

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA

PUESTA A PUNTO Y ENSAYO DE
UNA METODOLOGIA SENSIBLE Y
ESPECIFICA PARA EL DIAGNOS-
TICO DE LABORATORIO DE LA
TOXOCARIASIS HUMANA.

Tesina presentada por Dña
CRISTINA RIERA LIZANDRA
para optar al Grado de
Licenciatura.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA^L

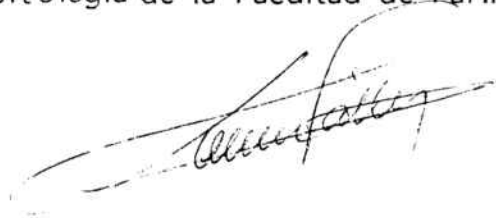


0701739021

El presente trabajo ha sido realizado en el laboratorio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau bajo la dirección de la Profesora Dra. Dña. MONTSERRAT PORTUS VINYETA

Barcelona, septiembre, 1985.

VºBº El Director del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia.



Autorizan su presentación
LOS DIRECTORES:



Al presentar esta Memoria es obligado hacer constar mi agradecimiento a todas aquellas persona que de una u otra forma han hecho posible la realización de este trabajo.

Al Dr. Guillermo Prats Pastor, Jefe de Servicio del Laboratorio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, por haber dado su consentimiento y su ayuda incondicional para que este trabajo se realizara, además de su juicio crítico durante toda la elaboración del mismo.

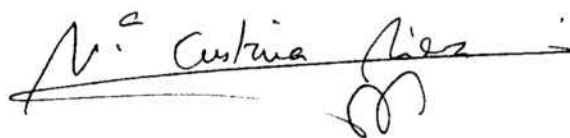
A mi directora de tesina y compañera Dra. Montserrat Portús Vinyeta, que aceptó la dirección de la misma, por sus consejos, estímulos y amistad que recibí en todo momento.

A mis compañeros del Servicio de Cirugía Experimental y del Laboratorio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, especialmente a Carmen Muñoz, Teresa Serra, Roser Fisa, Marina Lahoz, Jordi Folch y Perfecto Perez por su interés, ayuda, estímulo y amistad.

A todos aquellos que de forma desinteresada colaboraron en la obtención de material parasitario Dres: M. Aranda, A. Buxó, C. Coll, A. Guilló, R. Mora y M.P. Moreno.

A todos ellos, con mi sincero agradecimiento va dedicado este trabajo.

Barcelona, Septiembre, 1985.

M.ª Cristina Fisa

I N D I C E	pg.
I. INTRODUCCION	1
I.1. <u>TOXOCARIASIS CANINA</u>	3
I.1.1. Ciclo biológico de <u>Toxocara canis</u> en el perro	3
I.1.2. Incidencia mundial de la toxocariasis canina	4
I.1.3. Incidencia en España de la toxocariasis canina	5
I.2. <u>DISEMINACION AMBIENTAL DE LOS HUEVOS DE TOXOCARA CANIS</u>	6
I.3. <u>TOXOCARIASIS HUMANA</u>	8
I.3.1. Ciclo biológico de <u>Toxocara canis</u> en el hombre	8
I.3.2. Patología	8
I.3.3. Manifestaciones clínicas	9
I.3.3.1. Larva migrans visceral	9
I.3.3.2. Larva migrans ocular	11
I.3.4. Incidencia de la Toxocariasis humana	14
I.4. <u>DIAGNOSTICO DE LA TOXOCARIASIS</u>	15
I.4.1. Diagnóstico clínico	15
I.4.2. Diagnóstico etiológico	15
I.4.3. Diagnóstico inmunológico	16
I.5. <u>OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</u>	18

II. PARTE EXPERIMENTAL	20
II.1. <u>OBTENCION DEL ANTIGENO</u>	21
II.1.1. Obtención de los huevos de <u>Toxocara canis</u>	21
II.1.2. Maduración	22
II.1.3. Decorticación	22
II.1.4. Aislamiento de las larvas del segundo estadio	23
II.1.5. Obtención de antígeno soluble a partir de larvas de segundo estadio	24
II.1.6. Determinación de su concentración proteica	25
II.1.7. Cálculo de la concentración antigénica a utilizar	25
II.2. <u>ENSAYO EN MODELO EXPERIMENTAL MURINO</u>	28
II.2.1. Infestación experimental	28
II.2.2. Obtención de inmunosueros	28
II.2.3. Aplicación de la técnica de ELISA	29
II.2.3.1. Marcha de la reacción	29
II.2.3.2. Concentración de suero y de conjugado utilizados. Cinética de la reacción	32
II.2.3.3. Controles	32
II.2.3.4. Resultados	33
II.3. <u>APLICACION DE LA TECNICA ELISA A SUEROS HUMANOS</u>	63
II.3.1. Material utilizado	63
II.3.2. Cálculo de la dilución del conjugado y dilución del suero	66
II.3.3. Controles	66
II.3.4. Resultados	67
II.3.5. Determinación del criterio de positividad	67
II.3.6. Distribución de acuerdo con la patología del paciente	76

III. DISCUSION	79
IV. RESUMEN Y CONCLUSION	88
V. BIBLIOGRAFIA	91
VI. APENDICE	100

I. I N T R O D U C C I O N

La larva migrans visceral es un síndrome clínico causado por la migración tisular de larvas de diversas especies de nemátodos parásitos de animales y para los cuales el hombre actúa como huésped paraténico.

Para el desarrollo de un síndrome de larva migrans el parásito debe pertenecer a una especie que ya de forma natural sufra migraciones en el organismo de su huésped: Toxocara canis, Toxocara cati, Toxascaris leonina, Ascaris suum, Capillaria hepatica, Angiostrongylus cantonensis, Gnathostoma spinigerum, Dirofilaria spp., entre otras. Además de ello, la infestación humana debe ser masiva, lo cual solo se cumple si el parásito se halla en las proximidades del hombre y la conducta de este favorece el contacto. Se comprende por lo tanto que las especies de nemátodos parásitos de animales domésticos, fundamentalmente del perro y el gato: Toxocara cati, T. canis y Toxascaris leonina sean los principales responsables del síndrome de larva migrans visceral en nuestro país y dentro de ellos destaca por su importancia el ascárido habitual del perro: Toxocara canis.

1.1. TOXOCARIASIS CANINA

1.1.1. CICLO BIOLÓGICO DE TOXOCARA CANIS EN EL PERRO.

El ciclo biológico de T. canis en su huésped habitual, el perro, muestra diversas variaciones de acuerdo con la edad del huésped y su estado inmunitario.

El ciclo normal se presenta de forma usual en cachorros menores de tres meses de edad. Se inicia con la ingestión de huevos embrionados que contengan larvas de segundo estadio. Los huevos pasan al intestino donde eclosionan, liberándose la larva que inicia su migración a través de la pared intestinal, vasos sanguíneos y linfáticos para llegar al hígado y de aquí a los pulmones; rompen los pequeños capilares pulmonares y pasan a los alveolos, continúan su migración a través de los bronquiolos, bronquios y traquea hasta ser deglutidos. Una vez en el intestino delgado alcanzan su madurez sexual, iniciando a los pocos días la puesta de un gran número de huevos que son eliminados junto a las heces. Estos huevos en el momento de la puesta contienen una sola célula huevo y, bajo condiciones óptimas, tardan un mínimo de 5-6 días hasta que se desarrolla en su interior la larva de segundo estadio, es decir hasta adquirir capacidad infestante. Este ciclo completo dura un tiempo mínimo de 2-2,5 meses.

Si el perro es mayor de tres meses y fundamentalmente si ha adquirido un cierto estado de inmunidad, consecuencia de una infestación pasada, las larvas no son capaces de completar la migración pulmonar. En lugar de alcanzar los alveolos atraviesan el lecho vascular y llegan al corazón, viajando hasta los tejidos corporales a través de la circulación arterial. Estas larvas de segundo estadio se acumulan en las vísceras y músculos esqueléticos, donde permanecen inactivas, pero vivas, durante largos períodos de tiempo. En perras gestantes, las larvas quiescentes son reactivadas por los cambios hormonales que tienen lugar en el huésped, penetran de nuevo al sistema

circulatorio, atraviesan la placenta y alcanzan el sistema circulatorio del feto, en el cual completan la migración hasta alcanzar el sistema digestivo. Por esta vía la mayor parte de los cachorros se infestan intrauterinamente. El verme madura rápidamente después del nacimiento del cachorro que inicia la contaminación ovípara del área donde vive. Está comprobado que la infestación de los cachorros puede tener lugar también a través de la leche materna.

Una tercera vía de infestación tiene lugar a través de huéspedes paraténicos. SPRENT (1958) demostró que los huevos de Toxocara canis pueden eclosionar y sus larvas de segundo estadio permanecer viables en los tejidos de una amplia gama de animales desde el gusano de tierra hasta el hombre. Si alguno de estos animales, roedores fundamentalmente, es ingerido por un perro no inmune o una perra embarazada, la larva de segundo estadio queda libre en el estómago e inicia la migración tisular hasta alcanzar el estado adulto de nuevo en el intestino.

1.1.2. INCIDENCIA MUNDIAL DE LA TOXOCARIASIS CANINA.

Los datos publicados en la bibliografía mundial sobre la incidencia de la Toxocariasis canina son muy variables según los distintos autores. La toxocariasis canina es, tal como puede desprenderse de la biología del parásito descrita en el capítulo anterior, más frecuente en los cachorros que en los perros adultos. Algunos autores (RANDALL, 1982; SCHANTZ y GLICKMAN, 1978; ARNAUD, 1976) cifran la infestación en cachorros entre un 80% y 100% y la de adultos entre 5% y 20%. SAVEL (1981) en Francia, señala que el parasitismo en perros por Toxocara canis puede situarse alrededor de un 10%. ARMONE, LARANTI y BATELLI (1979) en Italia, dan frecuencias de infestación que oscilan entre el 10% y 34% según las ciudades, con valores extremos en Mesina (54%) y Palermo (casi un 80%).

1.1.3. INCIDENCIA EN ESPAÑA DE LA TOXOCARIASIS CANINA.

Las condiciones climáticas de nuestro país, idóneas para la supervivencia y maduración de los huevos del parásito hace que la incidencia de la toxocariasis canina sea superior a los valores globales hallados para el resto de Europa.

Aún cuando carezcamos de datos actuales, las cifras dadas por GALLEGO (1982), en Barcelona 36%, en Granada 28%, en Madrid 21%, en Pamplona 32% y en Zaragoza 13%, son de por sí suficientemente demostrativas, máxime si tenemos en cuenta que las condiciones ecológicas ambientales, favorecedoras de la diseminación del parásito, no tan sólo no han disminuido sino que paulatinamente tienden a aumentar sobre todo en lo que se refiere al ambiente urbano.

En España se calcula la existencia de 1 250 000 perros, siendo el censo de la provincia de Barcelona de 130 000, de los cuales entre 60 000 y 80 000 corresponden a la Ciudad Condal, GALLEGO (1982) señala que: "podemos estimar que la fauna canina de nuestra ciudad, junto a las 6-8 Tm de deyecciones que diariamente esparce por nuestras calles y escasos parques públicos, elimina en estas zonas una cifra no inferior a los dos o tres mil millones de huevos de Toxocara canis". Esta alta tasa de eliminación diaria de huevos por nuestra población canina junto a la alta longevidad que presentan los huevos de ascárido, sobre todo en ambientes húmedos (4-5 años según CHENG 1973), hace que el número de huevos de T. canis repartidos en los pocos metros cuadrados de zonas verdes del suelo urbano barcelonés puede estimarse de varios billones.

1.2. DISEMINACION AMBIENTAL DE LOS HUEVOS DE TOXOCARA.

Una de las principales características de los huevos de Toxocara es su gran capacidad de resistencia a las condiciones ambientales. Bajo condiciones adecuadas los huevos de Toxocara pueden sobrevivir varios años, sin embargo son destruidos rápidamente si se someten a la acción directa de las radiaciones solares o a la desecación (OWEN, 1930; OKOSHI y USUI, 1968 y FITZGERALD y ASHLEY, 1977). A temperaturas inferiores a 10°C el desarrollo larvario se detiene (OWEN, 1930) y la larva muere por debajo de los -15°C (OKOSHI y USUI, 1968).

Sin embargo, el factor que tiene quizás una mayor influencia en la prevalencia de las helmintiasis de transmisión telúrica es la naturaleza de la capa superficial del suelo (BEAVER; 1952). En suelos arcillosos los huevos de ascárido se agrupan y concentran por la acción de la lluvia, sedimentando en fina capa entre una delgada cubierta de arcilla coloidal y la capa más profunda de partículas gruesas. De esta forma los huevos de helminto quedan protegidos de la desecación y la acción solar directa. Los suelos arcillosos, por lo tanto, favorecen la concentración y supervivencia de los huevos de ascárido los cuales pueden ser ocasionalmente ingeridos, en número considerable, por niños que practiquen la geofagia (BEAVER, 1975).

Los huevos de helminto no son destruidos por los tratamientos que se practican habitualmente a las aguas residuales. En EEUU se han encontrado huevos de Toxocara viables en los lodos procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales de 27 municipios del sur del país. (REIMERS et al, citado por GLICKMAN y SCHANTZ, 1981). La utilización como abono de estos lodos puede favorecer su diseminación.

La presencia de huevos de Toxocara en el suelo de parques, jardines y otros lugares públicos ha sido demostrado por diversos autores. De acuerdo con GLICKMAN y SCHANTZ (1981) el grado de contaminación del suelo hallado por unos y otros es un reflejo tanto del grado de prevalencia de la infección en el perro, como de la densidad de la población canina del área estudiada, como de la efectividad de las técnicas utilizadas para la recogida de muestras y procesos subsiguientes para la recuperación de huevos.

BORG y WOODRUFF (1973) encuentran un 24,4% de muestras infestadas por huevos de Toxocara sobre un total de 800 recolectadas, en parques públicos de distintas localidades en Gran Bretaña. Las cifras aportadas por QUINN et al (1980) en Escocia son sensiblemente inferiores, 26 muestras positivas entre un total de 234 examinadas.

En España se han realizado también estudios de este tipo. Así estudios realizados por ANGULO MADERO et al. (1985) sobre muestras de suelo de diversos parques de Madrid permitieron detectar la presencia de huevos de Toxocara canis en un 9,7% de las muestras analizadas.

1.3. TOXOCARIASIS HUMANA.

1.3.1. CICLO BIOLÓGICO DE TOXOCARA CANIS EN EL HOMBRE.

El hombre puede ingerir los huevos embrionados, que hemos visto pueden dispersarse en grandes cantidades en el suelo urbano, tanto a través de las manos que han estado en contacto con el suelo polucionado, como del agua y alimentos contaminados. La geofagia presente en un alto porcentaje de niños de corta edad -entre uno y cuatro años- favorece sin duda la infestación de aquellos que frecuentan los parques y jardines públicos y explica la mayor incidencia de la toxocariasis en este grupo poblacional.

Las larvas que emergen de estos huevos embrionados, liberadas gracias a la acción de los jugos gástricos, penetran en la pared intestinal y, bien sea por su migración directa, bien sea a través del torrente circulatorio, alcanzan los diversos órganos (pulmón, cerebro, ojos, corazón, páncreas, musculatura estriada). Esta migración somática puede continuar durante un período indeterminado, habitualmente de varios meses de duración, acompañado de largos períodos de quiescencia. Al final se cercan de una reacción inflamatoria y así pueden permanecer encapsuladas pero viables y sin variación morfológica durante varios años, otras veces son destruídas debido a la reacción del huésped (BEAVER, 1956).

1.3.2. PATOLOGÍA

La patogenesis de la Toxocariasis ha sido ampliamente revisada por GLICKMAN Y SCHANTZ (1981).

Las manifestaciones patológicas de la "larva migrans" visceral son normalmente consecuencia de la lesión mecánica producida por la migración tisular larvaria y por la, a menudo severa, respuesta

inflamatoria del huésped. Los tejidos afectados presentan múltiples abscesos eosinofílicos y granulomas de tipo alérgico.

Cuando el tamaño de la larva excede al diámetro de los vasos sanguíneos, esta traspasa activamente la pared vascular y migra por los tejidos circundantes.

La predilección de las larvas de Toxocara por los distintos órganos varía de acuerdo con el hospedador. En el hombre el órgano de predilección es el hígado, aún cuando puede resultar afectado cualquier otro. La respuesta inmune del hospedador juega también un papel importante en esta distribución. En animales de laboratorio sometidos a repetidas infecciones se ha observado que la mayoría de las larvas queda retenida en el hígado, impidiendo por lo tanto, su acceso a los pulmones, cerebro y ojos. La respuesta inflamatoria provocada por las larvas muertas parece ser mayor que la provocada por las larvas vivas. Observaciones clínicas sugieren que factores similares a los descritos están relacionados con la patogénesis de la larva migrans visceral en el hombre. (SCHANTZ y GLICKMAN, 1978).

1.3.3. MANIFESTACIONES CLINICAS.

El cuadro clínico de la toxocariasis humana varía de acuerdo con el número de huevos ingeridos, la frecuencia de la reinfección, la distribución de las larvas y otros factores, todavía no bien esclarecidos. Las infecciones ligeras, que son por otra parte las más frecuentes, son normalmente asintomáticas.

1.3.3.1. Larva migrans visceral.

El síndrome de larva migrans visceral se presenta con más frecuencia en niños de 1 a 4 años, y los síntomas habituales incluyen tos, sudoración, palidez, irritabilidad y pérdida de peso. En ocasiones pueden presentarse erupciones pruriginosas en el tronco y extremidades inferiores.

Una de las principales características clínicas es la leucocitosis con un 50-90% de eosinófilos, tasas que pueden persistir por largo tiempo, incluso años, aún cuando haya desaparecido cualquier otro síntoma. La concentración de albúmina sérica es normal, ligeramente disminuída, mientras que la de gammaglobulinas, especialmente IgG, IgM y IgE está generalmente aumentada.

