

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina y Psiquiatría



**ESTUDIO DE LA RESPUESTA DUAL
DE ANTICUERPOS IgE E IgG
EN LA TOXOCARIOSIS HUMANA**

Y SU RELACIÓN CON EL FENÓMENO DE LA ATOPIA.

DESCRIPCIÓN DE ALERGENOS RELEVANTES

DE *TOXOCARA CANIS*

ADELA VALERO ADÁN

Tesis Doctoral

Alicante 2006

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina y Psiquiatría



**ESTUDIO DE LA RESPUESTA DUAL
DE ANTICUERPOS IgE E IgG
EN LA TOXOCARIOSIS HUMANA**

Y SU RELACIÓN CON EL FENÓMENO DE LA ATOPIA.

DESCRIPCIÓN DE ALERGENOS RELEVANTES

DE *TOXOCARA CANIS*

Memoria presentada por:

Dña. Adela Valero Adán

Para optar al grado de Doctor

Alicante 2006

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina y Psiquiatría

Los Dres. **D. JORGE MARTÍNEZ QUESADA** y **DÑA. REYES PASCUAL PÉREZ**, como Directores de la Tesis Doctoral “**ESTUDIO DE LA RESPUESTA DUAL DE ANTICUERPOS IgG E IgE EN LA TOXOCARIOSIS HUMANA Y SU RELACIÓN CON EL FENÓMENO DE LA ATOPIA. DESCRIPCIÓN DE ALERGENOS RELEVANTES DE *TOXOCARA CANIS***”, realizada en el Departamento de Medicina y Psiquiatría de la Facultad de Medicina de la Universidad Miguel Hernández de Alicante, por la Doctoranda **Dña. ADELA VALERO ADÁN**; autorizan la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En Alicante, a 25 de Septiembre del 2006

LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Firmado: **D. Jorge Martínez Quesada**

Firmado: **Dña. Reyes Pascual Pérez**



A mi marido, Antonio

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Por fin llega el capítulo de agradecimientos, que he estado haciendo y rehaciendo mentalmente durante este tiempo, y que ahora, que los debo escribir. ¡Seguro que se queda alguno en el tintero!

- A mi director de tesis, Jorge Martínez Quesada, por transmitirme su ilusión en todo momento, por su dedicación constante y orientación en la elaboración de toda esta tesis. Sin él, no hubiera podido realizar este trabajo. A Esther y a las niñas por haberles robado el tiempo de estar con él.

- A la Doctora Reyes Pascual Pérez, directora de esta tesis, por haberme brindado su apoyo en la realización de este trabajo.

- A los laboratorios Pharmacia (ahora Phadia), por su ayuda y colaboración en el desarrollo y elaboración de este trabajo.

- A Idoia y sus compañeros, por iniciarme en el fascinante mundo de las “larvas” y por su colaboración desinteresada.

- A mis compañeros del laboratorio del hospital de Elda y del hospital de Teruel, por su amistad y paciencia.
- A los pediatras de Teruel, a quienes he perseguido por todas las esquinas del hospital.
- A mi familia de Alcañiz, por su confianza y saber perdonar nuestras ausencias.
- A mi tía Maruja, por sus plegarias (seguro que han sido escuchadas) y a mis hermanos por su cariño y saber soportar mi único tema de conversación: “el *Toxocara*...”
- A Pepe, por ayudarme con el siempre complicado “ordenador”.



ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| ÍNDICE | 1 |
| | |
| INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 1.- EL PARÁSITO..... | 6 |
| 2.- EL CICLO BIOLÓGICO..... | 11 |
| 3.- CLÍNICA | 14 |
| 4.- TRATAMIENTO..... | 18 |
| 5.- RELACIONES HOSPEDADOR-PARÁSITO EN LA TOXOCARIOSIS HUMANA..... | 18 |
| 6.- ATOPIA Y ENFERMEDADES PARASITARIAS. TEORÍA DE LA HIGIENE..... | 22 |
| 7.- DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO..... | 27 |
| 8.- ESTUDIOS DE SEROPREVALENCIA HUMANA..... | 30 |
| | |
| JUSTIFICACIÓN | 33 |
| 1.- JUSTIFICACIÓN | 34 |
| | |
| OBJETIVOS..... | 37 |
| 1.- OBJETIVOS PRINCIPALES..... | 38 |
| 2.- OBJETIVOS SECUNDARIOS | 38 |

| | |
|--|-----------|
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 40 |
| 1.- POBLACIÓN DE ESTUDIO..... | 41 |
| 2.- OBTENCIÓN DE LOS ANTIGENOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN (ES) DE LARVAS INFECTANTES (L2) DE <i>TOXOCARA CANIS</i> | 44 |
| 2.1.- CULTIVO <i>IN VITRO</i> , ECLOSIÓN Y MANTENIMIENTO DE LAS LARVAS L2 DE <i>TOXOCARA CANIS</i> | 44 |
| 2.1.1. DESOVE <i>IN VITRO</i> DE <i>TOXOCARA CANIS</i> | 45 |
| 2.1.2. ECLOSIÓN DE LAS LARVAS DE <i>TOXOCARA CANIS</i> | 45 |
| 2.2.- OBTENCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN DE LARVAS L2 DE <i>TOXOCARA CANIS</i> | 47 |
| 2.3.- OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ANTIGÉNICO..... | 48 |
| 3.- CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS PRODUCTOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN..... | 49 |
| 3.1.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO DE LOS EXTRACTOS..... | 49 |
| 3.2.- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DODECIL SULFATO SÓDICO (SDS-PAGE). | 50 |
| 3.2.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA..... | 51 |
| 3.2.2. PREPARACIÓN DE LOS GELES..... | 52 |
| 3.3.- ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2D)..... | 54 |
| 4.- ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS INMOVILIZANTES E INMUNODETECCIÓN..... | 56 |
| 4.1.- ELECTROTRANSFERENCIA. | 56 |

| | |
|--|------------|
| 4.2.- INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS TRANSFERIDAS A MEMBRANAS..... | 57 |
| 4.3.- REVELADO POR QUIMIOLUMINISCENCIA | 59 |
| 5.- DETERMINACIÓN DE ATOPIA EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO | 60 |
| 6.- DETERMINACIÓN DE IgE TOTAL EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO..... | 63 |
| 7.- DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA CATIÓNICA DEL EOSINÓFILO EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO | 65 |
| 8.- DETERMINACIÓN DE EOSINÓFILOS EN LA POBLACION DE ESTUDIO | 66 |
| 9.- DETERMINACIÓN DE IgG ESPECÍFICA FRENTE A LOS ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN DE LARVAS INFECTANTES DE <i>TOXOCARA CANIS</i> | 67 |
| 10.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS..... | 69 |
| RESULTADOS..... | 71 |
| DISCUSIÓN..... | 96 |
| CONCLUSIONES..... | 114 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 117 |
| ABREVIATURAS | 140 |



INTRODUCCIÓN

1.- EL PARÁSITO.

La toxocariosis humana fue descrita, por primera vez, por WILDER, en 1950. Identificó una larva de nematodo en un granuloma retiniano de un niño, siendo una especie desconocida en ese momento. En 1952, BEAVER *et al.*, describen un grupo de niños con eosinofilia y síntomas sistémicos, en quienes se detecta *Toxocara canis* en el estudio histopatológico.

Desde entonces, la larva de este parásito se ha detectado en una gran variedad de lesiones, tanto oculares como distribuidas por el resto del organismo, en pacientes de todos los países del mundo.

Aunque los animales de compañía contribuyen beneficiosamente a la sociedad, constituyen un riesgo para la salud pública (ROBERTSON *et al.*, 2000) puesto que pueden ser portadores de un amplio rango de infecciones parasitarias, bacterianas, fúngicas y víricas transmisibles al hombre (MANFREDI y FELICITA, 1993). Una de estas enfermedades zoonóticas es la toxocariosis humana.

Toxocara canis (WERNER, 1782) es un nematodo parásito de cánidos, que también puede infectar a diversos mamíferos, incluido el hombre. (GLICKMAN y

SCHANTZ, 1981). Su fase infectante (L2) puede permanecer latente y resistir durante años fuera del hospedador, dentro del huevo.

Según la clasificación de *Sistema Naturae* 2000, *Toxocara canis* es un nematodo Rhabditoide perteneciente a la superfamilia Ascaridoidea dentro de la familia Toxocaridae, que conforma un único género, el género *Toxocara*. (Tabla 1)

Tabla 1.- Clasificación según *Sistema Naturae* 2000

Reino Animalia (Metazoa)

Subreino Bilateria

Phylum Nematoda

Clase Secernentea

Subclase Rhabditia

Orden Ascaridida

Superfamilia Ascaridoidea

Familia Toxocaridae

Género *Toxocara*

Especie *canis*

www.sn2000.taxonomy.nl

Aunque han sido descritas once especies de *Toxocara* (WARREN, 1970), sólo dos son causantes de enfermedad en el hombre (NAGAKURA *et al.*, 1990): *Toxocara canis* (WERNER, 1782), cuyo hospedador definitivo es el perro y *Toxocara cati* (SCHRANK, 1788), cuyo hospedador definitivo es el gato.

Los adultos del género *Toxocara* parasitan el tracto intestinal de sus hospedadores definitivos. Son de color blanquecino y poseen una cutícula que presenta estriaciones. (Figura 1).

Figura 1. [Adultos de *Toxocara canis*](#)

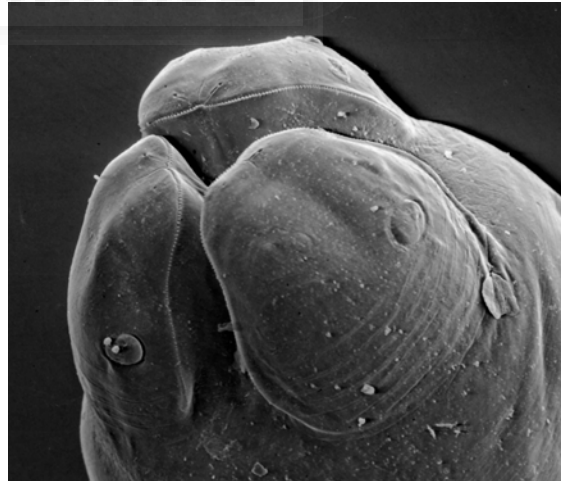


www.workforce.cup.edu

La hembra de *Toxocara canis*, tiene una longitud entre 6 y 18 cms, mientras que el macho mide entre 4 y 10 cms.

En la parte anterior del gusano adulto se encuentra la cavidad oral, formada por tres labios sin “inter-labios”. (Figura 2)

Figura 2. [Boca Adulto. *Toxocara canis*](#)



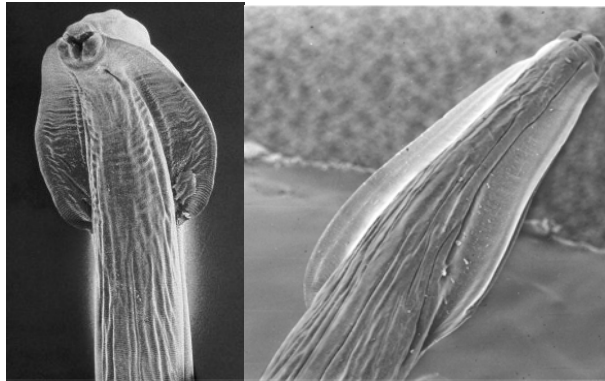
Presenta dos aletas cervicales que miden 2,5 x 0,2 mm, y tienen forma de punta de lanza.

www.workforce.cup.edu

Esta morfología nos sirve para su identificación, taxonomía y diferenciación de otras especies y géneros (WARREN, 1971). (Figuras 3 y 4)

Fig. 3. *Toxocara cati*

Fig. 4. *Toxocara canis*



www.users.unimi.it

El extremo posterior es romo en las hembras y puntiagudo en los machos, con dos espículas copulatrices.

Fig. 5. Huevo embrionado

Los huevos de *Toxocara canis* (Figura 5), son subsféricos, oscuros, de color marrón y de superficie irregular. Su tamaño es de 75 a 90 μm . Se distinguen dos membranas: una interna, lisa, no siempre visible, y otra membrana externa, gruesa y rugosa. En el interior se encuentra la larva, que ocupa casi la totalidad del espacio.

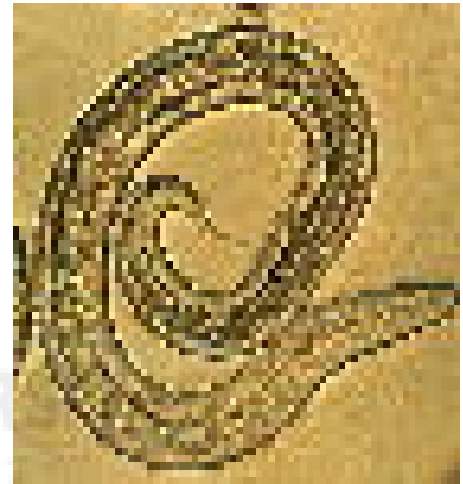


www.wormfree.co.uk

Toxocara canis atraviesa cuatro estadios larvarios desde el huevo hasta el estado adulto (L1, L2, L3 y L4). La fase infectante para el hombre es el segundo estadio larvario (L2).

Fig. 6. [Larva L2. *T. canis*](#)

Las larvas L2 son liberadas en el estómago del hospedador por la acción de los jugos gástricos. Miden 400 μm de largo, por 20 μm de ancho. Presentan un sistema secretor que está compuesto por dos columnas laterales, que convergen y se abren en la superficie anterior de la larva, a través de un único conducto de secreción (Figura 6).



www.cdfound.to.it

En la región anterior de la larva, el esófago está bien definido y unido a la glándula esofágica dorsal. En la parte posterior queda un vestigio de tracto intestinal, cerrado y no funcional.

2.- EL CICLO BIOLÓGICO.

- Ciclo biológico y toxocariosis en perros.

En el hospedador definitivo (cánidos) se completa el desarrollo hacia el estadio adulto. Las hembras de *Toxocara* depositan los huevos en el intestino del perro y éstos son eliminados con las heces al medio externo. Las hembras adultas pueden llegar a producir 200.000 huevos al día. Estos huevos no son, todavía, infectivos y requieren un periodo de incubación en el suelo (GLICKMAN y SHOFER, 1987). Cuando se dan las condiciones de humedad y temperatura adecuadas, los huevos embrionan, llegando en 2-5 semanas al estadio de larva infectante (L2) y permanecen viables tras largos periodos de tiempo hasta su ingestión por un nuevo hospedador.

Después de ser ingeridos, una vez en el estómago, se rompe la cubierta del huevo, las larvas atraviesan la pared intestinal y penetran en la circulación sanguínea por la que inician una migración hacia el hígado, vía porta. Algunas larvas quedarán retenidas por la reacción inflamatoria del hígado, y el resto seguirá camino hacia el pulmón, atravesando la cavidad derecha del corazón. En cachorros de menos de seis semanas, las larvas L2 pasan los alvéolos

pulmonares y a partir de ahí, son deglutidas con las secreciones traqueo-bronquiales, convertidas ya en larvas de tercer estadio (L3).

Llegan al estómago y posteriormente finalizan su desarrollo en el intestino, donde en las siguientes tres a cinco semanas, las larvas sufren la cuarta y última muda, fase adulta (L4).

Si el perro es mayor de seis semanas, no pasan la luz alveolar y continúan en la circulación, distribuyéndose por todo el organismo: pulmones, útero, etc.

En cánidos hembras preñadas, debido al estímulo hormonal, las larvas que se encuentran en estado latente, pueden reactivarse provocando una infección transplacentaria e infectar a los cachorros gestados (DUBEY, 1978). También, las larvas, pueden migrar a las glándulas mamarias (BURKE y ROBERSON, 1985) y causar una infección postnatal al amamantar a sus crías, así pues, las hembras de cánidos son un reservorio de primer orden en la infección por *Toxocara*.

Se han detectado larvas latentes en tejidos, nueve años después de una infección (BEAVER, 1962). De igual forma se pueden mantener *in vitro*, hasta 18 meses (DE SAVIGNY, 1975) constatándose en estos cultivos una elevada actividad metabólica, secretando y excretando glicoproteínas al medio, muy útiles para el diagnóstico de la toxocariosis (MAIZELS *et al.*, 1984).

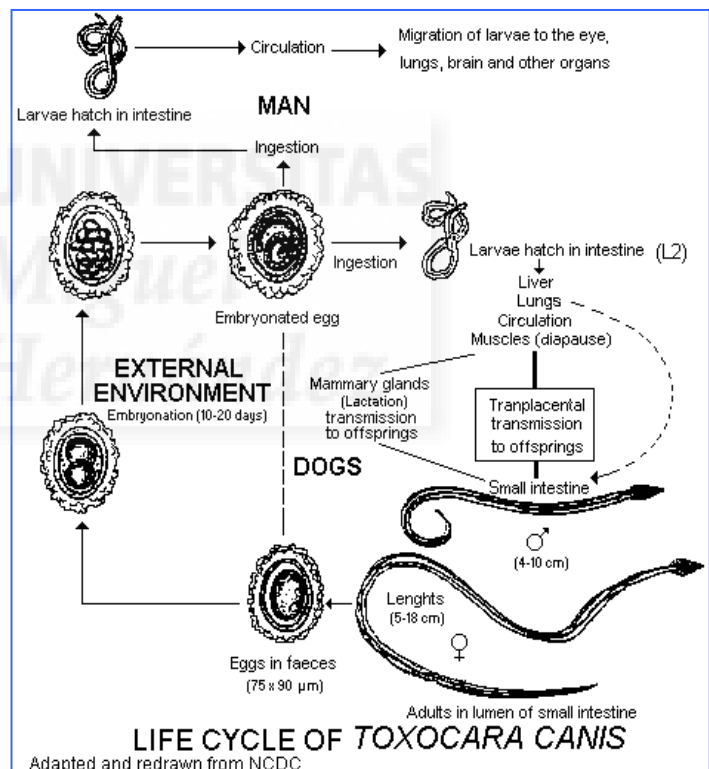
En los perros, la patología es reflejo de las migraciones larvarias y de su localización en los diferentes órganos, pasando de infecciones moderadas, con síntomas como flujo nasal, intranquilidad y diarreas, hasta afecciones más graves, como ataques epilépticos o neumonías.

- Ciclo biológico y toxocariosis humana

La toxocariosis humana es una zoonosis, en la que el hombre es un huésped accidental (Fig. 7)

Está causada por la ingestión de huevos embrionados que se pueden encontrar, bien en el suelo de los parques donde juegan los niños

Fig. 7. Ciclo de *Toxocara canis*



(geofagia), bien en vegetales contaminados por heces de perros (VÁZQUEZ *et al.*, 1997) o por la ingestión de carne mal cocinada de huéspedes paraténicos (BAIXENCH *et al.*, 1992): pollo (NAGAKURA *et al.*, 1990), cordero (SALEM y SCHANTZ, 1992) o conejo (STURCHLER *et al.*, 1990).

En el hombre, tras la ingestión de los huevos embrionados, las larvas L2 migran hacia los tejidos (hígado, ojo, cerebro, etc.), vía circulación general. Las larvas pueden quedar encerradas o encapsuladas dentro de granulomas donde serán destruidas, o bien persistirán latentes, incluso durante años. La respuesta inmunitaria del hospedador parece estar dirigida contra los antígenos excretos-secretos expulsados por la larva (PAGE *et al.*, 1992). Estos antígenos son mezclas de glicoproteínas (SUGANE y OSHIMA, 1983).

La presentación clínica depende del número de larvas ingeridas, del grado de la respuesta inmunitaria y de la edad del paciente.

3.- CLÍNICA

Se observan cuatro entidades clínicas bien diferenciadas.

- 1. *Larva migrans visceral* (LMV)

Afecta principalmente a niños entre 2 y 6 años, con historia de geofagia y contacto con perros.

La localización e intensidad de los síntomas depende de la cantidad, del establecimiento de las larvas y de la respuesta inmunitaria del hospedador. Los síntomas principales son de tipo respiratorio, (tos, estornudos, manifestaciones asmáticas); de tipo digestivo (dolor abdominal, anorexia, náuseas) y/o fiebre de carácter intermitente (LUZNA-LYSKOV, 2000).

En estos pacientes suele encontrarse eosinofilia, hipergammaglobulinemia policlonal y aumento de IgE.

Los casos de LMV con condiciones clínicas severas son poco comunes y la posible consecuencia de una prolongada eosinofilia es la fibrosis pulmonar (PHAN y KUNKEL, 1992) y la miocarditis eosinofílica (DE COCK *et al.*, 1998; HOKIBARA *et al.*, 1998; PRUNIER *et al.*, 2001; ABE *et al.*, 2002).

