

Desarrollo de ELISA indirecto para el diagnóstico serológico de la toxocariasis humana causada por la *Toxocara canis*

Development of indirect ELISA for the serological diagnosis of human toxocariasis caused by *Toxocara canis*

Idalia Sariego Ramos^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-3986-4960>

Rosabel Falcón Márquez¹ <https://orcid.org/0000-0003-1273-6835>

Lázara Rojas Rivera¹ <https://orcid.org/0000-0002-8070-5419>

¹Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: idalia@ipk.sld.cu

RESUMEN

Introducción: La toxocariasis humana es una infección zoonótica causada por la migración de larvas, principalmente de la especie *Toxocara canis*, por el interior del cuerpo. La detección de anticuerpos séricos contra los productos de excreción-secreción que liberan las larvas de *T. canis* es la mejor opción para el diagnóstico de laboratorio de esta parasitosis. Sin embargo, pueden presentarse reacciones cruzadas, especialmente en zonas de poliparasitismo.

Objetivo: Investigar la utilidad de la fracción de bajo peso molecular de los productos de excreción-secreción de larvas de *T. canis* para el diagnóstico de la toxocariasis humana.

Métodos: Los productos de excreción-secreción se colectaron durante el mantenimiento *in vitro* de las larvas. La fracción de bajo peso molecular de los productos se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño molecular y, con ella, se optimizó un ELISA para detectar inmunoglobulinas IgG específicas en muestras de suero. El desempeño del inmunoensayo se evaluó frente a la regla de oro, que consistió en la valoración clínica, epidemiológica y serológica del paciente.

Resultados: El perfil electroforético de la fracción purificada, bajo condiciones reductoras, consistió en dos bandas principales de peso molecular de 38 y 35 kDa, respectivamente. Los valores de los parámetros de desempeño de ELISA indirecto fueron adecuados (sensibilidad 93,4 %, especificidad 96,2 %). No se detectó reactividad cruzada en muestras de pacientes con otras parasitosis.

Conclusiones: Se demostró la utilidad de la fracción de bajo peso molecular de los productos de excreción-secreción larvales para el diagnóstico de la toxocariasis humana.

Palabras clave: toxocara canis; toxocariasis; inmunoensayo; ELISA indirecto.

ABSTRACT

Introduction: Human toxocariasis is a zoonotic infection caused by the migration of larvae, mainly from the species *Toxocara canis*, within the body. The detection of serum antibodies against the excretory-secretory products released by *T. canis* larvae is the best laboratory diagnostic option for this parasitic infection. However, cross-reactions may occur, especially in areas with multiple parasitic infections.

Objective: To research the usefulness of the low molecular weight fraction of excretory-secretory products from *T. canis* larvae for the diagnosis of human toxocariasis.

Methods: Excretory-secretory products were collected during the *in vitro* maintenance of the larvae. The low molecular weight fraction of the products was purified through molecular size exclusion chromatography, and with it, an ELISA

was optimized to detect specific IgG immunoglobulins in serum samples. The performance of the immunoassay was evaluated against the gold standard, which involved clinical, epidemiological, and serological assessment of the patient.

Results: The electrophoretic profile of the purified fraction, under reducing conditions, consisted of two main bands with molecular weights of 38 and 35 kDa, respectively. The values of the performance parameters of the indirect ELISA were adequate (sensitivity 93.4%, specificity 96.2%). No cross-reactivity was detected in samples from patients with other parasitic infections.

Conclusions: The usefulness of the low molecular weight fraction of larval excretory-secretory products for the diagnosis of human toxocariasis was demonstrated.

Keywords: *Toxocara canis*; toxocariasis; immunoassay; indirect ELISA.

