



**Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri**  
**Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia**  
**Departamento de Parasitología**

**Nuevas herramientas inmunoenzimáticas para el diagnóstico de la  
toxocarosis humana**



**Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la  
Salud**

**Autora: Lic. Idalia Sariego Ramos, MSc.**

**La Habana, 2023**

**Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí**  
**Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia**  
**Departamento de Parasitología**

**Nuevas herramientas inmunoenzimáticas para el diagnóstico de la**  
**toxocarosis humana**

**Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la**  
**Salud**

**Autora: Lic. Idalia Sariego Ramos, MSc.**

**Tutores: Dra. Lázara Rojas Rivero, Dr. C.**

**Prof. Katja Polman, Dr. C.**

**La Habana, 2023**

*En las ciencias no hay calzadas reales y quien aspire a remontar sus luminosas cumbres tiene que estar dispuesto a escalar la montaña por senderos escabrosos."*

Carlos Marx

A mi familia....

## ***Agradecimientos***

*Deseo expresar mi agradecimiento a todos aquellos que colaboraron para la realización de este trabajo de tesis:*

*A mis tutoras: en especial a la Dra. Lázara Rojas por su conducción, sus enseñanzas y su incentivo para seguir adelante y a la Dra. Katja Polman, por su confianza, su compromiso y su aliento*

*A los imprescindibles Kirezi, Francisco, el Prof. Serge Muyltermans y su equipo de trabajo*

*A Ramón, Cantillo, Mario, Dianeya, Rosabel, Fidel, Adiel, el colectivo de Anatomía Patológica, Nidia, Xiomi, Rosa y una lista interminable de colegas que han aportado sus conocimientos, habilidades y su cariño*

*A Hilda Hernández y Lianet Monzote por dedicar parte de su tiempo a la revisión de esta tesis, sus recomendaciones y su infinita amistad*

*Al resto de los miembros del Departamento de Parasitología con los que he compartido el día a día en el trabajo y que siempre han estado al tanto de mi progreso y desarrollo.*

*A los que ya no están tan cerca, pero siguen al tanto, Ingrid, Adonis, Jessica, Yuraimis*

*A los profesores del Departamento de Docencia por su entrega y su paciencia*

*También a los miembros del presente tribunal y del de pre-defensa que han permitido enriquecer esta obra con sus sugerencias*

*A los miembros de mi familia, que siempre han estado ahí, en especial a la memoria de mis padres que me inculcaron el amor por el estudio y las ansias de conocimiento*

*Finalmente quiera agradecer de manera muy especial a Leo, por su impaciencia, su amor y su comprensión, porque sin su apoyo esta tesis no hubiera sido posible*

*A todos, mi más sincero agradecimiento.*

## **SÍNTESIS**

El diagnóstico de la toxocarosis humana es complejo por la ausencia de signos clínicos específicos y porque en el interior del cuerpo humano las larvas que emergen de los huevos ingeridos, no sufren diferenciación ni se multiplican. En el presente trabajo, se normalizaron ensayos inmunoenzimáticos indirectos para detectar anticuerpos IgG e IgG<sub>4</sub>, respectivamente, específicos contra la fracción de bajo peso molecular de los antígenos de excreción-secreción de la larva L3. Estos ensayos mostraron elevados valores de sus parámetros de desempeño, sin reacciones cruzadas, lo que permite su aplicación en el diagnóstico de la toxocarosis humana. Además, se desarrollaron nanocuerpos contra los antígenos de excreción-secreción larvales de *T. canis*, lo que posibilitó normalizar un ELISA tipo sándwich doble anticuerpo que detectó antígenos en el orden de los picogramos, en un sistema simulado. El ELISA resultó útil en la detección de antígenos parasitarios circulantes en un modelo de infección experimental en ratones BALB/c. Por último, el ELISA basado en nanocuerpos no produjo falsos positivos y no mostró reacciones cruzadas con otros helmintos, pero la necesidad de incrementar su sensibilidad diagnóstica indica la necesidad de explorar el uso de los nanocuerpos en otros formatos de ensayos inmunoenzimáticos que permitan mejorar este indicador de desempeño.

## LISTADO DE ABREVIATURAS

### Abreviatura Significado

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico codificante
AmpR	Nombre del gen que confiere resistencia a ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
CIDR	Centro de Investigación Diagnóstico y Referencia
CENPALAB	Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio
EIE	Ensayo inmunoenzimático
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima, del inglés, <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FBPM-TES	Fracción de bajo peso molecular de los TES
HA	Hemaglutinina
His <sub>6</sub>	Poli-histidina
IgG	Inmunoglobulina de tipo G
IgG <sub>4</sub>	Inmunoglobulina de subtipo G <sub>4</sub>
IgM	Inmunoglobulina de tipo M
IPK	Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
LB	Medio de cultivo Luria Bertani,
LMO	Larva migrans ocular
LMV	Larva migrans visceral

MPM	Marcador de peso molecular
Nc(s)	Nanocuerpo(s)
PBS	Solución salina tamponada con fosfatos
PFH	Punto final humanitario
PMT	Placa de microtitulación
PRP	Peroxidasa de rábano picante
RCP	Reacción en cadena de la polimerasa
RPMI-1640	Medio de cultivo Instituto Conmemorativo de Roswell Park, del inglés, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rTES	Antígenos de excreción-secreción de <i>Toxocara</i> recombinante, del inglés, <i>recombinant Toxocaral excretion-secretion antigens</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio, del inglés, <i>sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis</i>
TCE	<i>Toxocara canis</i> excreción-secreción, del inglés, <i>Toxocara canis excretion-secretion</i>
TE	Toxocarosis encubierta
TES	Antígenos de excreción-secreción de <i>Toxocara</i> , del inglés, <i>Toxocaral excretion-secretion antigens</i>
TH	Toxocarosis humana
TN	Toxocarosis neurológica
VHH	Dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo de cadena pesada, del inglés, <i>variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody</i>

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	1
Hipótesis .....	6
Objetivos .....	6
Valor teórico .....	8
Valor práctico .....	8
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
I.1. <i>Toxocara canis</i> .....	11
I.1.1. Taxonomía.....	11
I.1.2. Descripción morfológica de las formas parasitarias .....	12
I.1.3. Ciclo de vida .....	14
I.1.4 Antígenos de excreción secreción de larvas de <i>Toxocara</i> .....	16
I.2. Toxocarosis humana .....	17
I.2.1. Primeras notificaciones de infección por <i>T. canis</i> en el humano .....	17
I.2.2. Patogenia .....	18
I.2.3. Manifestaciones clínicas .....	19
I.2.4. Epidemiología .....	21
I.2.5. Diagnóstico de la toxocarosis humana .....	23
I.2.6. Tratamiento .....	29
I.4. Modelo murino de infección experimental.....	31
I.5. Definición de nanocuerpo y ventajas de su plataforma tecnológica de producción para el desarrollo de ensayos inmunoenzimáticos .....	32
II. MATERIALES Y MÉTODOS .....	33
II.1. Diseño de la investigación y universo de estudio.....	33
II.2. Disoluciones y medios de cultivo.....	35
II.3. Plásmidos, fagos, cepas bacterianas y animales de experimentación .....	36
II.3.1. Animales de experimentación.....	38
II.4. Obtención de antígenos parasitarios.....	39
II.4.1. Obtención de antígenos de excreción-secreción larvales y caracterización del patrón electroforético de proteínas de los lotes .....	39
II.4.1.1. Purificación de la fracción de bajo peso molecular de los antígenos de excreción-secreción larvales .....	41
II.4.2. Obtención de antígenos de <i>Ascaris lumbricoides</i> y <i>A. suum</i> .....	42
II.5. Desarrollo de ensayos inmunoenzimáticos basados en la fracción de bajo peso molecular de los antígenos de excreción-secreción larvales, para la determinación de anticuerpos IgG o IgG <sub>4</sub> en muestras de suero .....	43
II.6. Desarrollo de ensayo inmunoenzimático basado en nanocuerpos para detectar antígenos circulantes en suero .....	45
II.6.1. Desarrollo de nanocuerpos específicos contra antígenos de excreción-secreción larvales.....	45
II.6.2. Selección de los nanocuerpos y su modificación para formar parte del ELISA sándwich doble anticuerpo .....	50

II.6.3. Optimización del ELISA sándwich doble anticuerpo mediante un sistema simulado .....	52
II.7. Determinación de la cinética de antígenos de excreción-secreción larvales y de inmunoglobulina IgG específica en suero, durante la infección murina experimental con <i>T. canis</i> . .....	53
II.7.1. Infección de los animales con huevos embrionados o con larvas de <i>T. canis</i> .....	53
II.7.2. Monitoreo de los animales de experimentación .....	54
II.7.3. Conteo de larvas en órganos de los animales infectados .....	55
II.7.4. Detección de antígenos de excreción-secreción larvales circulantes y de anticuerpos IgG específicos en suero .....	56
II.8. Estimación de los indicadores de desempeño de los ensayos inmunoenzimáticos desarrollados frente a la regla de oro. ....	57
II.9. Análisis estadístico .....	57
II.10. Aspectos éticos. ....	58
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	56
III.1. Desarrollo de ensayos inmunoenzimáticos basados en la fracción de bajo peso molecular de los antígenos de excreción-secreción larvales, para la determinación de anticuerpos IgG e IgG <sub>4</sub> específicos en muestras de suero .....	56
III.1.1. Obtención de antígenos de excreción-secreción larvales y purificación de la fracción de bajo peso molecular .....	56
III.1.2. Optimización de ensayos inmunoenzimáticos indirectos para detectar anticuerpos IgG e IgG <sub>4</sub> específicos contra <i>T. canis</i> .....	61
III.2. Desarrollo de un ensayo inmunoenzimático basado en nanocuerpos para la detección de antígenos larvales circulantes de <i>T. canis</i> . ....	63
III.3. Determinación de la cinética de antígenos de excreción-secreción larvales/anticuerpos IgG específicos en suero, durante la infección murina experimental con <i>T. canis</i> . ....	71
III.3.1. Modelo experimental murino de toxocarosis .....	71
III.3.2. Detección de antígenos de excreción secreción larvales de <i>T. canis</i> circulantes en suero y de anticuerpos IgG anti- <i>T. canis</i> .....	76
III.4. Evaluación de los ensayos inmunoenzimáticos desarrollados frente a la regla de oro	80
III.5. Consideraciones generales .....	86
CONCLUSIONES .....	89
RECOMENDACIONES.....	90
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	91
Anexo 1	
Anexo 2	



# *Introducción*

## INTRODUCCIÓN

La toxocarosis es una de las zoonosis parasitarias de mayor transmisión en el mundo y ocurre fundamentalmente en países en desarrollo (1). Los perros y los gatos son los hospederos definitivos de los agentes causales *Toxocara canis* (Werner, 1788) y *Toxocara cati* (Schrank, 1788), respectivamente. Ambas especies de parásitos pertenecen al Phylum Nematelminthes, Familia Toxocaridae.

En los hospederos definitivos, los parásitos alcanzan la adultez y la madurez sexual y los huevos se expulsan con las heces. Posteriormente, los huevos embrionan en el medio y constituyen la fase infectante. La infección en el hombre se produce fundamentalmente por ingestión accidental de los huevos larvados (2).

Una vez dentro del cuerpo humano, la larva que emerge del huevo (L3) migra a través de los tejidos internos, sin desarrollo ni multiplicación posterior. El encuentro con el sistema inmune desencadena una respuesta con predominio de células T auxiliaoras CD4+ de tipo 2, la cual puede provocar la muerte de la larva, o esta puede sobrevivir y mantenerse en un estado de hipobiosis (1). En los tejidos, las larvas pueden permanecer en estado hipobiótico en los tejidos hasta 10 años y reiniciar su migración en cualquier momento, según las investigaciones en modelos animales (3).

La toxocarosis humana (TH) puede transcurrir de forma asintomática, o pueden producirse formas clínicas severas en dependencia de la carga parasitaria, los sitios finales de migración larvaria y la respuesta inflamatoria del hospedero. Las dos formas clínicas principales, debido a la severidad del cuadro clínico, que se producen en el humano son: Larva Migrans Visceral (LMV), debido a la migración de las larvas a través de los órganos principales como el hígado y los pulmones y Larva Migrans Ocular (LMO), por la migración a través de las estructuras de los ojos. Las manifestaciones clínicas que se producen en el curso de LMV son: linfadenopatías, mialgias, artralgias, astenia, manifestaciones respiratorias y cutáneas, hepatitis granulomatosa. Por su parte, LMO se presenta casi siempre de manera unocular y transcurre con uveítis, retinitis y endoftalmitis. Además, puede aparecer impedimento visual, que puede llegar a la ceguera, como resultado de vitritis severa o de desprendimiento traccional de la retina. Se describen otras dos formas clínicas, menos severas: toxocarosis encubierta y toxocarosis común y ocurren en niños y adultos, respectivamente (4).

Tradicionalmente, se considera a *T. canis* como la especie responsable de las formas clínicas en humanos. La información acerca de la asociación de *T. cati* con la infección en humanos es escasa, como consecuencia de la similitud entre las especies (3). Por esta razón, la mayoría de las investigaciones acerca de la TH, incluido el presente trabajo se refieren casi exclusivamente a *T. canis*.

Para la cabal comprensión de la toxocarosis se deben combinar conocimientos clásicos y recientes del área médica y veterinaria, con el objetivo de establecer criterios integradores para

su tratamiento, control y prevención. Esta es la perspectiva del concepto Una Salud, que se define como los esfuerzos colaborativos de múltiples disciplinas (personal médico, veterinario, investigadores, etc) que trabajan a nivel local, nacional (5). Desafortunadamente, no abundan los trabajos con este enfoque integrador y predominan los estudios serológicos en poblaciones humanas, como una medida de la exposición al parásito.

Los estudios epidemiológicos realizados en distintos países, indican una amplia variación de la seropositividad contra *Toxocara*, en individuos aparentemente sanos; entre los resultados destacan dos valores extremos de seropositividad: 1,6% en Japón y 87% en Islas Marshall, en la región de la Micronesia en el Océano Pacífico (1). En Cuba se desconoce la prevalencia de la TH, aunque se ha constatado hasta 39% de seropositividad en escolares (6)

El diagnóstico definitivo de la TH consiste en la detección de las larvas del parásito en los tejidos mediante estudios histopatológicos, cuyo material biológico se obtiene a través de la biopsia, con varios inconvenientes como la distribución heterogénea de las larvas en órganos y tejidos y el hecho de que se requiere de una muestra invasiva. En algunos casos es difícil obtener material adecuado que permita realizar una identificación morfológica y morfométrica de la larva de tercer estadio en muestras de tejido. En la actualidad, la regla de oro para el diagnóstico de la TH se basa en la combinación de las interpretaciones de las manifestaciones clínicas y datos epidemiológicos relevantes, de conjunto con la positividad en ensayos inmunoenzimáticos (EIE), que detectan inmunoglobulinas séricas específicas contra antígenos del parásito (1).

La sensibilidad y especificidad de los EIE serológicos dependen de la combinación de antígenos que se use y del tipo de anticuerpo que se detecte. Entre los antígenos más usados se encuentran los de excreción-secreción larvales (TES, del inglés, *toxocaral excretion-secretion antigens*). Los TES son una mezcla de proteínas altamente glicosiladas, de entre 30 y 400 kDa que el parásito secreta durante su metabolismo, entre las que se encuentran: mucinas, lectinas, superóxido dismutasa, acetilcolinesterasa y metaloproteasa, entre otras (7). Los TES de alto peso molecular presentan mayores reacciones cruzadas con otros helmintos, que los TES que poseen bajo peso molecular (8).