La presencia de antígenos en la superficie larvaria que estimulan la producción de isohemaglutininas hace que los títulos de anti-A y anti-B séricos estén significativamente incrementados.

Las complicaciones pulmonares son frecuentes, pudiendo presentar bronquitis aguda, asma y/o pneumonitis. Los pocos casos fatales descritos hasta el momento han sido consecuencia de la invasión larvaria del sistema nervioso central o del miocardio o de una respuesta inmunológica del huésped exagerada.

La presencia de larvas y granulaciones eosinofílicas en el sistema nervioso central, sugieren que las complicaciones neurológicas, epilepsia, cambios de comportamiento, etc, son consecuencia de la invasión larvaria del tejido nervioso o de la reacción tisular a los productos de secreción de la larva (FRIEDMAN Y HERVADA, 1960; KAPUR et al. 1976; MIKHAEL et al., 1974; SCHOCHET, 1967; SNYDER, 1961; VARGO et al. 1977).

La mayor incidencia de la Toxocariasis en niños con trastornos nerviosos fundamentalmente epilépticos (WOODRUFF et al., 1966; GLICKMAN et al., 1979) que en sanos debe de considerarse como una mayor predisposición de estos niños a una infección por Toxocara canis. En efecto, la epilepsia está asociada muchas veces al retraso mental, hiperactividad y pica, lo que favorece la geofagia. Según GLICKMAN y SCHANTZ (1981) no existe ninguna evidencia que apoye el argumento de que T. canis sea una de las principales causas de la epilepsia infantil.

1.3.3.2. Larva migrans ocular.

La invasión ocular es una de las complicaciones más frecuentes de la toxocariasis. La afectación ocular es típicamente unilateral y las manifestaciones más comunes incluyen la pérdida visual, estrabismo y más raramente dolor ocular. El examen fundoscópico permite observar una lesión que varía entre un granuloma del polo posterior o periférico, a una endoftalmitis exudativa con desprendimiento de retina. Estas manifestaciones oculares se producen fundamentalmente en adultos y en ausencia de síntomas de larva migrans visceral. Los antecedentes epidemiológicos, convivencia con perros, geofagia, pica, etc, suelen ser también escasos o nulos.

GLICKMAN Y SCHANTZ (1981), basándose en observaciones clínicas en humanos y animales infestados experimentalmente sostienen la hipótesis de que la afectación visceral y/o ocular es una consecuencia de la respuesta inmune del hospedador, condicionada por la dosis infestante.

Si la dosis de larvas es baja estimada en inferior a 100 (CHAUDHURI y SAHA, 1959), la cantidad de antígeno presente es insuficiente para estimular un incremento marcado de la eosinofilia y anticuerpos específicos. En consecuencia las larvas migran libremente a través de hígado y pulmones induciendo una respuesta tisular y síntomas clínicos mínimos. Estas escasas larvas penetran en el sistema circulatorio y eventualmente en los capilares para migrar indiscriminadamente por los tejidos corporales. La mayoría de las personas infestadas con pocos organismos permanecen asintomáticas a menos de que la larva penetre a través de los vasos retiniales y coroideos al ojo. Estudios experimentales en primates han permitido observar la persistencia de estas larvas en los tejidos un mínimo de 10 años (BEAVER, 1966) lo cual puede explicar los largos períodos de incubación que se presentan en la larva migrans ocular.

Cuando la dosis infestante es alta tiene lugar un rápido incremento de la eosinofilia y niveles séricos de anticuerpos específicos. Las larvas que penetran en el hígado y pulmones quedan atrapados por la reacción inflamatoria, dando lugar a una afectación hepática y pulmonar notable. En estos casos el período de incubación es corto aún cuando pueda variar de acuerdo con el número de organismos ingerido y la sensibilización previa al parásito.

A dosis extremadamente altas, algunas larvas pueden sobrepasar la acción filtrante del hígado y pulmones produciendo miocarditis, afectación neurológica o enfermedad ocular.

GLICKMAN y SCHANTZ (1981) resumen la relación entre los síndromes de la larva migrans visceral y ocular de la siguiente forma: (Cuadro nº 1).

Toxocaríasis	Edad paciente	Dosis infestante	Período incubación	Tasa de anticuerpos
Visceral	Niños(10 años)	Moderada. Alta	Corto (días, meses)	Alta
Ocular	Niños y adultos	Baja	Largo (meses, años)	Baja
Visceral y ocular	Niños(5 años)	Muy alta	Muy corto (días)	Muy alto

Cuadro nº 1 Relación entre los síndromes de larva migrans visceral y ocular: modelo hipotético basado en observaciones en humanos y animales infestados experimentalmente (Tomado de GLICKMAN y SCHANTZ, 1981).

I.3.4. INCIDENCIA DE LA TOXOCARIASIS HUMANA.

A pesar de que el número de casos clínicos de toxocariasis humana actual descritos sea poco elevado, alrededor de un millar (EHRHARD y KERNBAUM, 1979), se considera que esto no representa más que una pequeñísima fracción de los realmente infestados. Estudios serológicos llevados a cabo en EEUU en el período de 1971-73, llevaron a la conclusión de que había en aquel país aproximadamente unos 6 millones de personas infestadas (JAMA, 1980). En Inglaterra se ha comprobado la presencia de anticuerpos antitoxocara en un 2-5% de los grupos de población examinados, y una positividad serológica claramente incrementada en ciertos grupos de enfermos: afectos de coroidoretinitis (9%), de hepatomegalia con eosinofilia sostenida (5-12%), epilépticos (15%), lo cual lleva a suponer que el parásito se encuentra involucrado en estos procesos.

1.4. DIAGNOSTICO DE LA TOXOCARIASIS.

1.4.1. DIAGNOSTICO CLINICO.

Se ha señalado ya en el capítulo 1.3 de esta memoria la inespecificidad de los síntomas clínicos tanto de la Toxocariasis ocular como visceral. Según WOODRUFF (1970) los pacientes con hepatomegalia, epilepsia, bronconeumonía y/o lesiones oculares corioretinales, con eosinofilia, deben considerarse sospechosos de Toxocariasis, particularmente si se trata de niños y si tienen una historia reciente de ingestión de tierra posiblemente contaminada.

GLICKMAN et al (1978) establecen los siguientes criterios para el diagnóstico clínico de la enfermedad: leucocitosis ($>10000/\text{mm}^3$), eosinofilia ($>10\%$); hemaglutininas anti A $\geq 1/400$ o anti B $\geq 1/200$; incremento de IgG e IgM (superior a la media más dos veces la desviación estándar de la población normal); hepatomegalia. Al otorgar 1 punto a cada una de las variables establecen los siguientes criterios de positividad:

<u>L M V</u>	<u>Puntuacion</u>
Positiva	5-6
Dudosa	3-4
Negativa	3

1.4.2. DIAGNOSTICO ETIOLOGICO.

El diagnóstico etiológico, basado en la demostración de la larva en el material procedente de biopsia hepática, ojos enucleados o necropsias, es el único método diagnóstico que permite aseverar la presencia de una Toxocariasis. El material obtenido por biopsia percutánea da habitualmente resultados pobres (SCHANTZ Y GLICKMAN, 1978 y RANDALL, 1982), siendo

más adecuada la biopsia efectuada por laparoscopia, si bien a veces es necesario realizar cientos de cortes para encontrar una larva, la cual deberá diferenciarse morfológicamente de la de otras posibles especies parásitas (NICHOLS, 1956 a y 1956 b). La poca eficacia y agresividad del método lo hace impracticable como método diagnóstico de rutina, por lo que el diagnóstico de laboratorio de la Toxocariasis se realiza habitualmente mediante técnicas serológicas.

1.4.3. DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO.

El diagnóstico inmunológico de la larva migrans visceral, al igual que el de la mayoría de las enfermedades parasitarias, ha sufrido cambios notables a lo largo del tiempo, los cuales han conducido al empleo de técnicas cada vez más sensibles y específicas. Los resultados del análisis inmunológico dependen fundamentalmente de dos factores principales:

- a) La calidad del antígeno utilizado.
- b) La sensibilidad de la técnica empleada.

a) Los antígenos ensayados y utilizados para el diagnóstico de la larva migrans visceral, han consistido en extractos antigénicos o fragmentos del parásito obtenidos a partir de diversas fases evolutivas: adultos (COLLINS et IVEY et al., 1975; GLICKMAN et al., 1978), huevos (CYPESS et al., 1977; GLICKMAN et al., 1978; SCHANTZ et al., 1979; WORLEY et al., 1984), larvas de 2º estadio (ALJEBOORI et IVEY, 1970 y CYPESS et al., 1977), o sus productos de secreción-excreción (de SAVIGNY et TIZARD, 1977; de SAVIGNY et al., 1979; van KNAPEN et al., 1983), obtenidos tras el cultivo "in vitro" (de SAVIGNY, 1975) de las larvas tras su eclosión por la técnica de FAIRBAIRN, 1961, de Toxocara canis o de Ascaris summ (KAGAN et al, 1959; COLLINS et IVEY, 1975; ALJEBOORI et IVEY, 1970; PATTERSON et al, 1975; CYPESS et al, 1977; WORLEY et al, 1984).

En todos los casos y fuera cual fuera la técnica utilizada, los mejores resultados se obtenían siempre al utilizar antígenos obtenidos de larvas de II estadio o de sus productos de secreción-excreción, de Toxocara canis.

b) Si bien la sensibilidad de la técnica juega un papel importante en la detección de anticuerpos anti-Toxocara, éste se ve relevado a un segundo plano, frente al jugado por la calidad del antígeno.

En el transcurso de los años, se han ensayado un gran número de técnicas para el diagnóstico inmunológico de la Toxocariasis, tanto pruebas cutáneas (WOODRUFF et al., 1964; IVEY, 1965; 1967; COLLINS et IVEY, (1975) como serológicas, entre las que destacan la floculación con bentonita (KAGAN et al., 1959; GLICKMAN et al., 1978), hemaglutinación indirecta (KAGAN et al., 1959; ALJEBOORI et IVEY, 1970; KRUPP, 1974; GLICKMAN et al., 1978), inmunofluorescencia (BISSERU et WOODRUFF, 1968; HOGART-SCOTT, 1966; WOODRUFF, 1970; de SAVIGNY et TIZARD, 1977), radioinmunoensayo (PATTERSON et al., 1975), inmunodifusión radial (CYPESS et al., 1977; GLICKMAN et al. 1978) y enzimoimmunoensayo (CYPESS et al., 1977; GLICKMAN et al., 1978; SCHANTZ et al., 1979; SAVIGNY et al., 1979; van KNAPEN et al., 1983; WORLEY et al., 1984). De entre ellas ha adquirido una importancia capital el enzimoimmunoensayo, dada su gran sensibilidad y especificidad al utilizar antígenos adecuados.

1.5. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

Se ha indicado ya en el transcurso de esta introducción la falta de métodos serológicos estandarizados y de reactivos comerciales aptos para la determinación de la Toxocariasis. Este hecho presenta graves problemas al clínico y al laboratorio, dada la dificultad de diagnosticar esta parasitosis autóctona, cuya prevalencia en nuestro ambiente consideramos que debe ser alta, pero de cualquier forma desconocida, y que cursa de forma apatógena o con una patognomonia poco clara.

Este trabajo se inició con el objetivo de poner a punto y ensayar una técnica serológica, lo suficientemente sensible y específica para el diagnóstico de la larva migrans visceral producida por Toxocara canis en vistas a su posterior aplicación a la investigación rutinaria de esta enfermedad. Debe de señalarse que no existe en este momento en nuestro país ningún laboratorio de referencia al que poder remitir una muestra para efectuar esta determinación.

Como técnica a utilizar, y después de revisar la bibliografía sobre el tema, escogimos el enzimoimmunoensayo, y como fuente antigénica las larvas II de Toxocara canis.

Uno de los principales problemas que se plantea el laboratorio al ensayar una técnica para la determinación de la Toxocariasis es la elección de los controles. La de controles positivos puesto que prácticamente nunca llega a aislarse el parásito y la gran inespecificidad de los signos patognomónicos de la enfermedad. La de controles negativos dada la nula patologia que muchas veces ocasiona y el poco conocimiento que se tiene de su prevalencia en el hombre. Por todo ello el trabajo se planteó en tres fases:

1. Preparación de un antígeno larvario para ser utilizado en el E.L.I.S.A.
2. Obtención de un modelo experimental sobre el que poder ensayar el antígeno preparado. Determinación de la sensibilidad del sistema.
3. Ensayo de la técnica con sueros humanos. Determinación de su especificidad y establecimiento de los criterios diagnósticos.

II. P A R T E E X P E R I M E N T A L

II.1. OBTENCION DEL ANTIGENO.

II.1.1. OBTENCION DE LOS HUEVOS DE TOXOCARA CANIS.

Las formas adultas de T. canis se recogen de las heces de perros infestados, previa administración de un antihelmíntico: piperazina (Neox[®]), a una dosis 8 cc (aproximadamente 0,800 g de piperazina) o pamoato de pirantel (Trilombrin[®]) a la dosis de 2,5cc de suspensión equivalente a 125 mg de droga, en cachorros de 1 a 3 meses de edad.

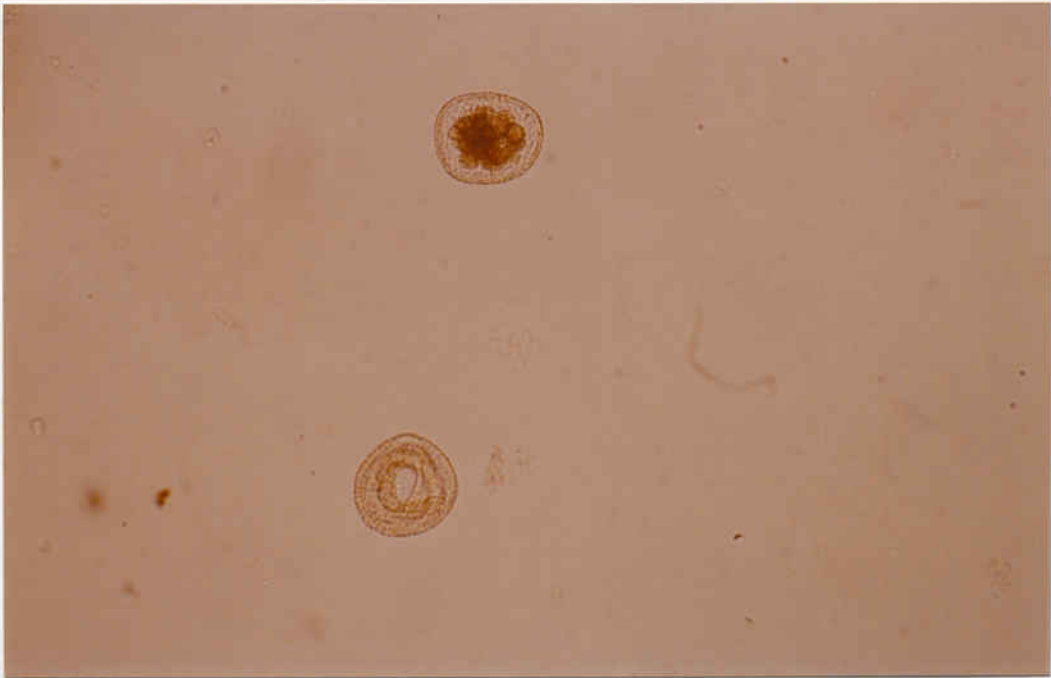
En otros casos los helmintos vivos se extraen directamente del tubo digestivo durante la autopsia de animales sacrificados en el servicio de Zoonosis local.

Del conjunto de ascáridos eliminados por los perros infestados se seleccionan las hembras bien desarrolladas y se lavan repetidamente con agua. Una vez lavadas se guardan a 4°C. Si el tiempo de almacenaje debe prolongarse más de 1 semana se guardan en formol al 1%. Seguidamente se procede a su disección y extracción del tercio final del útero que será la porción que contenga los huevos bien desarrollados y fértiles. La viabilidad y fertilidad de los huevos se comprueba observándolos a la lupa binocular. Serán huevos fértiles aquellos que contengan en su interior una célula huevo bien desarrollada, o que hayan iniciado ya su división, observándose en este caso una mórula con unos pocos blastómeros. Se considerarán huevos no fértiles y no viables aquellos que presenten un aspecto irregular, sin que se observe en su interior una célula huevo definida.

Se coloca una pequeña cantidad de solución salina y se fracciona el útero en segmentos de unos 2 mm de longitud aproximadamente.



T. canis. Huevo embrionado con
larva II formada.



T. canis. Huevo embrionado en fa-
se de morula.



T. canis. Huevo embrionado y decor-
ticado con larva II formada.



T. canis. Larva II eclosionando.

Una vez los úteros fragmentados se procede a la digestión de este material en solución ácido péptica (1% de pepsina + 5% CIH en agua destilada) a 37°C en un agitador magnético, hasta que no quede ningún resto uterino, aproximadamente a las 2 horas.

Una vez digeridos los restos uterinos se diluye la solución al 1/10 con agua destilada, se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 3 minutos, se decanta y se lava el sedimento 3 veces más, hasta eliminar los restos de solución ácido péptica que haya podido quedar.

II.1.2. MADURACION.

Después del último lavado se resuspenden los huevos en formol al 1% y se coloca en un erlenmeyer o matraz de 30 a 50 ml de dicha suspensión, y se mantiene a 30°C en baño maria durante un período de tiempo que oscila entre los 21 y 28 días, tiempo necesario para que en el interior de los huevos el desarrollo alcance la segunda fase larvaria convirtiéndose de esta manera en infestantes. El progreso de embrionamiento se va observando periódicamente, hasta que se observa más de un 65% de huevos embrionados.

II.1.3. DECORTICACION.

Una vez que más de un 65% de los huevos hayan embrionado y desarrollado en su interior una larva, se centrifuga durante 3 minutos a 3000 r.p.m. para eliminar el exceso de líquido. El sedimento obtenido se lava con agua destilada y centrifuga 3 minutos a 3000 r.p.m. Se repite la operación 3 veces más.