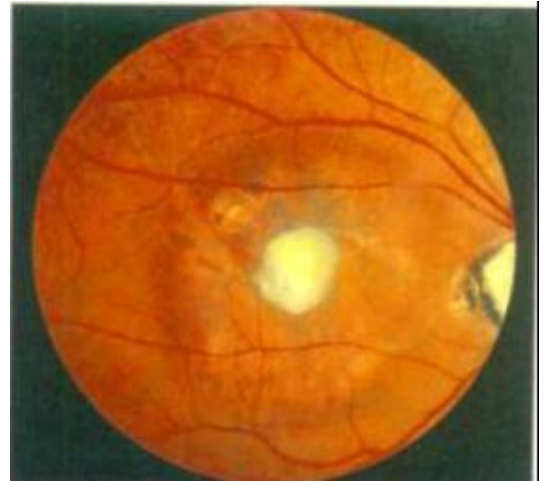
- 2. Larva migrans ocular (LMO)

Los pacientes son preferentemente niños de más de 7 años y adultos jóvenes.

En el examen del fondo ocular se puede observar: endoftalmitis granulomatosa (GASS y BRAUSTEIN, 1983), uveítis y granulomas retinianos (GILLESPI, *et al.*, 1993) ((Fig. 8).

Fig. 8. Granuloma por *Toxocara*

El síntoma más frecuente es la pérdida de la agudeza visual (STEWART *et al.*, 2005). En algunos individuos estos signos y síntomas pueden durar años. La infección ocular puede ser también subclínica y detectarse en un examen de rutina. En estos pacientes no se suele encontrar eosinofilia.



www.iztacala.unam.mx

Se ha hipotetizado que la larva migrans ocular ocurre en infecciones con baja dosis infectiva, lo que conlleva a una insuficiente respuesta inmunitaria por parte del hospedador (PAWLOWSKY, 2001). Esta menor respuesta permitiría la migración larvaria con compromiso tanto ocular como del sistema nervioso central (GLICKMAN y SCHANTZ, 1981; MIMOSO *et al.*, 1993).

- 3. Toxocariosis subclínica. (“Toxocariosis encubierta”)

Las manifestaciones clínicas son poco específicas y de poca gravedad. Encontramos fiebre, cansancio, pérdida de apetito, etc. No suele existir eosinofilia marcada.

Es la forma más frecuente de toxocariosis humana. En la mayoría de los casos, suele quedar sin diagnosticar (KINCEKOVA *et al.*, 1999).

- 4. Toxocariosis neurológica.

En el cerebro, las larvas de *Toxocara* no se encapsulan y su migración produce pequeñas áreas de necrosis e infiltrado inflamatorio mínimo (HOTEZ, 1993).

Las manifestaciones clínicas de esta forma rara de toxocariosis, suelen ser inespecíficas, al igual que ocurre con la LMV.

En el estudio de 1997, MAGNAVAL *et al.*, informan que la migración larvaria por el cerebro no produce síntomas o signos neurológicos reconocibles. Por el contrario, otros autores, comentan síntomas como déficit neurológico, trastornos de la conducta, meningoencefalitis eosinofílica y epilepsia (HILL *et al.*, 1985; COX y HOLLAND, 1998; BOUCHARD *et al.*, 1998; GOFFETTE *et al.*, 2000; COX y HOLLAND, 2001; RICHARTZ y BUCHKREMER, 2002; ROBINSON *et al.*, 2002; NICOLETTI *et al.*, 2002; XINOU *et al.*, 2003).

Se encuentran larvas o sus productos (antígenos) en el líquido cefalorraquídeo, cerebro o meninges. (WANG *et al.*, 1983; HILL *et al.*, 1985; RUSSEGER y SCHMUTZHARD, 1989; RUTTINGER y HADIDI, 1991; DUPREZ *et al.*, 1996).

4.- TRATAMIENTO

El albendazol es el tratamiento de elección en todos los tipos de toxocariosis humana.

5.- RELACIONES HOSPEDADOR-PARÁSITO EN LA TOXOCARIOSIS HUMANA.

- Inmunopatología de la toxocariosis humana.

Las larvas de *Toxocara canis* son capaces de secretar y excretar una serie de moléculas de naturaleza glicoproteica, son los llamados antígenos de excreción-secreción (ES). Estas moléculas tienen la capacidad de inducir respuesta inmunitaria en el hospedador, esta respuesta tiene como finalidad eliminar las larvas de *Toxocara* del organismo. La respuesta inmunitaria parece ser tanto de tipo Th1 como de tipo Th2.

La formación de granulomas se considera una manifestación de hipersensibilidad retardada Th1 (IL2, IFN- γ , TNF- β) (KAYES, 1997). Esta respuesta provoca la activación de los macrófagos, siendo responsable de la llamada inmunidad mediada por células (ROMAGNANI, 1991).

En contraste, la respuesta inmunitaria de las células T de tipo Th2 (IL4, IL5, IL6, IL9, IL10, IL13), es la responsable de la producción de anticuerpos. La unión de estos anticuerpos a las células refuerza la especificidad de las células citotóxicas, es la llamada citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (HYDE, 1990). La eliminación de los parásitos mediante este tipo de respuesta, puede ser realizada por varias combinaciones de anticuerpos y células efectoras: eosinófilos y anticuerpos IgE e IgG, neutrófilos y anticuerpos IgG e IgM, macrófagos con anticuerpos IgG e IgM o plaquetas con anticuerpos IgE.

Las citoquinas implicadas en la respuesta Th2 (IL4, IL10, IL13), parecen desempeñar un papel fundamental en la protección del hospedador frente al parásito y en la disminución de la severidad de la enfermedad (FINKELMAN *et al.*, 1999).

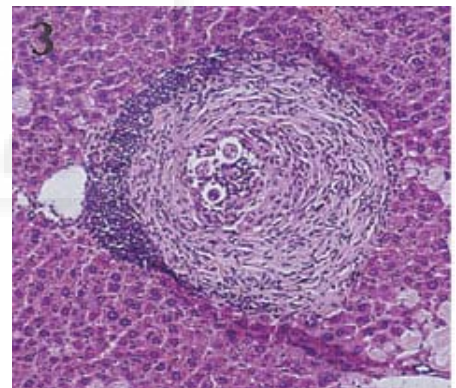
Estudios realizados en otras helmintiasis (Schistosomiasis) en ratas, ponen de manifiesto que la ausencia de interleuquina 4 (IL4) provoca una patología más severa e incluso la muerte (BRUNET *et al.*, 1997; FALLON *et al.*, 2000). Así mismo, la ausencia de interleuquina 10 (IL10) exacerbaba esta situación

(HOFFMANN *et al.*, 1999). De igual modo, se ha podido observar el papel de la interleuquina 13 (IL13) en el desarrollo de la fibrosis provocada por las helmintiasis (CHEEVER *et al.*, 2000; CHIARAMONTE *et al.*, 1999; FALLON *et al.*, 2000).

Los antígenos de excreción-secreción (ES), también inducen la producción de interleuquina 5 (IL5), la cual es una poderosa inductora de eosinofilia, tanto a nivel local como a nivel sanguíneo. Se requieren pequeñas cantidades de esta citoquina para provocar esta situación (THAKUR *et al.*, 1998).

Fig. 9. Larva *Toxocara canis*.
respuesta inflamatoria

Es difícil establecer el papel funcional de la eosinofilia en la toxocariasis, ya que no existe ninguna evidencia directa de que las larvas mueran como consecuencia de su interacción con los eosinófilos (Fig. 9).



www.cpl.yonsei.ac.kr

Esta afirmación es consistente con la observación de la supervivencia *in vivo* de las larvas, en granulomas hepáticos de hospedadores paraténicos (PARSON *et al.*, 1993).

Por medio de sus receptores de IgE, los eosinófilos se unen a los parásitos “opsonizados” por IgE, produciéndose la liberación de citoquinas, quimoquinas y factores de crecimiento:

- ECP. : Proteína Catiónica del Eosinófilo.
- EBP. : Proteína Básica del Eosinófilo.
- EPO. : Peroxidasa del Eosinófilo.

Los anticuerpos de tipo IgE están implicados de forma muy significativa en las infecciones parasitarias producidas por helmintos. La parasitación por *Toxocara* provoca un incremento policlonal inespecífico de esta inmunoglobulina, del que se calcula que sólo el 10% de dicha IgE total, es específica frente a *Toxocara*.

Se postula que la síntesis de IgE forma parte de la respuesta natural frente a la infección por helmintos. Una posible explicación por la que las infecciones parasitarias jugarían un papel “protector” frente a las reacciones alérgicas a alérgenos ambientales, sería la ocupación de los receptores de la IgE en mastocitos y basófilos por la IgE policlonal, impidiendo la fijación de las fracciones de anticuerpos IgE frente a dichos alérgenos. (YAZDANBAKHSI *et al.*, 2002).

Las evidencias epidemiológicas del papel “protector” del sistema IgE en las infecciones por helmintos gastrointestinales han sido proporcionadas por estudios de población altamente parasitadas, en las cuales se ha demostrado que

individuos que producen niveles de IgE específica elevados contra el parásito, tienen una menor tasa de reinfección después de recibir tratamiento antihelmíntico por un tiempo prolongado (HAGEL *et al.*, 1993).

6.- ATOPIA Y ENFERMEDADES PARASITARIAS. TEORÍA DE LA HIGIENE.

A pesar de que los fenómenos de hipersensibilidad mediados por IgE y las infecciones parasitarias, principalmente las producidas por helmintos intestinales, poseen respuestas inmunopatológicas muy semejantes en muchos aspectos (Tabla 2), no existe una evidencia clara de la posible relación entre atopia y parasitosis.

La atopia se presenta en individuos con predisposición genética, y se caracteriza por niveles séricos elevados de inmunoglobulina E (IgE), una reactividad aumentada en las pruebas cutáneas con extractos alérgicos y mayor susceptibilidad para sufrir enfermedades como asma, rinitis y/o dermatitis atópica.

Tabla 2. Helmintiasis intestinal y enfermedad alérgica (T. ALLISON)

| | Respuesta a helmintiasis intestinales | Respuesta alérgica/asmática |
|--|--|--|
| Inmunoglobulinas Involucradas | IgE, IgG4 | IgE, IgG4 |
| Células linfoides Involucradas | B. plasmáticas, Linfocitos T, Th2 | B. plasmáticas, linfocitos T, Th2, T-CD4+ |
| Células granulocíticas Involucradas | Neutrófilos, eosinófilos, basófilos | Neutrófilos, eosinófilos, basófilos |

www.Angelfire.com/ns/thatguytimallison/

La interacción de alérgenos ambientales con el sistema inmune, lleva a la estimulación de citoquinas como la IL4, IL5 e IL13, aumentando la producción de IgE y el número de eosinófilos y mastocitos, así como al desencadenamiento de una reacción inflamatoria de tipo alérgico en el tejido afectado.

Los parásitos helmintos estimulan este mismo tipo de respuesta, con su característico perfil de citoquinas (IL4, IL5 e IL13) (HAYES *et al.*, 2004).

Existe la hipótesis de que el principal factor en el aumento de la incidencia de las enfermedades alérgicas observada en los países industrializados, en las últimas tres o cuatro décadas, sería debida a la reducción de las enfermedades

infecciosas y que la presencia de dichas infecciones durante la infancia jugaría un papel preventivo en el desarrollo de rinitis o asma (BACH, 2002; MEDEIROS *et al.*, 2003).

La teoría de la higiene, argumenta que la ausencia de infecciones durante la primera infancia, debilita el desarrollo de la respuesta Th1, permitiendo una expansión de la respuesta Th2 ante alérgenos ambientales.

En la literatura científica internacional, existe un creciente interés en cuanto al papel modulador que ejercen las parasitosis intestinales sobre la expresión de síntomas de alergia y asma bronquial. Sin embargo, la naturaleza de estas asociaciones permanece todavía incierta y controvertida.

En condiciones en donde las parasitosis están presentes en una forma esporádica y leve, la reactividad alérgica parece estar elevada; mientras que cuando la infección por parásitos es crónica e intensa, la sobreestimulación del sistema IgE resultaría en un efecto inhibitor de la reactividad alérgica (DI PRISCO *et al.*, 2006).

El mecanismo de hipersensibilidad inmediata, inducido por helmintos y desarrollado como un mecanismo de defensa del hospedador, ha sido uno de los propuestos para explicar el incremento de la reactividad alérgica observada en algunas poblaciones tropicales. La unión de la IgE a sus receptores en los

eosinófilos, provoca la liberación de mediadores como la proteína catiónica del eosinófilo y óxido nítrico contra las larvas (CAPRON *et al.*, 1989; GOUNNI *et al.*, 1994), lo que se traduce en broncoconstricción y otros síntomas característicos del asma bronquial.

En 1992, un estudio realizado por LYNCH, señala la existencia de una relación directa entre el grado de infección helmíntica y el estado de broncoconstricción.

Los individuos con clara sintomatología alérgica pueden presentar pruebas cutáneas negativas frente a alérgenos ambientales comunes, pero ser altamente reactivos a extractos de *Ascaris lumbricoides*. (LYNCH *et al.*, 1997).

Además, LYNCH *et al.*, en 1993, indican que los pacientes con un fondo atópico intenso producen niveles de IgE específica frente a estos parásitos significativamente más elevados que los individuos no atópicos. La predisposición del sistema inmunológico de estos individuos para establecer principalmente una respuesta IgE, facilita su protección contra los parásitos, sin embargo, esta misma respuesta pudiera incrementar la reactividad alérgica, induciendo la aparición de síntomas de asma.

En poblaciones donde las parasitosis helmínticas son esporádicas, se observa un incremento de la reactividad alérgica frente a alérgenos ambientales no relacionados con el parásito (DI PRISCO *et al.*, 1987).

Por otro lado, distintos grupos de investigadores, han planteado que en comunidades rurales de países en vías de desarrollo, donde las parasitosis intestinales son endémicas y crónicas, existe una relación inversa entre reactividad alérgica y la prevalencia de estos parásitos (HAYES *et al.*, 2004; PERLMANN *et al.*, 1999).

Existen evidencias de que estos parásitos desarrollan mecanismos de evasión de la respuesta inmune establecida por el hospedador, evitando así el desencadenamiento de reacciones de hipersensibilidad inmediata locales que crearían un ambiente inhóspito para el establecimiento de las larvas en el intestino.

En individuos de las poblaciones donde las parasitosis helmínticas son endémicas, los niveles de IgE sérica total, son extremadamente elevados y no se correlacionan con la respuesta específica efectora contra el parásito. Estos altos niveles de IgE, pueden suprimir la respuesta alérgica mediante un mecanismo funcional a través de la saturación de los receptores de los mastocitos y basófilos, que evita la respuesta inflamatoria que conduce a la expulsión de las larvas (LYNCH *et al.*, 1993).

Estudios experimentales recientes indican que los helmintos estimulan la producción de interleuquina 10 (IL10), capaz de inhibir la respuesta inflamatoria

protectora, lo que favorece la persistencia de la infección (VAN DEN BIGGELAAR *et al.*, 2000).

En modelos animales se ha podido comprobar que la infección helmíntica protege contra el desarrollo de la alergia, y que dicha protección está mediada al menos en parte por la IL10 (WILLS *et al.*, 2001; BASHIR *et al.*, 2002).

No obstante y a pesar de los datos que apoyan esta teoría, existen otros en contra, que hacen que no exista una evidencia concluyente de que las infecciones parasitarias protejan contra el desarrollo de la alergia (HOLT, 2000; WEISS, 2000; LIU y MURPHY, 2003).

7.- DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO.

Debido a que las larvas de *Toxocara* no crecen ni se multiplican en el hospedador humano y a que se distribuyen ampliamente por todos los tejidos del organismo, la identificación directa del parásito es muy difícil. El diagnóstico está generalmente basado en la identificación de anticuerpos frente a *Toxocara*, usando para ello una gran variedad de antígenos parasitarios, que varían en su especificidad y de los que se han podido individualizar algunas proteínas con valor diagnóstico (Tabla 3).

Tabla 3. Relación de proteínas antigénicas nativas y recombinantes utilizadas para el diagnóstico de la toxocariosis humana.

| ANTIGENOS NATIVOS (MAIZELS <i>et al.</i> , 1984) | | ANTIGENOS RECOMBINANTES (MAIZELS <i>et al.</i> , 2001) | |
|---|------------------------------------|---|---|
| EXCRECIÓN SECRECIÓN Pm (kDa) | SUPERFICIE LARVARIA Pm (kDa) | Pm (kDa) | FUNCIÓN |
| | | 26 | Proteína de unión a fosfatidiletanolamina |
| 32 | 32 | 32 | Lectina tipo C (dependiente de calcio) |
| | | 45 | Lectina (no confirmado) |
| 55 | Componentes intermedios | 55 | Lectina |
| 70 | | 70 | Lectina tipo C |
| 120 | 120 | 120 | Mucina |
| 400 | | 400 | Análogo de proteoglicanos |

Las pruebas que emplean antígenos del gusano adulto, a los que el hospedador humano nunca ha estado expuesto, tienen una pobre especificidad (KHALIL *et al.*, 1989) y a su vez, están sujetas a fenómenos de reactividad cruzada con otros antígenos que se encuentran en otras especies de helmintos.

Los extractos solubles, a partir de huevos embrionados y no embrionados, requieren una preabsorción con antígenos de *Ascaris* para aumentar su especificidad (GLICKMAN *et al.*, 1985).

Sin duda alguna, los resultados más satisfactorios se han obtenido cuando se utilizan antígenos de excreción-secreción (ES) expulsados por larvas L2 de *Toxocara* mantenidas en cultivos *in vitro*.

Los antígenos de ES están considerados suficientemente específicos para ser usados en el enzimoimmunoensayo (ELISA-IgG) de forma rutinaria, para medir anticuerpos anti-*Toxocara*, en casos sospechosos de toxocariosis humana. (KENNEDY, 1991)

El método de inmunotransferencia se correlaciona bien con la técnica de ELISA, utilizando también antígenos de ES de larvas L2. La posibilidad de individualizar los componentes antigénicos, principalmente los de peso molecular bajo, proporcionan mayor especificidad a la técnica (MAGNAVAL *et al.*, 1991).

La técnica de ELISA IgE asociada a la inmunotransferencia IgE, se muestra como una eficaz herramienta complementaria en el diagnóstico inmunológico de toxocariosis. El ELISA-IgE ha demostrado ser una técnica eficaz en la monitorización de pacientes con toxocariosis, tratados con antiparasitarios (YMAN, 2000).

Algunos autores indican que la valoración de la IgE específica frente a antígenos ES de *Toxocara*; así como la determinación de ECP son marcadores de infección

activa en la toxocariosis humana (GENCHI *et al.*, 1988; MAGNAVAL *et al.*, 2001-b).

8.- ESTUDIOS DE SEROPREVALENCIA HUMANA.

La toxocariosis es una de las helmintiasis zoonóticas, que más frecuentemente ha sido informada, en prácticamente todas las áreas geográficas del planeta.

Los estudios sobre seroprevalencia de la toxocariosis humana nos muestran una gran variedad de valores, que van desde menos del 1% hasta más del 90%. Se acepta que dicha variabilidad se debe a la gran heterogeneidad de las poblaciones estudiadas, y a factores geográficos, climáticos, demográficos, socioeconómicos o de hábitos, que parece ser que influyen en la presencia y el desarrollo de esta parasitosis en el ser humano (SCHANTZ, 1989; KENNEDY, 1991; MAGNAVAL *et al.*, 2001-a).

En nuestro medio existen varios estudios de seroprevalencia, realizados en diferentes regiones, con una significativa diversidad de resultados (Tabla 4).

Tabla 4. Seroprevalencia de la toxocariosis humana en España.

| POBLACIÓN | PREVALENCIA (%) | LOCALIZACIÓN | AÑO | AUTORES |
|-----------------|-----------------|------------------------|------|-------------------------------------|
| Adultos | 28,6 | A Estrada (Galicia) | 2006 | González- Quintela <i>et al.</i> |
| 2-5 años | 0,0 | Guipúzcoa | 1996 | Cilla <i>et al.</i> |
| 6-16 años | 4,4 | Guipúzcoa | 1996 | Cilla <i>et al.</i> |
| 2-5 años (*) | 37,0 | San Sebastián | 1996 | Cilla <i>et al.</i> |
| 6-16 años (*) | 65,7 | San Sebastián | 1996 | Cilla <i>et al.</i> |
| Niños | 1,0 | Madrid | 1995 | Guerra <i>et al.</i> |
| Adultos (**) | 23,3 | Coruña | 1997 | Fenoy <i>et al.</i> |
| Niños (**) | 32,8 | Coruña | 1997 | Fenoy <i>et al.</i> |
| Niños | 0,0 | Madrid | 1996 | Fenoy <i>et al.</i> |
| Niños | 4,2 | Santa Cruz de Tenerife | 1996 | Fenoy <i>et al.</i> |
| Niños y adultos | 3,6 | Barcelona | 1989 | Portús <i>et al.</i> |
| Donantes | 1,0 | Barcelona | 1989 | Portús <i>et al.</i> |
| Niños | 8,0 | Salamanca | 1989 | Conde <i>et al.</i> |

(*): Población con pocos recursos socioeconómicos

(**): Población con síntomas compatibles con los evidenciados por la *Toxocariosis humana*.