Los TES pueden obtenerse en cultivo o vía tecnología recombinante y utilizarse deglicosilados o en conformación nativa (1). Los antígenos recombinantes son una mejor opción para el desarrollo de EIE, debido a que la obtención de los TES a partir del cultivo del parásito es laboriosa, consume tiempo y tiene bajo rendimiento. No obstante, algunos autores señalan que todavía se requieren estudios con paneles de muestras más representativas que demuestren las ventajas del uso de los antígenos recombinantes (7).

En cuanto a los tipos e isotipos de inmunoglobulinas, pocos informes señalan la utilidad de la IgM específica para el diagnóstico, quizás porque los anticuerpos de tipo IgM perduran en la TH (1, 9). La IgG predomina como el isotipo más usado en el diagnóstico y se notifica que la detección de IgG<sub>4</sub> incrementa la especificidad entre 20 y 40% (7).

El desempeño de los EIE desarrollados hasta el presente, para el diagnóstico de la TH, aún necesita validarse en distintos países y bajo diferentes condiciones epidemiológicas (1). Los

estuches serológicos comerciales disponibles son fundamentalmente de tipo ELISA (del inglés, *enzyme linked immunosorbent assay*) y tienen el inconveniente de no poder distinguir entre una infección activa y una pasada y que pueden ocurrir reacciones cruzadas con otros helmintos (Ejemplo de estuches comerciales: Toxocara ELISA kit, Bordier affinity, Crissier, Switzerland; AccuDiag™ Toxocara IgG ELISA kit, Diagnostic Automation/Cortez Diagnostics, Inc., California, EUA).

Entre las propuestas para mejorar el diagnóstico serológico de la TH, destaca explorar la utilidad de la fracción de bajo peso molecular (<50 kDa) de los TES (FBPM-TES), para disminuir la probabilidad de ocurrencia de reacciones cruzadas, especialmente en áreas donde el poliparasitismo es común. La detección de antígenos circulantes también constituye una opción con este mismo propósito, aunque la necesidad de un anticuerpo de captura de gran especificidad y de disociar los inmunocomplejos, para incrementar la probabilidad de detectar los antígenos, limitan su aplicación (10).

En este sentido, los nanocuerpos (Ncs, anticuerpos de un solo dominio), que se derivan de anticuerpos de cadena pesada que se encuentran en el suero de los camélidos, resultan una alternativa prometedora para el desarrollo de sistemas diagnósticos para TH. Estos se han utilizado exitosamente en el diagnóstico de otras enfermedades como la cisticercosis y tripanosomiasis africana. Los Ncs combinan propiedades tales como: pequeño tamaño, gran estabilidad ante cambios de pH y temperatura y gran especificidad por su diana (11, 12).

Además, los Ncs se pueden manipular genéticamente durante su producción, para formar novedosos constructos multivalentes, lo que permite sortear limitaciones y lograr el desarrollo de EIE de gran sensibilidad y especificidad (13). Estas ventajas favorecen su utilización en la detección de antígenos circulantes, lo que complementaría la obtención de nuevas herramientas para el diagnóstico de la TH.

Teniendo en cuenta la significativa circulación parasitaria en el país y las dificultades que presenta el diagnóstico de la parasitosis en el mundo, la inclusión de la FBPM-TES y de los Ncs en los EIE resulta una propuesta atractiva para el diagnóstico de la TH. Por todo lo antes expuesto, en la presente investigación se plantea la siguiente hipótesis.

### **Hipótesis**

Los EIE tipo indirecto que se basan en el uso de la fracción de bajo peso molecular de los TES para detectar inmunoglobulinas específicas contra *T. canis*, o tipo sándwich doble anticuerpo que se basa en Ncs para detectar antígenos circulantes en suero, contribuyen al desarrollo del diagnóstico y la investigación de la toxocarosis.

### **Objetivos**

#### **Objetivo general**

Desarrollar herramientas inmunoenzimáticas para la detección de la infección por *Toxocara* a partir de muestras de suero

### **Objetivos específicos**

1. Normalizar EIE de tipo ELISA, basados en la utilización de la FBPM-TES para la detección de inmunoglobulinas IgG e IgG<sub>4</sub> específicas contra el parásito
2. Desarrollar un inmunoensayo de tipo ELISA sándwich doble anticuerpo, basado en el uso de Ncs, para detectar los TES circulantes en suero
3. Determinar la cinética de TES/IgG específica en suero, para la evaluación del ELISA sándwich doble anticuerpo basado en Ncs, durante la infección murina experimental con *T. canis*
4. Evaluar los indicadores de desempeño de los EIE desarrollados frente a la regla de oro.

### **Novedad científica**

La presente investigación constituye el primer estudio que utiliza la fracción nativa de bajo peso molecular de los TES en la detección de inmunoglobulinas específicas contra *T. canis*. Además, constituye la primera vez que Ncs bivalentes biotinilados se utilizan como unidades captadoras en un formato de ELISA sándwich doble anticuerpo direccional. Por primera vez en nuestro país, se desarrollan métodos inmunoenzimáticos tipo ELISA para el diagnóstico y la investigación en toxocarosis. Parte de los biológicos necesarios para la implementación de estas técnicas se desarrollaron en el laboratorio, con parásitos autóctonos.

### **Valor teórico**

Los estudios realizados aportan nuevos conocimientos científicos sobre el comportamiento del parásito, lo que contribuye a una mejor comprensión y control de la enfermedad. Los resultados del presente estudio permitieron definir la utilidad de la FBPM-TES nativa para el diagnóstico de la TH. Además, quedó demostrada la aplicabilidad de los Ncs en el desarrollo de EIE, en especial en forma de constructos multivalentes. Se brindan evidencias que demuestran que es posible la detección de antígenos circulantes durante la toxocarosis, a la vez que se contribuye a un mejor conocimiento del modelo murino de infección experimental.

### **Valor práctico**

Se dispone de EIE con parámetros de desempeño adecuados para el diagnóstico de la TH, los cuales permitirán la confirmación de casos clínicos sospechosos y proveerán información actualizada sobre el impacto de la toxocarosis en la salud pública. Además, se adquirió experiencia en el cultivo de las larvas, en el proceso de obtención de TES, así como en la implementación del modelo experimental en ratones

### **Publicaciones donde se han presentado los resultados de la Tesis:**

- Francisco J. Morales-Yanez, Idalia Sariego, Cécile Vincke, Gholamreza Hassanzadeh-Ghassabeh, Katja Polman, Serge Muyldermans. An innovative approach in the detection of *Toxocara canis* excretory/secretory antigens using specific nanobodies. International Journal for Parasitology. 2019;49(8):635-645.

- Sariego I, Rosabel Falcón, Rojas L. Desarrollo de ELISA indirecto para el diagnóstico serológico de la toxocariasis humana causada por *Toxocara canis*. Revista Cubana de Medicina Tropical. 2023;75(1) (en prensa).

**Tesis tutorada que contiene resultados de esta tesis:**

- Tutoría de tesis en opción al título de Máster en Parasitología “Cinética de antígenos circulantes y de anticuerpos específicos en la toxocariasis murina experimental” Autora: Lic. Dianeya Mendoza. IPK. 2018.

**Otros**

**Eventos científicos donde se han expuesto los resultados de la tesis:**

- VII Congreso Internacional de Ciencias Veterinarias. 11-14 de abril de 2011, Palacio de Convenciones. La Habana
- XXIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. 6-9 de octubre de 2014. Palacio de Convenciones de La Habana
- VIII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. 14-16 de octubre de 2014. Palacio de Convenciones de La Habana
- 10th European Congress on Tropical Medicine and International Health, 16-20 October 2017, Antwerp, Belgium
- Congreso 80 aniversario del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, 4 al 8 de diciembre, 2017. Palacio de Convenciones, La Habana, Cuba

- VI Taller de Ciencias de Bioterio. CICUAL. IPK. 13-14 de diciembre de 2018
- II Taller Nacional de Parasitología, La Habana, 2-4 de diciembre de 2019

**Otras publicaciones de la autora relacionadas con el tema**

- Sariego I, L. Rojas, J. Cantillo, R. Falcon and K. Polman. Usefulness of *Toxocara canis* larval low molecular weight excretory-secretory products for diagnosis of human toxocariasis. *Tropical Medicine and International Health* 2017; 22:125.
- Morales F, Trashin S, Sariego I, Roucher C, Paredis L, Chico M, De Wael K, Muyldermans S, Cooper P, Polman K. Electrochemical detection of *Toxocara canis* excretory-secretory antigens in children from rural communities in Esmeraldas province, Ecuador: association between active infection and high eosinophilia. *Parasite Vectors* 2020; 13: 245.



# *Revisión bibliográfica*

## **I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **I.1. *Toxocara canis***

#### **I.1.1. Taxonomía**

Dominio: Eukaryota

Reino: Animalia

Subreino: Bilateria

Rama: Protostomia

Infrareino: Ecdysozoa

Superphylum: Aschelminthes

Phylum: Nematelminthes

Clase: Secernentea

Subclase: Rhabditia

Orden: Ascaridida

Suborden: Ascaridina

Superfamilia: Ascaridoidea

Familia: Toxocaridae

Género: *Toxocara*

Especie: *canis*

### I.1.2. Descripción morfológica de las formas parasitarias

El parásito *T. canis* se presenta en forma de huevos y larvas, ambas de tamaño microscópico o en forma de adulto que llega a alcanzar varios centímetros de longitud (Figura 1). A continuación, se detalla la morfología de cada una de estas formas.



Figura 1. Formas del parásito *Toxocara canis*. A: huevos, B: larvas, C: adultos. Fuente: Laboratorio de zoonosis, Departamento de Parasitología, Instituto de medicina Tropical "Pedro Kourí".

Los huevos son esféricos, de color marrón oscuro, con una cubierta externa gruesa e irregular, que está conformada por un sistema reticular superficial de crestas y nervaduras; miden aproximadamente 85  $\mu\text{m}$  de diámetro y son subglobulares (Figura 1A). El protoplasma se aprecia con un aspecto granuloso ya que no están embrionados cuando se expulsan al medio ambiente con las heces de los hospederos definitivos (14).

Las larvas de tercer estadio de *T. canis* miden aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  de longitud por entre 15 a 21  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 1B). Dos aletas que aparecen como dos líneas refráctiles, se extienden desde la boca hasta el poro anal y destacan de manera especial en su morfología. En

su parte anterior, las larvas poseen una boca con tres labios que se conecta con un esófago que ocupa el primer tercio del cuerpo del parásito. En la porción posterior del esófago se encuentran varias glándulas esofágicas, una dorsal y dos subventrales. A nivel de la región media del esófago se encuentra el anillo nervioso. Además, tienen una célula excretora constituida por dos columnas laterales que se extienden a ambos lados del intestino y que se abre al exterior a través del poro excretor, situado en la mitad del tercio anterior del cuerpo de la larva. El primordio genital se encuentra en la zona media del intestino, debajo de la cutícula. El extremo posterior de la larva es digitiforme, aguzado y ligeramente asimétrico (15).

El adulto, que puede llegar a medir varios centímetros de longitud o en forma de huevo o larva (L1-L3), ambas de tamaño microscópico (Figura 1C). Los adultos son gusanos dioicos, de color blanquecino o crema y se encuentran recubiertos por una cutícula con estrías transversales irregulares. Los machos miden entre nueve y 13 cm de largo y entre 0,20 y 0,25 cm de ancho, mientras que las hembras, entre 10 y 18 cm de largo por entre 0,25 y 0,30 cm de ancho. En el parásito adulto se pueden observar tres regiones; una anterior donde se encuentra la boca con tres labios bien desarrollados y el anillo nervioso, una región media donde se observa el intestino y una posterior donde se observan las gónadas y la cloaca (14).

En la región anterior se aprecian las aletas cervicales que son mucho más largas que anchas y que miden entre dos y cuatro milímetros de largo por 0,20 mm de ancho. El esófago alcanza alrededor de 5 mm de largo incluyendo el ventrículo, que mide 0,50 mm de longitud. En la hembra, la vulva se encuentra situada entre la quinta y sexta partes anteriores del cuerpo del



El ciclo comienza cuando los huevos se expulsan con las heces de los hospederos definitivos y embrionan en el medio en condiciones adecuadas de temperaturas (15 y 35 °C), humedad (>85%) y oxigenación abundante. Así, la larva de primer estadio se forma en 3 o 9 días y se transforma en infectante (L3) transcurridas entre 2 y 5 semanas, en dependencia de las condiciones ambientales, (18).

Los hospederos definitivos se infectan al ingerir los huevos embrionados. En el intestino, las larvas emergen de los huevos, invaden la mucosa y migran a través del torrente sanguíneo o linfático, por el interior del cuerpo. En perros jóvenes, la migración ocurre a través de los pulmones y la tráquea y, luego de ser deglutida, la larva alcanza el intestino, donde madura. Los helmintos adultos pueden vivir aproximadamente cuatro meses en el intestino delgado y la mayoría se expulsa antes que el cachorro alcance seis meses de edad. En estos cachorros, una pequeña cantidad de larvas no llega a completar el ciclo hasta el estadio adulto. Esto se produce debido a que, desde los pulmones, las larvas vuelven al corazón por la vena pulmonar y allí, a través de la circulación sistémica, se distribuyen por todo el organismo, y se alojan en los distintos tejidos somáticos, sin desarrollo posterior (19).

En la mayoría de los perros adultos, que tienen algún grado de inmunidad adquirida, algunas larvas fallan en penetrar la pared intestinal, mientras que otras larvas, aunque penetran, fracasan en completar la migración desde los pulmones a los intestinos y experimentan una migración hacia músculos, riñones, hígado y otras vísceras, donde permanecen en un estado hipobiótico. En las hembras preñadas, las larvas que se encuentran en el tejido se reactivan y migran a través de la placenta para infectar el feto. Las larvas que pasan de la madre al feto

permanecen en el hígado fetal hasta el momento del nacimiento, cuando comienzan su migración a los pulmones, sin que se conozca todavía la causa de dicha re-estimulación. Una vez en los pulmones continúa el ciclo antes descrito, por lo que cuando el cachorro alcanza los 21 días de vida se pueden encontrar parásitos adultos en el duodeno. Los cachorros recién nacidos también adquieren la infección a través de la ingestión de la leche materna que contiene las larvas.

Si los huevos embrionados (L3) se ingieren por hospederos paraténicos (humanos, conejos, roedores, ovejas, vacas, cabras, monos, aves), la larva que emerge penetrará la pared intestinal y migrará por vía circulatoria a través de tejidos internos y órganos, sin posibilidad de completar su desarrollo. La presencia de las larvas causa una reacción inflamatoria que puede matarla o forzarla a entrar en un estado hipobiótico. No se conoce con exactitud por cuánto tiempo pueden persistir las larvas en los tejidos de las diferentes especies de hospederos paraténicos. Por ejemplo, en macacos se informan larvas en estado hipobiótico tras nueve años de la infección experimental; mientras que pequeños roedores pueden permanecer infectados durante toda su vida (19).

#### **I.1.4 Antígenos de excreción secreción de larvas de *Toxocara***

Las larvas en cultivo secretan un conjunto complejo de glicoproteínas. Estos productos se nombran según su peso molecular aparente en SDS-PAGE (TES-32, TES-120, etc.). Hasta 50 moléculas distintas se han detectado mediante análisis bidimensional SDS-PAGE de TES, incluyendo muchas proteínas interesantes además de las mucinas y lectinas. Los principales productos incluyen TES-26/PEB-1, una fosfatidiletanolamina funcional proteína de unión con

homología a una proteína testicular de mamífero similar ; TES-45 y TES-55; TES-400, un proteoglicano como material que es predominantemente carbohidrato; y varias enzimas activas moléculas que aún no han sido asignadas a genes: estos incluyen la superóxido dismutasa; acetilcolinesterasa; y una metaloproteasa (9).