Recibido: 27/02/2023

Aceptado: 17/03/2023

Introducción

La toxocariasis humana (TH) es causada por la migración de larvas, principalmente de la especie *Toxocara canis*, por los tejidos internos del cuerpo.⁽¹⁾ Aunque la infección puede transcurrir de forma asintomática, también pueden producirse formas clínicas severas tales como: *larva migrans* visceral y *larva migrans* ocular. Además, se describen otras dos formas clínicas menos severas, la toxocariasis encubierta y toxocariasis común.⁽²⁾

El diagnóstico definitivo de la TH se produce cuando se identifican las larvas del parásito en los tejidos mediante estudios histopatológicos. Esto constituye un hallazgo, pues la obtención de una muestra invasiva no siempre está justificada en

la clínica. Además, dentro del cuerpo humano las larvas ni se diferencian ni se multiplican y pueden estar extensamente distribuidas en órganos y tejidos. En algunos casos es difícil obtener el material adecuado que permita realizar una identificación morfológica y morfométrica de la larva de tercer estadio en muestras de tejido, por lo que se tiene que recurrir a métodos de la biología molecular para la identificación del parásito. En la actualidad el diagnóstico de la TH se basa en la combinación de la interpretación de las manifestaciones clínicas y de datos epidemiológicos relevantes, de conjunto con la positividad en ensayos inmunoenzimáticos (EIE), que detectan inmunoglobulinas séricas específicas contra antígenos del parásito.⁽²⁾

La serología se basa en el uso de los productos de excreción-secreción que libera la larva de *T. canis* durante su mantenimiento *in vitro* (TES, del inglés *Toxocara excretion-secretion products*) en ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas. El uso de los TES tiene desventajas como la ocurrencia de reacciones cruzadas y la imposibilidad de distinguir entre infección reciente y pasada. Para sortear estas desventajas se ha sugerido, por ejemplo, el uso de fracciones nativas purificadas de TES que pudiera evitar la ocurrencia de reactividad cruzada.⁽³⁾ Por lo tanto, en el presente trabajo tuvo como objetivo investigar la utilidad de la fracción de bajo peso molecular de TES (FBPM-TES) en un inmunoensayo de tipo ELISA para el diagnóstico de la TH.

Métodos

Obtención de la fracción de bajo peso molecular de los antígenos de excreción-secreción larvales

Los adultos de *T. canis* se obtuvieron de canes infectados naturalmente. Los huevos se consiguieron mediante la disección de los parásitos hembras y se incubaron en solución de H₂SO₄ (0,2 M) a temperatura ambiente. Una vez que el 90 % de los huevos embrionaron, se extrajeron las larvas según la metodología

descrita por Fillaux y Magnaval con algunas modificaciones.⁽³⁾ Los huevos se incubaron en hipoclorito de sodio (10 %) durante 20 min. Posteriormente, se lavaron dos veces con salina tamponada con fosfatos (PBS, estéril) y una vez con medio de cultivo (RPMI 1640, Sigma Aldrich, Alemania).

La eclosión de los huevos se provocó mediante la homogeneización manual utilizando un homogeneizador Potter. La suspensión resultante se transfirió a un aparato de Baermann. Transcurridas 3 horas, se obtuvieron las larvas que se mantuvieron en cultivo a razón de 1000 larvas/mL en jarra para cultivo anaeróbico a 37 °C. El medio de cultivo se renovó cada semana. El sobrenadante que contenía los TES se complementó con inhibidores de proteínasa (*complete Mini*, Roche *Diagnostics* GmbH, Alemania) y se mantuvo a -20 °C. Los sobrenadantes se mezclaron y se concentraron en un sistema de ultrafiltración Amicón (3 kDa, Millipore, Reino Unido). El concentrado se filtró (0,22 µm, Millipore, Reino Unido) y se desaló mediante cromatografía de exclusión por tamaño (PD10, GE *Healthcare*, Reino Unido). La concentración de proteína se determinó por el método del ácido bicinconínico (Sigma, EUA), según las instrucciones del fabricante.