Como se puede observar, los valores de seroprevalencia en nuestro país son muy heterogéneos. Van desde el 0% al 66% y dependen del tipo de población (general, donantes, etc.), de la edad de la misma, del lugar geográfico, de las condiciones socioeconómicas, y de otros factores, como el año del estudio, etc.

De cualquier manera, la comparación de los resultados obtenidos por todos estos autores es siempre muy relativa y difícil de asumir, dada la diversidad de protocolos de estudio y de técnicas de medida.

Dado que la toxocariosis es un parasitismo, que en la mayoría de los casos es silente, pero que en determinadas ocasiones puede producir cuadros graves de tipo ocular o neurológicos; y, dado que, la seroprevalencia de esta parasitosis es relativamente alta en aquellos lugares en donde se ha realizado su medición, la ampliación de este tipo de estudios a otras áreas geográficas y comunidades autónomas de forma actualizada, permitiría disponer de una base sólida sobre la que se podrían proponer protocolos más eficaces para el diagnóstico de la toxocariosis humana; así como para protocolizar programas de control de dicha zoonosis. (GONZÁLEZ-QUINTELA *et al.*, 2006; CILLA *et al.*, 1996; PORTUS *et al.*, 1989; FENOY *et al.*, 1997; FENOY *et al.*, 1996; GUERRA *et al.*, 1995).



JUSTIFICACIÓN

1.- JUSTIFICACIÓN

Como hemos visto, existe una interesante relación entre las helmintiasis y las enfermedades alérgicas. Por una parte, los helmintos son agentes etiológicos muy comunes en las infecciones humanas de los países en desarrollo, mientras que las enfermedades atópicas lo son en los países desarrollados.

Tanto las infecciones por helmintos como las enfermedades alérgicas se caracterizan por polarizar las respuestas hacia las subpoblaciones celulares Th2, aumento de la síntesis de IgE y eosinofilia.

Desde el punto de vista evolutivo, el origen de la respuesta alérgica como tal, podría ser parte de un mecanismo inmunoprotector, frente a las infecciones por parásitos, principalmente helmintos.

Esto podría explicar que determinadas infecciones por helmintos puedan influir en el desarrollo de la alergia, si bien este concepto todavía resulta un tanto conflictivo, dado que existen tanto datos que apoyan el papel protector de los parásitos frente al fenómeno alérgico, como datos que dicen lo contrario. (WILLS-KARP *et al.*,

2001; BASHIR *et al.*, 2002; HOLT, 2000; WEISS, 2000; LIU *et al.*, 2003; MAIZELS *et al.*, 2003).

Por otra parte, las infecciones por helmintos pueden provocar manifestaciones alérgicas. (VUITTON, 2004; ALONSO *et al.*, 2004).

En este contexto, la toxocariosis no es una excepción y se sabe que es una parasitosis de distribución cosmopolita, con uno de los datos de prevalencia más altos en países industrializados. Algunos estudios confirman la asociación entre el fenómeno atópico y esta parasitosis, (BUIJS *et al.*, 1997), mientras que otros la ponen en duda. (SHARGAI *et al.*, 2001).

A pesar de que existen algunos trabajos en los que se utiliza la IgE tanto total como específica, como parámetros diagnósticos en la toxocariosis humana (MAGNAVAL *et al.*, 1992; BUIJS *et al.*, 1997; MAGNAVAL *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2002; GONZÁLEZ-QUINTELA *et al.*, 2006), y de que la respuesta de los anticuerpos que fijan IgG ha sido ampliamente estudiada (MAIZELS y ROBERTSON, 1991); no existen muchos datos acerca de la evaluación de la respuesta inmunitaria dual IgG-IgE y de su relación con los antígenos implicados en ella. Como consecuencia, no se dispone de datos acerca de qué antígenos son los que fijan específicamente anticuerpos IgE y cuales de ellos se pueden considerar alérgicos relevantes.

La dificultad que existe en la captación de individuos que padecen infecciones por *Toxocara*, debido a su escasa sintomatología, hace que los estudios seroepidemiológicos constituyan la fuente principal en la obtención de material para el estudio de las relaciones hospedador-parásito en la toxocariosis humana.

Por otra parte, estos estudios nos permiten acceder a datos de seroprevalencia, hasta ahora desconocidos en determinadas áreas o localizaciones de nuestro medio.





OBJETIVOS

1.- OBJETIVOS PRINCIPALES

- ✓ Estudio de la respuesta inmunológica dependiente de anticuerpos IgE e IgG en la toxocariosis humana.
- ✓ Definición de alérgenos mayores de *Toxocara canis*.

2.- OBJETIVOS SECUNDARIOS

- ✓ Estudio de la seroprevalencia de toxocariosis humana en población general (adultos y niños) en áreas de prevalencia desconocida (Elda y Teruel), con la finalidad de obtener muestras de sueros de individuos seropositivos frente a *Toxocara*
- ✓ Implicación de parámetros de riesgo en la toxocariosis: (a) fenómeno de hipersensibilidad y/o atopia, (b) niveles séricos IgE total, (c) niveles séricos de proteína catiónica del eosinófilo (ECP), (d) conteo de eosinófilos, (e) hábitat, (f)

edad, (g) síntomas, (h) contacto con el hospedador definitivo, (i) origen y (j) anticuerpos IgE anti-*Toxocara*.





MATERIAL Y MÉTODOS

1.- POBLACIÓN DE ESTUDIO

El estudio fue llevado a cabo durante los años 2002-2006. La población estudiada pertenece al Área de Salud 17 de la Comunidad Valenciana y al Sector 1 de la Comunidad Aragonesa.

El estudio se ha realizado sobre la siguiente población:

- 310 muestras en población adulta, donantes sanos del Área de Salud 17 de la Comunidad Valenciana.
- 656 muestras en población infantil, que acudían a consultas externas del Servicio de Pediatría, por controles rutinarios. Los pacientes procedían del Hospital Obispo Polanco, de Teruel.

Nota: Se obtuvo consentimiento informado de cada uno de los pacientes adultos, así como, de cada uno de los padres o tutores de los niños estudiados

Para la recogida de los datos de las muestras se realizó una encuesta en el Servicio de Pediatría, donde se reflejaban los siguientes datos para la población infantil estudiada:

1. Edad. Según este parámetro los pacientes se clasificaron en dos grupos:
 - Menores o iguales a 5 años: si la edad estaba comprendida entre los cero y los cinco años.
 - Mayores de 5 años: si la edad estaba comprendida entre los seis y los catorce años.

2. Entorno. Según este parámetro los pacientes se clasificaron en dos grupos:
 - Rural: si el paciente procedía de una población inferior a 20.000 habitantes.
 - Urbano: si el paciente procedía de una población superior a 20.000 habitantes.

3. Contacto. Este parámetro hace referencia al contacto del paciente con animales de riesgo como perros y/o gatos. Según este dato la población se clasificó en:
 - Con contacto: si el paciente mantenía contacto asiduo con perros y/o gatos.
 - Sin contacto: si el paciente no mantenía contacto con perros y/o gatos.

4. Motivo de la consulta: Este parámetro hace referencia a los síntomas que el paciente declaraba y podían tener relación con la toxocariosis. Según este dato, la población se clasificó en:

- Con síntomas: en este apartado se englobaron pacientes con síntomas respiratorios, oculares y neurológicos.
- Sin síntomas: en este apartado se englobaron pacientes sin síntomas o con síntomas no relacionados con la toxocariosis.

Las determinaciones analíticas se realizaron en el Servicio de Bioquímica del Hospital General de Elda, Servicio de Bioquímica del Hospital Obispo Polanco de Teruel y en el Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de Vitoria (Universidad del País Vasco).

La extracción de la sangre, se realizó a partir de la vena antecubital, evitando la venostasis prolongada, con material desechable y mediante sistema de vacío (Vacutainer). El suero obtenido a partir de cada muestra fue debidamente etiquetado y almacenado a - 20 °C, hasta su uso posterior.

2.- OBTENCIÓN DE LOS ANTIGENOS DE EXCRECIÓN- SECRECIÓN (ES) DE LARVAS INFECTANTES (L2) DE TOXOCARA CANIS.

2.1.- CULTIVO *IN VITRO*, ECLOSIÓN Y MANTENIMIENTO DE LAS LARVAS L2 DE TOXOCARA CANIS

Se realizó según el método descrito por DE SAVIGNY, 1975 con ligeras modificaciones.

El estadio infectante L2 de *Toxocara canis*, fue obtenido a partir de los parásitos adultos que fueron aislados del hospedador definitivo infectado de forma natural. La identificación taxonómica y la división por sexos de los parásitos fue realizada en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad del País Vasco.

2.1.1. DESOVE *IN VITRO* DE *TOXOCARA CANIS*.

Los parásitos adultos identificados como hembras de *Toxocara canis* fueron depositados individualmente en tubos de cultivo celular, conteniendo 5 ml de tampón fosfato sódico (PBS), pH 7,2, más una mezcla de antibióticos al 1%, consistente en 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina y 25 µg de anfotericina-B por mililitro (Sigma, R-5955). Para inducir el desove, los parásitos se mantuvieron durante 24 horas a 37 °C y en una atmósfera del 5% de CO₂.

Tras producirse el desove, los parásitos adultos fueron retirados de cada cultivo. A continuación, se añadieron 5 ml de hipoclorito sódico (lejía comercial) al 6,6% en agua estéril y se incubaron durante 15 días a 27 °C, con luz permanente y con una humedad relativa del 80% en un incubador (Sanyo MIR-153).

El desarrollo de los embriones hasta el estadio de larva infectante (L2) fue monitorizado diariamente por observación microscópica.

2.1.2. ECLOSIÓN DE LAS LARVAS DE *TOXOCARA CANIS*.

Para la obtención *in vitro* de las larvas L2 de *Toxocara canis*, es necesario inducir su eclosión de forma similar a lo que ocurre durante el ciclo biológico cuando los

huevos son ingeridos por un hospedador. Es necesario eliminar la cubierta proteica y la lipídica que envuelven al huevo mediante tratamientos físico-químicos.

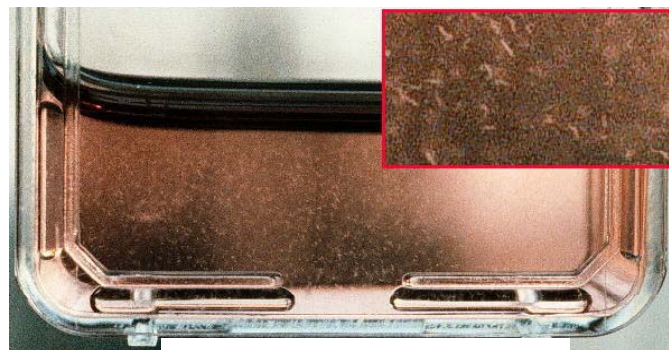
| SOLUCIONES Y REACTIVOS | Para cada cultivo |
|--|---------------------|
| MEDIO RPMI-1640 (Sigma, Ref. R-7388) | 10 ml |
| SOLUCIÓN ANTIBIÓTICA ANTIMICÓTICA(Sigma, Ref. A-5955); | 1% |
| GLUCOSA, (Panreac, Ref.141341), solución madre al 10% | 1 ml |
| NISTATINA, (Micostatina). (Sigma, Ref. N-1638); | 24 ml/l de cultivo. |
| SOLUCIÓN Hipoclorito Sódico, NaOH 2% | 5 ml |

Los cultivos se dejaron reposar en el interior de la campana de flujo laminar, durante una hora para sedimentar los huevos. Se retiraron 7 ml del medio de mantenimiento de cada frasco y se añadieron 10 ml de lejía al 2%. Los huevos se mantuvieron en esta solución 30 minutos a temperatura ambiente, con agitación esporádica, y continua observación al microscopio para detectar la degradación de las cubiertas proteicas y lipídicas.

Una vez que las cubiertas fueron eliminadas, la eclosión de las larvas fue facilitada mediante centrifugación a 2.500 r.p.m durante 5 minutos. Se recogió el sobrenadante y se realizó un primer lavado con 20 ml de RPMI con antibióticos, precalentado a 37 °C.

Esta operación de centrifugado-lavado se repitió tres veces más, hasta conseguir la completa liberación de las larvas. Una vez retirado el sobrenadante del último centrifugado, se recogió el

Figura 9. Cultivo *in vitro* de L2 de *Toxocara canis*



Margnaval J. www.cdfound.to.it

precipitado y se depositó en un nuevo frasco de cultivo celular, conteniendo 10 ml de medio de cultivo fresco, precalentado a 37 °C, complementado con glucosa al 1%, nistatina (24 ml / l. de cultivo) y antibióticos al 1%.

2.2.- OBTENCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN DE LARVAS L2 DE TOXOCARA CANIS

Las larvas L2 de *T. canis* fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma, Ref. R-7388) suplementado con glucosa y antibióticos por un período de hasta 18 meses. Durante este tiempo las larvas de forma natural excretan al medio de cultivo varias glicoproteínas entre las que se encuentran los antígenos de diagnóstico de la toxocariosis.

Para obtener los productos de excreción-secreción, los cultivos larvarios se dejaron reposar en posición vertical durante una hora para sedimentar las larvas

en el fondo. Con una pipeta estéril, se recogieron 7 ml de medio de cada frasco de cultivo que fueron mezclados entre sí hasta llegar a volúmenes adecuados para su procesamiento posterior.

El volumen recogido se repuso añadiendo 10 ml de medio RPMI-1640 (Sigma, Ref. R-7388) precalentado a 37 °C. Posteriormente se añadieron 100 µl de antibiótico, 240 µl de nistatina y 1 ml de glucosa por cada 10 ml de medio de cultivo. Esta operación se repitió cada tres días.

2.3.- OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ANTIGÉNICO

El extracto de los productos de excreción-secreción se obtuvo a partir del medio de cultivo recogido en la etapa anterior. Se partió de volúmenes de 500 ml que fueron filtrados a través de membranas de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 22 µm (Millipore, Ref. GSWP09000).

Una vez filtrado, el medio fue dializado frente a 50 volúmenes de dH₂O durante 24 horas, en membranas de diálisis con un punto de corte de 7.000 Daltons (Medicell Internacional Ltd, Ref. DTV07000.04.000). El volumen obtenido se congeló a -40 °C y fue liofilizado.

3.- CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS PRODUCTOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN.

3.1.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO DE LOS EXTRACTOS

La determinación del contenido proteico de los extractos antigénicos obtenidos, se realizó utilizando el método del ácido bicinconínico, basado en la técnica original de LOWRY (1951).

SOLUCIONES Y REACTIVOS

REACTIVO A, Solución de ácido bicinconínico (Sigma, Ref. B-9643)

REACTIVO B, Solución de sulfato de cobre pentahidratado al 4% (Sigma Ref. C-2284).

REACTIVO C, Reactivo A y Reactivo B en una proporción 50:1.

CURVA PATRÓN, Seroalbúmina bovina (Sigma Ref. A-7906) en PBS utilizando diluciones seriadas de concentraciones desde 1 mg/ml a 0,125 mg/ml

Se elaboró una curva patrón con seroalbúmina bovina (Sigma, Ref. A-7906) en tampón PBS utilizando diluciones seriadas por duplicado en concentraciones desde 1 mg/ml a 0,125 mg/ml. Como blanco se utilizó PBS.

En cada pocillo de la placa de microtitulación, se dispensaron 200 μl de reactivo C. Posteriormente se añadieron 30 μl por pocillo de las diluciones de albúmina para la curva patrón e igualmente, se añadieron 30 μl de cada dilución de la muestra problema, todo ello por duplicado. Las placas se incubaron durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. La lectura de los resultados se realizó en un lector de placas de ELISA Multiskan Bichromatic (Labsystems, Helsinki, Finlandia) a 560 nm.

Se calcularon los valores promedio de las absorbancias obtenidas tanto de las muestras problema como de las diferentes diluciones de la albúmina. Con estas últimas se elaboró la curva patrón representándolas frente a sus correspondientes concentraciones (expresadas en mg de proteína/mg de extracto).

El valor de la concentración correspondiente a cada muestra problema se determinó por extrapolación de su absorbancia sobre la curva patrón.

3.2.- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DODECIL SULFATO SÓDICO (SDS-PAGE).

La determinación del perfil proteico del extracto obtenido se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio, en

condiciones reductoras y con un sistema discontinuo, según el método de LAEMMLI (1970) modificado.

SOLUCIONES Y REACTIVOS (I)

PATRÓN DE PESOS MOLECULARES Y PRETEÑIDO (Biorad Ref.161-0372)

SOLUCIÓN ACRILAMIDA/BIS-ACRILAMIDA 40% 29:1 (Biorad Ref.161-0146)

TEMED (Sigma Ref. T-9281)

PERSULFATO AMONICO (Biorad Ref. 161-0700)

GELES EN GRADIENTE 4-20% (Biorad Ref.161-1105)

SOLUCIONES Y REACTIVOS (II)

| Tampón de muestra | | Tampón de electroforesis (pH 8,7-8,8) | |
|--------------------|---------|---------------------------------------|---------|
| Tris-HCl pH 6,8 | 62,5 mM | Tris base | 0,025 M |
| Glicerol | 10% | Glicina | 0,19 M |
| Azul de bromofenol | 0,0125% | SDS | 1% |
| SDS | 2% | | |
| 2-β-mercaptoetanol | 5% | | |

3.2.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

La muestra se preparó mezclando el extracto liofilizado con el tampón de muestra, a una concentración de 4 mg de proteína del extracto liofilizado por ml de tampón.

Se hirvió durante 5 minutos para provocar la reducción de los puentes disulfuro y tras su enfriamiento, los restos insolubles, se eliminaron por centrifugación, durante 5 minutos a 10.000 r.p.m.

3.2.2. PREPARACIÓN DE LOS GELES.

La separación de los componentes proteicos del extracto excretor-secretor larvario se llevó a cabo en un gel con una proporción de acrilamida del 12,5% a partir de una solución de acrilamida/bis-acrilamida 40%, 29:1.

SOLUCIONES Y REACTIVOS

| | Gel separador al 12,50% | Gel apilador al 4% |
|---------------------------|-------------------------|--------------------|
| Acrilamida/Bis-Acrilamida | 3,1 ml | 1 ml |
| Agua destilada | 4,3 ml | 6,4 ml |
| Tris-HCL 1,5 M, pH 8,8 | 2,5 ml | ----- |
| Tris-HCL 0,5 M pH 8,8 | ----- | 2,5 ml |

SOLUCIONES Y REACTIVOS (CONTINUACIÓN)

| | Gel separador al 12,5% | Gel apilador al 4% |
|--------------------|------------------------|--------------------|
| SDS 10% | 100 µl | 100 µl |
| Persulfato amonico | 75 µl | 75 µl |
| TEMED | 20 µl | 20 µl |

Las soluciones y reactivos para la elaboración del gel se mezclaron en las cantidades arriba indicadas. Una vez polimerizado, se procedió a la carga de la muestra y posterior electroforesis.

La electroforesis se llevó a cabo a las siguientes intensidades en función de la concentración de acrilamida de los geles (DEL ÁGUILA *et al.*, 1988):

- | | |
|-----------------|--------|
| - Gel apilador | 250 mA |
| - Gel separador | 30 mA |

La duración de la electroforesis fue de 10 minutos hasta que el frente penetró en el gel separador y de 50 minutos hasta que la proteína de 25 kDa del marcador de peso molecular alcanzó el frente del gel.

Terminada la electroforesis se procedió a la tinción de los geles (tinción de plata) para la visualización del perfil proteico del extracto, o bien, a la transferencia de las proteínas a membranas inmovilizantes para realizar las pruebas inmunoquímicas.

3.3.- ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2D).

La electroforesis bidimensional permite obtener una mejor resolución de los componentes proteicos de un extracto, ya que su separación se basa en dos parámetros, el punto isoeléctrico (pI) y el peso molecular de las proteínas.