El análisis proteómico mediante cromatografía líquida combinada con espectrometría de masa, permitió la identificación de un total de 19 proteínas. De estos productos, siete fueron extracelulares, 10 tenían localización citoplásmica o nuclear. La localización subcelular de los dos restantes resultó desconocida. El análisis de la función de los TES identificados, mediante BLAST2GO mostró que la mayoría de estas proteínas están asociadas con funciones de interacción con proteínas, hierro inorgánico o con compuestos orgánicos cíclicos, por lo que se considera que pueden estar implicadas en la interacción con el hospedero (20).

## **I.2. Toxocarosis humana**

### **I.2.1. Primeras notificaciones de infección por *T. canis* en el humano**

La infección por *T. canis* en el humano se describió por primera vez por Wilder en 1950 (21). Esta investigadora identificó una larva de una especie desconocida de nematodo, en ojos enucleados de niños con diagnóstico presuntivo de retinoblastoma. Dos años después, Beaver y colaboradores publicaron la presencia de larvas de *Toxocara*, en granulomas oculares que removieron de pacientes que tenían síntomas similares a los que manifestaron los pacientes de Wilder (22). Posteriormente, en 1956, Nichols identificó que las larvas que había encontrado Wilder, pertenecían a la especie *T. canis* (23).

### **I.2.2. Patogenia**

Durante la migración por los tejidos del cuerpo humano, las larvas atraviesan tejidos (bazo, ganglios) en los que las células del sistema inmune son abundantes. La presencia de hemorragias, necrosis e inflamación con predominio de eosinófilos debido a la migración larval, son frecuentes en los trayectos que siguen los parásitos. En este migrar, las larvas pueden quedar atrapadas dentro de granulomas eosinofílicos en los cuales van a degenerar o pueden permanecer en estado hipobiótico (24).

Los pequeños granulomas aparecen particularmente en hígado, pulmón y ganglios. El parásito se dispone en el centro del granuloma, intacto o destruido, rodeado por eosinófilos y macrófagos. En la periferia del granuloma se pueden encontrar histiocitos grandes, dispuestos en empalizadas y fibras colágenas concéntricas que envuelven a las células inflamatorias, las que posteriormente se calcifican (25).

La mayoría de las alteraciones patológicas que se asocian con esta infección se producen como consecuencia del daño tisular causado por dos fenómenos: la liberación de productos metabólicos por las larvas migrantes y la propia respuesta inflamatoria que se desencadena en el hospedero debido a la presencia de las larvas (24).

Las larvas liberan continuamente antígenos glicoproteicos solubles. Estos antígenos están involucrados en la supervivencia de la larva dentro del hospedero paraténico que desarrolla de manera preferencial una respuesta inmunológica contra ellos y no contra antígenos somáticos de las larvas. Una parte de los TES tiene un origen interno y es secretada mediante la glándula

esofageal de la larva y por la columna excretora. La otra parte de los TES está compuesta por glicoproteínas que son liberadas de la capa epicuticular externa de la larva que se renueva continua y rápidamente. Los TES contienen una fracción alérgica potente que podría explicar la frecuencia con que se presentan los síntomas alérgicos en pacientes con toxocarosis, especialmente en sujetos atópicos (26).

En las estructuras de los ojos también se pueden producir lesiones granulomatosas y abscesos eosinofílicos debido a la presencia del parásito, las localizaciones oculares más frecuentes de estas lesiones son en el segmento posterior. La migración de una sola larva y la respuesta inflamatoria que se producen pueden llevar a opacidad del vítreo y al desprendimiento parcial o total de la retina (27).

### **I.2.3. Manifestaciones clínicas**

El espectro clínico de la TH varía desde una infección asintomática hasta síndromes clínicos severos en dependencia de la carga parasitaria, la duración de la migración de las larvas y la respuesta inflamatoria del hospedero. En general, la TH se clasifica en cuatro formas clínicas: LMV, LMO o toxocarosis ocular, toxocarosis encubierta (TE) y toxocarosis neurológica (TN) (4).

**LMV:** es consecuencia de la migración sistémica de las larvas por los tejidos de las vísceras. Se trata de una forma clínica severa que afecta fundamentalmente a los niños y que se caracteriza por la presencia de anorexia, náuseas, vómitos, dolor abdominal, hepatomegalia,

fiebre alta, artralgias y manifestaciones neurológicas (4). También pueden presentarse: tos, crisis asmátiforme, hepatoesplenomegalia y miocarditis, incluso con insuficiencia cardíaca (1).

**LMO:** El parásito se localiza dentro del globo ocular y puede ocasionar uveítis y retinitis granulomatosa o puede pasar casi desapercibida, debido a que el paciente solamente refiere disminución progresiva de la agudeza visual. Se han descrito tres presentaciones clínicas fundamentales que son: el granuloma de polo posterior, el granuloma retinal periférico y la endoftalmitis (27). La afectación ocurre fundamentalmente de manera unocular y puede estar acompañada de estrabismo o leucocoria. Algunos casos presentan dolor o hemorragias intraoculares debido al intenso proceso inflamatorio. También pueden producirse diversas secuelas tales como: pigmentación simple de la retina, surgimiento de una membrana epiretinal, n defectos en la capa fibrosa del nervio retinal o que aparezca una escara macular (27-29).

**TE:** se caracteriza por signos y síntomas inespecíficos y la expresión clínica es muy variable. En adultos puede manifestarse como dificultad para respirar, erupción cutánea, prurito, debilidad (30). En niños se manifiesta con fiebre, cefalea, pérdida de apetito, náuseas, vómitos, letargo, trastornos del comportamiento y del sueño, dolor abdominal, faringitis, neumonía, tos, sibilancias, prurito, erupción cutánea, dolores en las extremidades, linfadenitis cervical y hepatomegalia (31).

**TN:** esta entidad clínica que resulta de la invasión del sistema nervioso central por larvas de *Toxocara* y se puede presentar cefalea, fiebre, fotofobia, debilidad, confusión, ataques

epilépticos, demencia y depresión. También comprende encefalitis, meningitis, mielitis, trastornos conductuales, hipoestesias, paraparesias, vejiga neurógena espástica y hemiplejía (32, 33).

#### I.2.4. Epidemiología

El estudio epidemiológico de la toxocarosis es complejo ya que se deben considerar tres eslabones: la enfermedad en los cánidos, la contaminación ambiental con el parásito y la TH, así como su interconexión. La toxocarosis tiene una distribución cosmopolita (Figura 3); se considera endémica en la mayor parte de los países de América, África y Asia y es de interés tanto veterinario como sanitario (34).

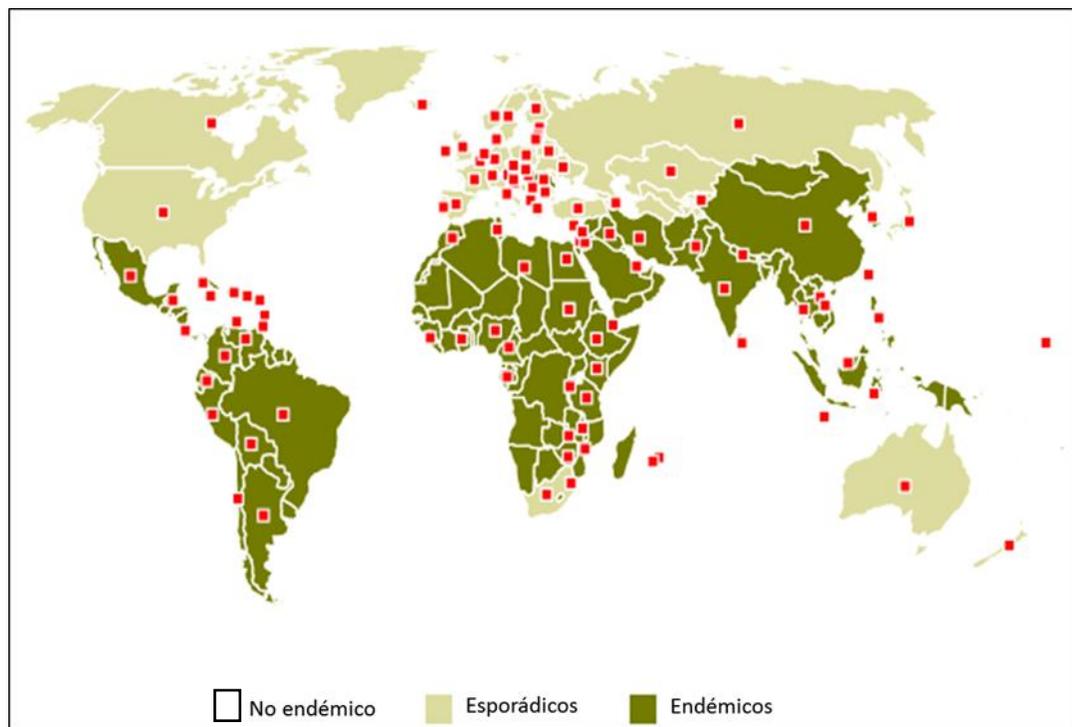


Figura 3. Distribución mundial de la toxocarosis. Los puntos rojos representan los países en los que se ha notificado la parasitosis. Fuente: GIDEON, <http://www.gideonline.com/> (Consultado 2 de febrero de 2021).

Los perros con infecciones patentes transmiten la toxocarosis al contaminar el ambiente con huevos del parásito. Los perros excretan grandes cantidades de huevos de *Toxocara*; incluso un perro infectado levemente puede excretar hasta 10 000 huevos por cada gramo de heces. Los cachorros son los principales contribuyentes a la contaminación de la tierra. Además, el contacto directo con perros también se debe considerar como factor de riesgo, ya que se han encontrado huevos viables de *Toxocara* adheridos en el pelaje (35, 36).

En condiciones adecuadas de humedad y temperatura los huevos son capaces de sobrevivir en el medio ambiente y un gran porcentaje llega a ser infectivo. Por ejemplo, se comprobó que, en el suelo, a una profundidad de 3-5 cm, bajo una temperatura promedio de 23 °C y con una humedad relativa de 82%, los huevos de *T. canis* maduran en 12 días, de un estadio en el que contienen de uno a dos blastómeros, hasta una larva infectante. A esa misma profundidad, más de 70% de los huevos preservan su viabilidad durante cuatro años (37).

El estudio de la epidemiología de la TH es difícil por varias razones. Entre ellas destacan que gran parte de los datos disponibles, se deben a la aplicación de métodos serológicos que evalúan la exposición al parásito y que la comprensión de la relación entre la exposición y la enfermedad sigue siendo limitada (10).

La TH tiende a ser más prevalente en las regiones tropicales que en las regiones templadas, y es más frecuente en las poblaciones rurales que en poblaciones urbanas en la misma región o país (38). Los valores de seropositividad en sujetos aparentemente sanos oscilan entre 2,4% en Dinamarca (se estudiaron 3247 sujetos menores de 40 años de edad) y 92,8% en La

Reunión (isla francesa ubicada en el suroeste del Océano Índico, se estudiaron 387 sujetos mayores de 15 años de edad) (39, 40). Más recientemente, se estimó una seropositividad de 87% en escolares de Islas Marshall (41).

Se describen dos formas fundamentales de infección para el humano, estas son: la ingestión accidental de los huevos embrionados (por contacto con suelo, agua o vegetales crudos contaminados) o por la ingestión de larvas encapsuladas en carne cruda o mal cocinada (42, 43). El factor de riesgo más relacionado con la toxocarosis sintomática es la geofagia, que se presenta fundamentalmente en niños menores de 5 años. Los niños son el segmento poblacional más proclive a padecer la toxocarosis, por sus hábitos de juego vinculados a la tierra y a la arena y por la costumbre de llevar las manos sucias a la boca (44).

La prevención de la toxocarosis puede lograrse mediante la puesta en práctica de las siguientes medidas: desparasitación regular de los perros, prevención de la contaminación del suelo por heces de perros en las áreas adyacentes a las casas y en las áreas de juego de los niños, lavado de las manos después del juego con animales o en el suelo y antes de consumir alimentos, lavar muy bien los vegetales que se ingieren de forma cruda, así como controlar la geofagia. Si bien la toxocarosis se puede prevenir fácilmente, no existe adecuada concientización sobre el alcance del problema (4).

### **I.2.5. Diagnóstico de la toxocarosis humana**

El diagnóstico definitivo de la toxocarosis en seres humanos se logra con la identificación de las larvas migrantes en biopsias de los tejidos afectados, lo cual es un hecho casi excepcional.

Sin embargo, esta confirmación no siempre es posible pues la recolección de muestra mediante una biopsia no siempre está justificada en terrenos clínicos. Por otro lado, las larvas pueden estar ampliamente distribuidas en los tejidos del cuerpo humano por lo que es difícil asegurar que estarán presentes en el material biopsiado, y por último es necesario obtener material adecuado que permita realizar una identificación morfológica y morfométrica de la larva de tercer estadio en las muestras de tejido (31). Debido a esto se plantea que se deben valorar los siguientes aspectos como regla de oro para diagnosticar una toxocarosis sintomática: las características de la historia epidemiológica del paciente, los síntomas y signos clínicos, la presencia de eosinofilia, así como los resultados de la serología (4).

#### **I.2.5.1. Estudios imagenológicos**

Las técnicas imagenológicas permiten detectar y localizar las lesiones granulomatosas que provocan las larvas. En el síndrome de LMV, las técnicas de ultrasonido de alta resolución pueden revelar la presencia de múltiples áreas hipocogénicas en el hígado (45). En el caso de la LMO, el uso de la angiografía fluoresceínica, el ultrasonido ocular y la tomografía axial computarizada, es de gran importancia, particularmente para diferenciar esta entidad del retinoblastoma (46). En pacientes con LMO, mediante ultrasonido, se detectan masas altamente reflectivas y bandas o membranas en el vítreo, con desprendimiento retinal por tracción (27). En el sistema nervioso central, las imágenes de técnicas muy sensibles de resonancia magnéticas, revelan granulomas que aparecen como áreas hiperintensas en T2 (33).

### **I.2.5.2. Eosinofilia**

Este parámetro medido en sangre periférica es proporcional a la eosinofilia hística, que es la reacción local a la presencia de las larvas de *Toxocara*, ya que los eosinófilos son el componente más abundante en el infiltrado celular o granuloma (47). En casos asintomáticos, en la TE y en el síndrome de LMV incompleto son frecuentes los valores entre 400 y 1000 x 10<sup>9</sup> eosinófilos L<sup>-1</sup>, mientras que valores superiores a 3000 x 10<sup>9</sup> eosinófilos L<sup>-1</sup> son típicos de casos de LMV (48). En el caso de la toxocarosis ocular la eosinofilia está casi ausente (27).

### **I.2.5.3. Estudios serológicos**

La detección de anticuerpos séricos de tipo IgG contra antígenos parasitarios constituye el marcador más importante de infección por *Toxocara* y es de utilidad para todo el espectro clínico de la toxocarosis (1). Aunque en el caso concreto de la toxocarosis ocular la detección de IgG específica es menos sensible para el diagnóstico, o sea, que muchos pacientes con manifestaciones clínicas no tienen niveles detectables de anticuerpos séricos contra *T. canis* (49). En estos casos se considera que cuando sea posible, la detección de anticuerpos en fluidos intraoculares, como el humor acuoso o vítreo, pudiera ofrecer mejores opciones diagnósticas. De esta manera, los títulos anti-TES más elevados en fluidos oculares que en el suero, indicarían la producción local de anticuerpos contra el parásito (50).

