; 97.7; 66.8; 64.6; 57.5; 44.8; 43.4; 41.7; 34.8; 25.1; 21.9; 18.2; 15.5; 15.1; 14.1 y 9.1 KDa; y sin tratar con DTT: 125.8; 97.7; 66.8; 65.3; 64.6; 57.5; 45.2; 43.4; 35.1; 30.9; 24.5; 23.0; 21.9; 18.2; 17.4; 15.5; 14.1 y 9.1 KDa.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Botero D, Restrepo M. Parasitosis humanas. 4<sup>ta</sup> ed. Medellín: Corporación para investigaciones biológicas. 2005.
2. Archelli S y Kozubsky L. Toxocara y toxocarosis. Acta Bioquim Clin Latinoam 2008; 42 (3): 379-384.
3. Roldán WH, Espinoza IA, Huapaya PE, Huiza AF, Sevilla CR, Jiménez S. Frequency of human Toxocarasis in a rural population from Cajamarca, Peru determined by Dot Elisa Test. Rev Inst Med Trop S Paulo 2009; 51 (2): 67- 71.
4. Park SP, Park I, Park HY, Lee SU, Huh S, Magnaval JF. Five cases of ocular Toxocarasis confirmed by serology. Korean J Parasitol 2000; 38 (4): 267- 273.
5. Campos D, Elefant GR, Melo e Silva EO de, Gandolfi L, Jacob CMA, Tofeti A, et al. Frequency of seropositivity to *Toxocara canis* in Children of different socioeconomic strata. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36 (4): 509- 513.
6. Alonso JM, López MA, Bojanich MV, Marull J. Infección por *Toxocara canis* en población adulta sana de un área subtropical de Argentina. Parasitol Latinoam 2004; 59: 61 – 64.
7. Catillo Y, Bazán H, Alvarado D, Sáez G. Estudio epidemiológico de *Toxocara canis* en parques recreacionales del distrito de San Juan de Lurigancho, Lima- Perú. Parasitol Día 2001; 25 (3-4):109-114.
8. Chávez VA, Casas AE, Serrano MM, Cajas UJ, Velarde OJ, La Rosa VV, López TJ. Riesgo de contraer enfermedades parasitarias en los parques públicos de lima y callao. Rev Inv Vet Perú 2002; 13 (2): 84-91.
9. López TF, Chávez VA, Casas AE. Contaminación de los parques públicos de los distritos de Lima oeste con huevos de *Toxocara* sp. Rev Inv Vet Perú 2005; 16 (1):76-81.
10. Guimaraes AM, Alves EGL, Resende GF de, Rodrigues MC. *Toxocara* sp. eggs and *Ancylostoma* sp. larva in public park, Brazil. Rev Saúde Pública 2005; 39 (2): 293- 295.
11. Salinas P, Matamala M y Schenone H. Prevalencia de hallazgo de huevos de *Toxocara canis* en plazas de la Región Metropolitana de la ciudad de Santiago, Chile. Bol Chil Parasitol. 2001; 56 (3-4): 102-105.
12. Brusoni C, Chistik, J, Fernández Canigia J. Estudio de la contaminación con huevos de *Toxocara* sp. en suelos de espacios públicos de San Martín de los Andes, Provincia del Neuquén. Argentina. Red Vet 2005; VI (10): 1- 13.
13. Romero Núñez C; García Contreras A Mendoza Martínez GD; Torres Corona NC; Ramírez Durán N. contaminación por *Toxocara* spp. en parques de Tulyehualco, México. Revista Científica 2009; XIX (3): 253-256
14. Devera R, Blanco Y, Hernández H, Simoes D. *Toxocara* spp. y otros helmintos en plazas y parques de Ciudad Bolívar, estado Bolívar (Venezuela). Enferm Infecc Microbiol Clin 2008;26(1):23-6
15. Chung L-Y, Fang B-H, Chang J-H, Chye S-M, Yen C-M. The infectivity and antigenicity of *Toxocara canis* eggs can be retained after long- term preservation. Ann Trop Med Parasitol 2004; 98 (3): 251-260.

16. Roldán WH, Espinoza YA, Huapaya PE, Jiménez S. Diagnóstico de la toxocariosis humana. Rev Perú Med Exp Salud Pública 2010; 27(4): 613-620
17. Magnaval JF, Glickman LT, Dorchie P, Morassin B. Highlights of human Toxocariasis. Korean J Parasitol. 2001; 39 (1):1-11.
18. Borecka A, Gawor J, Niedworok M, Sordyl B. Detection of *Toxocara canis* larvae by PCR in the liver of experimentally infected Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). Helminthologia 2008; 45, (3): 147-149.
19. Despommier D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. Clin Microbiol Rev. 2003; 16 (2):265-72.
20. Kennedy MW, Qureshi F, Fraser EM, Haswell-Elkins MR, Elkins DB, Smith HV. Antigenic relationships between the surface-exposed, secreted and somatic materials of the nematode parasites *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, and *Toxocara canis*. Clin.exp. Immunol. 1989; 75: 493-500.