SOLUCIONES Y REACTIVOS (I)

| Tampón de solubilización | Volumen final de 50 ml |
|---------------------------------|---|
| UREA 8M. | 24 g de urea disuelta en 25 ml de dH ₂ O |
| CHAPS 4% | 2 g |
| ANFOLITOS pH 3-10 al 0,2% | 250 µl de una solución madre al 40% |
| AZUL DE BROMOFENOL al 0,0002% | 100 µl de una solución madre al 0,1% |
| Ditiotreitol (DTT) 50 mM | 385 mg |
| dH ₂ O | Ajustar a 50 ml |

SOLUCIONES Y REACTIVOS (II)

| Tampón de equilibrado | Volumen final de 100 ml |
|------------------------------|-------------------------|
| UREA 6M. | 36 g |
| SDS 20% | 10 ml |
| Tris HCl 1,5 M pH 8,8 | 3,3 ml |
| Glicerol 50% | 40 ml |
| dH ₂ O | Ajustar a 100 ml |

La primera dimensión se realizó en geles con un gradiente de pH inmovilizado de 3 a 10 y de 7 cm de longitud. La muestra se preparó en tampón de solubilización a una concentración de 300 µg de proteína por ml de tampón y se dispuso en la

bandeja de isoelectroenfoque en un volumen final de 250 μ l por tira de gel utilizada. Tras una hora de incubación para permitir la entrada en el gel de las proteínas de mayor peso molecular, las tiras se cubrieron con aceite mineral y la bandeja de isoelectroenfoque se conectó a la unidad Protean IEF Cell (Bio Rad).

Las condiciones de isoelectroenfoque fueron las recomendadas por el fabricante, disponibles en: *2-D Electroforesis for Proteomics. A methods and product manual. Bio Rad.*

Antes de realizar la segunda dimensión, es necesario equilibrar los geles con las proteínas separadas por su punto isoeléctrico en tampones que contengan dodecil sulfato de sodio, para permitir la solubilización de las proteínas. Para ello, cada tira debe ser incubada durante 10 minutos y en agitación en tampón de equilibrado conteniendo ditiotreitol al 2%. De esta forma se consigue reducir los grupos sulfidrilo de las proteínas.

Una segunda incubación en tampón de equilibrado conteniendo iodoacetamida al 2,5% alquilizará los grupos sulfidrilo, permitiendo así que las proteínas se separen únicamente por su peso molecular en la segunda dimensión.

La segunda dimensión fue llevada a cabo en geles de acrilamida al 12,5% en presencia de dodecil sulfato de sodio, en condiciones estándar.

Terminada la electroforesis se procedió a la tinción de los geles (tinción de plata) para la visualización del perfil proteico del extracto o bien, a la transferencia de las proteínas a membranas inmovilizantes para realizar las pruebas inmunoquímicas.

4.- ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS INMOVILIZANTES E INMUNODETECCIÓN.

4.1.- ELECTROTRANSFERENCIA.

Las proteínas del extracto separadas por SDS-PAGE o por electroforesis 2D, fueron electrotransferidas a membranas inmovilizantes de fluoruro de polivinilideno (PVDF) *Immun-Blot*® (ref.: 162-0174. Bio Rad), utilizando un sistema de transferencia horizontal y semi-seco según el método descrito por TOWBIN *et al.*, (1979).

Antes de realizar la electrotransferencia se cambió la hidrofobicidad de la membrana sumergiéndola unos segundos en metanol, un minuto en agua y dos minutos en tampón de transferencia.

SOLUCIONES Y REACTIVOS

Tampón de transferencia

| | |
|------------------------------|---------------|
| Glicina | 39 mM |
| Tris HCl | 48 mM |
| SDS | 0,0375% (p/v) |
| Metanol | 20% |
| Agua desionizada (ultrapura) | Ajustar a 1 l |

Sobre la placa del ánodo, se colocó una capa de papel *Extra thick blot* (Biorad Ref. 1703966) impregnado en el tampón de transferencia. Encima del papel se colocó la membrana, sobre ésta, el gel y por último una capa más de papel *Extra thick blot* embebida en tampón de transferencia.

Se cubrió con la placa-electrodo cátodo y se aplicó un amperaje constante de 0,24 mA durante 45 minutos.

4.2.- INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS TRANSFERIDAS A MEMBRANAS.

Las proteínas trasferidas a la membrana fueron inmunodetectadas por el método de SHEN *et al*, (1988), con modificaciones para revelado con quimioluminiscencia (*ECL-plus Western Blotting detection System* Ref.: RPN2132. Amersham Biosciences).

En primer lugar, se saturó la membrana mediante incubación con tampón de bloqueo [*Tris Buffer Saline-Tween 20* al 0,1% (TBS-T)] para evitar uniones inespecíficas, tanto de inmunoglobulinas, como de conjugado inmunoglobulina-enzima. El periodo de incubación fue de una hora, en agitación suave y a temperatura ambiente.

Los restos de tampón de bloqueo se eliminaron mediante tres lavados con TBS.

Para la determinación de IgE específica frente al extracto excretor-secretor de larvas L2 de *Toxocara canis*, los sueros sin diluir de los pacientes, se incubaron durante toda la noche a 4°C, en agitación suave.

Para la determinación de IgG frente al mismo extracto, los sueros se diluyeron 1:100 en TBS-T al 0,1% y se incubaron durante toda la noche a 4 °C, en agitación suave.

Tras este periodo se realizaron tres lavados, de 5 minutos, en tampón TBS, con agitación fuerte, para eliminar los anticuerpos no fijados.

Como anticuerpos secundarios se utilizaron:

- Inmunoglobulinas anti-IgE humana producidas en conejo y unidas a peroxidasa (Ref.: PO295. DAKO A/S. Dinamarca) a una dilución 1:10.000 en TBS-T al 0,1%.

- Inmunoglobulinas anti-IgG humana producidas en conejo y unidas a peroxidasa (ref.: PO214. DAKO A/S. Dinamarca) a una dilución 1:100.000 en TBS-T al 0,10%.

La incubación con los anticuerpos secundarios fue de 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave.

Para eliminar el conjugado no fijado, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T al 0,1% y un último lavado con TBS.

4.3.- REVELADO POR QUIMIOLUMINISCENCIA

Para el revelado por quimioluminiscencia se utilizó el Sistema ECL-plus *Western Blotting detection System* (Ref.: RPN2132. Amersham Biosciences), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los resultados se autorradiografiaron en películas Hyperfil™ ECL™ Amersham LIFE SCIENCE. *High performance chemiluminescence film*. (Ref.: RPN 2103H) en una unidad de revelado Hypercassete™ Amersham LIFE SCIENCE. (Ref.: RPN 13642).

SOLUCIONES Y REACTIVOS

ECL-plus *Western Blotting detection System* (ref.: RPN2132. Amersham Biosciences),

Kodak GBX Developer (ref.: 190 1859)

Kodak GBX Fixer (ref.: 190 0943)

El revelado de las películas se realizó de forma convencional en habitación oscura.

5.- DETERMINACIÓN DE ATOPIA EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Todas las determinaciones se realizaron automáticamente en un analizador de enzimoimmunoensayo con lectura fluorimétrica (*Unicap* 100. Phadia AB, Uppsala, Suecia).

Cada muestra fue evaluada frente a los siguientes alergenios unidos covalentemente a la fase sólida (ImmunoCap™).

- *Phadiatop*® ImmunoCap™: se trata de una mezcla equilibrada de los alergenios medioambientales más relevantes que permite determinar la atopia en un paciente. Es un análisis cualitativo en el que una respuesta positiva indica una constitución atópica por parte del paciente.

- fx5 ImmunoCap™: Esta compuesto por la mezcla de alergenios procedentes de la clara de huevo (f1), leche desnatada de vaca (f2), carne de bacalao (f3), granos de trigo molidos (f4), cacahuete (f13) y semillas de soja (f14)
- Como anticuerpo secundario se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-IgE humana conjugados a β -galactosidasa y producidos en ratón (Ref. 10-9253-01. Phadia AB, Uppsala, Suecia).
- Como sustrato para el revelado del análisis se utilizó 4-metil-umbeliferil- β -D-galactosidasa al 0,01% y la reacción fue parada con carbonato sódico al 4% (Ref.: 10-9263-01. Phadia AB, Uppsala, Suecia).

El analizador previamente fue calibrado con una curva patrón constituida por IgE humana que incluía las siguientes concentraciones: 0,35; 0,7; 3,5; 17,5; 50 y 100 kU/l (Ref.: 10-9254-01. Phadia AB, Uppsala, Suecia)

Además, en cada ensayo se incluyeron dos Controles de la Curva (Ref.: 10-9408-01. Phadia) para monitorizar la variabilidad del ensayo.

Brevemente los pasos del procedimiento automatizado son los que se describen a continuación:

- Tras un lavado previo de la fase sólida, 40 μ l de cada suero de paciente fueron incubados con los alérgenos de interés durante aproximadamente 1 hora, a 37°C.
- Después de realizar un nuevo lavado para eliminar la IgE no específica, se añadieron por muestra analizada, 50 μ l del anticuerpo secundario. Tras un período de incubación de aproximadamente 1 hora a 37 °C, el anticuerpo anti-IgE no unido es eliminado con un tercer lavado.
- Por último, se añadieron por muestra 50 μ l del sustrato. Tras una incubación de 15 minutos, la reacción se detuvo con 600 μ l por muestra de la solución de parada.

La lectura de los resultados fue realizada automáticamente por el analizador. Los datos fueron almacenados en la aplicación UDM (Phadia AB, Uppsala, Suecia) para su análisis posterior.

6.- DETERMINACIÓN DE IgE TOTAL EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Las determinaciones se realizaron automáticamente en un analizador de enzimoimmunoensayo con lectura fluorimétrica (Unicap 100. Phadia AB. Uppsala, Suecia).

Los reactivos utilizados son los siguientes:

- Anti-IgE ImmunoCap™, anti-IgE unida covalentemente a la fase sólida.
- Como anticuerpo secundario se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-IgE humana conjugados a β -galactosidasa, producidos en ratón (Ref. 10-9253-01. Phadia AB, Uppsala, Suecia).
- Como sustrato para el revelado del análisis se utilizó 4-metil-umbeliferil- β -D-galactosidasa al 0,01% y la reacción fue parada con carbonato sódico al 4% (Ref.: 10-9263-01. Phadia AB, Uppsala, Suecia)

El analizador previamente fue calibrado con una curva patrón constituida por IgE humana que incluía las siguientes concentraciones: 2, 10, 50, 200, 1.000 y 5.000 kU/l (Ref.: 10-9252-01. Phadia AB, Uppsala, Suecia)

Además, en cada ensayo se incluyeron dos Controles de la Curva (Ref.: 10-9257-01. Phadia) para monitorizar la variabilidad del ensayo.

Brevemente, los pasos del procedimiento automatizado son los que se describen a continuación:

- Tras un lavado previo de la fase sólida, 40 μ l de cada suero de paciente fueron incubados con el ImmunoCap, unido covalentemente a la anti-IgE, durante aproximadamente 1 hora, a 37°C.
- Después de realizar un nuevo lavado para eliminar la IgE no específica, se añadieron por muestra analizada, 50 μ l del anticuerpo secundario. Tras un período de incubación de aproximadamente 1 hora a 37 °C, el anticuerpo anti-IgE no unido es eliminado con un tercer lavado.
- Por último, se añadieron por muestra 50 μ l del sustrato. Tras una incubación de 15 minutos, la reacción se paró con 600 μ l por muestra de la solución de parada.

La lectura de los resultados fue realizada automáticamente por el analizador. Los datos fueron almacenados en la aplicación UDM (Phadia AB, Uppsala, Suecia) para su análisis posterior.

Se utilizaron como valores de referencia los suministrados por la casa comercial Phadia AB, Uppsala, Suecia.

7.- DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA CATIONICA DEL EOSINÓFILO EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Las determinaciones se realizaron automáticamente en un analizador de enzimoimmunoensayo con lectura fluorimétrica (Unicap 100. Phadia AB. Uppsala, Suecia).

Los reactivos utilizados son:

- ECP ImmunoCap™: anti-ECP unida covalentemente a la fase sólida.

Como anticuerpo secundario se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-ECP humana conjugados a β -galactosidasa, fabricados en ratón (Ref. 10-9261-01. Phadia AB, Uppsala, Suecia).

Como sustrato para el revelado del análisis se utilizó 4-metil-umbeliferil- β -D-galactosidasa al 0,01% y la reacción fue parada con carbonato sódico al 4% (Ref.: 10-9263-01. Phadia AB, Uppsala, Suecia)

El analizador previamente fue calibrado con una curva patrón constituida por ECP humana que incluía las siguientes concentraciones: 2, 5, 15, 100 y 200 μ g/l (Ref.: 10-9260-01. Phadia AB, Uppsala, Suecia)

Además, en cada ensayo se incluyó un control de la curva (Ref: 10-9278-01. Phadia AB, Uppsala, Suecia) para monitorizar la variabilidad del ensayo.

Los pasos del procedimiento son los mismos que los descritos en el apartado anterior para la determinación de la IgE total, sustituyendo el anticuerpo secundario por los anticuerpos anti-ECP conjugados a β -galactosidasa.

8.- DETERMINACIÓN DE EOSINÓFILOS EN LA POBLACION DE ESTUDIO

La determinación de eosinófilos se realizó a partir de sangre total con anti-coagulante mediante un contador de células Coulter Gen-S System-2 (Laboratorios Izasa).

Se valoró una dilución de sangre total en isotón y líquido hemolítico, midiendo el número de pulsos registrados en un osciloscopio. El líquido hemolítico, lisa los glóbulos rojos y el citoplasma de los leucocitos de forma que utiliza los diferentes tamaños del núcleo de las células para diferenciar las poblaciones leucocitarias.

De allí, la muestra, pasa a una célula de flujo, donde por volumen, conductividad y dispersión de un rayo láser se determina la formula leucocitaria.

Los valores normales son los inferiores a 500 eosinófilos / mm³.

9.- DETERMINACIÓN DE IgG ESPECÍFICA FRENTE A LOS ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN DE LARVAS INFECTANTES DE *TOXOCARA CANIS*.

Se determinó la IgG específica frente a los antígenos de excreción-secreción de larvas infectantes de *Toxocara canis* mediante enzimoimmunoensayo (Ref.: TcG096. Test-Line LTD. Clínica. Diagnostics. Republica Checa)

Las placas de microtitulación están sensibilizadas con los antígenos de excreción-secreción de las larvas infectantes y como anticuerpo secundario se utilizó inmunoglobulinas anti-IgG humana conjugadas a peroxidasa.

El procedimiento fue realizado siguiendo las instrucciones del fabricante. Como controles de la prueba y para determinar la positividad o negatividad de una muestra, en cada placa se dispusieron un blanco cuya absorbancia fue siempre menor de 0,15, tal y como indica el control de calidad de la prueba; un control negativo, cuyos valores de absorbancia fueron siempre menores o iguales a 0,25; un control que determina el valor del punto de corte con absorbancias entre 0,25 y 0,8 y por último un control positivo cuya absorbancia fue siempre superior a 0,8.

La interpretación de los resultados se realizó en base a los valores de absorbancia que se obtuvieron para cada muestra y que fueron utilizados para calcular el índice de positividad.

El índice de positividad (IP) viene determinado por la siguiente fórmula:

$$- \text{IP} = (\text{Absorbancia de cada muestra}) / (\text{Absorbancia media del punto de corte})$$

En función de este cálculo los resultados se interpretaron de la siguiente manera:

| Índice de Positividad | Interpretación |
|-------------------------|----------------|
| Valores menores de 0,9 | Negativo |
| Valores entre 0,9 y 1,1 | Indeterminado |
| Valores mayores de 1,1 | Positivo |

10.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el programa de estadística GraphPad Prism 4 Versión 4.03 para Windows.

A partir de los datos recopilados en las encuestas y de los resultados experimentales obtenidos, se realizaron tablas de contingencia para estudiar la relación entre toxocariosis y los diferentes parámetros analizados: edad, entorno, síntomas declarados, atopia, eosinofilia, niveles de proteína catiónica en suero y niveles de IgE.

La prueba estadística utilizada fue la F de Fisher con un $p < 0,05$ y un intervalo de confianza del 95%.

La comparación entre las prevalencias entre toxocariosis de las poblaciones de adultos y la infantil, se realizó mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney que analiza la significación estadística entre las medianas de dos distribuciones dadas.

Con el fin de determinar los valores de normalidad de la Proteína Catiónica del Eosinófilo en nuestra población de estudio, se utilizaron estadísticos descriptivos de tendencia central y dispersión.





RESULTADOS

La tabla 5 expresa la prevalencia de la atopia en las dos poblaciones estudiadas. A pesar de las diferencias entre los dos grupos de población (niños de población general de Teruel y adultos donantes sanos de Elda, Alicante) los datos de dicha prevalencia son muy similares con valores alrededor del 30%.

Tabla 5: Prevalencia de atopia en la población estudiada.

| POBLACIÓN | TAMAÑO MUESTRA | PREVALENCIA DE ATOPIA |
|------------------------------|----------------|-----------------------|
| Adultos (Donantes sanos) | 312 | 0,32 |
| Niños (Población general) | 655 | 0,30 |

Prevalencia = número de casos en un momento dado/total población en ese momento

Medida de la atopia: IgE específica frente a alérgenos comunes utilizando fases sólidas de alérgenos múltiples inhalantes (Phadiatop) y alérgenos múltiples de alimentos (clara de huevo, leche, bacalao, soja, trigo y cacahuete).

Ya que la población de adultos donantes sanos no fue susceptible de integrarse en el estudio bajo el cuestionario general que fue aplicado a la población infantil, de este grupo tan sólo se poseen datos de atopia y toxocarosis, por lo que todos los demás parámetros (IgE total, ECP, eosinofilia, entorno, contacto con perros y/o gatos, inmigración y sintomatología) se refieren a la población pediátrica.

El porcentaje de individuos que mostraron valores elevados de IgE, en la población infantil fue del 6% (tabla 6). Como se puede observar, la medición del fenómeno alérgico utilizando IgE total o IgE específica origina porcentajes muy diferentes. Parece ser que la prevalencia del 30% calculada en base a la determinación de la IgE específica frente a alérgenos inhalantes y/o alimentarios comunes, es la que más se ajusta a la realidad actual.

Tabla 6: Porcentaje de la población infantil con valores altos de IgE total

| POBLACIÓN | TAMAÑO MUESTRA | FRECUENCIA DE INDIVIDUOS CON VALORES ALTOS DE IgE |
|------------------------------|-----------------------|--|
| Niños (Población general) | 494 | 6% |

El 14,3% de los niños incluidos en la población pediátrica del estudio originaron contajes de eosinófilos en sangre periférica, por encima de los valores normales (tabla 7)

Tabla 7: Porcentaje de la población infantil con eosinofilia

| POBLACIÓN | TAMAÑO MUESTRA | FRECUENCIA DE INDIVIDUOS CON EOSINOFILIA |
|------------------------------|----------------|---|
| Niños (Población general) | 494 | 14,3% |

Los valores de la frecuencia de la población infantil con valores altos de proteína catiónica del eosinófilo (ECP), se detallan en la tabla 8. Se puede observar que hay una diferencia del 5% según se tomen valores normales que se ajusten a percentiles del 87% o del 91%.

Tabla 8: Porcentaje de la población infantil con valores altos de ECP

| POBLACIÓN | TAMAÑO MUESTRA | FRECUENCIA DE INDIVIDUOS CON VALORES ALTOS DE ECP |
|-------------------------------|----------------|--|
| Niños (población general)(*) | 471 | 12,7% |
| Niños(Población general) (**) | 471 | 17,4%. |

(*) Considerando los valores normales por debajo 34 $\mu\text{g/l}$ (media aritmética + 1 DE) correspondiente a un percentil del 91%, en relación con la población de niños no atópicos y sin anticuerpos anti-*Toxocara*.

(**) Considerando los valores normales por debajo de 29 $\mu\text{g/l}$ (media geométrica + 1 DE) correspondiente a un percentil del 87%, en relación con la población de niños no atópicos y sin anticuerpos anti-*Toxocara*.

El análisis estadístico mediante la prueba de Fisher utilizando tablas de contingencia 2x2, muestra que existe relación entre los parámetros de ECP y eosinofilia ($p = 0,017$; IC = 95% utilizando valores normales de ECP de 29 $\mu\text{g/l}$ y $p = 0,006$; IC = 95% utilizando valores normales de ECP de 34 $\mu\text{g/l}$).

La tabla 9 y la figura 10 muestran los datos estadísticos de las subpoblaciones infantiles que nos permiten calcular los valores de normalidad de la ECP.

Tabla 9: Datos estadísticos de los valores de la ECP ($\mu\text{g/l}$) en función de los diferentes subgrupos de la población pediátrica (no atópicos, atópicos, toxocariosis y población normal*).

| | ATÓPICOS | TOXOCARIOSIS | POBLACIÓN NORMAL (*) |
|------------------|-----------------|---------------------|-----------------------------|
| n | 150 | 11 | 320 |
| Media aritmética | 27,4 | 48,7 | 16,8 |
| Desvío estándar | 32,2 | 54,4 | 17 |
| Rango | 2,3-177 | 14,5-200 | 2-134,2 |
| 95% percentil | 96,2 | 144,7 | 46,4 |
| Media geométrica | 18,09 | 34,6 | 11,9 |
| Mediana | 15,7 | 32 | 20,4 |

(*): Población no atópicos y no toxocariosis.