A lo largo de los años se han desarrollado varios EIE de tipo ELISA, cuya especificidad y sensibilidad varía en dependencia del tipo de preparación antigénica que se usa y del tipo o subtipo de inmunoglobulina que se detecta (1). Entre las preparaciones antigénicas, se han

utilizado desde antígenos totales que se han obtenido de la maceración de los adultos del parásito, hasta llegar a los TES, que aún se utilizan en nuestros días (51).

Sin embargo, algunos componentes de los TES comparten epitopes con otros helmintos, por lo que pueden producir reacciones cruzadas cuando se usan en los EIE. Para incrementar la especificidad de los ELISA se han utilizado fracciones de los TES o antígenos individuales, nativos o recombinantes (rTES). Entre los rTES que se han obtenido se encuentra rTES-30, con el que se desarrolló un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) de gran sensibilidad y especificidad (52). También se desarrolló un ELISA altamente específico utilizando rTES-120 (glicoproteína que conforma la pared de la larva y que es uno de los componentes mayoritarios de los TES) (53). Además, se demostró la ventaja de combinar los rTES (rTES-26, rTES-30USM y rTES-120) en la detección específica de anticuerpos de la subclase IgG<sub>4</sub>, para lograr gran sensibilidad y especificidad en el inmunodiagnóstico de la TH (54).

Recientemente se desarrolló un inmunoensayo basado en Luminex que usa simultáneamente los antígenos recombinantes lectina 1 tipo C y TES-26 para detectar LMV con una sensibilidad y especificidad de 99% y 94% respectivamente, la sensibilidad para LMO fue de 64%. Los autores consideran que el desempeño del inmunoensayo es superior a los EIE disponibles actualmente y que pudiera reemplazar a aquellos que se basan en el uso de TES nativos (55).

Debido a la existencia de reacciones cruzadas, varios autores recomiendan confirmar el resultado del ELISA haciendo uso de la inmunotransferencia (1). Esta técnica resulta más

específica, cuando se detectan bandas electroforéticas de bajo peso molecular (<50 kDa) de los TES (8).

Algunos autores han señalado lo ventajoso que resultaría, para el diagnóstico de la TH, poder disponer de ensayos para detectar antígenos circulantes. Estos autores recomiendan continuar la investigación en este campo, aunque reconocen las limitaciones que se han confrontado. Por ejemplo, es necesario desarrollar un anticuerpo de captura de gran especificidad y eliminar el requerimiento de disociar inmunocomplejos para incrementar la posibilidad de detectar los antígenos, que ha sido una característica común de todos los EIE desarrollados hasta la actualidad. Esto se debe fundamentalmente a que las larvas están normalmente asociadas a tejido y se presume que la carga parasitaria puede ser baja en la mayoría de las infecciones humanas (10).

A lo largo de los años, solo unos pocos estudios se han conducido con el objetivo de desarrollar EIE para detectar antígenos circulantes de *Toxocara* en muestras clínicas. En el primero de ellos, se desarrolló lo que los autores llamaron un "ensayo sándwich doble anticuerpo de dos sitios basado en un mismo anticuerpo monoclonal". Se trataba de un ELISA que usaba un anticuerpo monoclonal para la captura de los antígenos y luego ese mismo anticuerpo, conjugado con peroxidasa, se usaba para la detección. De esta manera se detectaron antígenos en el suero de pacientes ingleses diagnosticados con LMV o LMO y en cuatro niños asintomáticos de Papua Nueva Guinea (56).

En otro estudio se desarrolló un ELISA sándwich doble anticuerpo cuyo límite de detección fue de 4 ng/mL y no mostró reactividad cruzada con antígenos de *A. lumbricoides*, *A. suum* o *Dirofilaria immitis* (57). Ishiyama y colaboradores por su parte notificaron el desarrollo de un ELISA sándwich doble anticuerpo que usaba un anticuerpo monoclonal para capturar los antígenos y anticuerpos policlonales, obtenidos en conejo, para realizar la detección. Este ensayo también tenía un límite de detección de 4 ng/mL y fue capaz de detectar 4 de 9 muestras positivas, sin reactividad cruzada con antígenos de otros nematodos (58).

Llama la atención que al realizar una búsqueda en la literatura no se encuentra referencia posterior de la validación e introducción de ninguno de estos EIE para el diagnóstico de la TH. Más reciente, Rodríguez-Caballero y colaboradores publicaron el desarrollo de un ELISA sándwich doble anticuerpo que usa anticuerpos policlonales para la captura de los antígenos y un anticuerpo monoclonal para la detección. Este ensayo tiene un límite de detección de 440 pg/mL y una sensibilidad de 31% en muestras clínicas (59).

#### **I.2.5.4. Uso de la biología molecular**

En las últimas décadas se desarrollaron herramientas basadas en la RCP que permiten la identificación de las especies del género *Toxocara* (60). Entre las dianas genéticas se han usado el primero y el segundo espaciador interno transcrito del ADN nuclear ribosomal (61). Entre los métodos se ha utilizado la RCP que en ocasiones se ha combinado con la digestión con la enzima de restricción *RSAI* para generar patrones específicos para las especies *T. canis* y *T. cati*, respectivamente (62, 63). También se ha optimizado la técnica de la PCR en tiempo real dúplex y cuantitativa para discriminar las especies de *T. canis* y *T. cati* (64). Sin embargo,

hasta el momento el uso de estas herramientas se ha limitado a la detección de los parásitos en animales infectados, natural o experimentalmente, o en estudios de la contaminación del suelo, para la diferenciación de las especies de *Toxocara* presentes (64-66).

En el caso de exámenes histopatológicos practicados a humanos, se considera que estas herramientas pudieran ser muy útiles para realizar el diagnóstico, particularmente en aquellos casos en los que solo se ha recuperado parte de la larva y resulta difícil confirmar morfológicamente que la larva pertenece al género *Toxocara* (1). Sin embargo, en la literatura internacional son casi inexistentes las notificaciones de la búsqueda y/o hallazgo de ADN del parásito en material procedente de biopsias practicadas a humanos.

### **I.2.6. Tratamiento**

El albendazol se considera como el medicamento de elección para el tratamiento de la TH (67). El régimen recomendado es 400 mg, por vía oral, dos veces al día, durante 5 días (68). El medicamento debe ser administrado con una comida rica en grasas. Este medicamento cruza la barrera hematoencefálica y generalmente es bien tolerado (69). Otros medicamentos útiles pudieran ser dietilcarbamazina y tiabendazol (4). El tratamiento específico se recomienda en casos de LMV y algunos casos de TE. En ocasiones resulta imprescindible administrar medicamentos para contrarrestar las reacciones inflamatorias que pudieran producirse como consecuencia de la muerte de las larvas. Por ejemplo, en el caso de la LMO, los esteroides, administrados tópicamente y/o sistémicamente, producen una mejora de consideración (46).

### I.3. Toxocarosis en Cuba

Desde la década del 70, se notificaron pacientes con diagnóstico de LMV y aunque en muchos de ellos no fue posible identificar a qué especie pertenecía la larva presente en el material obtenido mediante biopsia, no se puede descartar que en algunos casos se tratara de *T. canis* (70).

En 1994, se informó una seropositividad a *T. canis* de 5,1%, en un grupo de niños sanos del municipio La Lisa, La Habana (71). El resultado de ese estudio contrastaba con los niveles de infección en canes y de contaminación ambiental con huevos del parásito, que se encontraron en la ciudad en esa misma época. Por ejemplo, se demostró la presencia del parásito en alrededor de 20% de los perros domésticos que se estudiaron y aproximadamente 68% de las áreas públicas, que se estudiaron en La Habana, se encontraron contaminadas con huevos del parásito (72, 73).

También en Cuba, en la década del 2000, se estudiaron un total de 461 perros callejeros de todos los municipios de La Habana y se comprobó que aproximadamente la quinta parte de los perros se encontraban infectados con *T. canis* (74). Por otro lado, en esa misma década, se notificaron pacientes con toxocarosis ocular o ganglionar (75, 76).

Una revisión de la literatura publicada hasta 2010, sobre la toxocarosis en Cuba, evidenció que el impacto de esta parasitosis en la salud pública se desconoce y que se necesitan herramientas para el diagnóstico de la TH (77). Posteriormente, un estudio seroepidemiológico en muestras procedentes de escolares de los municipios San Juan y Martínez (Pinar del Río) y

Fomento (Santi Spíritus) demostró una seropositividad de 38,8% a *Toxocara*. Además, la seropositividad tenía asociación con el género de los niños y con las coinfecciones por parásitos intestinales, pero no con la edad o con el municipio de residencia de los niños (6). El laboratorio de referencia del IPK, recibe todos los años muestras clínicas de pacientes sospechosos de TH que provienen de distintas regiones del país. La confirmación de la sospecha clínica y epidemiológica a través de estuches comerciales ha permitido informar casos principalmente de LMO (78, 79).

#### **I.4. Modelo murino de infección experimental**

Entre los animales que se han utilizado como modelo para el estudio de la TH se encuentran los ratones (líneas consanguíneas o no). Actualmente se considera que la línea de ratones BALB/c es la indicada si se quiere estudiar la distribución de las larvas después de la infección (80). En estos animales, cuando las larvas abandonan el pulmón, entran en la circulación sistémica desde donde alcanzan los músculos esqueléticos y el sistema nervioso central. Las larvas tienden a acumularse en el tejido cerebral donde pueden permanecer vivas, y resultar en cambios de comportamiento del animal (81, 82). Con el tiempo, las larvas parecen iniciar nuevamente la migración para redistribuirse por el cuerpo del hospedero (83).

Los ratones BALB/c también han sido inoculados con huevos embrionados o larvas para constatar la presencia de antígenos de excreción-secreción larvales en suero y para estudiar la cinética de los anticuerpos que se producen contra estos antígenos (56). En ese caso, se demostró la naturaleza transitoria de la circulación de antígenos parasitarios que reconocía un

inmunoensayo desarrollado y se especuló que se debía a que pasaban a formar parte de inmunocomplejos a medida que se desarrollaba la respuesta inmune.

Sin embargo, el modelo murino no está exento de contradicciones. Por ejemplo: el uso de inóculos de huevos embrionados que no se corresponden con las dosis de infección esperadas en humanos, que se suponen sufren más comúnmente infecciones repetidas con inóculos menores. No obstante, en varios estudios los ratones BALB/c han resultado el modelo apropiado para la toxocarosis, debido a su susceptibilidad (80, 84, 85).

### **I.5. Definición de nanocuerpo y ventajas de su plataforma tecnológica de producción para el desarrollo de ensayos inmunoenzimáticos**

La plataforma tecnológica de obtención de Ncs se desarrolló luego de que se descubriera accidentalmente, en el suero de los miembros de la familia Camelidae (camellos y llamas), un tipo especial de anticuerpo. Estos animales, además de tener anticuerpos convencionales de tipo IgG, tienen otros que carecen de cadenas ligeras. Estos anticuerpos usan el dominio variable amino terminal de sus cadenas pesadas para interactuar con el determinante antigénico. El dominio variable de esos anticuerpos, se identifica con las siglas VHH (del inglés, *variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody*). Los VHHs obtenidos de manera recombinante se conocen con el nombre de Ncs debido a que sus dimensiones, que son aproximadamente 4 x 2,5 x 3 nm, pertenecen a la escala nanométrica (86).

Los Ncs poseen propiedades tales como gran solubilidad y estabilidad, no poseen tendencia a agregarse y una alta afinidad por los antígenos diana. Hoy en día se cuenta con métodos bien

establecidos para producir genotecas de *vhh*, usando fagos o levaduras y para aislar los *vhs* antígeno-específicos. Además, los Ncs pueden ser producidos fácilmente como proteínas recombinantes en bacterias y levaduras y durante ese proceso pueden ser manipulados genéticamente, para generar constructos complejos y así poder cumplimentar los requerimientos de la aplicación para la cual se diseñaron (87).

Entre las ventajas de la plataforma de obtención de Ncs se destaca que es posible inmunizar un camélido con una mezcla de inmunógenos para luego seleccionar los Ncs que reconocen un inmunógeno individual. La inmunización con cantidades tan bajas como 50 µg del inmunógeno en adyuvante completo e incompleto de Freund genera Ncs de gran afinidad, luego de 5-6 semanas. Además, se considera que aproximadamente 1% de la población total de células B circulantes expresan VHH específicos para el inmunógeno diana, lo que, en el caso particular de los inmunoensayos, facilitaría obtener un par de Ncs para ensamblar un EIE tipo sándwich doble anticuerpo (87).

Debido a otras de sus propiedades, la rapidez con que se aclaran de la sangre y su capacidad de penetrar los tejidos, los convierten en herramientas promisorias para el diagnóstico y la terapéutica de algunas enfermedades. Hasta el día de hoy, se han desarrollado una gran variedad de Ncs para un amplio abanico de dianas moleculares (87). Entre las aplicaciones de los Ncs se encuentran: el uso en biosensores, en la captura por afinidad, en la asistencia a la cristalización de proteínas que se encuentran en estudio y en la identificación y terapéutica del cáncer, entre otras (88).

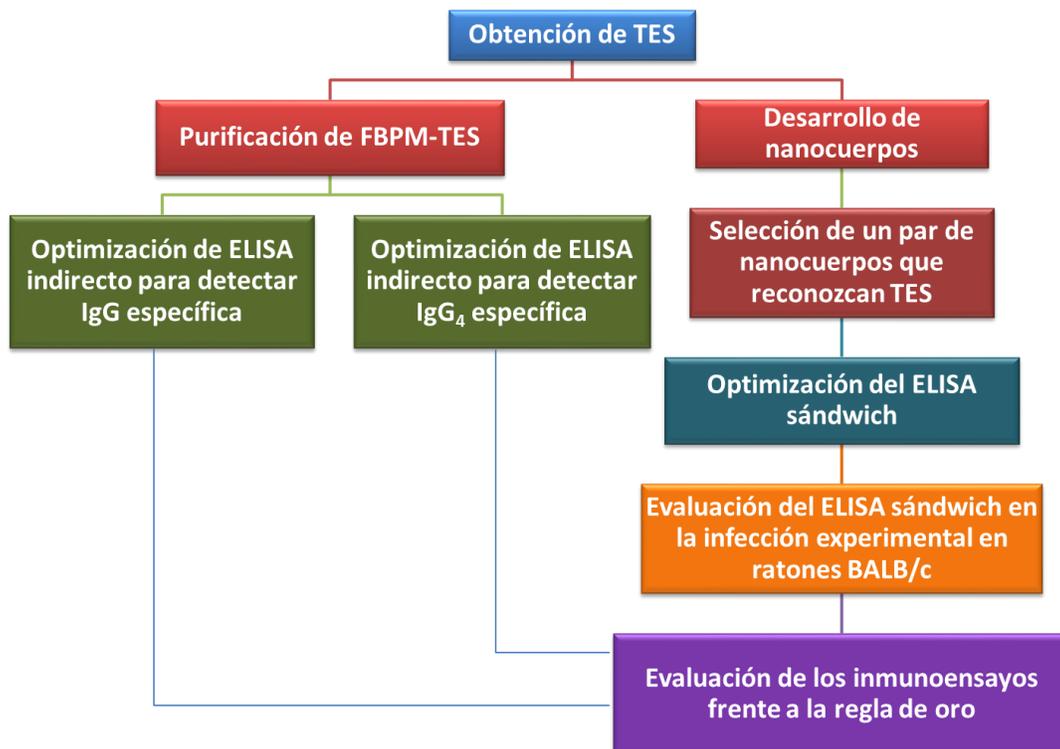


# ***Materiales y métodos***

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1. Diseño de la investigación y universo de estudio

El presente trabajo es un estudio experimental en el que se desarrollaron ensayos inmunoenzimáticos para el diagnóstico de la toxocarosis humana. A continuación, se describen de manera gráfica y luego de una forma más amplia los procedimientos generales seguidos para cumplir los objetivos planteados.