Después del último lavado se resuspende el sedimento que contendrá los huevos en solución decorticatora (2% NaOH en 1:1 solución hipoclorito sódico) a razón de 1 ml de suspensión de huevos en 20 ml de solución decorticatora.

Se mantiene a temperatura ambiente con ligera agitación hasta que la decorticación sea completa (unos 20 minutos aproximadamente). Se elimina el líquido por centrifugación, se suspende el sedimento en agua destilada y se centrifuga 3 minutos a 3000 r.p.m., repitiendo la operación de lavado 3 veces.

II.1.4. AISLAMIENTO DE LAS LARVAS DE 2º ESTADIO.

Para ello se ha seguido, en líneas generales, la técnica descrita por FAIRBAIRN (1961). Se realizan primero lavados de la suspensión de huevos con agua destilada, centrifugando 3 minutos a 3000 r.p.m. cada vez.

A 0,5 ml de la suspensión de huevos procedente del último lavado se añade 1 ml de CNa, 0,25 M, que contenga 0,0025% Tween 80 y 0,1 M de clorhidrato de cisteína, como agente reductor. Se añade al conjunto 1 ml de solución 0,1 M de bicarbonato sódico, previamente gaseada con una mezcla N_2-CO_2 (95%-5%). Se coloca en un frasco (Gas-pak) a 38°C con atmosfera N_2-CO_2 (95%-5%) durante un par de horas.

Se ha utilizado una campana de Gaspak Oxoid, y la atmosfera N_2-CO_2 se ha conseguido con sobres (gas generating kit, Anaerobic system, cod. Nº BR.38 Oxoid).

Transcurrido este tiempo se agita suavemente la suspensión en un "mixer" (super-mixer de Laboratorios Instruments) durante 30 segundos. Se observa a la lupa binocular el índice de eclosión y se deja la suspensión en reposo a la estufa a 37°C, hasta que la observación microscópica detecte una eclosión de alrededor del 80% de los huevos embrionados.

La suspensión larvaria obtenida se lava 3 veces con solución salina equilibrada de HANK, junto con 100 ui/ml de penicilina y 250 mcg/ml de estreptomicina.

Seguidamente se procede a la separación de las larvas vivas de las muertas empleando el método de Baermann.

Sobre el caño de un embudo de vidrio de 12 cm de diámetro adaptamos un tubo de goma cerrado por una pinza (de Mohr o Kocher). Se coloca la suspensión de larvas en un colador metálico, tapizado con 8 capas de gasa. Depositamos el colador en el embudo que se llena de agua a 45°C hasta que el nivel del líquido llegue a contactar con la suspensión. Se deja así de 2 a 3 horas. Transcurrido este tiempo se abre la pinza y se recoge un par de ml de la suspensión en un tubo de centrifuga, los cuales contienen las larvas vivas que han descendido por el tubo separadas de las muertas, restos de útero y cubiertas vitelinas, las cuales habían quedado retenidas en la gasa. Se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 3 minutos. y el sedimento se lava 3 veces en tampón borato 0,05 M, pH = 8,6, mediante centrifugación y decantación.

II.1.5. OBTENCION DEL ANTIGENO SOLUBLE A PARTIR DE LARVAS DE 2º ESTADIO.

Se resuspenden en el sedimento con igual volumen de tampón borato y se procede a la extracción antigénica.

Para ello se coloca en un homogenizador manual y se procede a una homogeneización enérgica hasta que la observación microscópica de la suspensión muestra la rotura total de las larvas, presentando un aspecto uniforme.

El homogeneizado se diluye con tampón borato y se extrae a 4°C durante 18 horas, mediante una agitación lenta. Se centrifuga a 20000 r.p.m. durante 30 minutos y se recoge el sobrenadante. Se repite la extracción de sedimento dos veces más. Se mezclan los sobrenadantes, se dializan frente a agua destilada a 4°C durante 18 horas y se determina la concentración de proteínas.

II.1.6. DETERMINACION DE SU CONCENTRACION PROTEICA.

La valoración de la concentración antigénica se realiza mediante el método de Bradford (bio Rad Protein assay). En los distintos lotes de antígeno preparado en el transcurso de este trabajo, la concentración proteica del antígeno obtenido tal como se ha descrito ha oscilado entre 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$.

La solución antigénica valorada se ha fraccionado y liofilizado, conservándose así hasta el momento de su empleo.

II.1.7. CALCULO DE LA CONCENTRACION ANTIGENICA A UTILIZAR.

Una vez obtenido y valorado el antígeno, tal como se ha descrito en los apartados II.1.4, II.1.5 y II.1.6, se procede al cálculo de la concentración antigénica adecuada. La sensibilidad y exactitud de la técnica de ELISA depende de la concentración y estabilidad del antígeno adsorbido a la placa.

La sensibilización de las placas por una concentración excesiva de antígeno puede producir una ligera interacción proteína-proteína generando un efecto hook (PESCE et al, 1984), mientras que una sensibilización con una concentración de antígeno insuficiente, puede disminuir la sensibilidad de ELISA así como la detección de anticuerpos de baja afinidad (MAKELA et al, 1983).

La determinación de la concentración óptima de antígeno puede realizarse mediante el método de saturación con peroxidasa (NIETO et al, 1984).

Dicha técnica consiste en sensibilizar una placa con distintas concentraciones de antígeno, incubarla frente a un exceso de peroxidasa y medir su actividad enzimática mediante un substrato revelador.

La actividad mide los sitios de la superficie de poliestireno no ocupados por el antígeno, por lo que permite evaluar su grado de adsorción para cada concentración de antígeno usada.

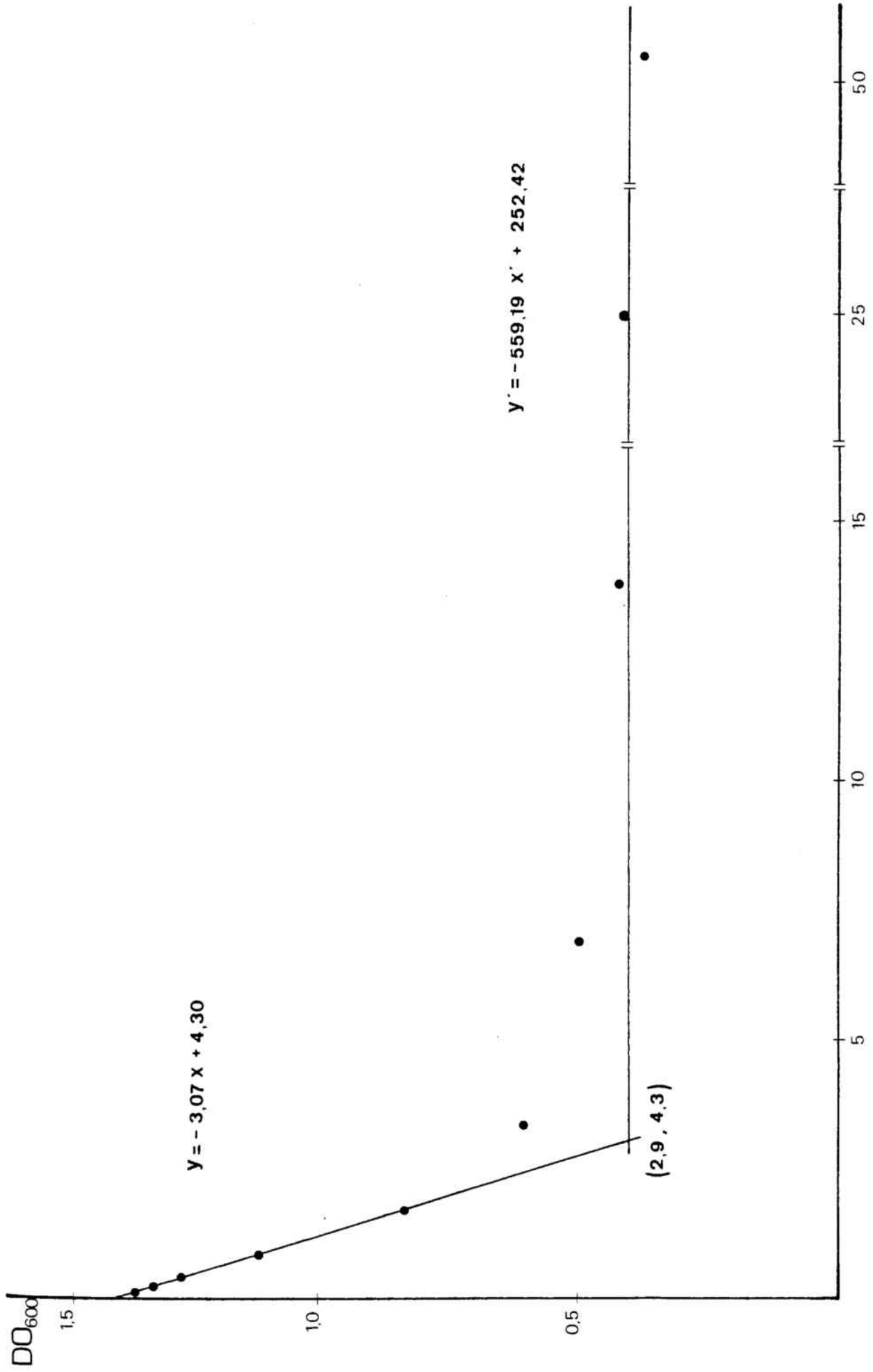
Al no utilizar antisuero control se evita cualquier dependencia de los artefactos derivados de la afinidad de los anticuerpos.

En nuestro caso ensayamos concentraciones antigénicas que oscilan entre $1 \mu\text{g/ml}$ y $55 \mu\text{g/ml}$ de proteína. Las DO_{600} obtenidas en la reacción enzimática para cada una de las concentraciones utilizadas se expresan esquemáticamente en la gráfica 1. En la misma puede observarse que mediante la técnica de saturación con peroxidasa la adsorción de enzima disminuye al aumentar la concentración antigénica hasta llegar a un punto en que prácticamente permanece constante. Dicho punto representa aquella concentración de antígeno a la cual este forma una monocapa en la superficie del poliestireno.

La concentración exacta de saturación de antígeno se determina por las intersecciones de las rectas de regresión correspondientes a las DO_{600} obtenidas a bajas y altas concentraciones de antígeno. En nuestro caso dichas rectas han estado representadas por la fórmula ($y = -3,07x + 4,30$) y ($y' = -559,19x' + 252,42$) cuya intersección ha dado una concentración antigénica de $2,9 \mu\text{g/ml}$ de proteína, por lo que a efectos prácticos decidimos utilizar una concentración de $3 \mu\text{g}$ proteína/ml para los ensayos subsiguientes.

La utilización de la técnica de la peroxidasa para la determinación de la concentración antigénica a fijar en la fase sólida presenta además de las ventajas ya señaladas la de obviar la utilización de inmunosueros control valorados, lo cual en nuestro caso era extremadamente difícil dada la carencia de los mismos.

GRAFICA N° 1



CONCENTRACION DE ANTIGENO (ug/ml)

II.2. ENSAYO EN MODELO EXPERIMENTAL MURINO.

II.2.1. INFESTACION EXPERIMENTAL.

Para proceder a la obtención de inmunosueros específicos se ha procedido a la infestación experimental de ratones (Balb/c) mediante la inoculación subcutánea de larvas II, obtenidas tal como se ha explicado en el apartado II.1.4.

El sedimento de larvas vivas obtenidas después de su separación en el embudo de Baermann se resuspende en 2 ml de solución salina. Se determina la concentración larvaria mediante recuento a la lupa binocular del número de larvas contenidas en 50 μ l de la suspensión. A partir de esta suspensión madre se han preparado dos suspensiones en solución salina con una concentración larvaria de 250 y 1000 larvas/ml respectivamente.

Se han inoculado subcutáneamente cuatro lotes de 5 ratones cada uno con las siguientes dosis:

lote 1	-----	25 larvas/ratón
lote 2	-----	50 larvas/ratón
lote 3	-----	100 larvas/ratón
lote 4	-----	200 larvas/ratón

II.2.2. OBTENCION DE INMUNOSUEROS.

Transcurridos dos meses de la inoculación larvaria se ha procedido al sangrado de los ratones mediante punción cardíaca obteniéndose un volumen de sangre que ha oscilado en 0,5 y 1 ml en los distintos ratones.

El suero se ha separado por centrifugación durante 10 minutos a 2500 r.p.m. y guardado a -20°C hasta el momento de su uso.

II.2.3. APLICACION DE LA TECNICA DE ELISA.

II.2.3.1. Marcha de la reacción.

a) Fijación del antígeno.

El antígeno valorado se disuelve con tampón carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH = 9,6, hasta la concentración adecuada, en nuestro caso resultó ser la óptima de 3 μg de proteína/ml, y procedemos a la sensibilización de la placa.

a.1. Sensibilización de la placa: se coloca 100 μl del antígeno en cada pocillo de la placa de poliestireno (Flat-bottom, Dynatech M-129-B, Switzerland). Las placas que mejor van para sensibilizar son las esterilizadas con radiaciones γ puesto que les confiere una cierta carga que permite fijar mejor el antígeno. Se deja incubar durante una noche a temperatura ambiente en cámara húmeda.

a.2. Bloqueo: se elimina de los pocillos la solución antigénica y se añaden 200 μl por pozo de PBS con 0,05% tween 20 + 1% de seroalbúmina bovina (PBS-T-S). Se deja incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. De esta forma se consigue bloquear los lugares que habían permanecido sin sensibilizar en la superficie del plástico.

a.3. Lavado: se elimina el exceso de PBS-T-S y se lava 3 veces con PBS-T colocando 200 μl /pozo y una vez con PBS. Una vez eliminada la última solución de lavado se puede congelar la placa a -20°C envuelta en papel de plata, o se puede usar inmediatamente.

b) Adición del suero.

Los sueros a estudiar son diluidos con PBS-T-S a las diluciones adecuadas.

Se colocan 100 μ l/pozo, y se deja incubar 3 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Transcurridas las 3 horas se procede al lavado 3 veces con PBS-T y el último con PBS.

c) Adición del conjugado.

Después de vaciar el contenido de los pozos con el PBS del último lavado se añade 100 μ l/pozo de la dilución apropiada del conjugado (antiinmunoglobulinas adecuadas marcadas con peroxidasa). La dilución del conjugado se hace también con PBS-T-S y se deja incubar toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente se procede al lavado, 3 veces con PBS-T y el último lavado con PBS.

d) Adición del substrato (como substrato revelador se ha utilizado el recomendado por Ngo y cols, 1980).

Preparación del substrato.

- MBTH: 1,8 mM

3 metil-2-benzotiazolinona hidrazona (Sigma chemical company, No. M-8006)

MBTH ----- 210 mg

Tampón fosfato 0,1M pH=7 ----- 400 ml

Llevar el pH a 6.5 mediante la adición de CIH concentrado, ajustar el volumen a 500 ml y filtrar.

- DMAB: 180 mM

ácido 3-(dimetilamino)benzoico (Sigma, Chemical Company No. D-1643)

DMAB ----- 6 g

Tampón fosfato 0,1M pH = 7 ----- 160 ml

Llevar con NaOH 5 M a pH = 7 y ajustar a 200 ml con tampón fosfato y filtrar.

La composición teórica de substrato es la siguiente:

DMAB -----	4,7 ml
MBTH -----	9,3 ml
Tampón fosfato 0,1 M pH 6.5 ---	7 ml
H ₂ O ₂ 30% -----	5 μ l

dicha cantidad es la necesaria para la preparación de una placa.

Dada la variabilidad que presentan los reactivos citados (DMAB y MBTH) en su concentración cuando se hallan en solución, las cantidades a utilizar deberán calcularse de acuerdo con su concentración real, calculada espectrofotométricamente.

Conocido el coeficiente de extinción molar del DMAB 0,1 M pH=6.5 a 305 nm (1430) y el de MBTH 0,1 M pH=6.5 a 285 nm (5160), pueden ajustarse las concentraciones reales a las teóricas de tal manera que la cantidad de cada uno de los reactantes a mezclar para obtener la concentración deseada según la fórmula mencionada será:

para DMAB	$a = \frac{1209}{E_1^0}$	$E_1^0 =$ Extinción a 305 nm de la solución preparada.
para MBTH	$b = \frac{83,96}{E_2^0}$	$E_2^0 =$ Extinción a 285 nm de la solución preparada.
para tampón fosfato 0,1M pH=7	21-(a+b)	

Una vez preparado el substrato se añade 200 μ l/pozo de dicha solución. Se deja incubar 20 minutos a temperatura ambiente.

e) Parada de la reacción.

La reacción se para añadiendo 50 μ l/pozo de SO_4H_2 2N.

f) La lectura se realiza en un espectrofotómetro (Titertek Multiskan) a una longitud de onda de 600 nm.

II.2.3.2. Concentraciones de suero y conjugado utilizados.

Cinética de la reacción.

Los sueros procedentes de los cuatro lotes de ratones inoculados, más un quinto lote control se ensayaron a las diluciones 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000.

El conjugado utilizado se diluyó a una concentración de 1/400, de acuerdo con ensayos previos realizados con el mismo.

La densidad óptica se midió a los 10, 15, 20 y 30 minutos de la reacción enzimática y después de la adición de SO_4H_2 2N, para parar la misma (cuadros 2-26).

II.2.3.3. Controles.

En cada una de las placas a utilizar, se introdujo un suero control negativo y se practicó un control de conjugado, para ello se realizó la técnica tal como se ha descrito, en un par de pocillos en los cuales se añade PBS-T-S en lugar de suero a ensayar.

II.2.3.4. Resultados.

Los resultados obtenidos se indican en los cuadros 2-26 y representan esquemáticamente en las gráficas 2-5, en las cuales no se incluyen las diluciones séricas de 10^4 y 10^5 por dar DO_{600} no significativas.