Así mismo, el análisis estadístico mediante la prueba de Fisher, utilizando tablas de contingencia 2x2, muestra que existe relación entre los parámetros de ECP y atopia, independientemente del valor de normalidad que se tome ($p = 0,0006$, IC = 95%; utilizando valores normales de ECP de $29 \mu\text{g/l}$ y $p = 0,001$, IC = 95%, utilizando valores normales de ECP de $34 \mu\text{g/l}$).

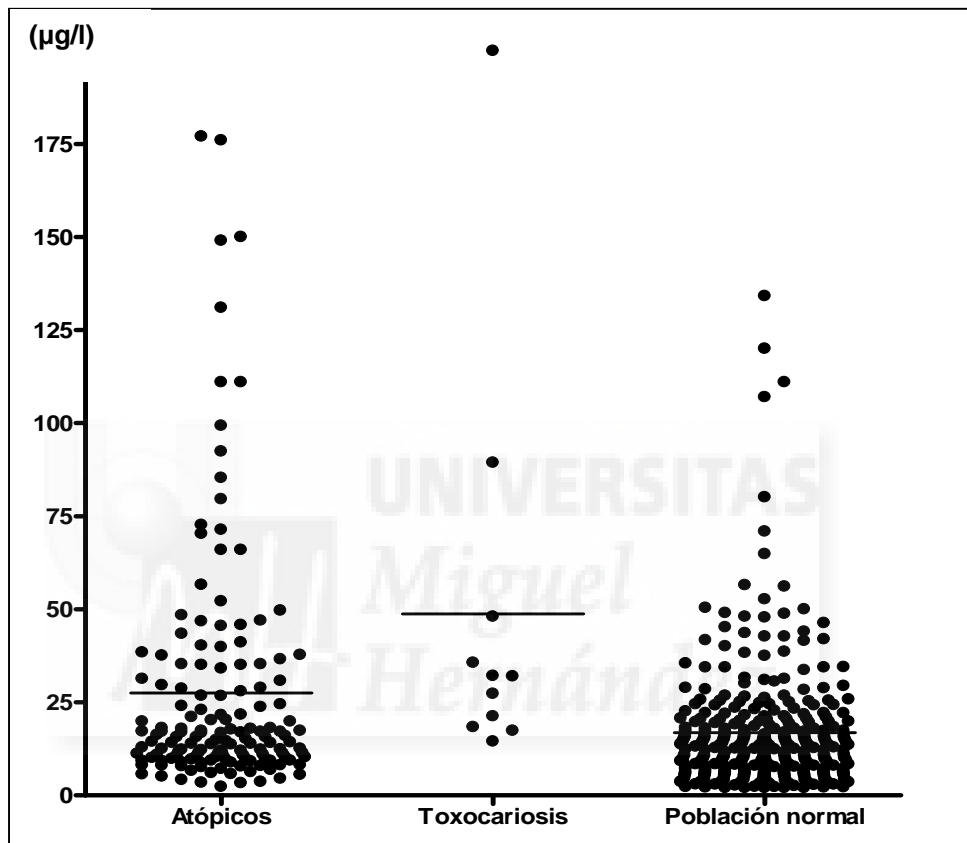


Figura 10: Distribución de los valores de ECP (µg/l) en los diferentes subgrupos de la población pediátrica (atópicos, toxocariosis y población normal*).

(*): No atópicos y no toxocariosis

Como se muestra en la tabla 10, la muestra de individuos con anticuerpos anti-*Toxocara*, tanto en la población de adultos como en la infantil es relativamente baja, con frecuencias de 0,60% y de 1,70%, respectivamente.

El análisis entre las dos poblaciones, utilizando la prueba de Mann Whitney, no mostró diferencias significativas ($p = 0,779$, IC = 95%), lo que significa que la probabilidad de que existan anticuerpos anti-*Toxocara* en ambas poblaciones es similar.

Tabla 10: Prevalencia de toxocariosis en la población estudiada.

| POBLACIÓN | TAMAÑO DE LA MUESTRA | PREVALENCIA DE TOXOCARIOSIS |
|---------------------------|----------------------|-----------------------------|
| Adultos (donantes sanos) | 312 | 0,006 |
| Niños (población general) | 655 | 0,017 |

Prevalencia = número de casos en un momento dado/total población en ese momento

Medida de la Toxocariosis: IgG (ELISA) e IgE específica (SDS-PAGE IgE Immunoblotting) frente a antígeno ES de *Toxocara canis*.

Los datos de prevalencia de la toxocariosis de las poblaciones de niños, según tengan más o menos de 5 años, o según vivan en un entorno urbano o rural, se muestran en las tablas 11 y 12 respectivamente. El análisis estadístico mediante la prueba de Fisher, utilizando tablas de contingencia 2x2, muestra que no existe relación entre la presencia de anticuerpos anti-*Toxocara* y la edad o el entorno de los niños. Los resultados fueron: $p = 0,771$; IC = 95%, al tener en cuenta la edad de la población infantil; y $p = 0,755$; IC = 95%, al referirnos al entorno de dicha población.

Tabla 11: [Prevalencia de toxocariosis de la población infantil en función de la edad.](#)

| POBLACIÓN | TAMAÑO MUESTRA | PREVALENCIA |
|-----------|----------------|-------------|
| > 5 años | 356 | 0,014 |
| < 5 años | 299 | 0,020 |

Prevalencia = número de casos en un momento dado/total población en ese momento

Medida de la Toxocariosis: IgG (ELISA) e IgE específica (SDS-PAGE IgE Immunoblotting) frente a antígeno ES de *Toxocara canis*.

Tabla 12: Prevalencia de toxocariosis de la población infantil en función del entorno.

| POBLACIÓN | TAMAÑO MUESTRA | PREVALENCIA |
|------------------------|----------------|-------------|
| Urbano (> 20.000 Hab.) | 419 | 0,014 |
| Rural (< 20.000 Hab.) | 236 | 0,021 |

Prevalencia = número de casos en un momento dado/total población en ese momento

Medida de la Toxocariosis: IgG (ELISA) e IgE específica (SDS-PAGE IgE Immunoblotting) frente a antígeno ES de *Toxocara canis*.



El factor que representa el contacto con los hospedadores definitivos de *Toxocara*, tampoco parece jugar un papel importante en la incidencia de la toxocariosis humana (tabla 13).

El análisis estadístico mediante la prueba de Fisher, utilizando tablas de contingencia 2x2, muestra un $p = 1,000$; IC = 95%.

Tabla 13: Porcentaje de toxocariosis de población infantil en función del contacto con perros y/o gatos.

| POBLACIÓN | TAMAÑO MUESTRA | FRECUENCIA |
|-------------------|----------------|------------|
| Contacto positivo | 106 | 1,00% |
| Contacto negativo | 549 | 0,80% |

Medida de la Toxocariosis: IgG (ELISA) e IgE específica (SDS-PAGE IgE Immunoblotting) frente a antígeno ES de *Toxocara canis*.

Los datos de prevalencia de la toxocariosis pediátrica en poblaciones autóctonas y de emigrantes, se muestran en la tabla 14. Aunque el porcentaje de población inmigrante que se estudió es relativamente bajo (5,3% del total de población infantil estudiada), se puede observar que la prevalencia en esta población supera en diez veces a la de la población autóctona. El 5,3% de la población (que corresponde a la población inmigrante) origina el 36,4% de los casos totales de toxocariosis humana.

Tabla 14: Prevalencia de toxocariosis de población infantil en función de la procedencia de la población.

| POBLACIÓN | TAMAÑO MUESTRA | PREVALENCIA |
|----------------------|----------------|-------------|
| Autóctono (española) | 620 | 0,011 |
| Inmigrantes (*) | 35 | 0,114 |

(*): Población compuesta por sudamericanos (n = 12, positivos = 2), magrebíes (n = 13, positivos = 0) y sujetos de países del este (n = 10, positivos = 1).

Prevalencia = número de casos en un momento dado/total población en ese momento

Medida de la Toxocariosis: IgG (ELISA) e IgE específica (SDS-PAGE IgE Immunoblotting) frente a antígeno ES de *Toxocara canis*.

En el presente estudio, todos los casos de toxocariosis demostrados por serología fueron en individuos carentes de síntomas (tabla 15), no demostrándose relación entre la positividad de anticuerpos anti-*Toxocara* y la presencia de síntomas, en el momento de realizar el estudio.

El análisis entre las poblaciones con síntomas y toxocariosis revelan una $p = 0,3249$; IC = 95%.

Tabla 15: Porcentaje de toxocariosis de población infantil en función de los síntomas que tenían en el momento del estudio.

| SÍNTOMAS | TAMAÑO DE LA MUESTRA | FRECUENCIA |
|-------------------------------|----------------------|------------|
| Asintomáticos | 475 | 1,7% |
| Respiratorios | 64 | 0,0% |
| Oculares | 6 | 0,0% |
| Neurológicos (epilepsia, ...) | 4 | 0,0% |
| Otros (fiebre, ...) | 106 | 4,7% |

Prevalencia = número de casos en un momento dado/total población en ese momento

Medida de la Toxocariosis: IgG (ELISA) e IgE específica (SDS-PAGE IgE Immunoblotting) frente a antígeno ES de *Toxocara canis*.

La prueba de Fisher demuestra que las diferencias entre las subpoblaciones de niños con valores altos de ECP y con anticuerpos anti-*Toxocara* están en función de los valores de normalidad de la ECP ($p = 0,155$; IC = 95%, para valores de normalidad de ECP de 34 y $p = 0,005$; IC = 95%, para valores de normalidad de ECP de 29) (tabla 16). Esto quiere decir que existe una relación entre las poblaciones de niños con anticuerpos anti-*Toxocara* y niños con valores altos de ECP, sólo cuando se considera el punto de corte a partir de 29 $\mu\text{g/l}$.

Tabla 16: Porcentaje de toxocariosis de la población infantil en función de los valores de la ECP.

| ECP SÉRICA | TAMAÑO DE LA MUESTRA | FRECUENCIA |
|-----------------------|----------------------|------------|
| Valores altos (*) | 82 | 7,3% |
| Valores normales (*) | 389 | 1,2% |
| Valores altos (**) | 60 | 5,0% |
| Valores normales (**) | 411 | 1,9% |

Medida de la Toxocariosis: IgG (ELISA) e IgE específica (SDS-PAGE IgE Immunoblotting) frente a antígeno ES de *Toxocara canis*.

(*).Considerando los valores normales por debajo de 29 $\mu\text{g/l}$ (media geométrica + 1 DE) correspondiente a un percentil del 87%, en relación a la población de niños no atópicos y sin anticuerpos anti-*Toxocara*

(**).Considerando los valores normales por debajo de 34 $\mu\text{g/l}$ (media aritmética + 1 DE) correspondiente a un percentil del 91%, en relación a la población de niños no atópicos y sin anticuerpos anti-*Toxocara*

El porcentaje de niños con anticuerpos anti-*Toxocara* que presentaron eosinofilia se muestra en la tabla 17. El análisis estadístico mediante la prueba de Fisher, utilizando tablas de contingencia 2x2, muestra que existe relación entre niveles de eosinofilia y presencia de anticuerpos anti-*Toxocara*.

El análisis entre las poblaciones con recuentos altos de eosinófilos y toxocariosis revelan una $p = 0,002$; IC = 95%

Tabla 17: Porcentaje de toxocariosis de la población infantil en función de los valores de eosinófilos en sangre periférica.

| EOSINOFILIA | TAMAÑO DE LA MUESTRA | FRECUENCIA |
|--------------------|-----------------------------|-------------------|
| Valores altos | 77 | 7,8% |
| Valores normales | 417 | 1,2% |

Medida de la Toxocariosis: IgG (ELISA) e IgE específica (SDS-PAGE IgE Immunoblotting) frente a antígeno ES de *Toxocara canis*.

El porcentaje de niños con anticuerpos anti-*Toxocara* que presentaron valores altos de IgE total se muestra en la tabla 18. El análisis estadístico mediante la prueba de Fisher, utilizando tablas de contingencia 2x2, muestra que existe relación entre niveles altos de IgE total y presencia de anticuerpos anti-*Toxocara*.

El análisis entre las poblaciones con valores altos de IgE total y toxocariosis revelan una $p = 0,005$; IC = 95%.

Tabla 18: Porcentaje de toxocariosis de la población infantil en función de los valores de IgE total.

| IgE TOTAL | TAMAÑO DE LA MUESTRA | FRECUENCIA |
|------------------|----------------------|------------|
| Valores altos | 30 | 13,3% |
| Valores normales | 402 | 1,7% |

Medida de la Toxocariosis: IgG (ELISA) e IgE específica (SDS-PAGE IgE Immunoblotting) frente a antígeno ES de *Toxocara canis*.

El porcentaje de niños con anticuerpos anti-*Toxocara* que presentaron atopia se muestra en la tabla 19. El análisis estadístico mediante la prueba de Fisher, utilizando tablas de contingencia 2x2, muestra que no existe relación entre atopia y presencia de anticuerpos anti-*Toxocara*.

El análisis entre las poblaciones con valores altos de IgE específica frente a alérgenos comunes y toxocariosis revelan una $p = 1,000$; IC = 95%.

Tabla 19: Porcentaje de toxocariosis de la población infantil en función de la atopia (Medida por Phadiatop y fx5).

| ATOPIA | TAMAÑO MUESTRA | FRECUENCIA |
|--------|----------------|------------|
| Sí | 197 | 3,0% |
| No | 458 | 1,1% |

Medida de la Toxocariosis: IgG (ELISA) e IgE específica (SDS-PAGE IgE Immunoblotting) frente a antígeno ES de *Toxocara canis*.

La tabla 20 muestra los resultados de los parámetros principales incluidos en el estudio, de los individuos que revelaron anticuerpos anti-*Toxocara*.

Tabla 20: Resultados de la población que reveló anticuerpos frente al antígeno excretor-secretor de *Toxocara canis*.

| | Edad ¹ | Entorno ² | Contacto ³ | Atopia ⁴ | Eosinofilia ⁵ | ECP ⁶ | slgE ⁷ | slgG ⁸ |
|----|-------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|--------------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | A | U | No | No | Nh | Nh | Nh | + |
| 2 | A | U | No | No | Nh | 22 | + | + |
| 3 | > 5 | R | Si | Si | Normal | Nh | + | + |
| 4 | > 5 | U | Si | Si | Normal | 18 | Nh | + |
| 5 | > 5 | U | No | No | Aumentada | 11 | + | + |
| 6 | > 5 | R | No | Si | Aumentada | 6 | + | + |
| 7 | > 5 | U | Si | Si | Nh | 37 | + | +* |
| 8 | < 5 | U | Si | No | Normal | 29 | + | +* |
| 9 | < 5 | R | No | No | Aumentada | 200 | + | + |
| 10 | < 5 | U | No | No | Normal | 32 | + | + |
| 11 | < 5 | R | No | No | Aumentada | 15 | + | + |
| 12 | < 5 | U | No | Si | Aumentada | 32 | + | + |
| 13 | < 5 | U | No | Si | Aumentada | 31 | + | + |

1. A: adulto; > 5: niños mayores de 5 años; < 5: niños menores de 5 años.
 2. R: Rural; U: Urbano (< 20.000 habitantes).
 3. Contacto directo con perros y/o gatos.
 4. Atopia medida con Phadiatop y fx5. Los resultados positivos se refieren a la positividad de cualquiera de las dos pruebas, y los negativos a la negatividad de ambas.
 5. Se considera eosinofilia cuando los valores exceden de 500 eosinófilos / mm³.
 6. Se consideran valores positivos los situados por encima de 29 mcg/l (87% percentil).
 7. La IgE específica frente a *Toxocara canis* se evaluó mediante SDS-PAGE IgE *Immunoblotting* con antígeno ES de L2.
 8. La IgG específica frente a *Toxocara canis* se evaluó mediante SDS-PAGE IgG *Immunoblotting* y mediante ELISA, utilizando antígeno ES de L2.
- (*). IgG mediante ELISA: 1,0 (*Borderline*: valores entre 0,9 y 1,1). SDS-PAGE IgG *Immunoblotting* negativo.
- Nh. Determinación no realizada.

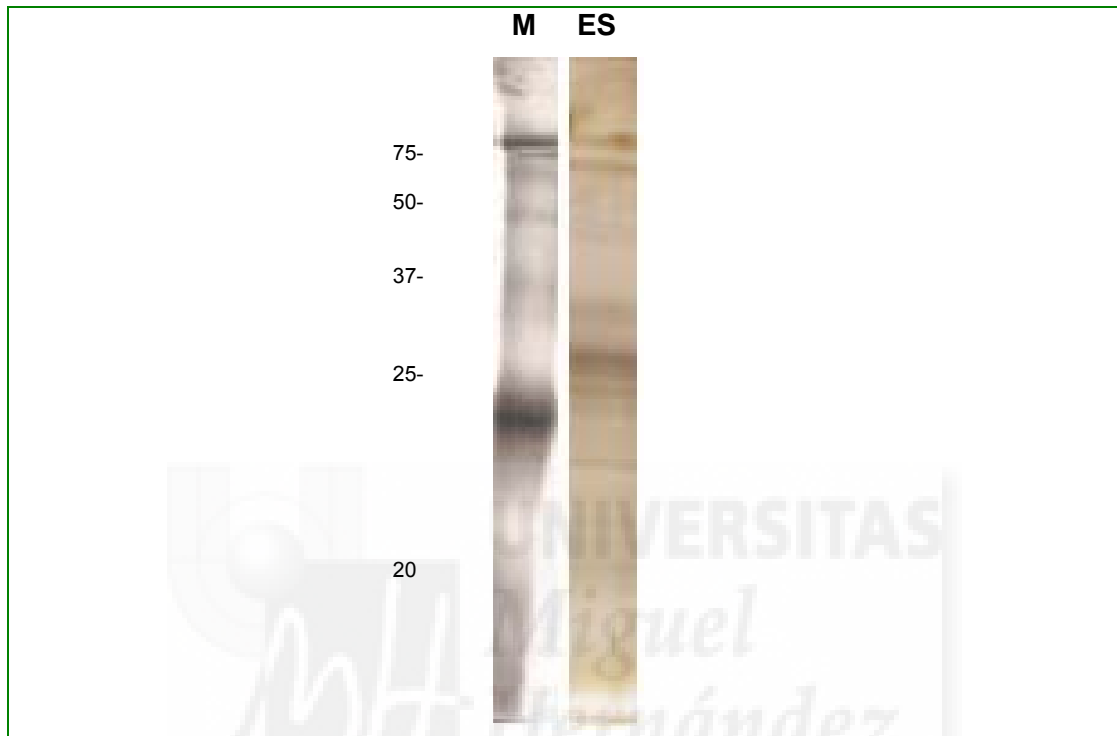


Figura 11: SDS-PAGE de los productos de excreción-secretión de larvas de segundo estado de *Toxocara canis* en cultivo.

M: Marcador de pesos moleculares

ES: antígeno excretor-secretor de larvas L2

La figura 11 muestra la electroforesis (en condiciones reductoras) del antígeno ES de larvas L2 de *Toxocara canis*. Se puede observar la presencia de 13 bandas proteicas con pesos moleculares (PM) de 75, 65, 56, 53, 36, 35, 34, 29, 28, 26, 25, 23 y 14 kDa, respectivamente.