Los experimentos se llevaron a cabo en el Departamento de Parasitología y en el Bioterio, ambos del Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia (CIDR) del IPK, excepto la obtención de los Ncs y la optimización del ELISA sándwich doble anticuerpo que se realizaron en el Departamento de Interacciones Moleculares y Celulares de la *Vrij Universiteit of Brussels*, Bélgica. Para el estudio, se colectaron muestras de suero de pacientes con TH, procedentes de las instituciones de la red nacional de salud, en el periodo comprendido entre 2015 y 2018. Además, en el mismo período también se colectaron muestras de donantes voluntarios de sangre, que se usaron como controles negativos. Todas las muestras utilizadas en el estudio, se clasificaron mediante los EIE serológicos comerciales (Toxocara ELISA kit, Bordier affinity, Crissier, Switzerland; AccuDiag™ Toxocara IgG ELISA kit, Diagnostic Automation/Cortez Diagnostics, Inc., California, EUA) para confirmar el diagnóstico y se conservaron a -20°C, hasta su utilización.

Para el estudio del desempeño de los EIE se definieron 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 (estuches comerciales para IgG anti-*Toxocara*, Bordier Affinity, Suiza; Diagnostic Automation, EUA), 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 supuestamente sanos

Panel 3: compuesto por muestras de suero de pacientes con ascariosis (7 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)

## **II.2. Disoluciones y medios de cultivo**

Solución salina tamponada con fosfatos (PBS): NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7,2. Tampón de uso general por sus propiedades de isotonicidad y valor de pH semejante al del líquido extracelular de los mamíferos.

Medio de cultivo Luria Bertani (LB): 25,0 g de LB-Broth High Salt (Thermo Scientific, EUA que se disolvieron en 1 L de H<sub>2</sub>O destilada. Se utilizó para el cultivo de los clones transformantes de *Escherichia coli*.

Medio de cultivo TB (Terrific broth): 2,3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 16,4 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O; 12,0 g de triptona; 24,0 g de extracto de levadura; que se disolvieron en 1 L de H<sub>2</sub>O destilada. Se añadieron 4 mL de glicerol (100%). Se utilizó para el cultivo de los clones transformantes de *E. coli*.

Las disoluciones anteriores se esterilizaron en autoclave (Sakura, Japón), a 121 °C, durante 20 min.

Tampón TES: Tris-HCl 0,2 M; pH 8,0; EDTA 0,5 mM; sacarosa 0,5 M. Se utilizó para provocar la ruptura de la pared bacteriana mediante choque osmótico.

Disolución para elución de los Ncs en cromatografía de afinidad por quelatos metálicos PBS/imidazol (0,5 M): 3,4 g de imidazol que se disolvieron en 100 mL de PBS-HCl pH 7,2; la solución se esterilizó mediante filtración a través de 0,2 µm de tamaño de poro (Millipore, USA).

### **II.3. Plásmidos, fagos, cepas bacterianas y animales de experimentación**

Los vectores de clonación y expresión, y las cepas bacterianas que se utilizaron, se suministraron por el laboratorio de Inmunología Molecular Celular de *Vrij Universiteit of Brussels*, Bélgica. A continuación, describimos brevemente las características principales de estos vectores y hospederos (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Características de los vectores utilizados en la clonación y la expresión de los nanocuerpos como proteínas recombinantes

Vectores	Características principales	Tarea
<b>Vector fagémico pMECS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-La expresión se induce mediante isopropil-<math>\beta</math>-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)</li> <li>-Posee un gen que le confiere resistencia a ampicilina</li> <li>-La proteína que se expresa posee en su extremo amino terminal el péptido-señal pelB y en su extremo carboxilo terminal una cola de hemaglutinina (HA), una cola de poli-histidina (His<sub>6</sub>), un codón de parada Ámbar y el gen III del bacteriófago M13, en ese orden.</li> </ul>	Clonación y expresión de los Ncs como proteínas recombinantes en bacterias
<b>Fago auxiliador M13K07 (89)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Posee gen de resistencia a kanamicina</li> <li>-En presencia de un vector fagémico que lleva un origen M13, el ADN del vector fagémico se empaqueta preferentemente y se secreta en el medio de cultivo.</li> </ul>	Clonación de los genes <i>vhh</i>
<b>Vector de expresión pHEN6c (90)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-La expresión se induce mediante IPTG</li> <li>-Tiene un gen que confiere resistencia al cloranfenicol</li> <li>-Posee el péptido-señal pelB anterior al sitio de clonación, así como un codón de parada Ámbar posterior al sitio de clonación.</li> <li>-Adiciona una cola His<sub>6</sub> para la detección y purificación del gen clonado</li> </ul>	Clonación y expresión de los Ncs como proteínas recombinantes en bacterias
<b>Vector de expresión pBAD17 (91)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-La expresión se induce mediante IPTG</li> <li>-Codifica en el carboxilo terminal de la proteína recombinante, una región de bisagra semi-rígida (16 aminoácidos), un dominio aceptor de biotina (15 aminoácidos, BAD del inglés, biotin acceptor domain) y una cola de His<sub>6</sub></li> </ul>	Expresión de los Ncs como proteínas recombinantes biotiniladas

Tabla 2. Características de las cepas de *Escherichia coli* que se utilizaron en la clonación y expresión de los nanocuerpos como proteínas recombinantes

Cepa de <i>E. coli</i>	Características	Tarea
TG1: F' [traD36 proAB lacIq2 ΔM15] supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcr-B-hsdSM(5 (rk-mk-)) <b>(92)</b>	-es supresora, el codón de parada Ámbar, no se lee y el Nc se expresa fusionado a la proteína III del fago	Clonación de los genes <i>vhh</i>
WK6: F' lacIq Δ(lacZ) M15 proA+B+ Δ (lacproAB) galE rpsL <b>(93)</b>	-es no supresora, el codón de parada se lee y el Nc no se expresa fusionado a la proteína III del fago	Expresión de los nanocuerpos como proteínas recombinantes

### II.3.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones BALB/c machos con peso de entre 18 y 20 g (8 semanas de nacidos) que se suministraron por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, con sus correspondientes certificados de salud. Setenta y dos horas antes de comenzar los experimentos, los animales se colocaron en cajas T3 en grupos de 7, con acceso libre al agua y a los alimentos y bajo condiciones adecuadas (temperatura de 25 °C, humedad de 70%), para facilitar su adaptación. Los procedimientos para la infección experimental de los animales se realizaron basados en la Directiva 2010/63/UE, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Los animales se mantuvieron en condiciones adecuadas según los requerimientos de su especie y se manipularon por personal calificado y que conocían las buenas prácticas en el manejo de los mismos. Se tuvieron en cuenta los principios de reemplazo, reducción, refinamiento para el trabajo con animales de laboratorio. El protocolo de trabajo se aprobó por el Comité de Ética del IPK (CEI-IPK 41-18).

## **II.4. Obtención de antígenos parasitarios**

### **II.4.1. Obtención de antígenos de excreción-secreción larvales y caracterización del patrón electroforético de proteínas de los lotes**

Los adultos de *T. canis* se obtuvieron en el Centro de Control y Observación Animal del Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de La Habana, a partir de perros que se infectaron naturalmente y que se trataron con piperazina (40 mg/kg de peso). Los parásitos que se expulsaron con las heces se colectaron y se transportaron inmediatamente al laboratorio de zoonosis del IPK, donde se observaron mediante microscopio estereoscópico (64x) (Leica, Canadá) y se clasificaron según género (94). Los parásitos hembras se colocaron individualmente en placas de Petri que contenían solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2 M) y se disectaron para extraer el útero bajo microscopio estereoscópico (64x). Seguidamente, se rasgó la membrana externa del útero y se obtuvieron los huevos, los cuales se mantuvieron en solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2 M) a temperatura ambiente (25 °C), con luz artificial constante y con agitación manual breve en días alternos. Este proceso continuó hasta que, transcurridos entre 7 y 10 días, aproximadamente, se observó, mediante microscopía, la larva móvil en el interior de los huevos.

Cuando aproximadamente 90% de los huevos estuvieron embrionados, se procedió a extraer las larvas, para lo cual se siguió la metodología propuesta por Savigny, con algunas modificaciones (95). Brevemente, los huevos embrionados se incubaron con hipoclorito de sodio a 14% durante 10 min, a temperatura ambiente. Posteriormente, en gabinete de seguridad (Flufrance, Francia), los huevos se lavaron dos veces con PBS (pH 7, estéril),

mediante centrifugación a 3000 g y finalmente, con medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma Aldrich, Alemania), que se suplementó con glutamina (2 mM), penicilina G sódica (100 IU/mL), sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) y anfotericina B (1 µg/mL). La eclosión de los huevos se provocó mediante homogenización manual con un homogenizador tipo Potter. Posteriormente, la suspensión se transfirió a un aparato de Baermann y se recuperaron las larvas, luego de tres horas de incubación a temperatura ambiente (96).

Las larvas (L3) se mantuvieron en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (Greiner Bio-One GmbH, Alemania), en jarra para cultivo anaeróbico, a 37 °C, a una concentración de 1000 larvas/mL, en medio de cultivo RPMI-1640 que se suplementó con antibióticos, según se describió previamente. Semanalmente, siempre que la mortalidad de las larvas no sobrepasó 5%, se colectó el sobrenadante del cultivo que contenía los TES y se reemplazó por medio de cultivo fresco. El sobrenadante del cultivo de las larvas se suplementó con inhibidores de proteasas (*cOmplete Mini*, Roche Diagnostics GmbH, Alemania), según las instrucciones del fabricante y se conservó a -20 °C hasta su uso posterior.

Finalmente, los sobrenadantes se mezclaron y se concentraron mediante un sistema de ultrafiltración Amicón (membrana 3000 Da, Millipore, Reino Unido). El concentrado se filtró (0,22 µm, Millipore, Reino Unido) y se desalinizó mediante cromatografía de tamizaje molecular (PD10, GE Healthcare, Reino Unido), para cuya elución se usó PBS. La concentración de las proteínas se determinó por el método del ácido bicinconínico (Sigma, St Louis, MO, EUA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los TES se dispensaron en alícuotas y se mantuvieron a -20 °C hasta su uso posterior.

Los TES que se colectaron de larvas que se obtuvieron de parásitos adultos procedentes de un mismo perro se definieron como un lote. Para cada uno de los lotes, se estimó la cantidad de TES que produce una larva por día. La concentración de las proteínas de los lotes se ajustó a 1 mg/mL para garantizar la homogeneidad en los análisis posteriores. Los lotes se compararon en cuanto al patrón de bandas de proteínas obtenidas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Para realizar la SDS-PAGE se utilizaron geles de poliacrilamida comerciales a 10% (NuPAGE, Thermo Fisher Scientific, EUA) y como tampón de electrodo, el ácido 2-(4-morfolino) etanosulfónico (Thermo Fisher Scientific, EUA). Las corridas electroforéticas se realizaron en cámara vertical doble (BIORAD, EUA) a 100 V, en presencia de agente reductor (NuPAGE sample reducing agent 10X, NuPAGE sample buffer, Invitrogen, EUA). Las bandas de las proteínas se visualizaron mediante tinción con plata (97). En cada corrida electroforética se incluyó un patrón de peso molecular (10-180 kDa, PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, Lituania). El peso molecular de las proteínas de los perfiles electroforéticos se estimó mediante el uso de una curva de calibración que se confeccionó a partir de las movilidades relativas de las proteínas incluidas en el patrón, con respecto al logaritmo de su peso molecular.

#### **II.4.1.1. Purificación de la fracción de bajo peso molecular de los antígenos de excreción-secreción larvales**

La FBPM-TES se obtuvo mediante cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex 75 HR10/30 (Pharmacia Biotech, Alemania) en Akta FPLC (Amersham Pharmacia Biotech, Alemania). Se aplicaron 2 mg de TES en un volumen de 100  $\mu$ L. La elución se realizó con tampón fosfato de sodio 0,05 M, pH 6,8; flujo 0,4 mL/min y se colectaron fracciones de 0,4 mL.

Las fracciones se estudiaron mediante SDS-PAGE y tinción con plata, según la metodología descrita en el acápite II.4.1 y aquellas que contenían proteínas cuyo tamaño era menor que 50 kDa se mezclaron y concentraron mediante dispositivo de ultrafiltración (Vivaspin 5 kDa, Sartorius, Reino Unido). Luego de determinar la concentración de proteínas, la FBPM-TES se conservó en alícuotas a -20 °C, hasta su uso posterior.

#### **II.4.2. Obtención de antígenos de *Ascaris lumbricoides* y *A. suum***

Los antígenos de adultos de *Ascaris lumbricoides* se obtuvieron según la metodología que describieron Elefant y colaboradores (Elefant *et al*, 2006). Investigadores del Departamento de Ciencias Biomédicas del Instituto de Medicina Tropical, Amberes, Bélgica donaron gentilmente los antígenos de *Ascaris suum*. Ambas preparaciones se utilizaron en el estudio de las reacciones cruzadas, para la selección de la mejor combinación de Ncs para el desarrollo del ELISA sándwich doble anticuerpo.

## **II.5. Desarrollo de ensayos inmunoenzimáticos basados en la fracción de bajo peso molecular de los antígenos de excreción-secreción larvales, para la determinación de anticuerpos IgG o IgG<sub>4</sub> en muestras de suero**

Con la FBPM-*TES* obtenida según se describió previamente, se normalizaron dos EIE de tipo ELISA para detectar anticuerpos IgG e IgG<sub>4</sub>, respectivamente. En ambos casos, se ensayaron diferentes concentraciones de los principales reactivos biológicos involucrados en el ELISA para determinar las condiciones que brindaron una mayor proporción muestra positiva/blanco con respecto a la absorbancia.

El control positivo consistió en una mezcla de volúmenes iguales de muestras de suero de pacientes con diagnóstico de toxocarosis (Panel 1). Como control negativo se usó una mezcla de suero, a partes iguales, de donantes voluntarios de sangre (Panel 2).

Para la optimización de ambos ensayos, de manera general, 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. Al día siguiente, 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 2 h. Se añadieron 100 µL del control positivo/control negativo/blanco en PBS-tween 20. Luego de la incubación a 37 °C durante 1 h y tres lavados con PBS-tween 20, se añadieron 100 µL de conjugado comercial anti IgG con peroxidasa (Sigma, EUA) o anti IgG<sub>4</sub> humana, (Invitrogen, EUA) según el caso. La placa se

incubó nuevamente a 37 °C, durante 1 h. Transcurrido ese periodo 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 µL de ácido sulfúrico 1 M. Inmediatamente, se realizó la lectura de la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA (Dynatech, EUA).

En el caso del ELISA-IgG se determinaron: la concentración óptima de recubrimiento con FBPM (0,625-40 µg/mL), dilución óptima de la muestra problema (1/100-1/102400) y la dilución óptima del conjugado comercial anti-IgG humana-PRP (1/50000-1/80000). Para la optimización del ELISA-IgG<sub>4</sub> se determinaron: la concentración óptima de recubrimiento con FBPM-TES (0,625-40 µg/mL), dilución óptima de la muestra problema (1/100-1/102400) y la dilución óptima del conjugado comercial anti-IgG<sub>4</sub> humana-PRP (1/2000-1/5000). Cada experimento se repitió dos veces y cada medición se realizó por triplicado.