Cabe destacar que 3 de los ratones que habían recibido un inóculo de 25 larvas y 2 de los que lo habían recibido de 200, murieron en el transcurso de la experiencia. Es por esto que en estos dos lotes únicamente se recogen los resultados de 2 y 3 animales respectivamente.

A partir de los mismos puede observarse las elevadas DO_{600} obtenidas con todos los sueros procedentes de ratones que recibieron inóculo, frente a las obtenidas con los animales control. Observamos también que si bien la intensidad de la reacción enzimática varía notablemente al variar la concentración sérica, prácticamente no varía al modificar el inóculo.

La mayor diferencia entre las DO_{600} obtenidas con los sueros hiperinmunes y los controles, se obtuvo siempre al utilizar una dilución de 1/100.

El estudio de la cinética de la reacción enzimática mostró que en la mayoría de los casos a los 20 minutos de incubación la coloración obtenida alcanzaba ya la zona de meseta, en la curva que relaciona tiempo de incubación-DO (gráficas 2-5). Es por ello que consideramos que la reacción enzimática puede pararse en este momento mediante la adición de SO_4H_2 2N.

DOSIS INOCULADA: 25 larvas.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 10 minutos.

	Dilución del suero				
	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1	1,536	0,702	0,117	0,021	0,011
2	1,713	0,706	0,086	0,006	9,997
$\bar{x} + DE$	$1,625 + 0,0885$	$0,704 + 0,002$	$0,102 + 0,015$	$0,0135 + 0,0075$	$0,004 + 0,0007$

Cuadro nº 2

DOSIS INOCULADA: 50 larvas.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 10 minutos.

	Dilución del suero				
	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1	1,575	0,675	0,121	0,015	0,000
2	1,776	1,193	0,174	0,000	9,993
3	1,650	0,779	0,130	0,012	9,998
4	1,746	0,886	0,118	0,008	9,992
5	1,673	0,733	0,123	0,007	9,984
$\bar{x} + DE$	$1,684 + 0,080$	$0,853 + 0,205$	$0,133 + 0,023$	$0,008 + 0,006$	$9,993 + 0,0005$

Cuadro nº 3

DOSIS INOCULADA: 100 larvas.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 10 minutos.

	Dilución del suero				
	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1	1,203	0,433	0,062	9,998	9,992
2	1,629	1,348	0,377	0,065	0,006
3	1,393	0,873	0,173	0,018	0,003
4	1,659	1,355	0,397	0,076	0,017
5	1,396	0,957	0,152	0,025	0,005
$\bar{x} + DE$	$1,456 + \underline{\quad}$	$0,993 + \underline{\quad}$	$0,232 + \underline{\quad}$	$0,035 + \underline{\quad}$	$0,005 + \underline{\quad}$

Cuadro nº 4

DOSIS INOCULADA: 200 larvas.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 10 minutos.

	Dilución del suero				
	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1	1,314	0,639	0,102	0,033	0,014
2	1,533	0,665	0,106	0,027	0,010
3	1,245	0,604	0,104	0,010	0,015
$\bar{x} \pm DE$	$1,364 \pm 0,123$	$0,636 \pm 0,025$	$0,104 \pm 0,002$	$0,023 \pm 0,009$	$0,013 \pm 0,002$

Cuadro nº 5

DOSIS INOCULADA: 25 larvas.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 15 minutos.

	Dilución del suero					
	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000	1/1000000
1	1,738	0,879	0,146	0,026	0,010	0,010
2	1,849	0,892	0,106	0,010	9,998	
$\bar{x} + DE$	$1,793 + 0,055$	$0,885 + 0,006$	$0,126 + 0,020$	$0,018 + 0,008$	$0,004 + 0,0006$	

Cuadro nº 6

DOSIS INOCULADA: 50 larvas.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 15 minutos.

		Dilución del suero				
		1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1		1,699	0,851	0,154	0,018	0,000
2		1,787	1,432	0,225	0,008	9,994
3		1,727	0,970	0,164	0,015	9,998
4		1,769	1,107	0,147	0,018	9,992
5		1,754	0,918	0,157	0,010	9,978
$\bar{x} + DE$		$1,747 + 0,031$	$1,055 + 0,206$	$0,169 + 0,028$	$0,013 + 0,004$	$9,992 + 0,0007$

Cuadro nº 7

DOSIS INOCULADA: 100 larvas.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 15 minutos.

		Dilución del suero				
		1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1	1,437	0,553	0,073	0,002	0,002	9,987
2	1,698	1,537	0,481	0,083	0,083	0,005
3	1,573	1,088	0,217	0,027	0,027	0,005
4	1,744	1,569	0,505	0,096	0,096	0,022
5	1,590	1,183	0,192	0,040	0,040	0,010
$\bar{x} + DE$	$1,608 \pm 0,107$	$1,186 \pm 0,368$	$0,293 \pm 0,170$	$0,049 \pm 0,035$	$0,006 \pm 0,011$	

Cuadro nº 8

DOSIS INOCULADA: 200 larvas.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 15 minutos.

	Dilución del suero					
	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000	1/1000000
1	1,517	0,809	0,129	0,035	0,014	0,014
2	1,648	0,839	0,131	0,038	0,013	0,013
3	1,459	0,772	0,136	0,017	0,020	0,020
$\bar{x} \pm DE$	$1,541 \pm 0,079$	$0,806 \pm 0,027$	$0,132 \pm 0,003$	$0,030 \pm 0,009$	$0,012 \pm 0,006$	$0,012 \pm 0,006$

Cuadro nº 9

DOSIS INOCULADA: 25 larvas.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 20 minutos.

	Dilución del suero					
	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000	1/1000000
1	1,806	1,031	0,77	0,039	0,019	0,019
2	1,856	1,064	0,140	0,024	0,009	0,009
$\bar{x} + DE$	$1,831 \pm 0,025$	$0,1047 \pm 0,0165$	$0,158 \pm 0,018$	$0,031 \pm 0,07$	$0,014 \pm 0,005$	

Cuadro nº 10

DOSIS INOCULADA: 50 larvas.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 20 minutos.

	Dilución del suero				
	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1	1,718	1,002	0,187	0,022	0,002
2	1,745	1,562	0,278	0,015	0,001
3	1,723	1,128	0,198	0,019	9,999
4	1,732	1,287	0,187	0,027	9,999
5	1,743	1,072	0,193	0,018	9,977
$\bar{x} \pm DE$	$1,732 \pm 0,010$	$1,210 \pm 0,199$	$0,208 \pm 0,039$	$0,020 \pm 0,004$	$9,995 \pm 0,0009$

Cuadro nº 11

DOSIS INOCULADA: 100 larvas.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 20 minutos.

		Dilución del suero				
		1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1	1,570	0,673	0,099	0,007	0,007	9,991
2	1,682	1,601	0,577	0,100	0,100	0,007
3	1,622	1,258	0,265	0,034	0,034	0,011
4	1,738	1,655	0,603	0,116	0,116	0,026
5	1,654	1,350	0,236	0,050	0,050	0,017
$\bar{x} \pm DE$	$1,653 \pm 0,056$	$1,307 \pm 0,350$	$0,356 \pm 0,199$	$0,061 \pm 0,040$	$0,010 \pm 0,011$	

Cuadro nº 12

DOSIS INOCULADA: 200 larvas.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 20 minutos.

	Dilución del suero				
	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1	1,600	0,954	0,156	0,039	0,016
2	1,649	0,999	0,163	0,047	0,021
3	1,553	0,912	0,163	0,019	0,020
$\bar{x} + DE$	$1,600 + 0,039$	$0,955 + 0,043$	$0,160 + 0,003$	$0,035 + 0,011$	$0,019 + 0,002$

Cuadro nº 13

DOSIS INOCULADA: 25 larvas.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 30 minutos.

	Dilución del suero				
	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1	1,796	1,137	0,199	0,048	0,022
2	1,835	1,177	0,156	0,026	0,010
$\bar{x} + DE$	$1,815 + 0,019$	$1,157 + 0,020$	$0,177 + 0,021$	$0,037 + 0,011$	$0,016 + 0,006$

Cuadro nº 14

DOSIS INOCULADA: 50 larvas.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 30 minutos.

	Dilución del suero				
	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1	1,679	1,102	0,212	0,028	0,002
2	1,716	1,601	0,315	0,016	0,001
3	1,677	1,231	0,225	0,025	0,001
4	1,699	1,385	0,213	0,030	0,004
5	1,696	1,174	0,216	0,023	9,974
$\bar{x} \pm DE$	$1,693 \pm 0,014$	$1,298 \pm 0,177$	$0,236 \pm 0,039$	$0,024 \pm 0,004$	$0,0036 \pm 0,011$

Cuadro nº 15

DOSIS INOCULADA: 100 larvas.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 30 minutos.

	Dilución del suero				
	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1	1,617	0,753	0,110	0,004	9,993
2	1,641	1,600	0,647	0,114	0,006
3	1,691	1,345	0,301	0,037	0,015
4	1,696	1,662	0,680	0,137	0,032
5	1,064	1,444	0,270	0,055	0,023
$\bar{x} + DE$	$1,541 + 0,240$	$1,360 + 0,323$	$0,401 + 0,223$	$0,069 + 0,05$	$0,0138 + 0,0135$

Cuadro nº 16

DOSIS INOCULADA: 200 larvas.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 30 minutos.

	Dilución del suero				
	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1	1,604	1,054	0,178	0,047	0,026
2	1,631	1,097	0,186	0,052	0,026
3	1,564	1,008	0,186	0,025	0,025
$\bar{x} \pm DE$	$1,599 \pm 0,027$	$1,053 \pm 0,036$	$0,183 \pm 0,003$	$0,041 \pm 0,011$	$0,025 \pm 0,0004$

Cuadro nº 17

DOSIS INOCULADA: 25 larvas.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 30 minutos con adición de SO_4H_2 2N.

		Dilución del suero				
		1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1		1,731	1,041	0,199	0,042	0,028
2		1,788	1,103	0,155	0,016	0,001
\bar{x}	+ DE	1,759 ± 0,028	1,058 ± 0,044	0,177 ± 0,022	0,029 ± 0,013	0,0145 ± 0,0135

Cuadro nº 18

DOSIS INOCULADA: 50 larvas.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 30 minutos con adición de SO_4H_2 2N.

	Dilución del suero				
	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1	1,656	1,019	0,209	0,035	0,002
2	1,700	1,519	0,302	0,014	9,995
3	1,668	1,136	0,225	0,027	9,999
4	1,687	1,298	0,216	0,037	0,001
5	1,684	1,085	0,219	0,026	9,989
$\bar{x} \pm \text{DE}$	$1,679 \pm 0,015$	$1,211 \pm 0,179$	$0,234 \pm 0,034$	$0,027 \pm 0,008$	$9,997 \pm 0,0005$

Cuadro nº 19

DOSIS INOCULADA: 100 larvas.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 30 minutos con adición de SO_4H_2 2N.

	Dilución del suero				
	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1	1,528	0,721	0,104	0,019	0,002
2	1,635	1,553	0,621	0,114	0,009
3	1,572	1,256	0,303	0,043	0,011
4	1,690	1,606	0,658	0,138	0,044
5	1,612	1,353	0,273	0,061	0,028
$\bar{x} + DE$	$1,607 + 0,055$	$1,297 + 0,315$	$0,391 + 0,213$	$0,075 + 0,044$	$0,018 + 0,015$

Cuadro nº 20

DOSIS INOCULADA: 200 larvas.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 30 minutos con adición de SO_4H_2 2N.

	Dilución del suero					
	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000	1/1000000
1	1,550	0,986	0,182	0,056	0,027	0,027
2	1,616	1,032	0,191	0,062	0,016	0,016
3	1,509	0,955	0,199	0,024	0,044	0,044
$\bar{X} \pm \text{DE}$	$1,558 \pm 0,044$	$0,991 \pm 0,031$	$0,190 \pm 0,006$	$0,047 \pm 0,016$	$0,029 \pm 0,011$	$0,029 \pm 0,011$

Cuadro nº 21

LOTE CONTROL.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 10 minutos.

	Dilución del suero				
	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1	0,584	0,064	0,003	9,990	9,995
2	0,679	0,079	0,005	9,996	9,999
3	0,892	0,112	0,021	0,014	0,020
4	0,794	0,098	0,015	0,001	0,004
5	0,862	0,110	0,019	0,004	0,003
$\bar{x} + DE$	$0,762 + 0,115$	$0,093 + 0,018$	$0,013 + 0,007$	$0,001 + 0,0012$	$0,004 + 0,008$

Cuadro nº 22

LOTE CONTROL.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 15 minutos.

	Dilución del suero				
	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1	0,728	0,087	0,003	9,990	9,994
2	0,889	0,107	0,009	9,992	0,001
3	1,227	0,164	0,038	0,022	0,019
4	0,910	0,125	0,019	0,002	0,004
5	1,115	0,147	0,022	0,005	0,002
$\bar{x} \pm DE$	$0,973 \pm 0,176$	$0,126 \pm 0,03$	$0,018 \pm 0,012$	$0,002 \pm 0,011$	$0,004 \pm 0,008$

Cuadro nº 23

LOTE CONTROL.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 20 minutos.

		Dilución del suero				
		1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1	1,022	0,096	0,010	9,994	0,002	0,002
2	1,098	0,125	0,015	9,992	0,004	0,004
3	1,298	0,229	0,049	0,012	0,024	0,024
4	1,158	0,146	0,018	0,005	0,008	0,008
5	1,200	0,198	0,041	0,007	0,006	0,006
$\bar{x} \pm DE$	$1,155 \pm 0,09$	$0,158 \pm 0,048$	$0,026 \pm 0,015$	$0,002 \pm 0,007$	$0,008 \pm 0,008$	$0,008 \pm 0,008$

Cuadro nº 24

LOTE CONTROL.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 30 minutos.

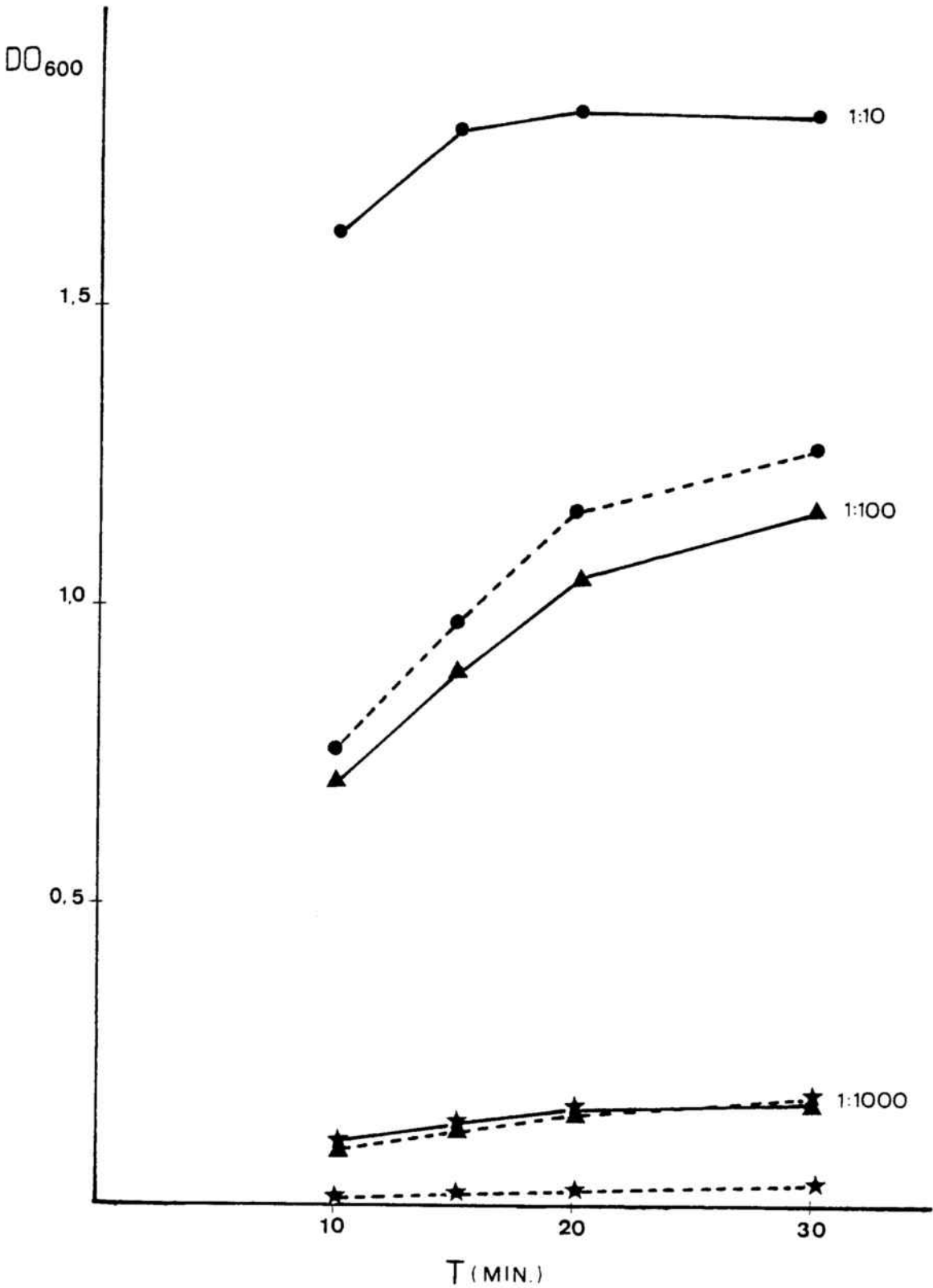
		Dilución del suero				
		1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1	1,101	0,156	0,014	0,014	9,996	0,005
2	1,320	0,167	0,018	0,018	9,999	0,18
3	1,472	0,217	0,054	0,054	0,011	0,021
4	1,162	0,163	0,020	0,020	9,998	0,012
5	1,385	0,195	0,049	0,049	0,006	0,001
$\bar{x} \pm DE$	$1,263 \pm 0,166$	$0,179 \pm 0,022$	$0,031 \pm 0,016$	$0,031 \pm 0,016$	$0,002 \pm 0,005$	$0,011 \pm 0,007$