La FBPM-TES se obtuvo mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex 75 HR10/30 (*Pharmacia Biotech*, Alemania) en Akta FPLC (*Amersham Pharmacia Biotech*, Alemania). Los TES se aplicaron en un volumen de 100 µL. La elución se realizó con tampón de fosfato de sodio 0,05 M; pH 6,8. Las fracciones se estudiaron mediante SDS-PAGE y tinción con plata y las que contenían bandas cuyo tamaño era inferior a 50 kDa se agruparon y concentraron (Vivaspin 5 kDa, Sartorius). Después de determinar la concentración de proteína la FBPM-TES se almacenó en alícuotas a -20 °C, hasta su uso.

Muestras de suero humano

Para el desarrollo del EIE y el estudio de su desempeño se utilizaron tres paneles de muestras de suero:

- Panel 1: constituido por 70 muestras de pacientes con diagnóstico de toxocarosis. Estos pacientes tenían un cuadro clínico compatible con LMV

(hepatoesplenomegalia e infiltrado pulmonar) o con TO, riesgo epidemiológico (convivencia con perros, mala higiene personal, déficit de saneamiento ambiental en las viviendas) y resultado positivo en serología (estuche comercial, detección de IgG anti-*Toxocara canis*, *Bordier Affinity*, Suiza), eosinofilia $> 3000 \times 10^9/\text{mL}$ y se constató que sus síntomas desaparecieron luego del tratamiento antihelmíntico (albendazol 15 mg/kg/día durante tres semanas).

- Panel 2: formado por 305 muestras de donantes voluntarios de sangre sin sintomatología sugestiva de toxocariasis, que resultaron negativos mediante estuches comerciales.
- Panel 3: comprendía muestras de suero de pacientes con ascariosis (siete muestras), trichurosis (17), fasciolosis (7), enterobiosis (4) y ancilostomideos (9) para evaluar las reacciones cruzadas.

En todos los casos se solicitó la firma de un documento de consentimiento informado y el protocolo de investigación se aprobó por el Comité de Ética del IPK (CEI-IPK 29-13).

Optimización del ensayo inmunoenzimático

Para la realización del ELISA se utilizaron placas de microtitulación (PMT) (NUNC-Maxisorp, *Thermo Scientific*, Alemania) que se sensibilizaron con 100 μL de FBPM-*TES*, diluida en tampón de recubrimiento (tampón carbonato; 0,05 M; pH 9,6) a 4°C toda la noche. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 (0,05 %) y se bloquearon los espacios libres en los pozos con 200 μL de leche descremada (2,5 %) diluida en PBS-Tween 20 a 37°C, durante 2h. Seguidamente, se añadieron 100 μL del control positivo/control negativo/blanco diluido en PBS-Tween 20. Luego de la incubación a 37°C durante 1h y tres lavados con PBS-Tween 20, se añadieron 100 μL de conjugado comercial anti- IgG humana-peroxidasa (Sigma, EUA). La placa se incubó nuevamente a 37°C durante 1h. Transcurrido ese período de tiempo, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 y seguidamente se dispensaron en cada pozo, 100 μL de tampón citrato pH 5,0 que contenía orto-fenilendiamina (0,05 %) y peróxido de hidrógeno (0,015 %). La placa se incubó a

temperatura ambiente y en la oscuridad. La reacción se detuvo a los 20 min con 50 μ L de ácido sulfúrico 1 M. Inmediatamente, se realizó la lectura de la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA (Dynatech, EUA).

Para la normalización del ELISA se ensayaron diferentes concentraciones de los principales reactivos biológicos para determinar las condiciones que brindaron una mayor proporción muestra positiva/negativa con respecto a la absorbancia. Por ejemplo, se determinaron: la concentración óptima de recubrimiento con FBPM-TES (0,625-40 μ g/mL), la dilución óptima de la muestra problema (1/100-1/102400) y la dilución óptima del conjugado comercial anti-IgG humana-peroxidasa (1/50000-1/80000). Cada experimento se repitió dos veces y cada medición se realizó por triplicado.

El control positivo consistió en una mezcla de volúmenes iguales de muestras de suero de pacientes con diagnóstico de toxocarosis (panel 1). De igual manera se preparó el control negativo con sueros de donantes voluntarios de sangre (panel 2).