21. Roldán W, Cornejo W, Espinoza Y. Evaluation of the dot enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with standard ELISA for the immunodiagnosis of human Toxocariasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101 (1): 71-74.
22. Espinoza Y, Huapaya P, Suárez R, Chávez V, Sevilla C, Dávila E, et al. Estandarización de la técnica de ELISA para el diagnóstico de Toxocariasis humana. An Fac Med 2003; 64 (1): 7- 12.
23. De Visser L; Rothova A, de Boer JH, Van Loon AM, Kerkhoff FT, Canninga-Van Dijk MR, et al. Diagnosis of Ocular Toxocariasis by Establishing Intraocular Antibody Production. Am J Ophthalmol 2008; 145 (2): 369-374.
24. Vidal JE, Sztajnbok J, Seguro AC. Eosinophilic meningoencephalitis due to *Toxocara canis*: case report and review of the literature. Am J Trop Med Hyg 2003; 69 (3): 341–343.
25. Cuéllar C, Fenoy S, del Águila C, Guillén JL. Isotype Specific Immune responses in murine experimental Toxocariasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96 (4): 549-553.
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 S Paulo 1997; 39 (5): 253- 256.
27. Noordin R, Smith HV, Mohamad S, Maizels RM, Fong MY. Comparison of IgG Elisa and IgG4 Elisa for *Toxocara* serodiagnosis. Acta Trop 2005; 93: 57- 62.
28. Dziemian E, Zarnowska H, Kolodziej- Sobocinska M, Machnicka B. Determination of the relative avidity of the specific IgG antibodies in Human Toxocariasis. Parasite Immunol 2008; 30: 187–190.
29. Morales OL, López MC, Nicholls RS, Agudelo C. Identification of *Toxocara canis* antigens by Western blot in experimentally infected rabbits. Rev Inst Med Trop S Paulo 2002; 44 (4): 213- 216.
30. López MA, Bojanich MV, Alonso ME, Alonso JM. Immunoblotting para diagnóstico de toxocariosis humana en un área subtropical. Parasitol Latinoam 2005; 60: 127- 131.
31. Roldán WH, Espinoza YA. Evaluation of an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test for the confirmatory serodiagnosis of human toxocariasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104 (3): 411-418.
32. Muñoz- Guzmán MA, Alba- Hurtado F. Antígenos de excreción / secreción de *Toxocara canis* reconocidos por cachorros del área metropolitana de la ciudad de México. Vet Méx 2010; 41 (1): 59- 64.
33. Peixoto PL, Nascimento E, Lopes Caçado GG, Cambraia de Miranda RR, Lunardi Rocha R, Araujo RN, et al. Identification of candidate antigens from adult stages of *Toxocara canis* for the serodiagnosis of human toxocariasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2011; 106 (2): 200-206.
34. Jara CA, Escalante- Añorga H, Díaz- Limay E, Reyes- Vega W. Antígenos de excreción- secreción de Geohelminthos parásitos del hombre productores de anticuerpos policlonales IgG. Sciendo 2003; 6 (1- 2): 81- 87.
35. Castro Sesquén YE. Antígeno de larvas infectivas y tisulares de *Toxocara canis* evaluadas mediante electroinmunotransferencia con anticuerpos de *Oryctolagus cuniculus* y de humanos. Tesis para optar el título de Biólogo- Microbiólogo. Trujillo, Universidad Nacional de Trujillo, 2006.

36. Escalante H, Liñan R, Díaz E, Davelois K, Huamanchay O. Antígenos de larvas pulmonares de *Ascaris suum* reconocidos por anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus*. Parasitol Latinoam 2005; 60: 132 – 137.
37. Escalante H, Torres P, Grupo de investigación en cisticercosis de la UPCH. Eficacia de la técnica de Western Blot con antígenos de fluido vesicular y glicoproteínas purificadas en el diagnóstico de la cisticercosis. Sciendo 1999; 2 (1- 2): 41- 45.
38. Escalante H, Davelois Atoc K, Torres P. Antígenos específicos de *Taenia solium* detectados por Western Blot usando sueros de paciente con parasitosis confirmada. Sciendo 1999; 2(1- 2): 33- 39.
39. Miranda E, Velarde F, Somocurcio J, Ayala E. Evaluación de dos pruebas de inmunoblot con antígeno hidatídico de caprino y ovino para el diagnóstico de equinococosis humana. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2010; 27(2): 209-214.
40. Colmenares C, Méndez L, Díaz-Bello Z, Alarcón de Noya B. Antígeno excreción-secreción de *Fasciola hepatica*: ultrafiltración y aplicación en inmunodiagnóstico. Acta bioquím Clín Latinoam. 2007; 41 (2): 259- 266.
41. Chávez-Salas F, Vásquez O, Escalante H. Evaluación de la técnica Western Blot para la detección de antígenos de *Hymenolepis nana*. Rev. Perú. Biol. 2007; 14(2): 283-286.
42. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem 1976; 72: 248- 254