Cuadro nº 25

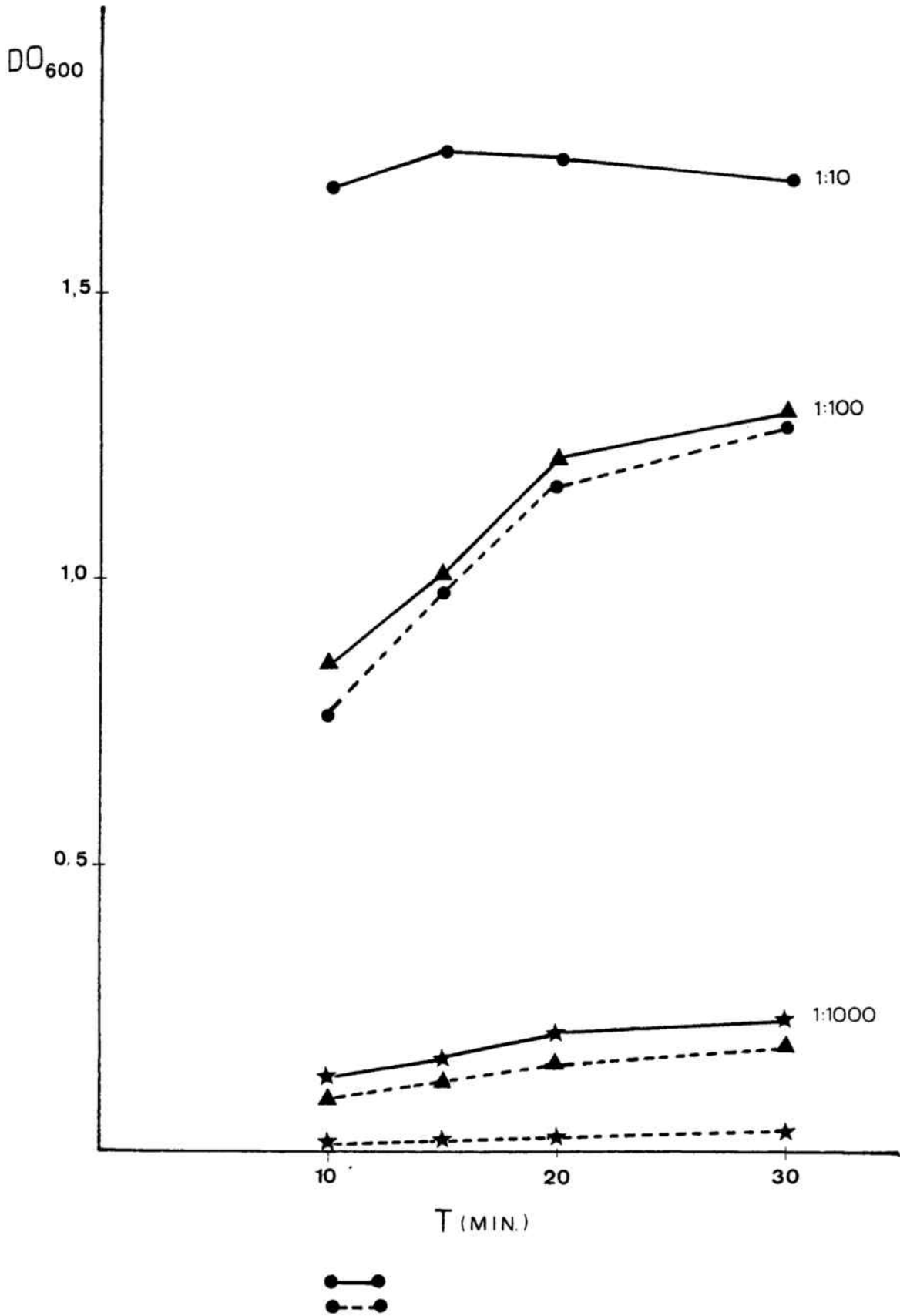
LOTE CONTROL.
 TIEMPO DE REACCION ENZIMATICA: 30 minutos con adición de SO_4H_2 2N.

	Dilución del suero				
	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1	0,996	0,154	0,016	9,995	0,002
2	1,231	0,165	0,020	9,998	0,006
3	1,399	0,221	0,049	0,007	0,020
4	1,164	0,166	0,027	0,002	0,008
5	1,278	0,190	0,035	0,004	0,017
$\bar{X} \pm \text{DE}$	$1,185 \pm 0,133$	$0,179 \pm 0,023$	$0,034 \pm 0,011$	$0,001 \pm 0,004$	$0,010 \pm 0,007$

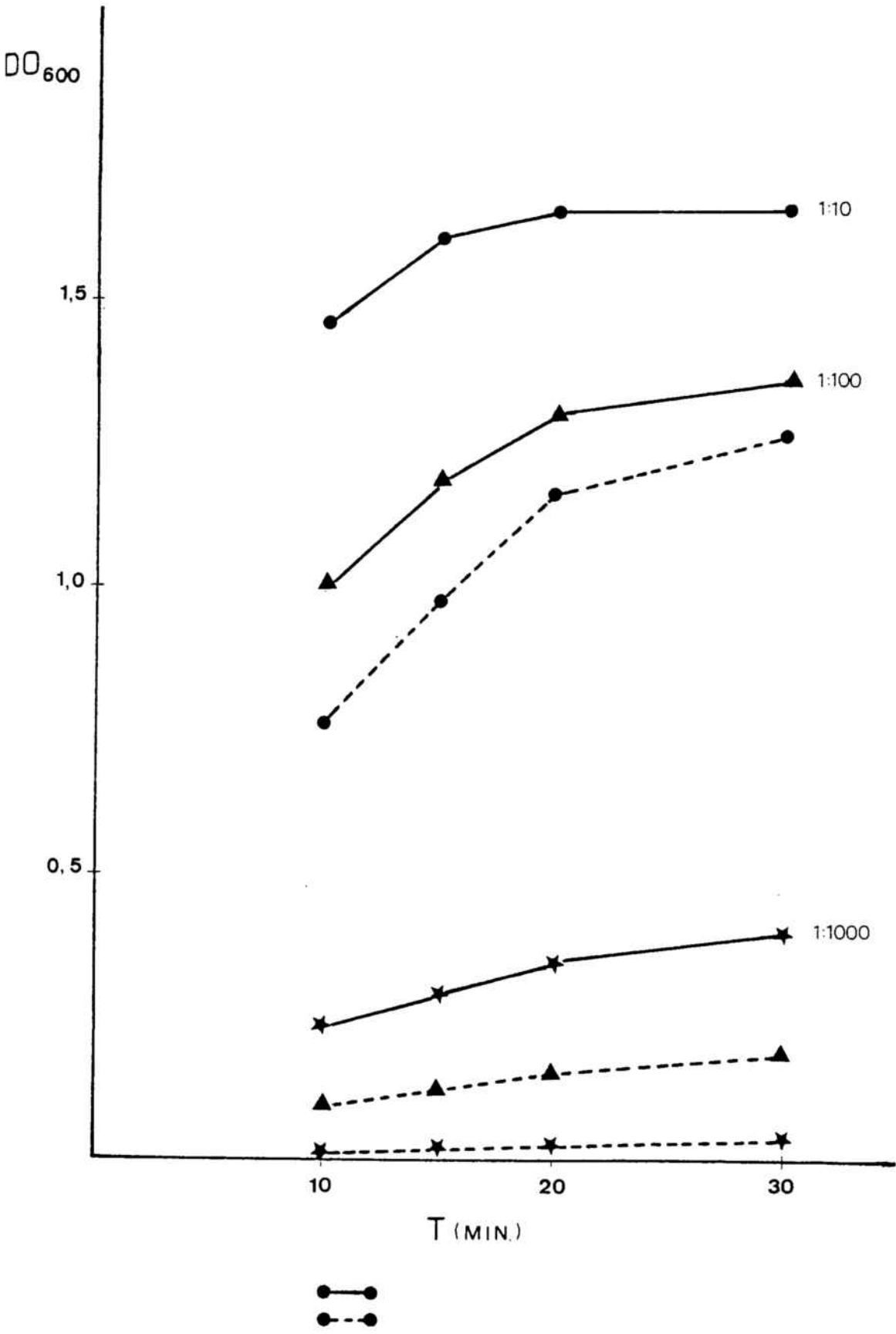
Cuadro nº 26



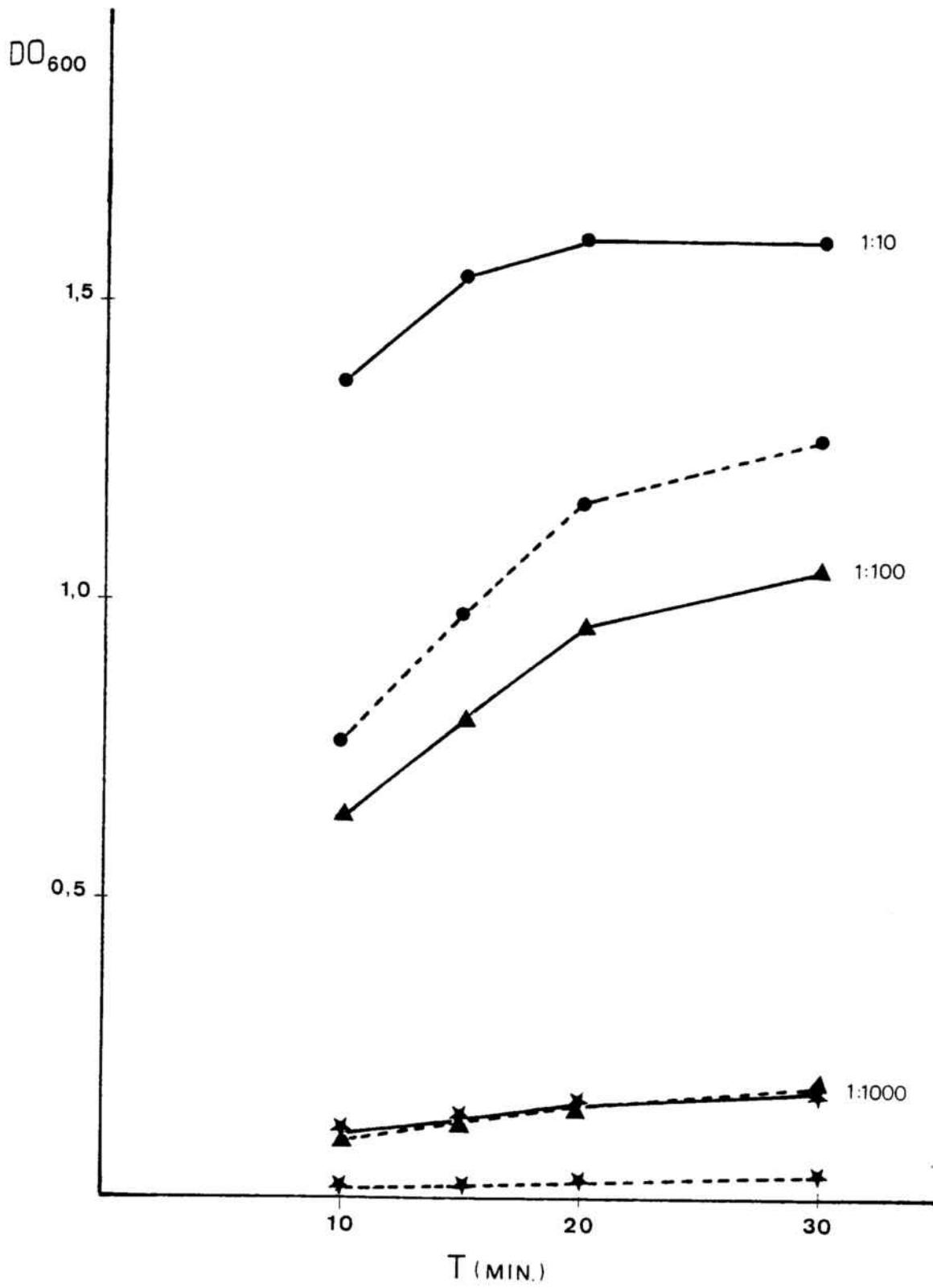
DOSIS INOCULADA: 25 LARVAS



DOSIS INOCULADA: 50 LARVAS



DOSIS INOCULADA: 100 LARVAS



DOSIS INOCULADA: 200 LARVAS

II.3. APLICACION DE LA TECNICA ELISA A SUEROS HUMANOS.

II.3.1. MATERIAL UTILIZADO.

Se ha realizado un estudio de 147 sueros pertenecientes a enfermos hospitalizados, enfermos de ambulatorio e individuos presumiblemente sanos.

Durante el estudio se ha creído convenientemente distribuir los sueros en distintos lotes de acuerdo con la patología que presentaban los pacientes de los cuales se obtuvieron, lotes que quedaron establecidos de la siguiente forma:

1. Hidatidosis
2. Otras helmintiasis
3. Eosinofilia
4. Corioretinitis y/o uveitis
5. Otras patologías y donantes sanos

II.3.2. CALCULO DE LA DILUCION DEL CONJUGADO Y DILUCION DEL SUERO.

Para determinar a que dilución debía utilizarse el conjugado antiinmunoglobulinas humanas se realizó un ensayo "a priori" con un lote de 5 sueros entre los que incluimos sueros presumiblemente positivos y negativos a la parasitosis estudiada.

Dichos sueros fueron ensayados a 6 diluciones distintas (1/400, 1/500, 1/600, 1/800, 1/1000, 1/1200) frente a 3 diluciones distintas de conjugado (1/400, 1/800, 1/1600), para poder escoger así la dilución de suero y de conjugado más apropiada, teniendo en cuenta que se considera como tal aquella dilución que nos da la máxima sensibilidad y la mínima inespecificidad.

Es difícil establecer cual es dicha dilución al no conocer con certeza cuales son los sueros positivos y cuales son los sueros negativos. En el cuadro (27) se expresan los resultados obtenidos al aplicar la técnica ensayada en los distintos sueros. Podemos observar que de los 5 sueros ensayados uno (suero nº 1) es claramente positivo, obteniendo en el mismo densidades ópticas extremadamente elevadas, rayando siempre los límites de la lectura del espectrofotómetro a todas las diluciones de suero y conjugado utilizadas.

En otro caso (suero nº 5) obtuvimos resultados moderadamente altos, con densidades ópticas que variaron de forma manifiesta al modificar la dilución del suero sin que se observaran grandes diferencias al modificar la dilución de conjugado.

En otro caso (suero nº 4) se obtuvieron resultados medios, con una densidad óptica que disminuyó gradualmente al disminuir la concentración sérica sin que se modificara sensiblemente al modificar la dilución de conjugado.

En los sueros nº 2 y nº 3 las densidades ópticas obtenidas fueron de moderadas a bajas, las cuales no se modificaron sensiblemente al diluir el suero, si bien manifestaron una disminución aparente al incrementar la dilución del conjugado.

A la vista de estos resultados se decidió utilizar como dilución de trabajo para el conjugado una dilución que estuviera próxima a la de 1/800, puesto que se consideró que es aquella que permite diferenciar al máximo la positividad debida a una reacción específica antígeno-anticuerpo y la debida a la coloración de fondo inespecífica. Por comodidad en la ejecución de las diluciones y por considerar que dicha dilución podría tranquilamente excederse se decidió adoptar como dilución de trabajo para los ensayos subsiguientes con el lote de conjugado ensayado la dilución 1/1000.

Nº suero	Dilución conjugado	Dilución sueros					
		1/400	1/500	1/600	1/800	1/1000	1/1200
1	1/400	1,923	1,891	1,890	1,900	1,893	1,898
	1/800	-	-	-	-	1,891	1,984
	1/1600	1,947	1,952	1,928	1,856	1,891	1,919
2	1/400	0,786	0,709	0,556	0,563	0,565	0,545
	1/800	0,669	0,534	0,494	0,442	0,395	0,300
	1/1600	0,580	0,486	0,466	0,427	0,421	0,419
3	1/400	0,597	0,608	0,596	0,585	0,525	0,531
	1/800	0,529	0,527	0,520	0,521	0,522	0,455
	1/1600	0,405	0,347	0,374	0,410	0,355	0,359
4	1/400	0,961	0,990	0,668	0,529	0,537	0,421
	1/800	0,868	0,877	0,860	0,629	0,573	0,409
	1/1600	0,916	0,906	0,839	0,600	0,564	0,390
5	1/400	1,404	1,349	1,212	0,786	0,451	0,444
	1/800	1,415	1,274	1,104	0,756	0,376	0,412
	1/1600	1,206	1,189	1,063	0,644	0,365	0,380

Cuadro nº 27

Dilución del suero:

La observación de que los sueros presumiblemente positivos modificaban la densidad óptica de forma sensible al incrementar la dilución de suero cuando esta se hallaba entre valores comprendidos entre 1,5 y 0,5, si bien no se modificaba sensiblemente cuando dichos valores oscilaban alrededor de 0,5, nos condujo a realizar todos los ensayos subsiguientes a 3 diluciones séricas distintas las cuales quedaron establecidas en 1/400, 1/800, 1/1600.

Pensamos que la utilización de estas 3 diluciones facilita no sólo la lectura, sino que permite poner de manifiesto posibles deficiencias o errores, cometidos durante el proceso, y que pueden falsificar los resultados al emplear una técnica tan sensible, errores que son difíciles de visualizar cuando se utiliza una única dilución. Además de ello, pensamos que sea cual sea la concentración de anticuerpos específicos presentes en el suero a ensayar, la utilización de 3 diluciones distintas permitirá su detección, estando situadas las densidades ópticas obtenidas en alguna de ellos en la zona de relación lineal de sigmoide que relaciona la concentración de inmunoglobulinas y densidad óptica obtenida.

II.3.3. CONTROLES.