La repetibilidad se evaluó a través del análisis de réplicas de sueros positivos con valores de densidad óptica bajos, medios y altos, así como de controles positivos y negativos. Para conocer la reproducibilidad se analizaron los resultados del procesamiento de las muestras por el mismo analista durante tres días consecutivos. Se utilizó el coeficiente de variación para estimar la imprecisión entre las réplicas y se consideraron como óptimos los valores inferiores a 10 % para la precisión intraensayo y a 20 % para la reproducibilidad.⁽⁴⁾ El valor de corte se determinó mediante análisis de la distribución de la absorbancia de muestras del panel 2, a través de un histograma de frecuencia para un intervalo de confianza del 95 %, mediante el programa estadístico SPSS para Windows versión 11.5.1, SPSS Inc, 1989-2002.

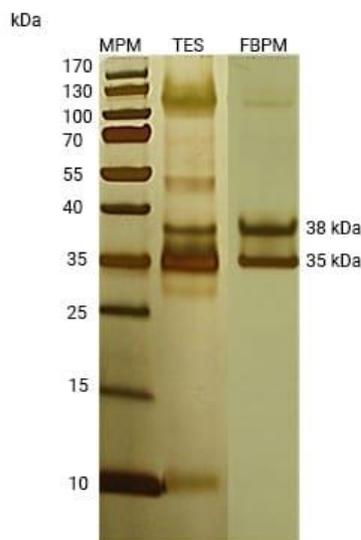
Evaluación del desempeño del ensayo inmunoenzimático

Los indicadores de desempeño (sensibilidad, especificidad, índice de validez, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo [VPP, VPN, respectivamente], índice de concordancia de Kappa) frente a la regla de oro se estimaron con las muestras de

suero de los paneles 1 y 2, mediante el programa estadístico EPIDAT, versión 3.1 (2006, Xunta de Galicia, Organización Panamericana de la Salud). Los valores del índice Kappa se interpretaron según la escala de Landis y Koch.⁽⁵⁾ Las reacciones cruzadas se evaluaron con las muestras del panel 3.

Resultados

La figura 1 muestra el perfil electroforético de los TES y de la fracción de bajo peso molecular purificada. El perfil electroforético de los TES, bajo condiciones reductoras, mostró un patrón de bandas discretas, cuyo peso molecular osciló entre 32 y 130 kDa. Por su parte, en el perfil de la fracción de bajo peso molecular se observaron dos bandas principales de peso molecular de 38 y 35 k

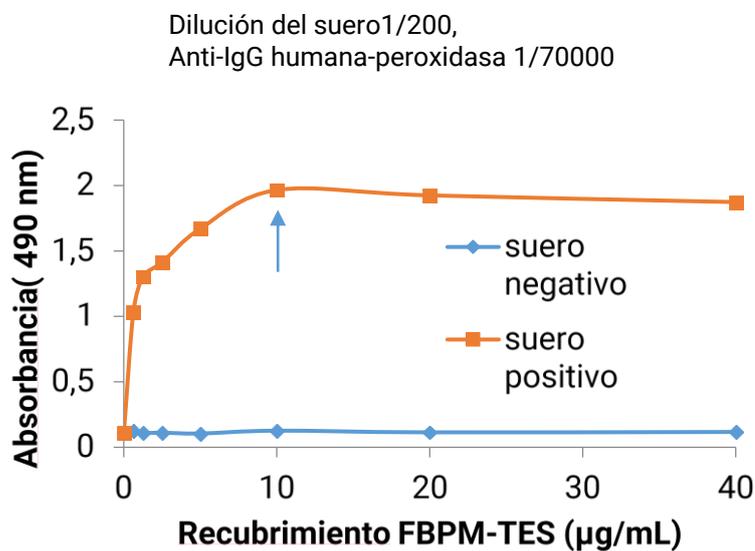


Fuente: Elaboración propia.