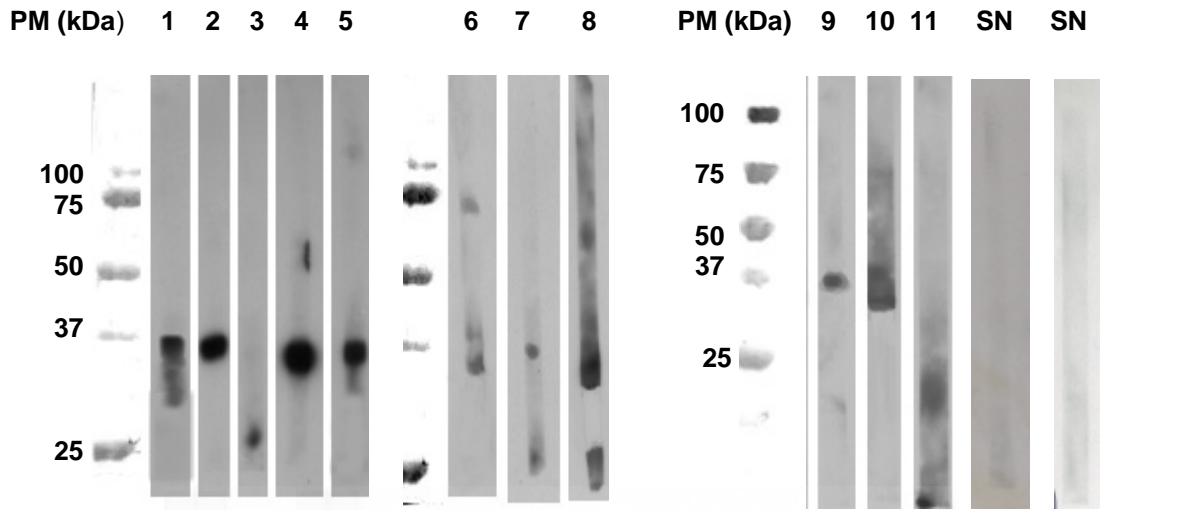


Figura 12: Inmunotransferencia. SDS-PAGE del antígeno ES de larvas L2 frente a cada uno de los sueros con anticuerpos IgG y/o IgE anti-*Toxocara canis*. Para la detección de los anticuerpos fijados a la fase sólida se utilizó conjugado anti-IgE (cadenas ϵ).

Las cifras sobre cada calle indican el número de suero.

SN: suero negativo

La figura 12 muestra los perfiles de alérgenos (componentes fijadores de IgE, de naturaleza proteica) que revelaron cada uno de los sueros correspondientes a los pacientes con presencia de anticuerpos anti-*Toxocara*.

No existe un patrón de uniformidad que se pueda aplicar a todo el conjunto de los sueros estudiados, aunque la mayor parte de ellos posee un patrón restrictivo en el que se aprecian pocas bandas.

El análisis de imagen de las inmunotransferencias muestra un total de 11 componentes fijadores de IgE que revelan pesos moleculares de 70, 63, 39, 36, 35, 34, 32, 26, 22, 21 y 19 kDa respectivamente (tabla 21).

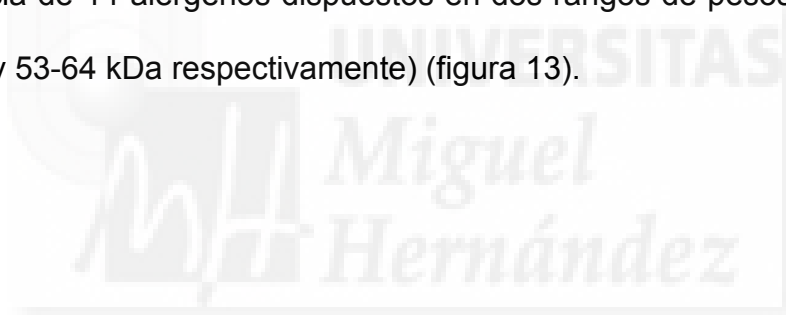
Se puede observar que el 81% de los sueros (9 de 11) revelan alguna o todas las bandas fijadoras de IgE que integran lo que el análisis de imagen define como un triplete de componentes proteicos con pesos moleculares de 36, 35 y 34 kDa respectivamente.

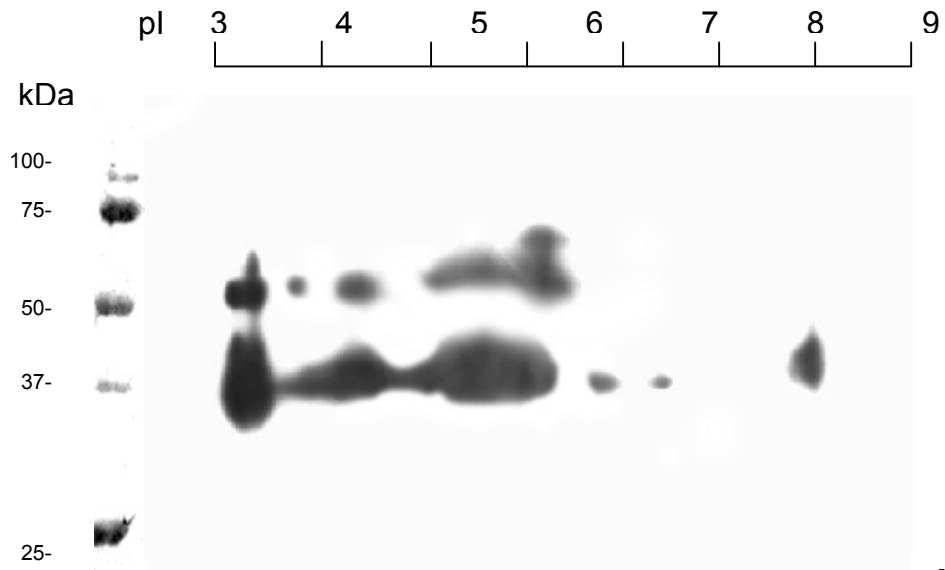
Tabla 21: Análisis de imagen. Resultados de la inmunotransferencia

| | | PACIENTE | | | | | | | | | | | |
|----|----|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | |
| PM | 70 | | | | | | + | | | | | | |
| | 63 | | | | | | | | + | | | | |
| | 39 | | | | | | + | | | | | | |
| | 36 | + | + | | + | + | | | + | + | + | | |
| | 35 | + | + | | + | + | + | + | | | | | |
| | 34 | + | + | | + | + | + | | | | | + | |
| | 32 | | | | | | | | + | | + | | |
| | 26 | | | + | | | | | + | + | | | |
| | 22 | | | | | | | | | | | | + |
| | 21 | | | | | | | | | | | | + |
| | 19 | | | | | | | | | | | | + |

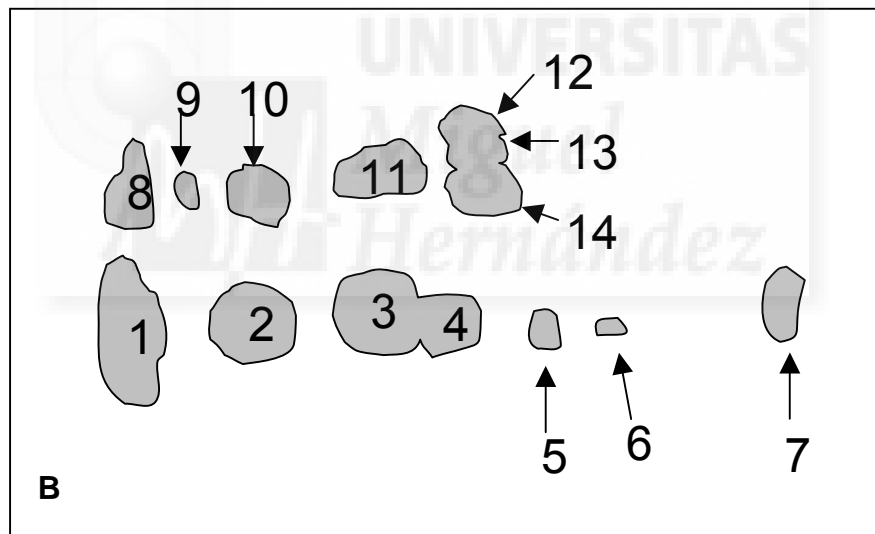
La inmunotransferencia a partir de la electroforesis en dos dimensiones (2D) muestra la heterogeneidad del triplete fijador de IgE de 34-36 kDa que aparece como única en la electroforesis unidimensional, y que el análisis de imagen define como un triplete.

El análisis de imagen de la inmunotransferencia IgE en dos dimensiones demuestra la presencia de 14 alergenios dispuestos en dos rangos de pesos moleculares (34 a 42 kDa y 53-64 kDa respectivamente) (figura 13).





A



B

Figura 13: **A:** Inmunotransferencia. Electroforesis en dos dimensiones del antígeno ES de larvas L2 frente a una mezcla de sueros (sueros 1, 2, 4 y 5) con anticuerpos IgE anti-*Toxocara canis*. Para la detección de los anticuerpos fijados a la fase sólida se utilizó conjugado anti-IgE (cadenas ϵ).

B: Representación esquemática de la movilidad de los componentes alergénicos revelados mediante electroforesis 2D.

Resultados

Valores de movilidad de los componentes alergénicos. (Electroforesis 2D).

| Componente alergénico | kDa | pI |
|-----------------------|-------|-----|
| 1 | 34-42 | 3,2 |
| 2 | 38 | 4,5 |
| 3 | 38 | 5,5 |
| 4 | 39 | 5,5 |
| 5 | 37 | 6,9 |
| 6 | 37 | 7,5 |
| 7 | 40 | 9,0 |
| 8 | 53 | 3,2 |
| 9 | 55 | 3,7 |
| 10 | 55 | 4,5 |
| 11 | 57 | 5,5 |
| 12 | 64 | 6,2 |
| 13 | 58 | 6,2 |
| 14 | 55 | 6,2 |



DISCUSIÓN

Existe el concepto de que el principal factor en el aumento de la incidencia de las enfermedades alérgicas en los países industrializados es la reducción de las enfermedades infecciosas en las últimas tres o cuatro décadas, y que la presencia de dichas infecciones durante la infancia juega un papel preventivo en la rinitis o el asma (BACH, 2002; MEDEIROS *et al.*, 2003).

A pesar de que los fenómenos de hipersensibilidad mediados por IgE y las infecciones parasitarias, principalmente las producidas por helmintos intestinales poseen respuestas inmunopatológicas que en muchos aspectos son muy semejantes, no existe una evidencia clara de la posible relación entre atopia y parasitosis, ni si ambos fenómenos poseen una base inmunológica común.

Es un hecho universalmente aceptado que la prevalencia de la alergia está aumentando de forma considerable. Se considera que el 20% de la población mundial es atópica, esto es, que tiene la capacidad de poder desarrollar síntomas alérgicos que pueden provocar asma extrínseco, rinitis y/o conjuntivitis alérgica, eccema atópico y anafilaxia. Se prevé que en la segunda mitad de este siglo, en condiciones similares a las actuales, dicha prevalencia podría situarse alrededor del 40-50%.

Según Gaig, realizando un análisis de prevalencia de la alergia mediante pruebas cutáneas, consideran que el 21,60% de la población española adulta es alérgica (GAIG *et al.*, 2004).

En el presente estudio, tanto en la población adulta como en la infantil, al evaluar la atopia mediante la detección de IgE específica frente a alergenios múltiples se encontraron valores de prevalencia del 30%. En nuestro caso existe, por tanto, una prevalencia de este fenómeno que está por encima de la media española.

Existen varios factores que podrían explicar este hecho, tales como las pruebas de cribado que se han utilizado en este estudio y que difieren de las del trabajo de GAIG *et al.*, (2004). (En este estudio se utilizó la determinación sérica de IgE específica). El tipo de población escogida para este estudio, la geografía y otros posibles parámetros que puedan influir en este tipo de resultados, aunque sin duda alguna las principales diferencias entre ambos estudios es el método elegido, y el hecho de que aquí se habla de prevalencia de atopia y no de alergia (JOHANSON *et al.*, 2001).

Desde el punto de vista práctico, y a pesar de que se han descrito varios parámetros como potenciales marcadores diagnósticos de la enfermedad alérgica en el laboratorio (histamina, proteína catiónica del eosinófilo, leucotrienos, etc.), sin duda alguna, las pruebas que permiten la detección y cuantificación de IgE

total y IgE específica en suero de pacientes, son las que han demostrado ser más fiables y resolutivas en el diagnóstico *in vitro* de las alergias (AHLSTEDT, 2002).

En la actualidad, los marcadores inmunológicos son los que poseen mayor capacidad para realizar *screening*, diagnóstico precoz y predictivo de forma más precisa y fiable. Los parámetros más utilizados como métodos de cribado han sido la cuantificación de IgE total y de IgE específica. Se ha demostrado ampliamente que la IgE total muestra importantes limitaciones para cumplir los objetivos especificados anteriormente, y en la actualidad se considera un marcador de poco valor para tal objetivo.

En el presente estudio se ha podido demostrar que el porcentaje de la población infantil con valores elevados de IgE es tan sólo del 6%. Este dato difiere claramente de los datos de prevalencia de atopia de la población general, y apoyaría el hecho de que este parámetro no sería de utilidad para medir la prevalencia del fenómeno de hipersensibilidad mediado por IgE.

De las aproximaciones que se han evaluado para el cribado de la atopia o de las enfermedades alérgicas mediadas por IgE, sin duda alguna la determinación de IgE específica frente a alérgenos múltiples es la que ha referido valores predictivos y de sensibilidad y especificidad más adecuados (BROCK *et al.*, 2000).

Estudios realizados con alérgenos múltiples para el diagnóstico de alergia respiratoria infantil utilizando neumoaérgenos o alérgenos alimentarios ofrecen una eficacia diagnóstica muy alta, con valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos por encima del 85%, siempre y cuando se elijan adecuadamente los alérgenos que deben de ser incluidos en la fase sólida. El alto porcentaje que resultó de los valores predictivos, en especial el valor predictivo negativo (95%) asegura un escaso número de falsos negativos (FIOCCHI *et al.*, 2004).

En un amplio estudio que incluyó población de varios países europeos, se demostró la consistencia de este tipo de pruebas, y encontraron valores de sensibilidad y especificidad por encima del 90% (PAGANELLI *et al.*, 1998). Esto demuestra de forma concluyente que el *screening* utilizando IgE específica frente a alérgenos múltiples, discrimina de forma clara y concluyente entre síntomas mediados y no mediados por IgE en niños de corta edad, y que un resultado positivo podría predecir el desarrollo de la enfermedad alérgica mediada por IgE.

Por tanto, dando por validado el método de la determinación de IgE específica frente a alérgenos múltiples como técnica para la evaluación del fenómeno atópico, deberíamos de considerar la prevalencia del 30% como un resultado fiable de la prevalencia actual de atopia en los grupos incluidos en este estudio, y que no se alejan significativamente de las expectativas de la prevalencia actual de

la atopia en nuestro medio, de hecho, algunos autores dan cifras del 30 al 40% en la prevalencia global de atopia de la población española (VEGA *et al.*, 2000).

La toxocariosis es una parasitosis de distribución mundial con una alta tasa de infestación, tanto en los países en desarrollo como en los industrializados (SCHANTZ, 1989; MAIZELS y ROBERTSON, 1991; MAGNAVAL *et al.*, 2001-a).

En el hombre la infección por *Toxocara* puede llegar a provocar daños importantes tanto a nivel ocular, como del tejido nervioso u otros órganos, si bien en la mayoría de los casos la clínica suele ser inespecífica y de poca gravedad. Esta sintomatología y su evolución casi siempre autolimitada, hace que sea difícil evaluar su prevalencia real, y por consiguiente el estudio de la misma se hace de forma indirecta por medio de estudios seroepidemiológicos evaluando la presencia de anticuerpos anti-*Toxocara*.

Desde que DE SAVIGNY (1975) describió el método para el mantenimiento de larvas L2 de *Toxocara* en cultivos *in vitro* como fuente de obtención de antígenos de excreción-secreción de esas larvas y su posterior aplicación al serodiagnóstico de la toxocariosis humana (DE SAVIGNY *et al.*, 1979), la utilización del ELISA para diagnóstico individual de la toxocariosis así como para la realización de estudios seroepidemiológicos se ha convertido en el método de elección. Los valores de especificidad (> 90%) y sensibilidad (\geq 80%) de esta técnica

(DESPOMMIER, 2003) muestran una eficacia diagnóstica más que razonable para estos objetivos.

En el presente estudio, utilizando ELISA con antígeno ES de larvas L2 de *Toxocara canis* se demostró una prevalencia del 0,6% en la población de adultos donantes sanos de Elda (Alicante) y del 1,7% en la población general infantil de Teruel. El estudio estadístico demostró que las diferencias entre ambas poblaciones no tenían significación estadística.

Tampoco hubo diferencias entre la prevalencia de seropositividad a *Toxocara*, cuando se dividió la población infantil en niños mayores y menores de 5 años. Las características de la infección humana por larvas L2, que le confieren una capacidad autolimitante en la mayor parte de los casos, así como la larga vida de dichas larvas infectantes en el hospedador, hace que sea difícil conocer tanto la actividad del parásito en un momento dado de la infección como el presente o pasado de la misma (MAGNAVAL *et al.*, 2001-a).

Los datos de la población adulta de este estudio coinciden con los obtenidos en Barcelona por PORTUS *et al.*, (1989) quienes también evaluaron un grupo de donantes sanos.

Los datos de población adulta obtenidos en Galicia por GONZÁLEZ QUINTELA *et al.*, (2006) y por FENOY *et al.*, (1997) muestran datos de prevalencia mucho más altos, revelando porcentajes del 28% y del 23% respectivamente.

Las discrepancias encontradas entre este estudio y los de los autores citados anteriormente, posiblemente reflejen las diferencias existentes en el tipo de población, y la frecuencia de factores de riesgo (variaciones geográficas contacto con perros y/o gatos, síntomas, ambiente rural, etc.) a que están sujetas cada una de las diferentes poblaciones.

Los estudios de prevalencia de la toxocariosis en la población infantil española también muestran valores muy heterogéneos según la región donde se realicen y los factores de riesgo que se tomen en consideración. Así, los resultados obtenidos sobre población general infantil en Madrid (GUERRA *et al.*, 1995; FENOY *et al.*, 1996); Tenerife (FENOY *et al.*, 1996); Guipúzcoa (CILLA *et al.*, 1996); Barcelona (PORTÚS *et al.*, 1989) y Salamanca (CONDE *et al.*, 1989); muestran prevalencias de 1%, 0%, 4%, 0%, 3% y 8% respectivamente. En nuestro estudio la prevalencia fue del 1,7%, correspondiendo a un porcentaje relativamente bajo, que está en cierta consonancia con los valores reportados en los trabajos citados anteriormente.

En países industrializados se puede observar que las tasas de prevalencia están generalmente por debajo del 10%. GIACCOMETTI *et al.* (2001) informan

porcentajes del 8% en Italia, STURCHLER *et al.* (1986) comunican un 5% en Suiza, MATSAMURA y ENDO (1983) informan valores del 4% en Japón; HERRMANN *et al.* (1985) del 6% en USA; VAN KNAPEN *et al.* (1983) del 7% en Holanda; KENNY y ALWRIGHT (1987) del 9% en Irlanda y NICHOLAS *et al.* (1986) informan un 7% en Australia.

Por otra parte, los estudios de seroprevalencia de la toxocariosis realizados en países en desarrollo muestran en general, valores mucho más elevados, en numerosas ocasiones por encima del 30%. RADMAN *et al.* (2000) informa valores del 39% en Argentina. ALONSO *et al.* (2004) comunican un 39% también en Argentina. LYNCH *et al.* (1988) encuentra un 35% en poblaciones indígenas del Amazonas, CANCRINI *et al.* (1998) informan entre un 27 y un 42% en Bolivia, ESPINOZA *et al.* (2003) informan un 33% en Perú, ALDERETE *et al.* (2003) informan un 38% en Brasil y CAMPOS *et al.* (2003) informan valores de un 2 a un 22% dependiendo de la condición social de la población de Brasil.

La prevalencia demostrada en el presente estudio está claramente integrada entre los países industrializados de nuestro entorno.

Al analizar detalladamente la población infantil del presente estudio en relación a la procedencia de la población, observamos que la prevalencia en la población autóctona es del 1,1%, mientras que la prevalencia en los sujetos que conforman la población no autóctona (inmigrantes) es del 11,4%. Aunque la muestra de

población inmigrante es muy pequeña (35 niños), estas diferencias podrían por una parte explicarse a través de las prevalencias de sus países de origen o bien por el factor de riesgo asociado al nivel socioeconómico tal y como demuestran CAMPOS *et al.*, (2003) o CILLA *et al.*, (1996).

La teoría de la higiene argumenta que la existencia de infecciones durante la primera infancia proporciona un estímulo a las células Th1 para que se efectúe el cambio inmunológico a partir de las células Th2, y que de esta manera se sigue manteniendo la vía Th2.

En modelos animales se ha podido comprobar que la infección helmíntica protege contra el desarrollo de la alergia y dicha protección está mediada, al menos en parte por la IL10 (WILLS-KARP *et al.*, 2001; BASHIR *et al.*, 2002)

No obstante y a pesar de los datos que apoyan esta teoría, existen otros en contra que hacen que no exista una evidencia concluyente de que las infecciones parasitarias protejan contra el desarrollo de la alergia. (HOLT *et al.*, 2000; WEISS, 2000; LIU y MURPHY, 2003).

BELL (1996), propone que las reacciones alérgicas son una consecuencia puramente patológica de la rotura del mecanismo homeostático, que a su vez desequilibra el mecanismo inmunoprotector que deriva de él.