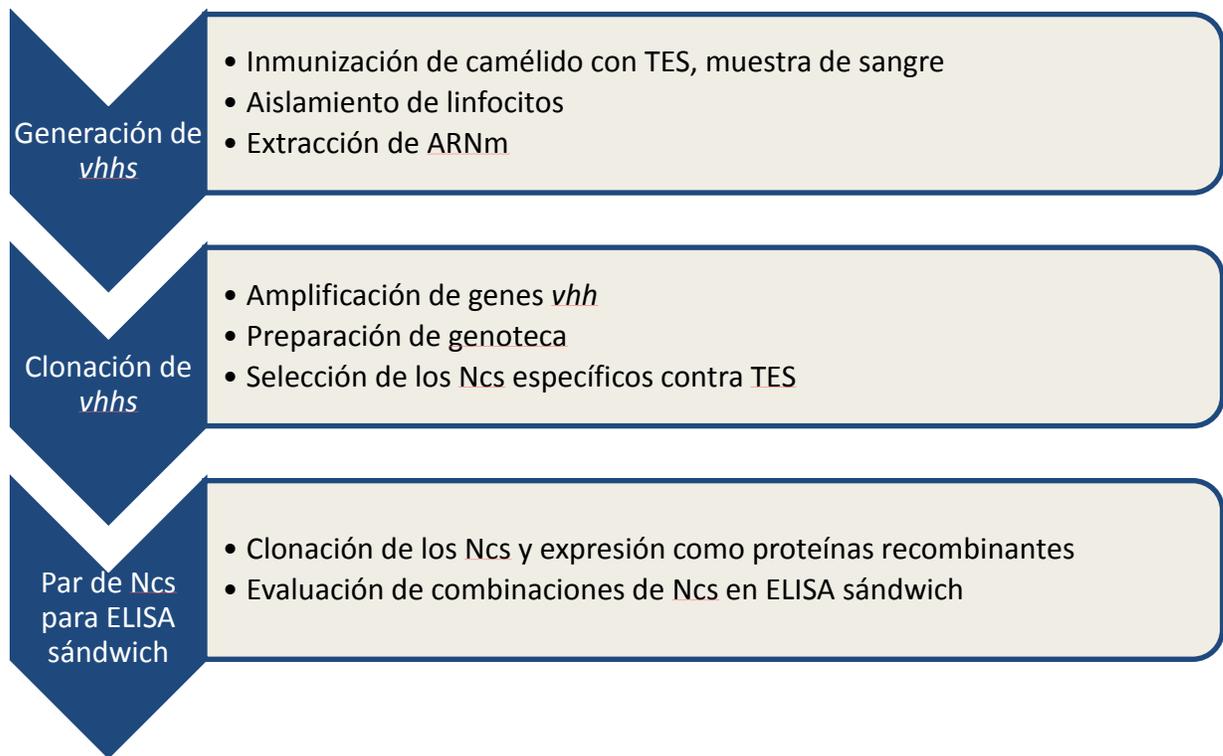
Para determinar el valor de corte se evaluaron 200 muestras obtenidas de donantes voluntarios de sangre, sin clínica sugestiva de toxocarosis y que resultaron negativos a *Toxocara* al estudiarse mediante dos estuches serológicos comerciales (*Toxocara canis* ELISA, Bordier Affinity Products SA, Crissier, Suiza; *Toxocara* kit, Diagnostic Automation, Inc. Calabazas, Ca, EUA). Se analizó la distribución de la absorbancia a través de un histograma de frecuencia para un intervalo de confianza de 95% mediante el programa estadístico SPSS para Windows versión 11.5.1, SPSS Inc, 1989-2002. Para cada uno de los EIE se determinó la repetibilidad, la reproducibilidad y el valor de corte. 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 mismas 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 15%, para la reproducibilidad.

## **II.6. Desarrollo de ensayo inmunoenzimático basado en nanocuerpos para detectar antígenos circulantes en suero**

### **II.6.1. Desarrollo de nanocuerpos específicos contra antígenos de excreción-secreción larvales**

A continuación, se describen de manera gráfica y luego de una forma más amplia los procedimientos generales seguidos para cumplir las tareas.



Para el desarrollo de los nanocuerpos y su obtención como proteínas recombinantes en células bacterianas se siguieron los procedimientos descritos por Vincke y colaboradores (98). Brevemente, con el objetivo de inmunizar una alpaca, se seleccionó un animal saludable, de 5 años de edad con apetito y comportamiento normal para la especie. Durante la inmunización se siguieron normas elementales generales para el bienestar y la protección animal, así como buenas prácticas experimentales. Se administraron al animal 125  $\mu$ g de TES, diluidos en 1 mL de PBS y mezclados a partes iguales con adyuvante completo de Freund (SIGMA, EUA) en la primera inmunización y con adyuvante incompleto de Freund (SIGMA, EUA) en las siguientes, por vía subcutánea los días 0, 7, 14, 21, 28 y 35. El día 39 se obtuvo una muestra de 100 mL de sangre, por punción de la vena yugular, de la que se aislaron los genes que codificaban para Ncs.

Brevemente, la sangre se depositó en tubos que contenían anticoagulante (ácido etilendiaminotetraacético), se diluyó al doble con solución salina a 0,9% y se separaron los linfocitos mediante centrifugación en tubos Leucosep® (Greiner Bio-One, Alemania) a 1000 x g, durante 10 min. Posteriormente, se aisló el ácido ribonucleico (ARN) total de los linfocitos de sangre periférica con TRIzol (Invitrogen, EUA), según las instrucciones del fabricante. El ARN se usó como molde para sintetizar la primera cadena de ADNc mediante RCP con un cebador oligo-dT<sub>12-18</sub>. El ADNc sirvió de molde para amplificar los genes *vhh* del animal. La amplificación generó dos grupos de amplicones con pesos moleculares de 0,7 y 0,9 kb, aproximadamente, correspondientes a *vhh* y a los genes que codifican para las inmunoglobulinas convencionales, respectivamente. Los amplicones de 0,7 kb se eluyeron de un gel preparativo de agarosa a 2% y luego se usaron como molde en una RCP anidada para amplificar las secuencias *vhh* (98). La RCP anidada introdujo las secuencias diana para el corte con enzimas de restricción, en los extremos 5' y 3' de los amplicones *vhh*, para clonación en el vector fagémico pMECS.

Los genes *vhh*, una vez que se amplificaron, se digirieron con las enzimas de restricción *Pst*I (40 U/μL, Thermo Scientific) y *Not*I (40 U/μL, Thermo Scientific, EUA), según las recomendaciones del fabricante y se clonaron en el vector pMECS, que previamente también se digirió con las enzimas de restricción. Seguidamente, se preparó una genoteca en células electrocompetentes de la cepa bacteriana TG1 de *E. coli*. Luego, se calculó el tamaño de la genoteca y se determinó el porcentaje de las colonias que contenían un inserto del tamaño esperado (vector-*vhh*: 700 pb).

A continuación, se realizaron dos rondas de enriquecimiento de los fagos de la genoteca que contenían *vhh* TES-específicos, sobre antígenos inmovilizados en una PMT (20 µg TES/pozo). Previamente, se infectaron las bacterias con fagos auxiliares M13KO7 ( $>10^{11}$  unidades formadoras de placas/mL) para lograr que los viriones recuperados de las bacterias de la genoteca, mostraran los Ncs en su cubierta. Al terminar cada ronda de enriquecimiento, los viriones que se eluyeron, se usaron para infectar bacterias de la cepa TG1 de *E. coli* y se generaron colonias individuales.

Las colonias se evaluaron mediante ELISA indirecto para seleccionar aquellas que contenían *vhh* específicos contra TES, siguiendo la metodología descrita por Vincke y colaboradores (98). Las colonias que resultaron positivas se cultivaron en medio LB y el ADN plasmídico se aisló y posteriormente se determinó su secuencia nucleotídica (99). Las secuencias de ADN y aminoácidas derivadas, se alinearon mediante el programa MEGA versión 6 (100), lo que permitió identificar los Ncs y eliminar las colonias redundantes. A partir de las secuencias de ADN obtenidas se estimaron algunas características de los Ncs, como el peso molecular y su coeficiente de extinción, mediante el programa de computación ProtParam (2005), servidor Expasy, Instituto Suizo de Bioinformática ([web.expasy.org](http://web.expasy.org)).

Los Ncs se nombraron según la ronda de enriquecimiento en que se seleccionaron, seguido de la abreviatura TCE (del inglés *Toxocara canis excretion-secretion*) y el número ordinal con el que se identificó la colonia bacteriana original que los contenía, ejemplo 1TCE1. Posteriormente, los *vhh* se re-clonaron en el vector de expresión pHEN6c y con estos constructos y los obtenidos anteriormente en pMECS, se transformaron las bacterias de la cepa

WK6 de *E. coli* mediante técnicas estándar de clonación, para la expresión y purificación de los Ncs (98).

Los Ncs clonados en pMECS o en pHEN6c, se expresaron como proteínas recombinantes. Brevemente, se prepararon cultivos bacterianos en medio LB que se suplementó con ampicilina 100 µg/mL y se incubaron en agitación (200 rpm) a 37 °C, toda la noche. Al día siguiente, se inoculó 1 mL de este cultivo en un frasco que contenía 330 mL de medio de cultivo TB que se suplementó con ampicilina 100 µg/mL, glucosa 0,1% y MgCl<sub>2</sub> 2 mM. Este cultivo se incubó en agitación a 37 °C hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial (absorbancia a 600 nm entre 0,6 y 0,9). Luego de inducir la expresión con IPTG (1 M) e incubación durante toda la noche en agitación a 28 °C, las bacterias se concentraron mediante centrifugación a 11 300 g durante 8 min a 4 °C. Posteriormente, se sometieron a cambio osmótico para obtener el extracto periplásmico, mediante adición sucesiva de tampón TES y tampón TES diluido cuatro veces. Para la realización de este procedimiento, las bacterias se mantuvieron en baño de hielo y con agitación constante. Finalmente, la suspensión se centrifugó a 11 300 g para coleccionar el sobrenadante que contenía los Ncs.

Posteriormente, los Ncs se purificaron mediante cromatografía de afinidad por quelatos metálicos (matriz HIS select, Sigma, EUA) en una columna PD-10 y se eluyeron con 5 volúmenes de columna de PBS/imidazol (0,5 M). Seguidamente, se removió el imidazol mediante ciclos sucesivos de dilución en PBS y concentración en dispositivo de ultrafiltración Vivaspin (5000 MWCO, Sartorius, Reino Unido). El rendimiento de la producción de cada Nc se determinó mediante la medición de la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro

NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, EUA). La pureza de los Ncs se verificó mediante SDS-PAGE a 10%, según el procedimiento descrito en el acápite II.4.1.

## **II.6.2. Selección de los nanocuerpos y su modificación para formar parte del ELISA sándwich doble anticuerpo**

Los Ncs se ensayaron por pares, mediante ELISA sándwich, para identificar la combinación que detectara los TES con los mayores valores de absorbancia. Para ello se recubrieron los pozos de una PMT con 100 µL un Nc-PHEN6c (1 µg/mL). Luego de bloquear con 200 µL de leche descremada los espacios libres en los pozos e incubar con 500 ng de TES/pozo, se añadió un Nc-pMECs (1 µg/mL). Para la detección, se usó un anticuerpo anti-hemaglutinina (1/2000) obtenido en ratón (Covance, EUA) y un conjugado anti IgG total de ratón-PRP, obtenido en carnero (1/2000, Sigma, EUA). Se realizaron pasos intermedios de cinco lavados con Tris-HCl 10mM, pH 8,0/Tween 20 (0,05%). Como sustrato, se añadieron 100 µL de paranitrofenil fosfato (2 mg/mL) en tampón de sustrato (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, pH 9,5). La lectura de la absorbancia se realizó a 405 nm. Se incluyó un control negativo en el que se sustituyó la solución de TES por 100 µL de PBS. En lo adelante nos referiremos al primer Nc-PHEN6c como "capturador" y el segundo Nc-pMECs como "detector".

La ausencia de reacciones cruzadas se verificó mediante ELISA sándwich doble anticuerpo con antígenos de *A. lumbricoides* y *A. suum*, según el procedimiento descrito en el acápite II.6.2. Los antígenos de *A. lumbricoides*, *A. suum* o TES se añadieron disueltos en PBS a razón de 500 ng/pozo.

Posteriormente, los Ncs seleccionados se modificaron para continuar con los experimentos. De esta manera, con el Nc captador, se procedió a generar un constructo bivalente biotinilado. Para ello, se unieron los dominios VHH por un conector glicina-serina, mediante mutagénesis dirigida por RCP, usando cebadores específicos:

5'-TAGGCCAGCCGGCCATGGCCAGGTGCAGCTTCAGGAGTCYGGRRGGAG-3'

5'ATTCTGCAGCTGCACCTGACTACCGCCGCCTCCGGAACCTCCACCGCCGGATCCGCCTCCGCCTG  
AGGAGACCGTGACCTGGGTBCC-3'

Posteriormente, el constructo se clonó en el vector pBAD17 mediante RCP y corte con enzimas de restricción *Pst*I y *Bst*EII (Thermo-Fisher Scientific, EUA).

Las células electro-competentes de la cepa bacteriana WK6 se transfectaron con los plásmidos resultantes y con el plásmido pACYC184 (Avidity, EUA) que contenía el gen que codifica para pBirA, la ligasa de biotina de *E. coli*. El nuevo constructo se produjo bajo condiciones estándar. La expresión del Nc se indujo con IPTG (1 M) y se colectaron las bacterias, mediante centrifugación (11300 g). Luego de tres rondas de congelación-descongelación, se procedió a la biotinilización, se añadió D-biotina (50 µM, Acros organics, EUA) y DNasa I, (5 µg/mL) y la suspensión se incubó con agitación, a 37 °C, durante 1 h. El sobrenadante se dializó toda la noche contra PBS y los Ncs biotinilados se purificaron mediante una matriz de muteína, según las recomendaciones del fabricante (Roche Diagnostics GmbH, Alemania). Por otro lado, el nanocuerpo detector se acopló a PRP mediante modificación química (Abcam HRP conjugation kit, Reino Unido).

### **II.6.3. Optimización del ELISA sándwich doble anticuerpo mediante un sistema simulado**

Se ensayaron diferentes concentraciones de los principales reactivos biológicos involucrados en el ELISA, para determinar las condiciones que brindaron una mayor proporción señal/fondo. Brevemente, se recubrieron los pozos de una PMT con 100  $\mu$ L de estreptavidina (0,156-5  $\mu$ g/mL) (Sigma, EUA) en tampón carbonato 0,05 M (pH 9,6) y la PMT se incubó a temperatura ambiente. Transcurridas 18 h, se adicionaron 100  $\mu$ L Nc bivalente biotinilado (0,0064-20  $\mu$ g/mL) y se continuó la incubación durante 1 h. Luego de bloquear los espacios libres en los pozos, con 200  $\mu$ L tampón de bloqueo Pierce™ Protein-Free (Thermo-Scientific, EUA) durante 1 h e incubar con 100  $\mu$ L de suero humano (Sigma, EUA) al que se añadieron 0,1  $\mu$ g/mL de TES, se añadió el Nc detector conjugado con PRP (0,2-5  $\mu$ g/mL). La placa se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió el sustrato, tetrametilbenzidina (BD Biosciences, California, EUA) y la placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo transcurridos 20 min, con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M y la lectura de la absorbancia se realizó a 450 nm. Se realizaron pasos intermedios de cinco lavados con PBS-Tween 20 (0,05%). En todos los casos, los períodos de incubación se realizaron en agitación, con excepción de la incubación con el sustrato. Seguidamente, se determinó el valor de corte del ensayo mediante interpolación del valor medio de la absorbancia de tres réplicas del blanco sumado al valor de la desviación estándar multiplicada por tres, en la curva.