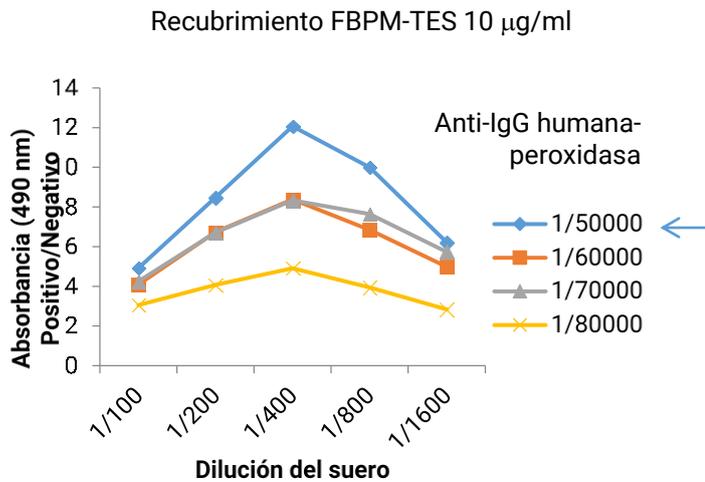
Fig. 1 – Perfil electroforético en SDS-PAGE (10 %) en condiciones reductoras de la fracción de bajo peso molecular, purificada a partir de los antígenos de excreción-secreción larvales de *Toxocara canis* mediante cromatografía de tamizaje molecular. Se aplicaron 4 µg de proteína por carril. Las bandas de las proteínas se visualizaron mediante tinción con plata. Marcador de peso molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, Lituania).

Una vez que se obtuvo la FBPM-TES, se optimizó el ELISA indirecto para detectar inmunoglobulinas IgG específicas en muestras de suero con sospecha de TH (fig. 2). Las condiciones del ELISA optimizado fueron: recubrimiento 10 $\mu\text{g/mL}$ de FBPM-TES, dilución de la muestra de suero (1/400) y dilución del conjugado comercial anti-IgG humana-peroxidasa 1/50000. El coeficiente de variación intraensayo fue de 5 % y el interensayo de 7 %. El valor de corte resultó en uno de absorbancia de 0,225.

A

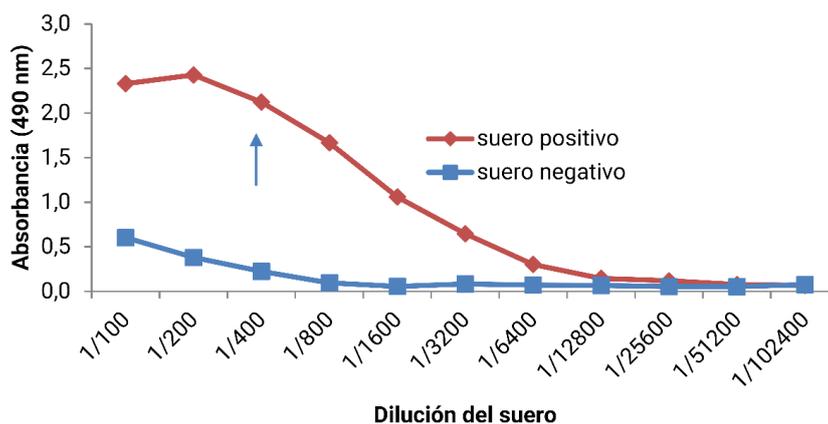


B



C

Recubrimiento FBPM-TES 10 µg/ml, anti-IgG humana-peroxidasa 1/50000



Fuente: Elaboración propia.

Fig. 2 – Normalización del ELISA indirecto para detectar IgG en suero humano contra la fracción de bajo peso molecular de los productos de excreción-secreción larvales de *Toxocara canis*. A: Normalización de la concentración de recubrimiento, B: de la dilución del conjugado y C: de la dilución de la muestra de suero.