En el caso de *Toxocara* se han realizado diversos estudios que intentan evaluar la relación entre manifestaciones alérgicas o atopia e infección por este parásito, demostrándose valores contradictorios. BUIJS *et al.*, (1997), encuentran que las manifestaciones alérgicas se expresan más comúnmente en niños seropositivos a *Toxocara*. GONZÁLEZ QUINTELA *et al.*, (2006), demostraron que existía asociación entre atopia y la población adulta seropositiva a *Toxocara*. Al contrario SHARGAI *et al.*, (2001), no encontraron relación entre la presencia de anticuerpos anti-*Toxocara* y asma.

En el presente estudio tampoco se encontró asociación entre atopia y seropositividad a *Toxocara*. SHARGAI *et al.*, (2001) justifican estas diferencias con BUIJS *et al.*, (1997), por el hecho de realizar una técnica que ofrecía valores mayores de especificidad y sensibilidad. En nuestro estudio la asociación de la determinación de IgE específica mediante *immunobloting* al ELISA IgG con antígeno ES de larvas L2, confiere a los datos de seroprevalencia más especificidad y sensibilidad que la técnica habitual de ELISA IgG utilizada por la mayoría de los autores.

Por otro lado, sí se encontró asociación entre niveles altos de IgE total y presencia de anticuerpos anti-*Toxocara*. Estos resultados difieren de los descritos por BUIJS *et al.*, (1997), también en población infantil. Según BELL (1996), esto podría estar en concordancia con el hecho de que la respuesta IgE policlonal frente a la infección por nematodos forma parte de la respuesta inmunitaria natural frente a

parásitos helmintos, y en nuestro caso, la IgE total de la población seropositiva a *Toxocara*, podría ser un parámetro que interfiera fundamentalmente en el desarrollo inmunológico de la respuesta frente a *Toxocara*, más que un valor de relación con el fenómeno atópico.

El contacto con perros y/o gatos no demostró ser un factor de riesgo relacionado con la seropositividad de la población infantil aquí estudiada.

Como cita OVERGAAUW (1997), el contacto con perros o gatos no se considera un riesgo potencial de adquirir esta parasitosis. La manipulación de tierra (suelo) contaminada con huevos embrionados por niños parece estar más en consonancia con el riesgo de adquirir la toxocariosis.

Las diferencias entre las poblaciones rural y urbana tampoco demostraron ser un factor de riesgo en la seropositividad de nuestra población a *Toxocara*. Por el contrario, CONDE *et al.*, (1989), en Salamanca, encontraron diferencias entre estos parámetros. No obstante, tal y como discuten BUIJS *et al.*, (1997), es muy probable que en poblaciones rurales y urbanas que tienen un parecido nivel socioeconómico e higiénico-sanitario, estas diferencias sean mínimas.

Como se ha comentado anteriormente, la mayor parte de las infecciones por *Toxocara* cursan con síntomas mínimos y no patognomónicos que pasan desapercibidos. En el presente estudio la totalidad de los individuos seropositivos

estaban asintomáticos o poseían síntomas claramente diferentes de los descritos para las infecciones activas por *Toxocara*, por lo que en esta población, la sintomatología no debería considerarse como uno de los factores de riesgo.

Está ampliamente descrita la asociación entre los eosinófilos y la proteína catiónica del eosinófilo y atopia y enfermedades parasitarias (PREHN *et al.*, 1998; BEHM y OVINGTON, 2000; MEEUSEN y BALIC, 2002; DOMBROWICZ y CAPRON, 2001), incluyendo la toxocariosis (FATTAH *et al.*, 1986; GONZÁLEZ-QUINTELA *et al.*, 2006; MAGNAVAL *et al.*, 2001-b; MAGNAVAL *et al.*, 2002).

En este estudio se encontró una asociación entre contajes altos de eosinófilos en sangre y seropositividad a *Toxocara*, aunque se pudo observar que no todos los individuos con anticuerpos anti-*Toxocara* tuvieron eosinofilia. BUIJS *et al.*, (1997), que encuentran unos datos similares a los nuestros, proponen que dependiendo del momento de la infección (fase aguda, fase activa, fase crónica o fase autolimitante) la migración de los eosinófilos puede ser más o menos activa, y eso podría justificar la diversidad de los datos en la población de individuos seropositivos.

Algo similar pasa con los valores altos de la proteína catiónica del eosinófilo, que también mostraron una buena relación con la seropositividad a *Toxocara*.

Al igual que con los eosinófilos, no todos los sujetos seropositivos mostraron valores altos de proteína catiónica del eosinófilo. MAGNAVAL *et al.*, (2001-b), proponen que la utilización de este parámetro, conjuntamente con la serología, aún cuando el conteo de eosinófilos en sangre sea bajo, es una herramienta eficaz para distinguir entre toxocariosis activa y no activa.

Asumiendo esto, en nuestra población de niños con anticuerpos anti-*Toxocara* tendríamos 6 casos de larva migrans visceral (LMV) activa.

Para poder realizar los estudios relacionados con la proteína catiónica del eosinófilo, se tuvieron que analizar los valores de la población infantil, a fin de poder extraer los valores de normalidad que fueran más consecuentes con la función y las expectativas de dicho parámetro. El análisis de la población infantil normal, en la que se excluía la población atópica y la población seropositiva a *Toxocara*, mostró valores medios de 16,8 y 11,9 según se refiriesen a la media aritmética o a la geométrica, respectivamente. Estos valores son más altos que los propuestos por FITCH *et al.*, (1999) y NJA *et al.*, (2001).

Cuando el punto de corte se estableció en el valor de la media geométrica más una desviación estándar (29 $\mu\text{g/l}$), el análisis mostró que existía relación entre la proteína catiónica del eosinófilo y el conteo de eosinófilos en sangre periférica, así como entre dicha proteína y la atopia.

Teniendo en cuenta esos valores de normalidad, que correspondían a un percentil del 87%, también se pudo demostrar una relación estadísticamente significativa entre los valores altos de proteína catiónica del eosinófilo y los anticuerpos anti-*Toxocara*.

Hasta la fecha, existen pocos trabajos que estudien la respuesta inmune humoral frente a la infección por larvas de *Toxocara* en el hombre, analizando al mismo tiempo anticuerpos de las clases IgE e IgG (GENCHI *et al.*, 1988; MAGNAVAL *et al.*, 1992; UHLIKOVA *et al.*, 1996; MAGNAVAL *et al.*, 2002). La mayor parte de ellos analizan la respuesta de la IgE específica como apoyo al diagnóstico de la toxocariosis, y algunos concluyen que la IgG específica podría enmascarar la respuesta de la IgE en un mecanismo competitivo por los mismos epítomos (GENCHI *et al.*, 1988) y que no existe correlación entre IgG específica e IgE específica en pacientes sintomáticos (UHLIKOVA *et al.*, 1996). MAGNAVAL *et al.*, (1992), concluyen que la IgE específica es un parámetro que se muestra insuficiente en el serodiagnóstico de la toxocariosis, aunque posteriormente proponen la utilización de la IgE y la IgG específicas de forma conjunta para obtener un diagnóstico más fiable (MAGNAVAL *et al.*, 2002).

En el presente estudio los trece pacientes demostraron una respuesta dual IgG e IgE específica a los antígenos ES de las larvas de *Toxocara canis*, y la incorporación de la IgE específica definió algunos casos que revelaron títulos dudosos al medirlos por ELISA IgG.

Aunque no se conoce cual es el papel de esta respuesta dual (anticuerpos IgG e IgE) frente a antígenos de *Toxocara*, es probable que en aquellos pacientes en los que la respuesta de la IgE anti-*Toxocara* sea evidente, la posible relación con fenómenos de hipersensibilidad frente a dichos antígenos también puede hacerse evidente, de la misma manera que aparece en la anisakidosis (DASCHNER y PASCUAL, 2005).

Bajo este contexto, sería necesario conocer cuales de los antígenos de *Toxocara* son capaces de inducir la síntesis de IgE específica, para poder estudiar en profundidad el posible fenómeno de la alergia relacionada con la infección de *Toxocara*.

A pesar de que existen numerosos antígenos de *Toxocara canis* descritos (MAIZELS *et al.*, 2000; MAIZELS y LOUKAS, 2001), hasta la fecha no existe ningún alérgeno descrito o definido para esta especie (www.allergome.org; www.allergen.org).

En el presente estudio, mediante SDS-PAGE se pudo demostrar la presencia de 11 alérgenos diferentes a partir del material de excreción-secreción de las larvas de L2 de *Toxocara*, de los que tres componentes de 34, 35 y 36 kDa se podrían definir como alérgenos mayores o relevantes ya que se expresan en más del 50% de la población seropositiva.

El análisis de esos componentes mediante electroforesis 2D reveló la presencia de al menos 7 componentes de 34 a 40 kDa con un rango de pI muy amplio (4 componentes ácidos, 2 neutros y 1 básico) y otros 7 componentes con pesos moleculares de 53 a 64 kDa, todos ellos con pI en el rango de la acidez (pI 3,2-6,2). Dado que la electroforesis 2D se reveló a través de sueros que reaccionaban solo frente a los alérgenos del triplete, la aparición de componentes de pesos moleculares más altos, que casi duplican o duplican los calculados en la electroforesis en una dimensión podría explicarse como la detección de dímeros o agregados. De cualquier manera sería necesario realizar estudios más exhaustivos a este respecto para poder demostrarlo.

De las proteínas reveladas por la inmunotransferencia, la correspondiente al triplete de 34-37 kDa definido mediante análisis de imagen, podría asociarse a la proteína de 32 kDa definida por MAIZELS *et al.*, (1984), que constituye el producto más abundante secretado por el parásito y que corresponde a una lectina 1 tipo C (CT1) que podría ser utilizada por el parásito para la evasión de la respuesta inmunitaria, dado que pertenece a la misma superfamilia de los receptores del sistema inmunitario de los mamíferos como la selectina o el CD23. Además, se han podido aislar otras lectinas tipo C de *Toxocara* que difieren en un 13-17% de la secuencia de aminoácidos (MAIZELS y LOUKAS, 2001), y que podrían explicar la heterogeneidad revelada por la electroforesis 2D.

PAGE *et al.*, (1991), mediante electroforesis 2D mostraron unos patrones de proteínas muy similares a los de los alérgenos encontrados en este estudio y demostraron que dichos patrones eran muy diferentes a los de otras especies de *Toxocara* (*T. vitulorum*) o a los de *Toxascaris leonina*. Esto estaría a favor de la especificidad de la respuesta IgE específica de los individuos protocolizados en el estudio, frente a la infección por larvas de *Toxocara canis*.





CONCLUSIONES

1.- En la población seropositiva a *Toxocara* se han podido detectar 11 componentes alergénicos diferentes, de los cuales tres; de pesos moleculares 34, 35 y 36 kDa, pueden constituir alérgenos relevantes por detectarse en más del 50% de dicha población.

2.- El análisis bidimensional de los componentes alergénicos que pueden constituir alérgenos relevantes (34-36 kDa) demuestra la presencia de siete componentes protéicos diferentes.

3.- En todos los individuos de la población seropositiva a *Toxocara canis* se pudo demostrar la presencia de anticuerpos IgE e IgG específicos frente a los productos larvarios de excreción-secreción.

4.- En nuestro estudio, la prevalencia de toxocariasis no está significativamente relacionada con la edad de la población, con el entorno (urbano-rural), ni con el contacto estrecho con animales (perros y/o gatos) que constituyen la fuente primaria de infección.

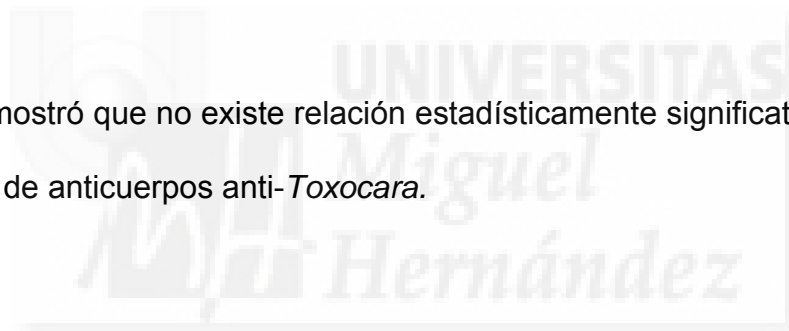
5.- Se ha constatado la elevada seroprevalencia de toxocariosis en la población infantil inmigrante en relación con la población infantil autóctona.

6.- En nuestro estudio se demostró la relación estadísticamente significativa entre valores altos de ECP (valor de corte a partir de 29 $\mu\text{g/l}$) y detección de anticuerpos anti-*Toxocara canis*.

7.- Nuestros datos apoyan la relación existente entre la seropositividad a *Toxocara* y recuentos altos de eosinófilos en sangre periférica.

8.- Se demostró la relación estadísticamente significativa entre niveles altos de IgE total y presencia de anticuerpos anti-*Toxocara*.

9.- Se demostró que no existe relación estadísticamente significativa entre atopia y presencia de anticuerpos anti-*Toxocara*.





BIBLIOGRAFÍA

Abe K., Shimokawa H., Kubota T., Nawa Y., Takeshita A., 2002. Myocarditis associated with visceral larva migrans due to *Toxocara canis*. *Inter. Med.* 41:706-708.

Ahlstedt S., 2002. Understanding the usefulness of specific IgE blood tests in allergy. *Clin. Exp. Allergy.* 32:11-16.

Alderete J.M., Jacob C.M., Pastorino A.C., Elefant G.R., Castro A.P., Fomin A.B., Chieffi P.P., 2003. Prevalence of *Toxocara* infection in schoolchildren from the Butanta region. Sao Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98:593-597.

Allison T., 2002. Intestinal helminthiasis and allergic disease. www.Angelfire.com/ns/thatguytimallison/

Alonso A., Moreno A., Lopez M.C., Suarez J.M., Daschner A., Caballero M.T., Barranco P., Cabañas R., 2004. *Anisakis simplex* only provokes allergic symptoms when the Word parasites the gastrointestinal tract. *Parasitol Res.* 93:378-384.

Alonso J.M., Lopez M.A., Bojanich M.V., Marull J., 2004. Infección por *Toxocara canis* en población adulta sana de un area subtropical de Argentina. *Parasitol Latinoam.* 59:61-64.

Bach J.F., 2002. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *New Eng. J. Med.* 347:911-920.

Baixench M.T., Magnaval J.F., Dorchies P., 1992. Epidemiologie de la toxocarose chez les étudiants de l'Ecole Nationale Veterinarinaire de Toulouse. *Rev. Med. Vet.* 143:749-752.

Bashir Meh, Andersen P., Fuss I.J., Shi Hn., Hagler-Anderson C., 2002. An enteric helminth infection protects against an allergic response to dietary antigen. *J. Immunol.* 168:3284-3292.

Beaver P.C., Snyder C.H., Carrera G.M., 1952. Eosinofilia crónica debida a larva migrans visceral. *Pediatrics.* 9:7-19.

Beaver P.C., 1962. Toxocariasis (visceral larva migrans) in relation to tropical eosinophilia. *Bol. Soc. Pathol. Exot.* 55:555-576.

Behm C.A., Ovington K.S., 2000. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: Insights from genetically modified mice. *Parasitol Today.* 16:202-209.

Bell R.G., 1996. IgE, allergies and helminth parasites: A new perspective on an old conundrum. *Immunol. Cell. Biol.* 74:337-345.

Bouchard O., Bosseray A., Leclercq P., Micoud M., 1998. Meningoencephalitis caused by *Toxocara canis*. Ann. Med. Interne. 149:391-392.

Brock Williams P., Barnes J.H., Szeinbach S.L., Sullivan T.J., 2000. Analytic precision and accuracy of commercial immunoassays for specific IgE: Establishing a standard. J. Allergy Clin. Immunol. 105:1221-1230.

Brunet L.R., Finkelman F.D., Cheever A.W., Kopf M.A., Pearce E.J., 1997. IL4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis: J. Immunol. 159:777-785.

Buijs J., Borsboom, Renting M., Hilgersom W.J., Van Wieringen J.C., Janse G., Neijens J., 1997. Relationship between allergic manifestations and *Toxocara* seropositivity: a cross-sectional study among elementary school children. Eur. Resp. J. 10:1467-1475.

Burke T.M., Roberson E.L., 1985. Prenatal and lactational transmission of *Toxocara canis* and *Ancylostomum caninum*. Experimental infection of the bitch before pregnancy. Int. J. Parasitol. 15:71-75.

Campos Junior D., Rubinsky Elefant G., Melo e Silva E., Gandolfi L., Miuki Abe Jacob C., Tofeti A., Pratesi R., 2003. Frequência de seropositividade para antígenos de *Toxocara canis* em crianças de classes sociais diferentes. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 36(4):509-513.

Cancrini G., Bartoloni A., Zaffaroni E., Guglielmetti P., Gamboa H., Nicoletti A., Gechi C., 1998. Seroprevalence of *Toxocara canis*-IgG antibodies in two rural Bolivian communities. *Parassitol.* 40:473-475.

Capron M., Grangette C., Torpier G., Capron A., 1989. The second receptor for IgE in eosinophil effector function. *Chem. Immunol.* 47:128-178.

Cheever A.W., Hoffmann K.F., Wynn T.A., 2000. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. *Immunol. Today.* 21:465-466.

Chiaromonte M.G., Schopt L.R., Neben T.Y., Cheever A.W., Donaldson D.D., Wynn T.A., 1999. IL13 is a key regulatory cytokine for Th2 cell-mediated pulmonary granuloma formation and IgE responses induced by *schistosoma mansoni* eggs. *J. Immunol.* 162:920-930.

Cilla G., Perez-Trallero E., Gutierrez C., Part C., Gomariz M., 1996. Seroprevalence of *Toxocara* infection in middle-class and disadvantaged children in northern Spain (Gipuzkoa. Basque Country). *Eur. J. Epidemiol.* 12(5):541-543.

Coelho L., Silva M., Dini C., Giancon A., Novo N., Silveira E., 2004. Human Toxocariasis: a Seroepidemiological survey in schoolchildren of Sorocaba, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99(6):533-557.

Conde-García L., Muro-Alvarez A., Simón-Martín F., 1989. Epidemiological studies on toxocariasis and visceral larva migrans in a zone of Western Spain. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 83:615-620.

Cox D.M., Holland C.V., 1998. The relationship between numbers of larvae recovered from the brain of *Toxocara canis* infected mice and social behaviour and anxiety in the host. *Parasitol.* 116:579-594.

Cox D.M., Holland C.V., 2001. Relationship between three intensity levels of *Toxocara canis* larvae in the brain and effects on exploration, anxiety, learning and memory in the murine host. *J. Helminthol.* 75:33-41.

Daschner A., Pascual C.Y., 2005. *Anisakis simplex*: sensitization and clinical allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 5(3):281-285.

De Cock C., Lemaitre J., Deuvaert F.E., 1998. Loeffler endomyocarditis: a clinical presentation as right ventricular tumor. *J. Heart Valve. Dis.* 7:668-671.

De Savigny D.H., 1975. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnosis test for visceral larva migrans. *J. Parasitol.* 61:781-782.

De Savigny D.H., Voller A., Woodruff A.W., 1979. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J. Clin. Pathol.* 32(3):284-288.

Del Águila C., Cúellar C., Guillén J.M., 1988. Excretory/secretory antigen of *Toxocara canis*: recognition profiles of polyclonal and larvicidal monoclonal antibodies. *Paras. Immunol.* 10:237-241.

Despommier D., 2003. Toxocariasis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:265-272.

Di Prisco M.C., Lynch N.R., López R., 1987. Allergy in the tropical environment with special reference to the Venezuelan population. *Inter.* 12:300-303.

Di Prisco M.C., Hagel I., Puccio F., 2006. Efectos moduladores de las parasitosis helmínticas en el desarrollo del asma y las enfermedades alérgicas. *Vitae Acad. Biom. Digital.* Marzo 2006.

Dombrowicz D., Capron M., 2001. Eosinophils, allergy and parasites. *Cur. Opin. Immunol.* 13:716-720.

Dubey J., 1978. Patent *Toxocara canis* infection in ascarid naïve dogs. *J. Parasitol.* 64:1021-1023.

Duprez T.P.J., Bigaignon G., Delgrange E., 1996. MRI of cervical cord lesions and their resolution in *Toxocara canis* myelopathy. *Neuroradiol.* 38:792-795.

Espinoza Y., Huapaya P., Sevilla C., Huiza A., Jiménez S., Náquira C., 2003. Toxocariasis humana: seroprevalencia en población de Lima mediante la técnica de ELISA. *An. Fac. Med.* 64 n. 4.

Fallon P.G., Richardson E.J., McKenzie G.J., McKenzie A.N., 2000. *Schistosome* infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL4 and IL13: IL13 is a profibrotic agent. *J. Immunol.* 164:2585-2591.