Vistos los resultados obtenidos al ensayar la dilución de conjugado y suero a emplear, y vista la elevada densidad óptica obtenida como coloración de fondo, decidimos introducir, a parte del control de conjugado ya señalado anteriormente, un blanco para cada uno de los sueros. Dicho blanco se realiza a una única dilución sérica (1/400), omitiendo en el proceso la adición de conjugado y colocando en su lugar PBS-T-S. De esta manera se puede detectar la actividad peroxidasa del suero ensayado.

La densidad óptica obtenida en cada uno de los blancos adicionada de la obtenida en el control de conjugado consideramos que podría constituir la llamada coloración de fondo para cada uno de los sueros.

II.3.4. RESULTADOS.

Los resultados obtenidos al aplicar la técnica descrita a 147 sueros humanos son los que se indican en el cuadro nº 28.

II.3.5. DETERMINACION DEL CRITERIO DE POSITIVIDAD.

Se ha señalado ya la gran dificultad que representa para el ensayo de una técnica serológica para la determinación de la larva migrans visceral, la elección de controles. La de controles positivos, puesto que el parásito casi nunca llega a aislarse y los criterios de GLICKMAN et al (1978) para el diagnóstico clínico de la enfermedad gozan de gran inespecificidad. La de controles negativos, puesto que sus manifestaciones clínicas son muy inconstantes y su patología a veces nula.

Como consecuencia de ello decidimos considerar como negativos a todos aquellos sueros que a la dilución de 1/800 dieron una DO_{600} que presentara una distribución normal. Para ello calculamos la media y la desviación estandar (DE) del conjunto, eliminando todos aquellos sueros cuya DO_{600} era superior a la media más dos veces la DE. Una vez eliminados se calculó de nuevo la \bar{x} y la DE hasta que no se eliminó ningún valor, obteniendo unos valores de $0,289 \pm 0,101$ (cuadro nº 29). Consideramos que todos los sueros que no habían sido eliminados formaban un conjunto homogéneo perteneciente a la población normal seronegativa.

Aquellos sueros que dieron una DO_{600} comprendida entre la media adicionada de 2 y 4 veces la DE de la población normal, los incluimos en el grupo de dudosos y como positivos consideramos a aquellos que dieron una reacción enzimática con DO_{600} superiores a la media más cuatro veces la DE (cuadro nº 30).

Cuadro nº 28

Nº.suero	<u>Dilución suero</u>			<u>Blanco</u>	PATOLOGIA
	1/400	1/800	1/1600		
1	1,737	1,699	1,609	0,034	Eosinofilia
2	1,852	1,306	1,075	0,052	Eosinofilia
3	0,595	0,440	0,302	0,051	Corioretinitis
4	0,527	0,376	0,290	0,073	Corioretinitis
5	0,496	0,364	0,333	0,054	Eosinofilia
6	0,489	0,358	0,261	0,017	Eosinofilia
7	0,748	0,534	0,401	0,011	Eosinofilia
8	0,443	0,315	0,268	0,017	Donante sano
9	0,487	0,344	0,273	0,019	Shock séptico
10	0,585	0,445	0,332	0,032	Donante sano
11	0,527	0,390	0,266	0,067	Donante sano
12	0,346	0,341	0,309	0,064	Donante sano
13	0,495	0,357	0,269	0,037	Corioretinitis
14	0,249	0,276	0,204	0,009	Donante sano
15	0,567	0,415	0,318	0,012	Adenopatías
16	0,358	0,360	0,258	0,045	Hidrocefalia congénita
17	0,386	0,305	0,260	0,064	Donante sano
18	0,568	0,411	0,397	0,012	Donante sano
19	0,422	0,335	0,306	0,007	Adenopatías
20	0,382	0,382	0,237	0,006	Donante sano
21	0,463	0,346	0,231	0,003	Sdme.diarréico
22	0,300	0,253	0,212	0,014	Donante sano
23	0,480	0,340	0,260	0,013	Donante sano
24	0,480	0,355	0,266	0,003	Donante sano
25	0,438	0,321	0,278	0,055	Donante sano
26	0,494	0,423	0,355	0,063	Donante sano
27	0,256	0,459	0,382	0,030	Donante sano
28	0,514	0,397	0,346	0,033	Donante sano
29	0,480	0,394	0,375	0,063	Eosinofilia

Cuadro n.º 28 (continuación)

N.º.suero	<u>Dilución suero</u>			<u>Blanco</u>	PATOLOGIA
	1/400	1/800	1/1600		
30	0,655	0,495	0,392	0,042	Eosinofilia
31	0,332	0,364	0,267	0,016	Eosinofilia
32	0,613	0,486	0,401	0,039	Eosinofilia
33	0,400	0,348	0,319	0,081	Hidatidosis
34	0,621	0,463	0,395	0,027	Hidatidosis
35	0,908	0,790	0,598	0,045	Hidatidosis
36	0,624	0,478	0,399	0,045	Hidatidosis
37	0,545	0,425	0,332	0,040	Uveitis
38	0,751	0,536	0,356	0,043	Corioretinitis
39	0,739	0,612	0,494	0,034	Uveitis
40	0,483	0,411	0,322	0,073	Uveitis
41	0,636	0,509	0,374	0,033	Paludismo Tricocefalosis
42	0,221	0,203	0,214	0,036	Ascariidiasis
43	0,784	0,546	0,386	0,048	Tricocefalosis
44	0,604	0,482	0,330	0,049	Eosinofilia
45	0,168	0,143	0,139	0,047	Donante sano
46	0,199	0,163	0,108	0,010	Donante sano
47	0,142	0,115	0,91	0,013	Adenopatías
48	0,271	0,199	0,156	0,019	Meningoencefalitis
49	0,405	0,298	0,211	0,024	Eosinofilia
50	0,255	0,209	0,135	0,044	Eosinofilia
51	0,439	0,293	0,277	0,078	Eosinofilia
52	0,501	0,340	0,441	0,083	Eosinofilia
53	0,445	0,327	0,239	0,090	Eosinofilia
54	0,266	0,193	0,151	0,039	Hidatidosis
55	0,522	0,382	0,272	0,073	Hidatidosis
56	0,430	0,276	0,196	0,077	Hidatidosis
57	0,576	0,481	0,402	0,103	Hidatidosis
58	0,624	0,654	0,540	0,140	Hidatidosis

Cuadro nº 28 (continuación)

Nº.suero	<u>Dilución suero</u>			<u>Blanco</u>	PATOLOGIA
	1/400	1/800	1/1600		
59	0,254	0,168	0,141	0,075	Uveitis
60	0,531	0,411	0,259	0,092	Uveitis
61	0,268	0,280	0,209	0,097	Corioretinitis
62	0,323	0,202	0,142	0,066	Oxiuriasis y Necatoriasis
63	0,286	0,194	0,148	0,055	Schistosomiasis vesical
64	0,300	0,223	0,159	0,077	Hymenolepiasis y Tricocefalosis
65	0,262	0,174	0,132	0,219	Hymenolepiasis
66	0,263	0,219	0,135	0,072	Donante sano
67	1,157	0,863	0,608	0,005	Hidatidosis
68	1,010	0,646	0,480	0,002	Hidatidosis
69	0,982	0,645	0,535	9,999	Hidatidosis
70	1,465	1,334	1,216	0,001	Hidatidosis
71	1,054	1,518	1,459	0,001	Hidatidosis
72	0,991	0,534	0,472	0,101	Hidatidosis
73	0,834	0,604	0,848	0,105	Hidatidosis
74	1,128	0,972	0,592	0,056	Hidatidosis
75	1,010	0,770	0,653	0,019	Hidatidosis
76	0,795	0,500	0,016	0,021	Hidatidosis
77	1,008	0,740	0,633	9,973	Hidatidosis
78	1,406	1,033	1,114	0,034	Eosinofilia
79	0,926	0,633	0,499	0,018	Eosinofilia
80	0,234	0,214	0,267	0,035	Eosinofilia
81	0,776	0,597	0,512	0,051	Eosinofilia
82	0,895	0,668	0,582	0,083	Eosinofilia
83	0,766	0,537	0,412	0,026	Eosinofilia

Cuadro nº 28 (continuación)

Nº.suero	<u>Dilución suero</u>			<u>Blanco</u>	PATOLOGIA
	1/400	1/800	1/1600		
84	1,009	0,658	0,538	9,956	Eosinofilia
85	0,587	0,466	0,330	0,002	Eosinofilia
86	0,578	0,331	0,248	0,001	Eosinofilia
87	0,889	0,565	0,357	9,999	Corioretinitis
88	0,521	0,332	0,289	0,001	Uveitis
89	0,284	0,243	0,175	0,002	Corioretinitis
90	0,451	0,353	0,250	0,001	Corioretinitis
91	0,329	0,241	0,182	9,998	SIDA
92					
93	0,682	0,551	0,396	9,992	Corioretinitis
94	0,535	0,418	0,302	0,001	Corioretinitis
95	0,644	0,339	0,285	0,007	Corioretinitis
96	0,178	0,155	0,162	9,973	Corioretinitis
97	0,975	0,636	0,613	0,160	Uveitis
98	0,974	0,690	0,564	0,090	Uveitis
99	0,321	0,273	0,263	0,072	Uveitis
100	0,824	0,545	0,347	0,014	Corioretinitis
101	0,361	0,258	0,233	9,983	Amebiasis. Anguilulosis.
102	0,244	0,203	0,156	0,007	Paludismo
103	0,319	0,226	0,181	9,995	Donante sano
104	0,314	0,274	0,194	9,974	Donante sano
105	0,543	0,434	0,454	0,015	Adenopatías axilares
106	0,379	0,263	0,202	0,001	Adenopatías laterocervicales
107	0,451	0,287	0,239	0,035	Adenopatías
108	0,599	0,399	0,325	0,004	Uveitis
109	0,435	0,371	0,348	9,998	Corioretinitis
110	0,316	0,188	0,145	0,002	Triquinosis

Cuadro nº 28 (continuación)

Nº. suero	<u>Dilución suero</u>			<u>Blanco</u>	PATOLOGIA
	1/400	1/800	1/1600		
111	0,403	0,276	0,262	9,999	Triquinosis
112	0,428	0,306	0,213	9,998	Triquinosis
113	0,409	0,313	0,241	0,001	Triquinosis
114	0,775	0,568	0,362	0,002	Triquinosis
115	0,595	0,384	0,272	9,999	Triquinosis
116	0,355	0,326	0,293	0,003	Triquinosis
117	0,211	0,116	0,110	9,917	Donante sano
118	0,378	0,285	0,243	0,009	Eosinofilia
119	0,255	0,208	0,198	9,974	Eosinofilia
120	0,238	0,206	0,196	9,987	Diabetes
121	0,315	0,213	0,202	9,990	Sdme. febril
122	0,239	0,202	0,185	9,959	Donante sano
123	0,441	0,328	0,304	9,998	Lesión tronco-cerebral
124	0,269	0,206	0,237	0,022	Donante sano
125	0,143	0,119	0,130	9,913	Donante sano
126	0,393	0,313	0,259	0,032	Donante sano
127	0,286	0,222	0,220	9,998	Donante sano
128	0,347	0,261	0,225	9,999	Adenopatías
129	0,243	0,248	0,207	0,018	Sdme. febril
130	0,253	0,192	0,202	9,965	E. Hodgkin
131	0,263	0,223	0,171	9,979	Sdme. febril
132	0,351	0,220	0,181	9,980	E. de Crohn
133	0,227	0,154	0,160	9,986	Donante sano
134	0,199	0,135	0,102	9,962	Donante sano
135	0,163	0,130	0,138	9,980	Hepatoesplenomegalia
136	0,306	0,263	0,275	0,005	Donante sano
137	0,427	0,264	0,275	0,008	Sdme. febril
138	0,315	0,240	0,212	9,975	Donante sano

Cuadro nº 28 (continuación)

Nº. suero	<u>Dilución suero</u>			<u>Blanco</u>	PATOLOGIA
	1/400	1/800	1/1600		
139	0,152	0,121	0,110	9,978	Adenopatía submaxilar
140	0,109	0,102	0,97	9,977	Malformación neonatal
141	0,219	0,179	0,170	9,969	Uveitis
142	0,169	0,117	0,95	9,998	Donante sano
143	0,448	0,314	0,219	9,898	Diabetes
144	0,308	0,208	0,139	0,002	Linfoma
145	0,311	0,231	0,168	9,984	Donante sano
146	0,335	0,234	0,213	9,991	Donante sano
147	0,217	0,174	0,159	9,970	Adenopatía laterocervical

	<u>Nº sueros ensayados</u>	<u>D.O. máxima</u>	<u>D.O. mínima</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>D.E.</u>
Sobre el total de sueros ensayados	147	1.699	0.102	0.382	0.245
Después de eliminar resultados aberrantes	115	0.495	0.102	0.289 (0.3)	0.101 (0.1)

Cuadro nº 29

Criterios de positividad

Negativo	$D.O. < \bar{x} + 2 D.E.$	$D.O. < 0.5$
Dudoso	$\bar{x} + 2 D.E. < D.O. < \bar{x} + 4 D.E.$	$0.5 < D.O. < 0.7$
Positivo	$D.O. > \bar{x} + 4 D.E.$	$D.O. > 0.7$

Cuadro nº 30

II.3.6. DISTRIBUCION DE ACUERDO CON LA PATOLOGIA DEL PACIENTE.

En el cuadro nº 31 se han indicado los procesos patológicos que presentaban los pacientes cuyos sueros se han sometido a estudio. Al agruparlos de acuerdo con los lotes señalados en el apartado II.3.1. y distribuirlos según el resultado obtenido en el ELISA, vemos que tan sólo uno de los 58 sueros ensayados pertenecientes a donantes sanos o a pacientes con un cuadro patológico cuya etiología, en principio, no podía atribuirse a una "larva migrans", dió reacción dudosa, siendo los 57 restantes negativos.

El lote que presentó mayor positividad fue el correspondiente a enfermos hidatídicos, un tercio de los cuales dieron reacción positiva frente al antígeno de Toxocara, otro tercio la dió dudosa y tan sólo el tercio restante negativa. Esta alta positividad no fue compartida por las demás helmintiasis estudiadas ya que tan sólo 3 de los 15 sueros de este lote dieron reacción dudosa y ninguno positiva.

De los 26 pacientes afectos de eosinofilia de etiología desconocida ensayados, 3 dieron reacción claramente positiva al antígeno ensayado y otros 6 dudosa, según el baremo establecido.

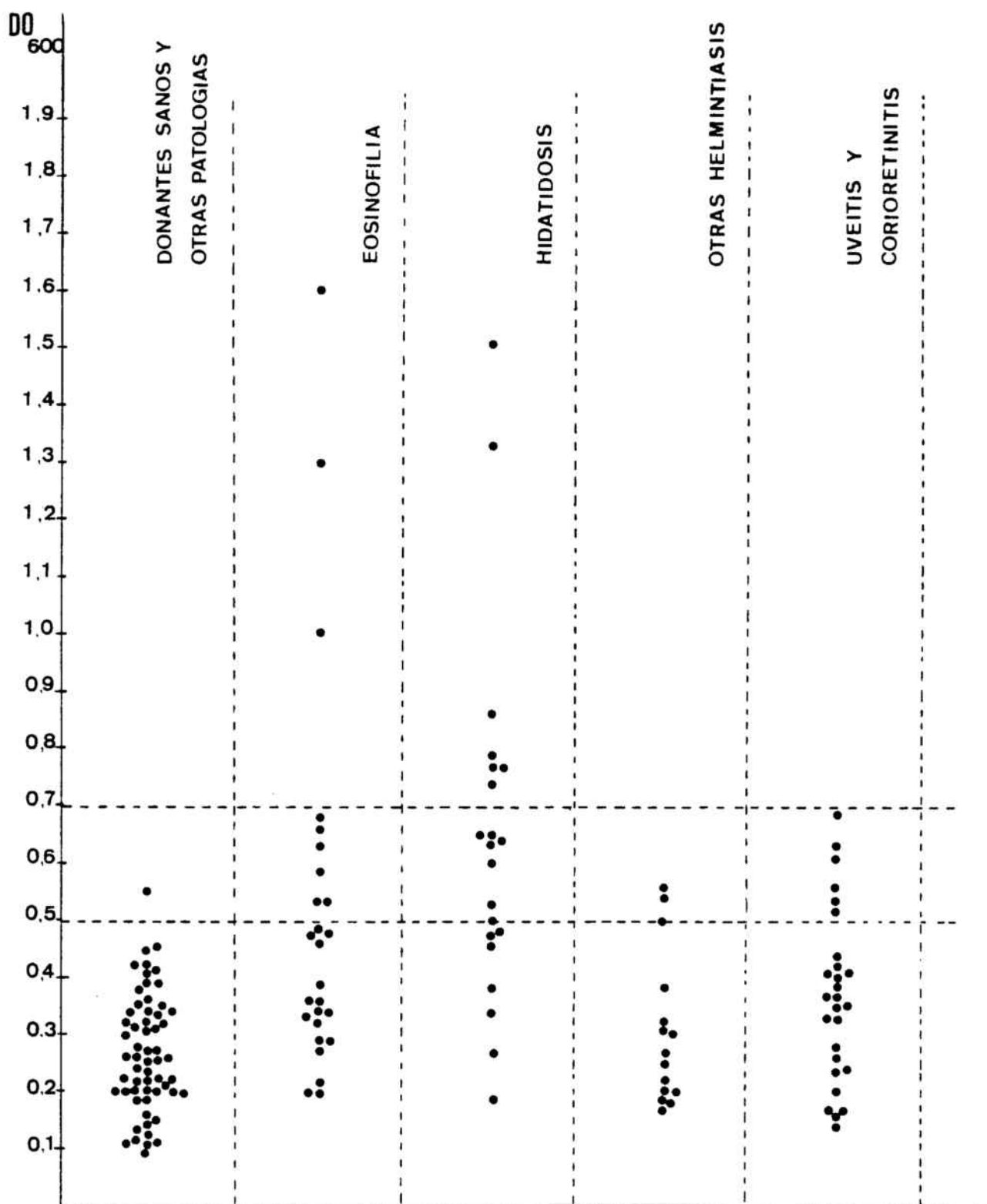
En el grupo de pacientes con trastornos oculares analizado, 6 dieron reacción dudosa, lo que representa casi una cuarta parte de los mismos. Cuadro nº 31 y representación gráfica nº 6.