La evaluación del ELISA con muestras de suero permitió determinar los valores de los indicadores de desempeño. La tabla 1 muestra los resultados de la evaluación. En el análisis comparativo se obtuvo una sensibilidad de 93,4 % (IC 95 %: 86,4-100),

una especificidad de 96,2 % (IC 95 %: 92,0-100). El valor predictivo positivo fue de 93,4 % (IC 95 %: 86,4-100) y el negativo de 96,2 % (IC 95 %: 92,0-100). El índice Kappa fue de 0,89 (IC 95 %: 0,82-0,96), lo que muestra una fuerza de concordancia buena, en comparación con la regla de oro. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguna de las muestras ensayadas de ascariasis, trichuriasis, enterobiasis o infección por ancilostomídeos.

Tabla 1 - Resultados de la evaluación del ELISA indirecto desarrollado, con muestras de suero

Grupos de pacientes	ELISA indirecto	
	Positivo	Negativo
Pacientes con toxocariasis	57	4
Donantes voluntarios de sangre	4	101
Pacientes con otras infecciones helmínticas	0	44

Fuente: Elaboración propia.

Discusión

La publicación de la metodología para la obtención de TES a partir del cultivo *in vitro* de las larvas del parásito permitió estudiar la composición de esta mezcla antigénica en diferentes regiones del mundo según su perfil electroforético. Los estudios concluyeron que las preparaciones antigénicas eran complejas con alrededor de 10 componentes y que, aunque existían discrepancias en el número de componentes y en sus pesos moleculares, estas diferencias no afectaban el desempeño de los EIE cuando se usaban en el serodiagnóstico.⁽⁶⁾ El perfil electroforético de los TES obtenidos en la presente investigación coincidió con los autores quienes establecieron que los componentes mayoritarios del TES se podían subdividir en dos fracciones de alto y bajo peso molecular.⁽³⁾

El uso de los TES constituyó un avance con respecto al empleo de antígenos somáticos en el desarrollo del EIE para el diagnóstico de la toxocarosis. Hasta el presente se han optimizado los EIE que varían en cuanto al tipo de antígeno

utilizado (TES nativos o recombinantes, glicanos o TES deglicosilados).⁽⁷⁾ De manera general, estos inmunoensayos presentan una elevada sensibilidad y especificidad. Sin embargo, los EIE no están exentos de limitaciones; por ejemplo, se notifica la ocurrencia de reacciones cruzadas con otros helmintos o se tiene que recurrir a combinaciones de antigénicas para lograr mayor sensibilidad.⁽⁷⁾

En el presente trabajo el uso de la FBPM-TES permitió normalizar los EIE de elevada sensibilidad y especificidad diagnóstica. Los valores para ambos parámetros fueron superiores a los obtenidos cuando se usan los TES sin fraccionar. Por ejemplo, la primera evaluación de un estuche comercial (*Biokema-Affinity Products, Crissier-Lausanne, Suiza*) resultó en una sensibilidad diagnóstica del 91 % y una especificidad del 86 %.⁽⁸⁾ Otros estuches comerciales muestran un rendimiento similar.⁽⁹⁾ Recientemente se desarrolló un EIE basado en Luminex, de alta capacidad de procesamiento de muestras, que aumentó la sensibilidad a 99 % y la especificidad hasta 94 % para LMV; pero se basó en el uso de múltiples antígenos recombinantes.⁽¹⁰⁾

En las condiciones epidemiológicas de América Latina, caracterizada por la frecuencia elevada de parasitismo, especialmente de parasitismo intestinal, la ausencia de reactividad cruzada con sueros de pacientes con helmintiasis puede desempeñar un papel importante en el diagnóstico diferencial de la toxocarosis. Otros autores, al desarrollar EIE indirectos que se basan en TES sin fraccionar, informaron de reacciones cruzadas con otras especies de helmintos de los géneros *Filaria*, *Trichinella*, *Strongyloides* y *Fasciola*.⁽³⁾ En general los investigadores reconocen que es difícil acceder a grupos de pacientes con toxocarosis bien documentada y refieren la dificultad de excluir una infección pasada por *Toxocara* en pacientes cuyos sueros se utilizan para investigar la reactividad cruzada. Es de destacar que no se encontró reactividad cruzada en los sistemas tipo ELISA desarrollados en la presente investigación con las principales helmintiasis que afectan a la población cubana.