Fattah D.I., Maizels R., McLaren D.J., Spry C.J.F., 1986. *Toxocara canis*: Interaction of human blood eosinophils with the infective larva. *Exp. Parasitol.* 61:421-431.

Fenoy S., Cuellar C., Guillén J.L., 1996. Seroprevalence of toxocariasis in children and in adults in Madrid and Tenerife. *J. Helminthol.* 70:109-113.

Fenoy S., Cuellar C., Guillén J.L., 1997. Serological evidence of toxocariasis in patients from Spain with a clinical suspicion of Visceral Larva Migrans. *J. Helminthol.* 1997. 71:9-12.

Finkelman F.D., Wynn T., Donaldson D., Urban J.F., 1999. Current opinion in immunology. *Art. Acad.* 11:420-426.

Fiocchi A., Besana R., Ryden A.C., Terrachiano L., Andreotti M., Arrigini S., Martelli A., 2004. Differential diagnosis of IgE-mediated allergy in young children with wheezing or eczema symptoms using a single blood test. *Ann. Allergy Asth. Immunol.* 93:328-333.

Fitch P.S., Brown V., Schock B.C., Taylor R., Ennis M., Shields M.D., 1999. Serum ECP: reference values in healthy nonatopic children. *Allergy.* 54:1199-1203.

Gass J.D., Braunstein R.A., 1983. Further observations concerning the diffuse unilateral subacute neuroretinitis syndrome. *Arch. Ophthalmol.* 101:1689-1697.

Gaig P., Muñoz D., Leonart R., García J.L., Caballero T., Rodríguez A., Echechipia S., Martínez C., Domínguez F.J., Gonzalo M.A., Olona M., 2004. Prevalencia de alergia en la población adulta española. *Alergol. Inmunol. Clin.* 19: 68-74.

Genchi C., Falangiani P., Riva G., Tinelli M., Brunello F., Boero M., Almaviva M., 1988. IgE and IgG antibodies, in *Toxocara canis* infection. A clinic evaluation. *Ann. Allergy.* 61:43-46.

Giaccometti A., Cirioni O., Fortuna M., Osimani P., Antonicelli L., Del Petre M.S., Riva A., D'Errico M.M., Petrelli E., Scalise G., 2001. Environmental and serological evidence for the presence of toxocariasis in the urban area of Ancona. Italy. Eur. J. Epidemiol. 16:1023-1026.

Gillespi S.H., Dinning W.J., Voller A., Crowcroft N.S., 1993. The spectrum of ocular toxocariosis. Eye. 7:415-418.

Glickman L.T., Schantz P.M., 1981. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. Epidemiol. Rev. 3:230-250.

Glickman L.T., Grieve R.B., Lauria S.S., Jones D.L., 1985. Serodiagnosis of ocular toxocariasis comparison of two antigens. J. Clin. Pathol. 38:103-107.

Glickman L.T., Shofer F.S., 1987. Zoonotic visceral and ocular larva migrans. The Vet. Clin. North Am. Small Anim. 17:39-53.

Goffette S., Jeanjean A.P., Duprez T.P., Bigaignon S., Sindic C.J., 2000. Eosinophilic pleocytosis and myelitis related to *Toxocara canis* infection. Eur. J. Neurol. 7:703-706.

Gonzalez-Quintela A., Gude F., Campos J., Garea M.T., Romero P.A., Rey J., Mijide L.M., Fernandez M.C., Vidal C., 2006. *Toxocara* infection seroprevalence and its relationship with atopic features in a general adult population. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 139:317-324.

Gounni A.S., Lamkhioued B., Ochiai K., Tanaka Y., Delaporte E., Capron A., 1994. High-Affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature.* 367:183-186.

Guerra A., Navarro C., de Guevara C.L., 1995. Seroprevalence of toxocariasis in children and a case of Visceral Larva Migrans. *Eur. J. Epidemiol.* 11:701-702.

Hagel I., Lynch N.R., Di Prisco N.C., Rojas E., Perez M., Alvarez N., 1993. *Ascaris* reinfection of slum children relation with the IgE response. *Clin. Exp. Immunol.* 94:80-83.

Hayes K., Bankcroft A., Grencis R., 2004. Immune-mediated regulation of chronic intestinal nematode infection. *Immunol. Rev.* 201:75-88.

Herrmann N., Glickman L.T., Schantz P.M., 1985. Seroprevalence of zoonotic toxocariasis in the United States. *Am. J. Epidemiol.* 122:890-896.

Hill I.R., Denham D.A., Scholtz C.L., 1985. *Toxocara canis* larvae in the brain of a British child. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79:351-354.

Hoffmann K.F., James S.L., Cheever A.W., Wynn T.A., 1999. Studies with double cytokine-deficient mice reveal that highly polarized Th1 and Th2-type cytokine and antibody responses contribute equally to vaccine induced immunity to *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 163:927-938.

Hokibara S., Takamoto M., Isobe M., Sugane K., 1998. Effects of monoclonal antibodies to adhesion molecules on eosinophilic myocarditis in *Toxocara canis* infected CBA/J mice. *Clin. Exp. Immunol.* 114:236-244.

Holt P.G., 2000. Parasites, atopy and the hygiene hipotesis resolution of a paradox?. *Lancet.* 356:1699-1670.

Hotez P.J., 1993. Visceral and ocular larva migrans. *Semin. Neurol.* 13:175-179.

Hyde J.E., 1990. *Molecular Parasitology*. Open University press.

Johanson S.G.O., O'B Ouriane J., Bousquet J., Bruijnzeel C., Dreborg S., Haahtela T., Kowalski M.L., Mygind N., Ring J., Van Cauwenberge P., Van Hage-Hanmsten M., Wüthrich B., 2001. A revised nomenclatura for allergy. *Allergy.* 56:813-824.

Kayes S.G., 1997. Human Toxocariosis and Visceral Larva Migrans syndrome. *Chem. Immunol.* 66:99-124.

Kennedy M.W., 1991. Parasitic nematodes: antigens, membranes and genes. Taylor and Francis. London, New York.

Kenny V., Allwright S.P., 1987. Seroprevalence of toxocariasis in a hospital based sample in Ireland. *Ir. J. Med. Sci.* 156:361-363.

Khalil H.M., Azab M.E., Safar E.H., Bebars M.A., el Hady H.M., Khattab H.M., 1989. Immunodiagnosics of visceral toxocariasis. *J. Egypt Soc. Parasitol.* 19(2):381-393.

Kincekova J., Reiterova K., Dubinsky P., 1999. Larval toxocariasis and its clinical manifestation in childhood in the Slovak Replubic. *J. Helminthol.* 73:323-328.

Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

Liu A.H., Murphy J., 2003. Hygiene hypothesis: Fact or fiction. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111:471-478.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

Luzna-Lyskov A., 2000. Toxocariasis in children living in highly contaminated area. An epidemiological and clinical study. *Acta Parasitol.* 45:40-42.

Lynch N.R., Eddy K., Hodgen A.N., Lopez R.I., Turner K.J., 1988. Seroprevalence of *Toxocara canis* infection in tropical Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82:275-281.

Lynch N.R., 1992. Influence of socio-economic level on helminthic infection and allergic reactivity in tropical countries. In: Moqbel R., Editor. *Allergy and Immunity to Helminths: Common Mechanisms or Divergent Pathways?*. London: Taylor and Francis. P: 51-62.

Lynch N.R., Hagel I., Pérez M., Di Prisco M.C., López R., Alvarez N., 1993. Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92:404-411.

Lynch N.R., Palenque M., Hagel I., Di Prisco M.C., 1997. Clinical improvement of asthma after anthelmintic treatment in a tropical situación. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 156:50-54.

Magnaival J.F., Fabre R., Maurieres P., Charlet J.P., De Larrard B., 1991. Application of the western-blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol. Research.* 77:667-702.

Magnaival J.F. Fabre R., Maurieres P., Charlet J.P., De Larrard B., 1992. Evaluation of an immunoenzymatic assay detecting specific anti-*Toxocara* immunoglobulin E for diagnosis and posttreatment follow-up of human toxocariasis. *J. Clin. Microbiol.* 30:2269-2274.

Magnaival J.F., Galindo V., Glickman L.T., Clanet M., 1997. Human *Toxocara* infection of the central nervous system and neurological disorders: a case-control study. *Parasitol.* 115:537-543.

Magnaival J.F., Glickman L.T., Dorchie P., Morassin B., 2001 (a). Highlighths of human toxocariasis. *Korean J. Parasitol.* 39:1-11.

Magnaival F.J., Berry A., Fabre R., Morassin B., 2001 (b). Eosinophil cationic protein as a possible marker of active human *Toxocara* infection. *Allergy.* 56:1096-1099.

Magnaival F.J., Malard L., Morassin B., Fabre R., 2002. Immunodiagnosis of ocular toxocariosis using Westwern-blot for the detection of specific anti-*Toxocara* IgG and CAP for the measurement of specific anti-*Toxocara* IgE. *J. Helminthol.* 76:335-339.

Maizels R.M., de Savigni D. and Ogilvie B.M., 1984. Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. Paras. Immunol. 6:23-37.

Maizels R.M., Robertson B.D., 1991: *Toxocara canis*: secreted glycoconjugate antigens in immunobiology and immunodiagnosis. En: Kennedy M.W. (Ed). Parasitic nematodes, antigens, membranes and genes. pp: 95-115. Taylor and Francis. Ltd. London.

Maizels R.M., Tetteh K.K.A., Loukas A., 2000. *Toxocara canis*: Genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode. International J. Parasitol. 30:495-508.

Maizels R.M., Loukas A., 2001. The surface and secreted antigens of *Toxocara canis*: genes, protein structure and function. In: Kennedy M.W. and Harbett W. (Ed.). Parasitic Nematodes. CAB. International. 230.

Maizels R.M., Yazdanbakhsh M., 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. Nature Rev. Immunol. 3:733-744.

Manfredi M.T., Felicita A., 1993. Recenti rilievi epidemiologici sui cestodi del cane e del gatto. Prax. Vet. 14:5-7.

Matsumara K., Endo R., 1983. Seroepidemiological study on toxocaral infection in man by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Hyg. Camb.* 90:61-65.

Medeiros M., Figueiredo J.P., Almeida M.C., Matos M.A., Araujo M.I., 2003. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 111:947-951.

Meeusen E.N.T., Balic A., 2002. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites?. *Trends. Parasitol.* 16:95-101.

Mimoso M., Pereira M., Estevao M., Barroso A., Mota H., 1993. Eosinophilic meningoencephalitis due to *Toxocara canis*. *Eur. J. Pediatr.* 152:783-784.

Nagakura K., Kanno S., Tachibana H., Kaneda Y., Ohkido M., Kondo K., Inoue H., 1990. Serologic differentiation between *Toxocara canis* and *Toxocara cati*. *J. Infect. Diseases.* 162:1418-1419.

Nicholas W.L., Steward A.C., Wlaker J.C., 1986. Toxocariasis: a serological survey of blood donors in the Australian Capital Territory together with observations on the risks of infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80:217-221.

Nicoletti A., Bartolini A., Reggio A., Bartalesi F., Roselli M., Sofia V. Rosado Chavez J., Gamboa Barahona H., Paradisi F., Cancrini G., Tsang V.C., Hall A.J., 2002. Epilepsy cysticercosis and toxocariasis: a population based case-control study in rural Bolivia. *Neurol.* 58:1256-1561.

Nja F., Roksund O.D., Carlsen K.H., 2001. ECP in schoolchildren living in a mountainous area of Norway: a population-based study of ECP as a tool for diagnosing asthma in children with reference values. *Allergy.* 56:138-144.

Overgaauw P., 1997. Aspects of *Toxocara* epidemiology: human toxocariasis. *Crit. Rev. Microbiol.* 23:215-231.

Paganelli R., Ansotegui I.J., Sastre J., Lange C.E., Roovers M.H., De Groot L., Lindholm N.B., Ewan P.W., 1998. Specific IgE antibodies in the diagnosis of atopic diseases. Clinical evaluation of a new test system, UniCAP in six European allergy clinics. *Allergy.* 53:763-768.

Page A.P., Richards D.T., Lewis J.W., Omar H.M., Maizels R.M., 1991. Comparison of isolates and species of *Toxocara* and *Toxascaris* by biosynthetic labelling of somatic and ES proteins from infective larvae. *Parasitol.* 103:454-464.

Page A.P., Rudin W., Flui E., Maizels R.M., 1992. *Toxocara canis*: a labile antigenic surface coat overlying the epicutide of infective larvae. *Exp. Parasitol.* 76:72-86.

Park H.Y., Lee S.U., Huh S., Kong Y., Magnaval J.F., 2002. A seroepidemiological survey from toxocariasis in apparently healthy residents in Gangwon-do, Korea. *Korean J. Parasitol.* 40:113-117.

Parson J.C., Coffman L., Grieve R.B., 1993. Antibody to interleukin five prevent blood and tissue eosinophilia but not trapping in murine larval toxocariasis. *Parasitol. Imm.* 15:501-508.

Pawlowski Z., 2001. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *J. Helminthol.* 75:299-305.

Perlmann P., Perlmann H., El Ghazali E., Blomberg M.T., 1999. IgE and tumor necrosis factor in malaria infection. *Immunol. Lett.* 65:29-33.

Phan S.H., Kunkel S.L., 1992. Lung cytokine production in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Exp. Lung. Res.* 18:29-43.

Portus M., Riera C., Prats C., 1989. A serological survey of toxocariasis in patients and healthy donors in Barcelona (Spain). *Eur. J. Epidemiol.* 5:224-227.

Prehn A., Seger R.A., Faber J., Torresani T., Molinari L., Gerber A., Sennhauser F.H., 1998. The relationship of serum ECP and eosinophil count to disease activity in children with bronchial asthma. *Pediatr. Allergy. Immunol.* 9:197-203.

Prunier F., Delpine S., Victor J., 2001. Loeffler fibroblastic endocarditis. A report of a case complicating toxocariasis. *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.* 94:226-230.

Radman N.E., Archelli S.M., Fonrouge R.D., del V. Guardis M., Linzitto O.R., 2000. Human toxocariasis. Its seroprevalence in the city of La Plata. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 95:281-285.

Richartz E., Buchkremer G., 2002. Cerebral toxocariasis: a rare cause of cognitive disorders. A contribution to differential dementia diagnosis. *Der. Nervenarat.* 73:458-462.

Robertson I.D., Irwin P.J., LyMBERY A.J., Thompson R.C.A., 2000. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *International J. Parasitol.* 30:1369-1377.

Robinson A., Tannier C., Magnaval J.F., 2002. *Toxocara canis* meningoradiculitis. *Rev. Neurol.* 158:351-353.

Romagnani S., 1991. Human Th1 and Th2 subset: doubt no more. *Immunol. Today.* 12:256-257.

Russeger L., Schmutzhard E., 1989. Spinal toxocaral abscess. *Lancet* ii:398.

Ruttinger P., Hadidi H., 1991. MRI in cerebral toxocaral disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 54:361-362.

Salem G., Schantz P.M., 1992. Toxocaral visceral larva migrans after ingestion of raw lamb liver. *Clin. Infect. Dis.* 15:743-744.

Schantz P.M., 1989. *Toxocara* larva migrans now. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41:21-34.

Shargai N., Schantz P.M., Caramico L., Ballas K., Teague Ba, Hotez P.J., 2001. Environmental exposure to *Toxocara* as a possible risk factor for asthma: a clinical based case-control study. *Clin. Infect. Dis.* 32:111-116.

Shen H.D., Wang S.R., Tang RB. Chang F., Su S.N., Han S.N., 1988. Identification of allergens and antigens of Bermuda-grass pollen by immunoblotting análisis. *Clin. Allergy.* 18:401-410.

Sistema Naturae, 2000. (www.sn2000.toxonomy.nl). *Toxocara canis*.

Stewart J.M., Cubillan L.D., Cunningham E.T., 2005. Prevalence, Clinical features, and causes of vision loss among patients with ocular toxocariasis. *Retina*. 25(8):1005-1013.

Sturchler D., Bruppacher R., Speiser F., 1986. Epidemiological aspects of toxocariasis in Switzerland. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 116:1088-1093.

Sturchler D., Weiss N., Gassner M., 1990. Transmission of toxocariasis. *J. Infect. Dis.* 162:571-572.

Sugane K., Oshima T., 1983. Purification and characterization of excretory and secretory antigen of *Toxocara canis* larvae. *Immunol.* 50:113-120.

Thakur B.K., Murali M.R., New D., Smith T.H., Volkman D., 1998. Hypereosinophilia and markedly elevated immunoglobulin E in a 3-year old child. *Ann. All Asth. Imm.* 370:371-376.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 76(9):4350-4354.

Uhlikova M., Hubner J., Kolarova L., Polackova M., 1996. Immunological studies on human larval toxocariasis. *Cent. Eur. J. Public. Health.* 4:242-245.

Van Den Biggelaar, A.H., Van Ree R., Rodrigues L.C., Lell B., Deelder A.M., Kremsner P.G., Yazdanbakhsh M., 2000. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet.* 356:1723-1727.

Van Knapen F., Van Leusden J., Polderman A.M., 1983. Visceral larva migrans: examinations by means of ELISA of human sera for antibodies to excretory-secretory antigens of second stage larvae of *Toxocara canis*. *Zentralblatt für Parasitenkunde.* 69:113-18.

Vazquez O., Martínez I., Tay J., Ruiz A., Perez A., 1997. Vegetables for human consumption as probable source of *Toxocara* infection in man. *Bol. Chil. Parasitol.* 52:47-50.

Vega J.M., García J.J., Pérez M., Carmona M.J., Miranda A., Fernández S., Ámela A., Anguita J.L., Romero E., Reina E., 2000. Epidemiología del asma en Malaga. *Alergol. Inmunol. Clin.* 15:170-72.

Vuitton D.A., 2004. Echinococcosis and allergy. *Clin. Rev. Allergy.* 26: 93-104.

Wang C., Huang C.Y., Chan P.H., Preston P., Chau P.Y., 1983. Transverse myelitis associated with larva migrans. Finding of a larva in cerebrospinal fluid. *Lancet*. i:423.

Warren E.G., 1970. Observations on the life-cycle of *Toxocara mackerrasae*. *Parasitol.* 60(2):239-253.

Warren E.G., 1971. Studies on the morphology and taxonomy of the genera *Toxocara* (Stiles, 1905) and *Neoascaris* (Travassos, 1927). *Zool. Anz.* 185:393-442.

Weiss S.T., 2000. Parasites and asthma/allergy. What is the relationship?. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 105:205-210.

Wilder H.C., 1950. Nematode endophthalmitis. *Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaringol.* 55:99-104.

Wills-Karp M., Santeliz J., Karp CL., 2001. The germless theory of allergic diseases: revisiting the hygiene hypothesis. *Nature Rev. Immunol.* 1:69-75.

Xinou E., Lefkopoulos A., Gelagoti M., Drevelegas A., Diakou A., Milonas I., Dimitriadis A.S., 2003. CT and MR Imaging Findings in Cerebral Toxocaral Disease. *AJNR. Am. J. Neuroradiol.* 24:714-718.

Yazdanbakhsh M., Kremsner P., Van Ree R., 2002. Allergy. Parasites and the hygiene hipotesis. *Science*. 296:490-494.

Yman L., 2000. Specific IgE in the diagnosis of parasite-induced allergy. *Allergy*. 55:14-17.



- ABREVIATURAS

- DE: Desviación Estandar
- EBP: Proteína Básica del Eosinófilo.
- ECP: Proteína Catiónica del Eosinófilo.
- ELISA: Enzimoimmunoensayo.
- EPO: Peroxidasa del Eosinófilo.
- ES: Antígenos de Excreción-Secreción.
- IFN- γ : Interferon Gamma.
- IgE: Inmunoglobulina E.
- IgG: Inmunoglobulina G.
- IgM: Inmunoglobulina M.
- IL: Interleuquina.
- IP: Índice de Positividad.
- kDa: Kilodaltons.
- L: Estadio de larva *Toxocara*.
- LMO: Larva Migrans Ocular.
- LMV: Larva Migrans Visceral.
- PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.
- PBS: Tampón Fosfato Salino.
- pI: Punto Isoeléctrico.
- PM: Peso Molecular
- PVDF: Fluoruro de Polivinilideno.
- RPMI: Roswell Park Memorial Institute (Lugar donde fue diseñado)

Abreviaturas

- SDS: Dodecil Sulfato de Sodio.
- TBS-T: Tampón Trisbase-Tween 20.
- TEMED: N, N, N', N'-Tetrametiletildiamina.
- Th: Linfocito T helper.
- TNF- β : Factor de Necrosis Tumoral β .
- 2D: Electroforesis 2 Dimensiones.