	<u>Nº sueros ensayados</u>	<u>D.O. > 0.7</u>	<u>0.5 < D.O. < 0.7</u>	<u>D.O. < 0.5</u>
Hidatidosis	21	7	7	7
Otras helmintiasis	15	0	3*	12
Eosinofilia	26	3	6	17
Corioretinitis y/o uveitis	27	0	6	21
Otras patologías y donantes sanos	58	0	1	57

* Trichuris trichiura 2

Trichinella spiralis 1

Cuadro nº 31



GRAFICA N° 6

III. D I S C U S I O N

De los resultados obtenidos en el ensayo de los sueros de ratones infestados experimentalmente frente al de los controles se desprende la validez del modelo utilizado. En consecuencia, consideramos que la técnica ensayada, y por lo tanto el antígeno preparado, son válidos para este modelo.

Al comparar las DO_{600} obtenidas con los sueros procedentes de los ratones de los distintos lotes, vemos que la respuesta inmune no ha sido sensiblemente distinta, y por lo tanto la consideramos independiente del inóculo recibido. Suponemos que las dosis larvarias inoculadas fueron demasiado próximas entre sí como para que se produjera una tasa de anticuerpos suficientemente distinta para poder ser valorada serológicamente.

Por lo que se refiere a los sueros humanos cabe destacar la importante "coloración de fondo" obtenida durante todo el ensayo, lo cual conlleva dificultades en la lectura fundamentalmente si la misma debe de realizarse sin la ayuda de un espectrofotómetro, y la obtención siempre de DO_{600} elevadas. La inclusión de un blanco para cada uno de los sueros (omitiendo en el la adición de conjugado), y un control de conjugado (en el que se omite la adición de suero), facilita la interpretación de los resultados. El valor hallado al restar de la DO_{600} obtenida con cada uno de los sueros la de su "blanco" y "control de conjugado", indicará la que es consecuencia de una unión específica antígeno-anticuerpo. De todas maneras, pensamos que una disminución en la concentración del conjugado enzimático utilizado puede disminuir sensiblemente esta "coloración de fondo", lo cual podrá realizarse en subsiguientes ensayos, al tener ya sueros humanos positivos, por lo que podrán probarse mayores diluciones de conjugado y ver si alteran o no la sensibilidad del sistema.

Uno de los principales problemas planteados ha sido el establecimiento del límite de positividad. Este problema ha sido abordado de distinta forma por los diversos autores:

- Unos valoran la positividad de la reacción inmunoenzimática mediante un título que queda establecido como la máxima dilución sérica que da una reacción positiva, considerando como tal a aquella que da una coloración superior al control negativo (WORLEY et al., 1984, CDC-comunicación personal). Este método presenta a nuestro entender el inconveniente de tener que realizar muchas diluciones con el correspondiente gasto de material, tiempo y antígeno. Por otra parte el punto final de la reacción depende del resultado obtenido en el control negativo, el cual puede variar de un suero a otro.

- La mayoría de los autores, fundamentalmente cuando realizan ensayos con fines epidemiológicos prefieren operar con una única dilución sérica, y establecer la positividad de acuerdo con la coloración obtenida. GUILLEN LLERA et al., (1985), mediante este sistema, consideran positivos aquellos sueros que dan DO superiores a tres veces la del control negativo, van KNAPEN et al., (1983) calculan la media y desviación estándar de lo que consideran la población normal y establecen el límite de positividad en la media más tres veces la desviación estándar obtenida. De SAVIGNY et al., (1979) y MAIZELS et al. (1984) dan como límite de significancia una densidad óptica 0,500 que es aquella que, según sus condiciones de trabajo, supera en tres veces la media de la población normal.

En nuestro caso hemos valorado las ventajas e inconvenientes de ambos sistemas. El realizar diluciones múltiples permite una valoración cuantitativa al suero, sea cual sea la concentración de anticuerpos presentes, pero supone un gasto notable de material. El operar con una única dilución presenta problemas notables: si dicha dilución es alta pueden darse como negativos sueros que

presenten una tasa baja de anticuerpos específicos, si es baja dificulta la valoración cuantitativa de sueros ricos en anticuerpos por dar una coloración demasiado intensa. Es por ello que escogimos la utilización de un sistema que compatibilizase la valoración cuantitativa y el ahorro de antígeno. El sistema de las tres diluciones (1/400, 1/800 y 1/1600), refiriendo los resultados a una de ellas, permite la evaluación de los sueros, aún cuando presenten un título de anticuerpos alto. Esta valoración cuantitativa, si bien no presenta demasiado interés cuando se trabaja con fines epidemiológicos, si que lo tiene cuando se realiza el seguimiento y control terapéutico de pacientes afectos de toxocariasis. En estos casos la evolución de la tasa de anticuerpos da mucha información al clínico sobre la evolución de la enfermedad. En aquellos casos de pacientes, cuyo suero al ser utilizado a las diluciones mencionadas no ha mostrado variaciones colorimétricas sustanciales de una dilución a otra, rayando todas ellas el límite de lectura del espectrofotómetro o con una densidad óptica superior a 1,5, deberá repetirse el examen a mayores diluciones séricas, hasta obtener una que esté situada en la zona de relación lineal, del sigmoide que relaciona la tasa de anticuerpos y la DO obtenida y de una DO comprendida entre 0,5 y 1,5.

Elegido el criterio de lectura, el segundo problema fundamental a abordar ha sido establecer el límite de positividad. Al carecer de sueros los cuales pudiéramos considerar positivos "a priori" ha dificultado esta tarea. Es por ello que en este ensayo preliminar, hemos preferido seguir unos criterios bastante estrictos que permitieran discernir claramente cuales eran los sueros positivos, junto con unos márgenes de duda suficientemente amplios para no dar como negativos sueros que podrían no serlo. A tenor de ello consideramos a la media de la población normal más dos veces su DE como punto de partida para posibles seropositividades. A la vista de los resultados obtenidos pensamos que muchos de los sueros que quedan incluidos en el

grupo de dudosos deberían considerarse como positivos, de todas maneras la dificultad de establecer un diagnóstico clínico correcto en los pacientes de los cuales procedían dichos sueros, no nos permite aseverar tal circunstancia, máxime cuando posiblemente la racción inmunoenzimática obtenida fuera consecuencia de anticuerpos residuales procedentes quizá de toxocariasis ya pasadas. Compartimos así la opinión de SAVIGNY et al. (1979) quienes encuentran un incremento en la prevalencia de bajos títulos de anticuerpos específicos en la población adulta en relación con la que encuentran en la población pediátrica, lo cual consideran el resultado de una exposición al parásito durante la edad infantil.

Al observar los resultados obtenidos en los distintos lotes de sueros humano destaca la especificidad de la técnica, ya que tan sólo un suero del grupo de donantes sanos y enfermos con patología no compatible con un cuadro de toxocariasis dió reacción dudosa, sin que pueda descartarse toxocariasis asintomática. Estos datos coinciden con los obtenidos por SAVIGNY et al (1979) quienes encuentran seropositividad en el 2,6% de donantes sanos.

Un tratamiento especial merecen los lotes de sueros estudiados procedentes de enfermos con hidatidosis y con otras helmintiasis.

A primerva vista parece evidente una gran discordancia entre ambos, puesto que si bien, en el primer grupo parece existir una fuerte reacción cruzada entre los antígenos de Echinococo y Toxocara, esta no se manifiesta al menos en el mismo grado, con las otras helmintiasis estudiadas. Más sorprendente es todavía al pensar que la presencia de comunidades antigénicas entre distintos helmintos es habitual entre especies pertenecientes a los mismos grupos zoológicos, por lo que mucho nos extraña que puedan presentarla Toxocara y un céstodo y casi no la presente Toxocara y otros nemátodos.

De los tres pacientes con Nematodiasis que dieron reacción dudosa con la técnica ensayada, uno estaba aquejado de triquinosis y los otros dos de tricocefalosis. Es difícil de imaginar como Trichuris trichiura puede producir anticuerpos que reaccionen específicamente con el antígeno larvario de Toxocara, cuando el mismo no presenta formas larvarias tisulares y tiene un hábitat exclusivamente intestinal.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por SAVIGNY et al. (1979), quienes de entre 62 nematodiasis estudiadas tan sólo encuentran seropositividad en un parasitismo por trichuris, una uncinariasis y una filariasis. MAIZELS et al. (1984) utilizando una técnica de inmunoprecipitación con antígeno marcado con yodo radioactivo tan sólo encontraron unas pocas reacciones cruzadas con enfermos de ascaridiasis, estrongyloidiasis y filariasis. Dichos autores se preguntan sin embargo si la positividad obtenida en los enfermos con dichas parasitosis son realmente reacciones cruzadas, ya que no logran reproducirlas experimentalmente. Nosotros compartimos la opinión de estos últimos y pensamos que ésta aparente falta de especificidad muy bien puede ser debida a la concomitancia de ambos parásitos en un mismo individuo quedando el cuadro patológico ocasionado por Toxocara oculto por el producido por otro helminto. Esta concomitancia es lógica si pensamos en la epidemiología de las parasitosis en cuestión: tanto la hidatidosis como la toxocariasis, se adquieren mediante la ingestión de huevos del verme presentes en las heces del perro. Las circunstancias que favorecen el contagio por uno u otro helminto serán por lo tanto las mismas: contacto con perros infestados y/o con el suelo u otros materiales contaminados. Una hepatomegalia, hipergammaglobulinemia, eosinofilia, dolores abdominales de un paciente con un cuadro de larva migrans visceral pueden muy bien ser justificados cuando el mismo paciente presenta un quiste hidatídico. En el caso de la tricocefalosis, su concomitancia con la toxocariasis podrá ser justificada también por el contacto con el suelo polucionado, fundamentalmente en ambientes rurales y en individuos con

historias de pica y geofagia. No debe olvidarse que ambas parasitosis se encuentran mucho más extendidas en ambientes rurales y en comunidades con bajas condiciones higiénico-sanitarias (WORLEY et al., 1984).

El lote de sueros de pacientes aquejados de eosinofilia de etiología desconocida, ha sido, junto al de los enfermos hidatídicos, el que ha presentado una mayor tasa de positividad. Como se ha señalado ya en la introducción de esta tesina, la eosinofilia es una de las alteraciones patológicas que se produce más frecuentemente frente a un cuadro de larva migrans. SUGANE et OSHIMA (1984) logran la inducción experimental de eosinofilia en ratones mediante la administración intraperitoneal de antígeno secretor-excretor de larvas II de Toxocara canis. Sin embargo no se tiene evidencia de durante cuanto tiempo permanece dicha eosinofilia y si su presencia se halla siempre acompañada de una alta tasa de anticuerpos específicos. No se conoce tampoco durante cuanto tiempo las larvas de Toxocara persisten y continúan migrando en el organismo humano en infestaciones naturales (SAVIGNY et al., 1979). Sin embargo, DE SAVIGNY y TIZARD (1977) señalan que la respuesta en la producción de anticuerpos durante las infecciones activas tiende a ser alta aun cuando las mismas sean muy ligeras.

De los 26 sueros ensayados pertenecientes a este lote, tres dieron una reacción claramente positiva al antígeno de Toxocara, presentando los pacientes de los cuales procedían un cuadro patológico totalmente compatible con el de una larva migrans visceral. En otros seis casos obtuvimos una reacción serológica dudosa, si bien no sabemos si se trata de títulos de anticuerpos residuales procedentes de una infección ya pasada, si se trata de infestaciones muy ligeras o si se trata de una respuesta baja del individuo en la producción de anticuerpos. De todas maneras estos datos concuerdan con los de otros autores. Van KNAPEN et al. (1983) al estudiar los sueros de 112 escolares sanos encontraron que la media de la eosinofilia de aquellos que dieron reacción

positiva al antígeno de Toxocara era de un 7%, frente al 4,3% que presentaron los seronegativos.

Según GLICKMAN y SCHANTZ (1981) la toxocariasis ocular se caracteriza por una baja dosis de larva infestante, acompañada de una baja producción de anticuerpos, de aquí las dificultades diagnósticas habidas cuando no se emplean técnicas serológicas suficientemente sensibles. De SAVIGNY et al. (1979), en seis pacientes aquejados de toxocariasis oftálmica encuentra mediante la técnica ELISA valores de DO que oscilan entre 0,7 y 2,25, frente a los valores de 1,55 a 4,72 que encuentran en las toxocariasis viscerales. Van KNAPEN et al. (1983) al estudiar el suero de 7 individuos afectados de Toxocariasis ocular encuentran títulos de anticuerpos que oscilan entre 1/20 y 1/160 frente a los de 1/80 a 1/2560 que presentaron los sueros de 8 individuos con afectación visceral. No es por lo tanto de extrañar el que 6 de los 27 sueros por nosotros ensayados procedentes de enfermos oftálmicos quedaron incluidos dentro del grupo de reacción dudosa, lo cual, apoya nuestra suposición de que el margen de duda establecido es demasiado amplio y que incluye muchos más sueros que son en realidad seropositivos que no de seronegativos.

Todo ellos apoya nuestra idea de que la técnica ensayada es válida y de que la misma permite el diagnóstico serológico específico de la toxocariasis con unos márgenes de fiabilidad estrictos. Los resultados obtenidos en este estudio inicial nos indican sin embargo algunos puntos que deberán perfeccionarse, lo cual podrá hacerse en el momento en que tengamos un lote de sueros positivos y dudosos suficientemente amplio, para establecer unos límites de positividad más rigurosos, reduciendo por lo tanto, el amplio margen de reacciones dudosas que se han obtenido en este estudio preliminar.

Se trataba por lo tanto de poner en marcha una técnica que permitiera el diagnóstico de laboratorio de una parasitosis que hoy por hoy está prácticamente desconocida dado que la misma no podía

ser diagnosticada ni a través de sus signos patognomónicos ni a través de las pruebas de laboratorio. A través de este ensayo no sólo hemos podido comprobar la validez de la técnica ELISA para su diagnóstico serológico y la especificidad del antígeno preparado sino también la suposición que teníamos de que la Toxocariasis era un enfermedad frecuente en nuestro entorno. A pesar de que el número de sueros ensayado es bajo y de que la elección de los mismos fue totalmente sesgada, lo cual impide tomar conclusiones epidemiológicas válidas, consideramos que el hecho de haber encontrado 10 sueros claramente positivos y 23 dudosos de entre los 147 ensayados, deja lejos de toda discusión la importancia de ésta parasitosis en nuestro entorno.

IV. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se prepara un antígeno somático procedente de larvas II de Toxocara canis para proceder a su fijación en la fase sólida y ser utilizado mediante la técnica ELISA en el diagnóstico de laboratorio de la Toxocariasis humana.

Se ensaya dicho antígeno en inmunosueros procedentes de ratones experimentalmente infestados. Para ello se inoculan distintas dosis de larvas II de T. canis subcutáneamente a ratones Balb/c y se procede a su sangrado a los 2 meses.

Se aplica la técnica ELISA utilizando como enzima la peroxidasa y como substrato cromogénico el DMAB y MBTH, según técnica al NGO et al. (1980).

La reacción inmunoenzimática producida en los lotes de ratones experimentalmente infestados es claramente positiva en comparación con la del lote control.

Se ensaya la técnica en sueros humanos, a 3 diluciones distintas (1/400, 1/800 y 1/1600) y se establecen los límites de positividad para los mismos. Se realiza una evaluación global de los resultados obtenidos en los sueros humanos procedentes de individuos sanos o con cuadros patológicos no compatibles con los de una toxocariasis, pacientes con hidatidosis, con eosinofilia de etiología desconocida, con helmintiasis diversas y con trastornos oftálmicos. De los resultados obtenidos en este estudio obtenemos las siguientes conclusiones:

1. El modelo experimental ensayado es válido al discernir claramente entre los animales que recibieron y no recibieron inóculo.

2. El antígeno larvario obtenido es específico para la toxocariasis ya que prácticamente no ha dado reacciones cruzadas con otras nematodiasis. Tan sólo en tres casos se observó una débil reacción cruzada sin que pueda descartarse la posibilidad de una infestación mixta. Tampoco en el grupo de sueros de individuos sanos se han observado mayores positivities que las citadas en la bibliografía.

3. La técnica ELISA es una técnica sensible para el diagnóstico de la toxocariasis ya que permite detectar cantidades bajas de anticuerpos, hecho importante cuando se trata de toxocariasis ocular, cuya respuesta inmunológica es baja.

4. Los criterios de positividad establecidos: sueros positivos aquellos que al utilizar una dilución sérica de 1/800 y del conjugado enzimático al 1/1000 dieran una $DO > 0,7$; sueros dudosos aquellos que en las mismas condiciones de trabajo dieron una $0,5 < DO < 0,7$ y negativos aquellos que lo dieran inferior a $0,5$. $DO < 0,5$, pensamos que si bien presentan una especificidad notable incluyen muchos sueros que deberían considerarse como positivos en el capítulo de los dudosos. A partir de los resultados obtenidos en este ensayo preliminar deberá perfeccionarse la técnica para poder discernir con mayor claridad la positividad o negatividad de aquellos sueros que den densidades ópticas medias, aún cuando el margen de duda es constante en cualquier determinación de tipo serológico que quiera realizarse.

5. Del estudio serológico de los 147 sueros ensayados se desprende la alta incidencia de la toxocariasis en nuestro entorno. Esta helmintiasis, sin embargo queda oculta muchas veces por el cuadro patológico producido por otra u otras helmintiasis que puedan presentarse junto a ella.

6. La presencia de posibles comunidades antigénicas entre los extractos de Toxocara y de otros helmintos, fundamentalmente de Echinococcus granulosus deberán ser determinados con ayuda de las nuevas técnicas inmunológicas.

V. BIBLIOGRAFIA

ALJEBOORI, T.J., IVEY, M.H. 1970. An improved hemagglutination technique for detecting antibody against Toxocara canis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 19: 244-248.