La repetibilidad se evaluó a través del análisis de réplicas de tres sueros negativos a los que se añadieron diferentes concentraciones de TES y para conocer la reproducibilidad se analizaron los resultados del 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 15%, para la reproducibilidad.

## **II.7. Determinación de la cinética de antígenos de excreción-secreción larvales y de inmunoglobulina IgG específica en suero, durante la infección murina experimental con *T. canis*.**

### **II.7.1. Infección de los animales con huevos embrionados o con larvas de *T. canis***

Los huevos y larvas del parásito se obtuvieron según lo descrito en el acápite II.5.1. La concentración de las suspensiones de parásitos, se determinó mediante conteo en cámara de Neubauer, en el caso de las larvas se inmovilizaron con ayuda de PBS-formol 5%. En cada caso se promedió el conteo de los parásitos de cinco alícuotas de la suspensión (20 µL). La concentración de cada suspensión se ajustó para administrar a cada grupo de animales, que se seleccionaron aleatoriamente, la cantidad de parásitos correspondiente, en 100 µL de solución salina fisiológica estéril. Dos grupos de animales recibieron 100 µL solución salina por vía oral o por vía intraperitoneal y se usaron como control negativo. Los animales se infectaron con huevos embrionados por vía oral o con larvas por vía intraperitoneal, con dosis de 50 o 100 parásitos en ambos casos (101). Para una mejor comprensión, los grupos experimentales se nombraron como se muestra a continuación:

Grupo 1 (H50): se administraron 50 huevos embrionados por vía oral

Grupo 2 (H100): se administraron 100 huevos embrionados por vía oral

Grupo 3 (L50): se inocularon 50 larvas por vía intraperitoneal

Grupo 4 (L100): se inocularon 100 larvas por vía intraperitoneal

### **II.7.2. Monitoreo de los animales de experimentación**

Los ratones se sometieron a vigilancia periódica para, en caso de ser necesario, realizar acciones para disminuir el daño o aplicar punto final humanitario. Se confeccionó una ficha de observación donde aparece la relación de variables que se estudiaron y las acciones a emprender según la severidad del daño (Tabla 3). Los animales se identificaron individualmente mediante muescas en las orejas para facilitar el seguimiento. Se determinó el peso de cada uno de los ratones y se les extrajeron 60  $\mu$ L de sangre del seno retro-orbital utilizando un tubo microcapilar no heparinizado (Clinitubes<sup>TM</sup>, Dinamarca). La sangre se procesó, mediante centrifugación a 500 g, para obtener el suero, que se conservó a -20 °C hasta su utilización. Estos procedimientos se realizaron antes de la infección y se repitieron los días 3, 6, 9, 12, 15, 21, 30 y 45 pos infección.

Tabla 3. Relación de parámetros evaluados en los animales involucrados en los experimentos y acciones propuestas

Aspecto/Indicador	Acciones
<b>Peso corporal</b>	
Pérdida de peso hasta 10%	Revisar la frecuencia del seguimiento
Pérdida de peso de 10% a 20%	Consultar al veterinario
Pérdida de peso superior a 20%	Adoptar punto final humanitario (PFH)
<b>Acicalamiento</b>	
Ligeramente descuidado	Revisar la frecuencia del seguimiento
Falta de acicalamiento	PFH
<b>Locomoción</b>	
Postura/locomoción ligeramente anormales	Revisar la frecuencia del seguimiento
Postura/locomoción muy anormales	Consultar al veterinario
Inmovilidad	PFH
<b>Respiración</b>	
Taquipnea	Revisar la frecuencia del seguimiento, consultar al veterinario
Disnea	PFH
<b>Convulsiones</b>	
Se observan	PFH

### II.7.3. Conteo de larvas en órganos de los animales infectados

Transcurridos 45 días, a los animales se les aplicó eutanasia mediante dislocación cervical, para extraer hígado, pulmones y cerebro. Los órganos se cortaron finamente y se incubaron en una solución de digestión (HCl 0,5%) durante 24 h a 37 °C. La suspensión resultante se centrifugó a 1000 g durante 10 min y en el sedimento se identificaron y se contaron las larvas con el microscopio óptico (200 X) (Olympus, Japón).

#### **II.7.4. Detección de antígenos de excreción-secreción larvales circulantes y de anticuerpos IgG específicos en suero**

Para la detección de TES circulantes en suero en el modelo murino experimental, se utilizó el ELISA sándwich doble anticuerpo optimizado como se describió en el acápite II.6.3, con la particularidad de que las muestras de suero de los animales se utilizaron diluidas 1/50 en PBS-tween 20, (0,05%). El control negativo consistió en una mezcla a partes iguales de muestras de suero obtenidas de tres ratones sin infectar. El control positivo consistió en una mezcla a partes iguales de muestras de suero de tres ratones sin infectar a la que se añadió TES (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Para la detección de anticuerpos séricos específicos contra los TES en el modelo murino experimental se utilizó un inmunoensayo de tipo ELISA indirecto. Cada pozo de una PMT (NUNC-Maxisorp, Thermo Scientific, Alemania) se sensibilizó con 100  $\mu\text{L}$  de TES (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en tampón de recubrimiento (tampón carbonato; 0,05 M; pH 9,6), durante 18 h. Los espacios libres en los pozos se bloquearon con 200  $\mu\text{L}$  de leche descremada (2,5%) en PBS-tween 20 (0,05%). Posteriormente, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de la muestra de suero (1/500 en PBS-tween 20). Luego de la incubación durante 1 h a 37 °C y tres lavados con PBS-tween 20, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de conjugado comercial anti IgG mouse-PRP, diluido 1/2000 (Dako, Alemania). La placa se incubó nuevamente durante 1 h a 37 °C. Transcurrido ese periodo de tiempo, se realizaron tres lavados con PBS-tween 20 y se dispensaron en cada pozo 100  $\mu\text{L}$  de orto-fenilendiamina (0,05%) y peróxido de hidrógeno (0,015%) en tampón citrato pH 5,0. La

placa se incubó a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 20 min. La reacción se detuvo con 50  $\mu$ L de ácido sulfúrico 1 M y se realizó la lectura de la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA (Dynatech, EUA).

El control negativo consistió en una mezcla a partes iguales de muestras de suero de tres ratones sin infectar. El control positivo: consistió en una mezcla a partes iguales de muestras de suero de dos ratones infectados con 500 huevos embrionados y sangrados a los 80 días pos infección.

## **II.8. Estimación de los indicadores de desempeño de los ensayos inmunoenzimáticos desarrollados frente a la regla de oro.**

Una vez optimizadas las condiciones de los EIE, los indicadores de desempeño (sensibilidad, especificidad, índice de validez, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo (VPP, VPN, respectivamente) se evaluaron con las muestras de suero de los paneles 1 y 2 (acápites II.1), mediante un programa estadístico, como se describe en el acápite II.9. Las reacciones cruzadas se evaluaron con las muestras del panel 3 (acápites II.1).

## **II.9. Análisis estadístico**

Los resultados de la infección experimental en ratones se analizaron mediante el paquete estadístico Graphpad Prism version 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California EUA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Se determinaron las medianas del número de larvas observadas por órgano analizado y por animal en cada grupo experimental, además de los valores medios de densidad óptica en los EIE entre los grupos experimentales. Las diferencias, en cuanto a estos parámetros entre los grupos experimentales, se determinaron utilizando la

prueba de Kruskal-Wallis (más de dos muestras independientes) y la prueba de comparación múltiple de Dunn. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si  $P < 0,05$ . Los indicadores de desempeño de los EIE (sensibilidad, especificidad, índice de validez, valor predictivo positivo y negativo e índice Kappa) frente a la regla de oro se calcularon 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 (102).

#### **II.10. Aspectos éticos.**

El presente trabajo se ajustó a los principios establecidos en la declaración de Helsinki, así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones vigentes en Cuba. Estos resultados se encuentran amparados bajo la certificación del Comité de Ética del IPK en los protocolos de investigación titulados “Desarrollo de inmunoensayos para el diagnóstico de la toxocarosis humana” (CEI-IPK 29-13) y “Validación y aplicación epidemiológica de inmunoensayos para la detección de la toxocarosis humana, La Lisa, 2018-2019” (CEI-IPK 56-16). Se tuvieron en cuenta los principios de reemplazo, reducción y refinamiento, en el uso de los animales de experimentación.

Principio de Reemplazo: Se realizó una revisión bibliográfica en las principales bases de datos internacionales para revistas biomédicas. Esto permitió seleccionar el modelo animal a utilizar, así como las dosis de infección para evitar repetir de manera innecesaria los experimentos.

Principio de Reducción: Solo se utilizó la cantidad mínima imprescindible de animales que permitiera obtener resultados científicos satisfactorios, según aplicación de pruebas estadísticas.

Principio de Refinamiento: Se tuvieron en cuenta las principales necesidades biológicas de los animales: encamado, confinamiento social, alimentación y suministro de agua. Se emplearon técnicas adecuadas para la restricción del animal y para la toma de muestra de sangre del seno retro-ocular se indujo la anestesia en cámara con dietileter (103).



# *Resultados y discusión*

### **III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **III.1. Desarrollo de ensayos inmunoenzimáticos basados en la fracción de bajo peso molecular de los antígenos de excreción-secreción larvales, para la determinación de anticuerpos IgG e IgG<sub>4</sub> específicos en muestras de suero**

##### **III.1.1. Obtención de antígenos de excreción-secreción larvales y purificación de la fracción de bajo peso molecular**

La cantidad de proteína de los lotes obtenidos varió de acuerdo al número de larvas en cultivo y al tiempo que sobrevivieron sin evidencias de contaminación. En total se obtuvieron alrededor de 50 mg de TES (Tabla 4). Se estimó que una larva produjo entre 1,81 y 8,4 ng de proteína por día.

Tabla 4. Cantidad de proteínas totales (mg) de antígenos de excreción-secreción de larvas de *Toxocara canis*, por lote.

Lote	Cantidad de proteína <sup>1</sup> (mg)
1	10,17
2	3,44
3	3,82
4	1,36
5	1,81
6	3,4
7	3,7
8	4,3
9	1,7
10	5,6
11	9,5
<b>Total</b>	<b>48,8</b>

<sup>1</sup> La cantidad de proteínas se determinó mediante el método del ácido bicinónico.

Desde que se publicó por primera vez la metodología para la obtención de TES a partir del cultivo *in vitro* de larvas del parásito, se notificó la cantidad de proteínas que produce una larva por día, como medida del rendimiento. En ese estudio los valores variaron entre 4 y 9 pg/larva/día (95). En investigaciones posteriores, se obtuvieron valores superiores, por ejemplo 8 ng/larva/día (104), como es el caso de la presente investigación. Se ha sugerido que las diferencias encontradas pudieran deberse a que se utilizaron diferentes medios de cultivo para el mantenimiento *in vitro* de las larvas (99). Savigny utilizó Medio Mínimo Esencial de Eagle con sales de Hanks (95); mientras que posteriormente los investigadores, en su mayoría, han utilizado medio RPMI (52, 104). Al parecer los ingredientes de este último favorecen el metabolismo de las larvas y su mantenimiento en cultivo. Otros factores como los métodos de procesamiento de los antígenos y los utilizados para determinar la cantidad de proteínas también pudieran influir.

El patrón electroforético de los TES de los diferentes lotes, bajo condiciones reductoras mostró un patrón de bandas discretas, cuyo peso molecular osciló entre 32 y 130 kDa. El patrón fue similar entre los lotes, aunque se muestran diferencias en la cantidad relativa de algunas proteínas (Figura 4). Podemos destacar que a pesar de las variaciones entre ellos, el perfil electroforético de los lotes de TES obtenidos en la presente investigación coincidió con la mayoría de los autores que establecieron los componentes mayoritarios de TES (8, 104-106).

Los primeros estudios que caracterizaron los TES de *T. canis* por SDS-PAGE se realizaron en la década de los años 80 del pasado siglo (107-109). Desde esas primeras investigaciones se han notificado discrepancias en el número de componentes y en sus pesos moleculares. Por ejemplo, se informaron diferencias en dos lotes de TES obtenidos y analizados en dos laboratorios separados usando los mismos protocolos (109). Ambas preparaciones antigénicas tenían al menos 10 componentes antigénicos en común, sin embargo, una de las preparaciones tenía una composición más compleja.

En otro estudio, un total de 15 bandas proteicas de peso molecular entre 29 y 94 kDa, y algunas bandas tenues menores de 21 kDa se detectaron en una muestra de TES que se analizó mediante SDS-PAGE (99). Al mismo tiempo se observaron diferencias de composición en función de la edad de las larvas en cultivo, especialmente en las fracciones de peso molecular menores de 70 kDa. En otra investigación se reconocieron, mediante SDS-PAGE, al menos 17

bandas entre 27 y 180 kDa (177-92, 77-41, 38-27 kDa) (103). Posteriormente, se identificaron en los productos de TES, al menos 7 bandas de peso molecular superior a 200 kDa y una de aproximadamente 400 kDa; en la zona de 100 a 120 kDa contabilizaron 3 bandas de migración muy próxima, además encontraron 3 proteínas débilmente teñidas, de 51, 59 y 78 kDa, y una banda de coloración intensa de 32 kDa (104). También se describió un patrón proteico constituido por siete bandas: 24, 28, 30, 35, 132, 147 y 200 kDa, bandas que fueron reconocidas por sueros de pacientes con LMV (17). Las diferencias encontradas pudieran deberse a factores como la edad de los cultivos o quizás, la existencia de cepas del parásito con diferente constitución antigénica. Aunque la base biológica de esa variación se desconoce, sí se sabe que no afecta la sensibilidad de los EIE cuando se usan en serodiagnóstico (104).

Algunos autores estudiaron la especificidad de los componentes de TES mediante inmunotransferencia con muestras de suero de pacientes con toxocarosis. Estos estudios permitieron determinar la especificidad de las proteínas de bajo peso molecular, pues los sueros de pacientes con otras helmintiasis reconocieron las proteínas de alto peso molecular (8). Posteriormente, se recomendó el uso de la FBPM-TES de los TES en los EIE (10).

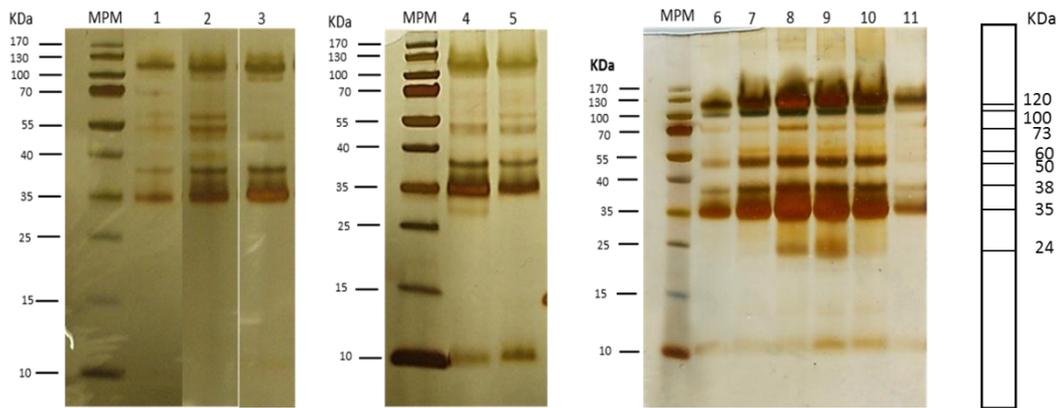


Figura 4. Perfil electroforético en SDS-PAGE (10%) en condiciones reductoras de los antígenos de excreción-secreción de larvas de *Toxocara canis* por lotes. Se aplicaron 8  $\mu\text{g}$  de proteína por carril. Las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con plata. Marcador de peso molecular (MPM): PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Lituania). El diagrama representa las bandas de proteínas más abundantes en el perfil.