Por otro lado, el EIE desarrollado también pudiera aplicarse en estudios epidemiológicos. En la literatura relacionada con la TH abundan los estudios de la prevalencia en grupos de riesgo, escolares, residentes de comunidades con bajo

nivel socioeconómico, condiciones clínicas específicas (asma, epilepsia) o de prevalencia a nivel nacional.^(11,12) De esta manera, se puede concluir que el EIE desarrollado, basado en la fracción de bajo peso molecular de TES, puede recomendarse, tanto para el diagnóstico de la toxocariasis humana como para el estudio de la epidemiología.

Referencias bibliográficas

1. Magnaval JF, Bouhsira E, Fillaux J. Therapy and Prevention for Human Toxocariasis. *Microorganisms* 2022;10:241. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020241>
2. Chen J, Liu Q, Liu GH, Zheng WB, Hong SJ, Sugiyama H, *et al.* Toxocariasis: a silent threat with a progressive public health impact. *Infect Dis Poverty* 2018;7(1):59. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40249-018-0437-0>
3. Fillaux J, Magnaval JF. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Vet Parasitol.* 2013;193(4):327-36. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.028>
4. Fossceco SL, Curtis NA. Exploring Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Data with SAS® analyst application. Disponible en: <http://www.ats.ucla.edu/sta/sas/library/analystelisa.pdf>
5. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1997;33(1):159-74. DOI: <https://doi.org/10.2307/2529310>
6. Speiser F, Gottstein B. A collaborative study on larval excretory/secretory antigens of *Toxocara canis* for the immunodiagnosis of human toxocariasis with ELISA. *Acta Trop.* 1984 [27/10/2022];41(4):361-72. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6084948/>

7. Ma G, Holland CV, Wang T, Hofmann A, Fan CK, Maizels RM, *et al.* Human toxocariasis. *Lancet Infect Dis* 2018;18(1):e14-e24. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30331-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30331-6)
8. Jacquier P, Gottstein B, Stingelin Y, Eckert J. Immunodiagnosis of toxocarosis in humans: evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. *J Clin Microbiol* 1991;29(9):1831-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.29.9.1831-1835.1991>
9. Moreira GM, Telmo Pde L, Mendonca M, Moreira AN, McBride AJ, Scaini CJ, *et al.* Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends Parasitol* 2014;30(9):456-64. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.07.003>
10. Anderson JP, Rascoe LN, Levert K, Chastain HM, Reed MS, Rivera HN, *et al.* Development of a luminex bead-based assay for diagnosis of Toxocariasis using recombinant antigens Tc-CTL-1 and Tc-TES-26. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9(10):e0004168. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004168>
11. Farmer A, Beltran T, Choi YS. Prevalence of Toxocara species infection in the U.S.: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2011-2014. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(7):e0005818. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005818>
12. Rostami A, Riahi SM, Holland CV, Taghipour A, Khalili-Fomeshi M, Fakhri Y, *et al.* seroprevalence estimates for toxocariasis in people worldwide: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 3(12):e0007809. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007809>

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Idalia Sariego, Lázara Rojas.

Curación de datos: Idalia Sariego, Rosabel Falcón.

Análisis formal: Idalia Sariego, Rosabel Falcón.

Adquisición de fondos: Lázara Rojas.

Investigación: Idalia Sariego, Rosabel Falcón.

Metodología: Idalia Sariego, Lázara Rojas, Rosabel Falcón.

Administración del proyecto: Lázara Rojas, Idalia Sariego.

Redacción – borrador original: Idalia Sariego.

Redacción – revisión y edición: Lázara Rojas, Rosabel Falcón.