ANGULO MADERO, R., GUILA DE LA PUENTE, C., GUILLEN LLERA, J.L. 1985. Contaminación de suelos de parques públicos por Toxocara canis. Comunicación IV Congreso Nacional de Parasitología, 226.

ARMONE, LARANTI, BATELLI (1979). Citado por CALLEGO, J. 1982. Discurso inaugural. Real Academia de Farmacia de Barcelona, 26.

ARNAUD, J.P. 1976. Toxocariosis. *Pediatría práctica*. 14: 33-36.

BEAVER, P.C. 1952. Observations on the epidemiology of ascariasis in a region of high hokworm endemicity. *J. Parasitol.* 38: 445-53. (Tomado de GLICKMAN y SCHANTZ, 1981).

BEAVER, P.C. 1956. Larva migrans. *Exp. Parasitol.* 5: 587-621. (Tomado de GLICKMAN y SCHANTZ, 1981).

BEAVER, P.C. 1975. Biology of soil-transmitted helminths: the massive infection. *Health Lab. Sci.* 12: 116-25. (Tomado de GLICKAMN y SCHANTZ, 1981).

BEAVER; P.C. 1966. Zoonose xith particular reference to parasites of veterinary importance. Soulsby E.J.L., ed. *Biology of parasits*. New York. Academia Press: 215-27. (Tomado de GLICKMAN y SCHANTZ, 1981).

BISSERU, B., WOODRUFF, A.W. 1968. The detection of circulating antibody in human Toxocara infections using the indirect fluorescent antibody test. *J. Clin. Pathol.* 21: 449-455.

BORG, D.A., WOODRUFF, W. 1973. Prevalence of infective ova of Toxocara species in public places. *Brit. Med. J.* 4(5890): 470-472.

COLLINS, R.F., IVEY, M.H. 1975. Specificity and sensitivity of skin test reactions to extracts of Toxocara canis and Ascaris suum I. Skin tests done on infected guinea pigs. Am. J. Trop. Med. Hyg. 24 (3): 455-459.

COLLINS, R.F., IVEY, M.H. 1975. Specificity and sensitivity of skin test reactions to extracts of Toxocara canis and Ascaris suum. II. Homologous 48 hour passive cutaneous anaphylaxis tests with sera from infected guinea pigs. Am. J. Trop. Med. and Hyg. 24(3): 460-464.

CYPESS, R.H., KARON, M.H., ZIDIAN, J.L., GLICKMAN, L.T. y GITLIN, D. 1977. "Larva specific antibodies in patients with visceral larva migrans". J. Infect. Dis., 135: 633-640.

CHAUDHURI, R.N., SAHA, T.K. 1959. Tropical eosinophilia experiments with Toxocara canis. Lancet. 2: 493-4. (Tomado de GLICKAMN y SCHANTZ, 1981).

CHENG, T.C. 1973. Gen. Parasit., 18: 646-647.

EHRHARD, T., KERNBAUM, S. 1979. Toxocara canis et Toxocariose humaine. Bull. de l'Ins. Past. 77: 225-7. (Tomado de GLICKMAN y SCHANTZ, 1981).

FAIRBAIRN, D. 1961. The in vitro hatching of Ascaris lumbricoides eggs. Can. J. Zool. 39: 153-162.

FITZGERALD, P.R., ASHLEY, R.F. 1977. Differential survival of Ascaris ova in wastewater sludge. J. Water Pollut Control Fed. 17: 222-4. (Tomado de GLICKAMN y SCHANTZ, 1981).

FRIEDMAN, S., HERVADA, A.R., 1960. Severe myocarditis with recovery in a child with visceral larva migrans. J. Pediatr. 56: 91. (Tomado de GLICKAMN y SCHANTZ, 1981).

GALLEGO, J. 1982. Discurso inaugural. Real Academia de Farmacia de Barcelona. Introducción. 13-18; 24-30.

GLICKAMN, L.T., SCHANTZ, P.M., DOMBROSKE, R.L., CYPESS, R.M. 1978. "Evaluation of serodiagnostic tests for visceral larva migrans". Am. J. Trop. Med. Hyg., 27: 492-498.

GLICKAMN, L.T., CYPESS, R.H., CRUMRINE, P.K. et al. 1979. Toxocara infection and epilepsy in children. J. Pediatr. 1: 75-8. (Tomado de GLICKAMN y SCHANTZ, 1981).

GLICKMAN, L., CYPESS, R., HILES; D., GESSNER, T. 1979. Toxocara-specific antibody in the serum and aqueous humor of a patient with presumed ocular and visceral toxocariasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 28 (1): 29-35. (Tomado de GLICKMAN y SCHANTZ, 1981).

GLICKAMN, L.T., DUBEY, J.P., WINSLOW, L.J. 1981. Serological response of ascarid-free dogs to Toxocara canis infection. Parasit. 82 (3): 383-387. (Tomado de GLICKMAN y SCHANTZ, 1981).

GLICKAMN, L.T., SCHANTZ, P.M. 1981. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic Toxocariasis. Epid. Rev., 3: 230-250.

GUILLEN LLERA, J.L., CUELLAR DEL HOYO, C., AGUILA DE LA PUENTE, C. 1985. Diagnóstico positivo de Toxocariasis humana con antígeno excretor-secretor larvario. Comunicación IV. Congreso Nacional de Parasitología, 248.

HOGART, SCOTT, R. S. 1966. Visceral larva migrans an immunofluorescent examination of rabbit and human sera for antibodies to the E.S. antigens of the second stage larvae of Toxocara canis, Toxocara cati and Toxascaris leonina. Immun. 10: 217-223.

IVEY, M.H., 1965. Immediate hypersensitivity and serological responses in guinea pigs infected with Toxocara canis or Trichinella spiralis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 14: 1044-1051. (Tomado de ALJEBOORI y IVETY, 1970). (COLLINS e IVEY).

IVEY, M.H. 1967. Quantitative aspects of Toxocara antigen-antibody reactions with a modified passive cutaneous anaphylactic procedure. Am. J. Trop. Med. Hyg. 16: 315-320. (Tomado de ALJEBOORI y IVEY, 1970). (COLLINS e IVEY, 1975).

JAMA, Toxocariasis, July, 4, 1980. Medical News, 17.

KAGAN, I.G., NORMAN, L., ALLAIN, D.S. 1959. Studies on the serology of visceral larva migrans I. Hemagglutination and flocculation test with purified Ascaris antigens. J. Immunol. 83: 297-301.

KAPUR, S., SAWHNEY, B.B., PAL, S.R. et al. 1976. Visceral larva migrans encephalopathy. Neur. India. 24: 104-7. (Tomado de GLIKMAN y SCHANTZ, 1981).

KRUPP, J.M. 1974. Hemagglutination tests for the detection of antibodies specific for Ascaris and Toxocara antigens in patients with suspected visceral larva migrans. Am. J. Trop. Med. Hyg., 23 (3): 378-384.

MAIZELS; R.M, DE SAVIGNY, D.H., OGILVIE; B.M. 1981. Surface and Secreted Antigens from Infective Larvae of Toxocara canis. Proceedings of the British Society for Parasitology Noordwijkerbont, The Netherlands 12-16-IV, 81. Parasit. 84 (J-LXXV).

MAIZELS; R.M. DE SAVIGNY, D.H., OGILVIE, B.M., 1984. Characterization of surface and excretory- secretory antigens of Toxocara canis infective larvae. Parasit. Immun. 6: 23-27.

MAKELA, O., PETERFI, F. 1983. Standard sera in solid phase immunoassays. Europ. J. of Imm. 13: 815-819.

MIKHAEL, N.L., MONPETIT, V.J.A., ORIZAGA, M. et al. 1974. Toxocara canis infestation with encephalitis. Can. J. Neurol. Sci. 1: 114-120. (Tomado de GLICKAMN y SCHANTZ, 1981).

NICHOLS, R.L. 1956 a. The etiology of visceral larva migrans. I. Diagnostic morphology of infective second stage Toxocara larvae. J. Parasitol. 24: 349-362.

NICHOLS, R.L. 1956 b. The etiology of visceral larva migrans. II. Comparative larvae morphology of Ascaris lumbricoides, Necator americanus, Strongyloides stercoralis and Ancylostoma caninum. J. Parasitol. 42: 363-399.

NIETO; A., GAYA, A., MORENO, C., VIVES, J. Nuevo método para determinar la adsorción de proteínas a las placas de poliestireno usadas en ELISA. Inmunol. vol.3, nº1, Enero-Marzo 1984.

NGO, T.T. and LENHOFF, H.M. 1980. A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidasa and peroxidasa-complected reactions. Analyt. Biochem. 105: 389-397.

OKOSHI, S. y USUI, M. 1968. Experimental studies on Toxascaris leonina. Jpn. J. Vet. Sci. 30: 29-38. (Tomado de GLICKMAN y SCHANTZ, 1981).

OWEN, W.B. 1930. Factors that influence the development of the ova of an ascarid roundworm. Toxocara canis (Werner, 1782). Stiles 1905, under field conditions. St. Paul: University of Minnesota Agricultural Experimental Station. Techn. Bull. 71: 25. (Tomado de GLICKMAN y SCHANTZ, 1981).

PATTERSON, R., HUNTLEY, C.C., ROBERTS, M., IRONS, J.S. 1975. Visceral larva migrans: Immunoglobulins, precipitating antibodies and detection of IgG and IgM antibodies against Ascaris antigen. Am. J. Trop. Med. Hyg. 24 (3): 465-470.

PESCE, A.J., FORD, D.J., MAKLER, M.I. 1981. Properties of enzyme immunoassays in: Enzyme Immunoassay. (E.B.S. ISHIKAWAE, E., KAWAI, T., KIYOSHI, M. 27-39. Igakushoin, Tokyo).

QUINN, R., SMITH; H.V., BRUCE, R.G., GIRDWOOD, R.W.A. 1980. Studies on the incidence of Toxocara and Toxascaris spp. ova in the environment, 1. A comparison of flotation procedures for recovering Toxocara spp. ova from soil. J. Hyg. Camb. 84: 83-39.

RANDALL, E.L. 1982. Visceral larva migrans. Cli. Micr. New. 4 (6): 39-41.

REIMERS, R.S., LITTLE, M.D., ENGLANDE, A.J. et al. Parasites in southern sludges and disinfection by standard sludge treatment. Municipal Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development, US EPA, Cincinnati, Ohio (Manuscript). (Tomado de GLICKMAN y SCHANTZ, 1981).

SAVEL, J. 1981. Parasitología. Documentación Científica Semar. 30: 132-136.

SAVIGNY, D.H. de. 1975. In vitro maintenance of Toxocara canis larvae and a simple method for the production of Toxocara ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. J. Parasitol. 61: 781-782.

SAVIGNY, D.H., VOLLER, A., WOODRUFF; A.W. 1979. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. J. Clin. Path. 32: 284-288.

SAVIGNY, D.H., TIZARD, J.R. 1977. Toxocaral larval migrans. The use of larval secretory antigens in haemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody tests. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 71: 501-507.

SCHANTZ, P.M., GLICKAMN, L.T. 1978. Toxocaral visceral larva migrans. N. Engl. J. Med. 298 (8): 436-439.

SCHANTZ, P.M., GLICKMAN, J.L., ALLAIN, D., DYKES, A.C., KAGAN, I.G. 1978. Clinical, serologic and epidemiologic studies of ocular Toxocariasis. Proc. IV th. Int. Congr. Parasitol., Short Communication, E: 97-98.

SCHANTZ, P.M., MEYER, D., GLICKMAN, L.T. 1979. Clinical, serologic and epidemiologic characteristics of ocular Toxocariasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 28 (1): 24-28.

SCHOCHET, S.S. 1967. Human Toxocara canis encephalopathy in a case of visceral larva migrans. Neurology. 17: 227-9. (Tomado de GLICKMAN y SCHANTZ, 1981).

SNYDER, C.H. 1961. Visceral larva migrans. Pediatrics 28: 85-91 (Tomado de GLICKMAN y SCHANTZ, 1981).

SPRENT, J.F.A. 1958. Observations on the development of Toxocara canis (Werner, 1782) in the dog. Parasit. 48: 184-209. (Tomado de GLICKMAN y SCHANTZ, 1981).

SUGANE, K., OSHIMA, T. 1984. Induction of peripheral blood eosinophilia in mice by excretory and secretory antigen of Toxocara canis larvae. J. Helmitol. 58: 143-147.

SUGANE, K., OSHIMA, T. 1984. Internelationship of eosinophilia and IgE antibody production to larval ES antigen in Toxocara canis infected mice. Parasit. Immunol. 6: 409-420.

SUGANE, K., OSHIMA, T. 1983. Trapping of large numbers of larvae in the livers of Toxocara canis infected mice. J. Helmitol. 57: 95-99.

SUGANE, K., OSHIMA, T. 1983. Purification and characterization of ES antigen of Toxocara canis larvae. Immunol. 50: 113-120.

Van KNAPEN, van LEUSDEN, J., POLDERMAN, A.M., FRANCHIMON, J.H. 1983. Visceral larva migrans: Examinations by Means of Enzyme-linked Immunosorbent Assay of Human sera for Antibodies Excretor-Secretory Antigens of the second- stage larvae of Toxocara canis. Parasitenk. 69: 113-118.

VARGO. T., SINGER, D.B., GILLETTE, PC. et al 1977. Myocarditis due to visceral larva migrans. J. Pediatr. 90: 322-23. (tomado de GLICKMAN y SCHANTZ, 1981).

WOODRUFF, A.W. 1970. Toxocariasis. Brit. Med. J. 3: 663-669. (Tomado de GLICKMAN y SCHANTZ, 1981).

WOODRUFF, A.W., BISSERU, B., BOWE, J.C. 1966. Infection with animal helminths as a factor in causing poliomyelitis and epilepsy. Br. Med. J. 1: 1576-9. (Tomado de GLICKMAN y SCHANTZ, 1981).

WOODRUFF, A.W., THACKER, C.K., SHAH, A.I. 1964. Infection with animal helminths. Brit. Met. J. 1: 1001-1005. (Tomado de GLICKMAN y SCHANTZ, 1981).

WORLEY; G. A.GREEN, J., FROTHINGAN, T.E., STURNER, R.A., WALLS,K.W., PAKALNIS; V.A., ELLIS, G.S.Jr. 1984 Toxocara canis infection: Clinical and epidemiological associations with seropositivity in kindergarten children. J. Inf. Dis. vol. 149, nº 4. 591-597.

VI. A P E N D I C E

REACTIVOS UTILIZADOS EN LA OBTENCION DE ANTIGENO Y
PUESTA EN MARCHA DE LA TECNICA DE ELISA

PBS

PBS (bio Mèrieux, Ref.: 7551.1, pH = 7.2)

PBS-Tween (PBS-T)

PBS ----- 1 litro

Tween 20% ----- 500 μ l

PBS (bioMèrieux, Ref.: 7551.1, pH = 7.2)

Tween 20% (Pancreac)

PBS-Tween-seroalbúmina (PBS-T-S)

PBS-T ----- 100 ml

Albumina ----- 1 g

Albumina (Merck, art. 12018)

TAMPON CARBONATO-BICARBOMATO 0,1M pH = 9.6

Na_2CO_3 ----- 3,2 g

NaHCO_3 ----- 5,9 g

Agua destilada csp 1 litro

Na_2CO_3 (Merck, art. 6329)

NaHCO_3 (Merck, art. 6398)

TAMPON FOSFATO 0,1M pH = 7

K_2PO_4 ----- 5,3 g

Na_2HPO_4 (anhidro) ----- 8,65 g

Agua destilada csp 1 litro

KH_2PO_4 (Merck, art. 4873)

Na_2HPO_4 , anhidro (Merck, art. 6580)

H_2SO_4 2N (D = 1,148/cc)

H_2SO_4 (96%) D = 1,8358/cc ----- 28 ml

Agua destilada csp. 250 ml

H_2SO_4 (95-97%), AC 2069, Scharlan (F.E.R.O.S.A.)

BUFFER BORATO 0,1M

BO_3H_3	-----	6,7 g
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	-----	13,4 g
Agua destilada	-----	800 ml

Ajustar el pH = 8.6 y llevar a 1 litro con agua destilada.

Acido bórico (BO_3H_3) (Merck, art. 165)

di-sodio tetraborato decahidrato ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) (Merck, art. 6315)

CONJUGADO ANTIINMUNOGLOBULINAS HUMANAS DILUCION 1/1000 PARA UNA PLACA

Conjugado ----- 10 μ l

PBS-T-S ----- 10 ml

Conjugado. Peroxidasa, anti-human IgG, H. and L chain (Goat),
cod.: 61230, lot. E020, Miles-Yedo LTD/Research
Products.

CONJUGADO ANTIINMUNOGLOBULINAS RATON dil 1/400 PARA UNA PLACA

Inmunoconjugante

RAM/IgG (H+L) PO., 19384, Nordie and Immunology

Conjugado ----- 25 μ l

PBS-T-S ----- 10 ml

SOLUCION REDUCTORA PARA ECLOSION DE HUEVOS

CINa 0,25M ----- 1,462 g

Clorhidrato de cisteina ----- 1,57 g

Tween 80 ----- 0,0025 ml

Agua destilada csp 100 ml

L-clorhidrato de cisteina (anhidro) (Sharlan, Ci 302)

Tween 80 (Difco, 3118-15)

SOLUCION SALINA EQUILIBRADA DE HANK

CaCl ₂ ·2H ₂ O	-----	185,5 mg
KCl	-----	400,0 mg
KH ₂ PO ₄	-----	60,0 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-----	200,0 mg
NaCl	-----	8000 mg
NaHCO ₃	-----	350,0 mg
Na ₂ HPO ₄	-----	47,5 mg
D-glucosa	-----	1000 mg
Rojo de fenol	-----	17,0 mg
Agua destilada csp	1000 ml	

A la solución hay que añadir 100 ui/ml de penicilina y 250 mcg/ml de estreptomicina.