La figura 5 muestra el cromatograma obtenido al purificar la FBPM de los TES. Los productos de mayor peso molecular eluyeron en el volumen muerto.

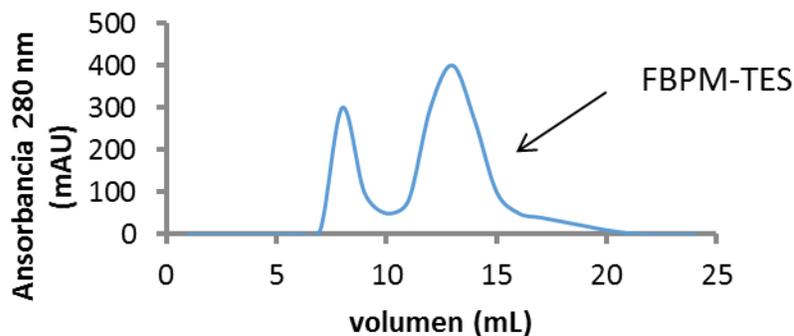


Figura 5. Separación de la fracción de bajo peso molecular de los antígenos de excreción secreción larvales de *Toxocara canis* mediante cromatografía de exclusión molecular. Se aplicaron 2 mg de proteínas en 100  $\mu\text{L}$  a una columna Superdex® 75 HR 10/30 (Amersham Biosciences). Para la elución se usó tampón fosfato de sodio 0,05 M, pH 6,8; con un flujo de 0,4 mL/min.

Se verificó el grado de pureza de la fracción de bajo peso molecular mediante SDS-PAGE y se observaron dos bandas principales de peso molecular de 38 y 35 kDa, respectivamente (Figura 6).

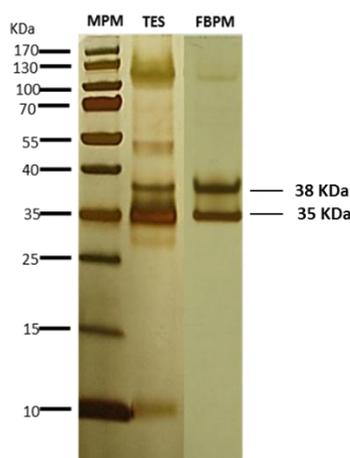


Figura 6. Perfil electroforético en SDS-PAGE (10%) en condiciones reductoras de la fracción de bajo peso molecular, purificada a partir de los antígenos de excreción-secreción larvales de *Toxocara canis* mediante cromatografía de tamizaje molecular. Se aplicaron 4  $\mu$ g de proteína por carril. Las bandas de las proteínas se visualizaron mediante tinción con plata. Marcador de peso molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, Lituania).

### III.1.2. Optimización de ensayos inmunoenzimáticos indirectos para detectar anticuerpos

#### IgG e IgG<sub>4</sub> específicos contra *T. canis*

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

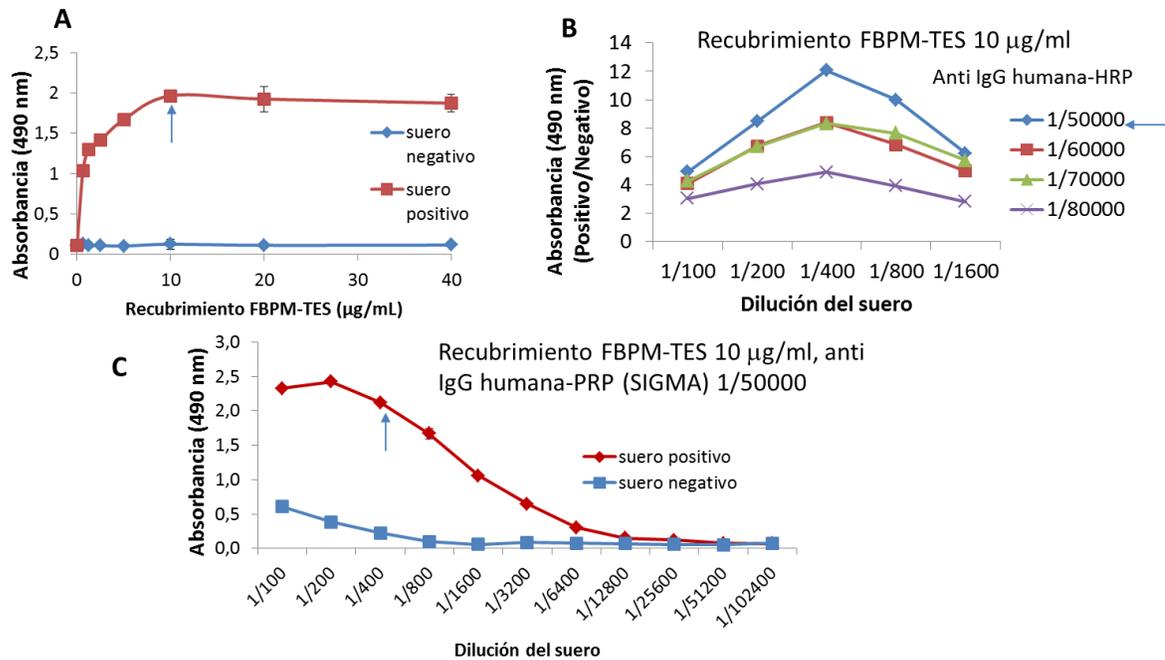


Figura 7. Normalización del ELISA indirecto para detectar IgG en suero humano contra la fracción de bajo peso molecular de los productos de excreción-secreción larvales de *Toxocara canis*. Normalización de la concentración de recubrimiento (A), de la dilución del conjugado (B) y de la dilución de la muestra de suero (C).

De manera similar se procedió en la optimización del ELISA indirecto para detectar inmunoglobulinas IgG<sub>4</sub> contra la FBPM-TES en muestras de suero de pacientes con sospecha de TH (Figura 8). Se normalizaron la concentración de recubrimiento con la FBPM-TES, la dilución del conjugado y la dilución de la muestra de suero. Las condiciones del ELISA optimizado fueron: recubrimiento 10 µg/mL de FBPM-TES (Figura 8A, dilución de la muestra de suero 1/200 (Figura 8B), dilución del conjugado anti IgG<sub>4</sub> humano-PRP 1/2000 (Figura 8C). El valor de corte resultó en 0,214. El coeficiente de variación intraensayo fue de 7% y el interensayo de 11%.

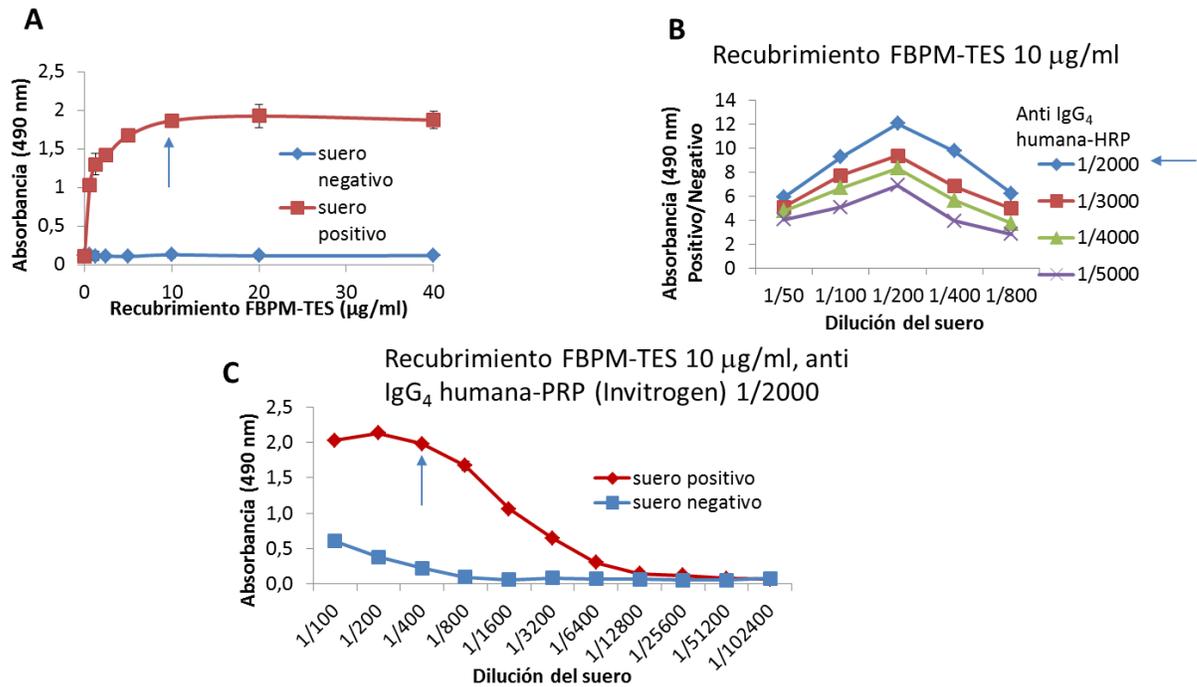


Figura 8. Optimización del ELISA indirecto para detectar IgG<sub>4</sub> en suero humano usando la fracción de bajo peso molecular de los productos de excreción-secreción larvales de *Toxocara canis*. Normalización de la concentración de recubrimiento (A), de la dilución del conjugado (B) y de la dilución de la muestra de suero (C).

### III.2. Desarrollo de un ensayo inmunoenzimático basado en nanocuerpos para la detección de antígenos larvales circulantes de *T. canis*.

En la toxocariasis humana, las larvas L3 se encuentran en los tejidos y se sospecha que la carga parasitaria puede ser baja. Debido a esto la detección de antígenos circulantes, que pudiera proveer una constancia de la infección activa, se dificulta. Por esto se sugiere contar con un anticuerpo de captura de gran especificidad y disociar los inmunocomplejos, para incrementar la probabilidad de encontrar antígenos circulantes en muestras clínicas (10).

En este sentido, la plataforma tecnológica de producción de Ncs se consideró apropiada para vencer los retos asociados al desarrollo de anticuerpos específicos para la detección de los antígenos circulantes en el suero humano. Esta plataforma tiene propiedades inherentes favorables como la construcción de una genoteca, que contiene el repertorio completo de un animal inmunizado con la preparación antigénica de interés para luego seleccionar los Ncs que más se ajusten a los objetivos propuestos. Los Ncs muestran una alta afinidad y especificidad por sus antígenos diana y tienen, por su pequeño tamaño, la posibilidad de reconocer epitopes diferentes a los que reconocería, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que se diseñe con igual finalidad. Además, los Ncs pueden ser fácilmente modificados genéticamente para incrementar la sensibilidad de un ensayo, por ejemplo, creando constructos bivalentes (86).

Con la finalidad de generar Ncs específicos contra los TES se inmunizó una alpaca con TES y se generó una genoteca de ADNc-*vhh* con aproximadamente  $3 \times 10^8$  transformantes. Alrededor de 84% de los transformantes contenían el vector con un inserto del tamaño esperado.

Del total de colonias que conformaron la genoteca, se seleccionaron al azar 190 colonias (95 colonias en cada ronda de enriquecimiento) y se analizaron mediante ELISA para detectar la presencia de Ncs específicos contra los TES en su extracto periplásmico. De estas 190 colonias, 68 resultaron positivas. De las colonias positivas, 47 se seleccionaron al azar y se secuenciaron para identificar los Ncs. La alineación de las secuencias de ADN y aminoacídicas que se obtuvieron se muestran en los anexos 1 y 2.

La tabla 6 muestra algunas características de los nanocuerpos que se estimaron a partir de las secuencias de ADN obtenidas. El peso molecular de los Ncs comprendió desde 14,4 kDa hasta 16,2 kDa. El coeficiente de extinción permitió calcular el rendimiento luego de la producción de los Ncs como proteínas recombinantes en *E. coli* (Tabla 6). El rendimiento varió entre 0,51 y 8,74 mg de proteína/L de cultivo bacteriano.

Tabla 6. Características teóricas (Programa Protparam, servidor ExPASy, Instituto Suizo de Bioinformática) y rendimiento en la obtención de los nanocuerpos que se clonaron en el vector pHEN6c/pMECS y que se expresaron como proteínas recombinantes en la cepa WK6 de *Escherichia coli*.

Nanocuerpo	Peso molecular teórico (Da)	Coeficiente de extinción Abs 0,1% (=1 g/l)	Rendimiento mg de proteína/litro de cultivo bacteriano	
			pHEN6c	pMECS
2TCE24	14838,3	1,924	6,4	8,6
2TCE87	14737,3	1,928	5,6	7,1
1TCE37	14574,0	2,069	4,4	7,0
1TCE92	14388,9	1,880	14,6	1,6
1TCE25	14561,0	2,063	7,5	7,0
1TCE21	14662,0	1,854	4,2	4,3
1TCE52	14672,2	1,579	7,9	2,3
1TCE19	14547,9	2,065	12,7	9,7
2TCE13	14757,3	1,724	12,5	14,3
2TCE49	14721,3	1,363	12,2	3,5
1TCE24	15890,5	1,980	1,5	0,5
1TCE39	16084,6	1,626	1,7	1,3
1TCE49	16058,6	1,721	3,0	3,4
1TCE69	15929,5	1,980	3,1	3,0
2TCE18	16083,7	1,626	2,1	1,5
2TCE19	16101,7	1,773	1,8	1,0
2TCE44	15984,5	1,972	2,0	2,6
2TCE61	16222,8	2,035	7,8	8,7
2TCE78	16107,8	1,772	5,7	6,0
2TCE90	15671,2	2,010	6,1	5,9

La pureza de los Ncs se demostró mediante la presencia de una banda única, correspondiente al peso molecular esperado, en el perfil electroforético, algunos ejemplos se muestran en la figura 9.

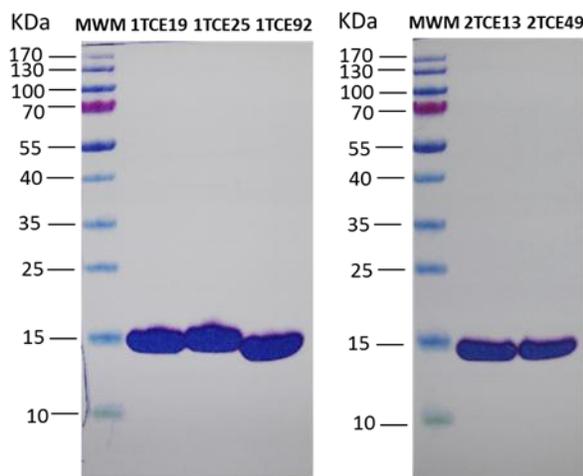


Figura 9. Perfil electroforético en SDS-PAGE (10%) en condiciones reductoras de los nanocuerpos purificados del extracto periplásmico bacteriano mediante cromatografía de afinidad por quelatos metálicos. Se muestran nanocuerpos que se clonaron en el vector pHEN6c, se aplicaron 5  $\mu$ g de proteína por carril. Las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción azul de Coomassie. Marcador de peso molecular (MPM): PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Lituania).

A continuación, se ensayaron combinaciones de Ncs para identificar una combinación útil con la cual posteriormente poder normalizar un ELISA sándwich doble anticuerpo para detectar TES en muestras de suero. En la Figura 10 se muestran las combinaciones que proporcionaron los mayores valores de absorbancia entre las que se ensayaron. De todas esas combinaciones

se seleccionó la combinación 2TCE49-1TCE39 por ser la que generó mayores valores de absorbancia.

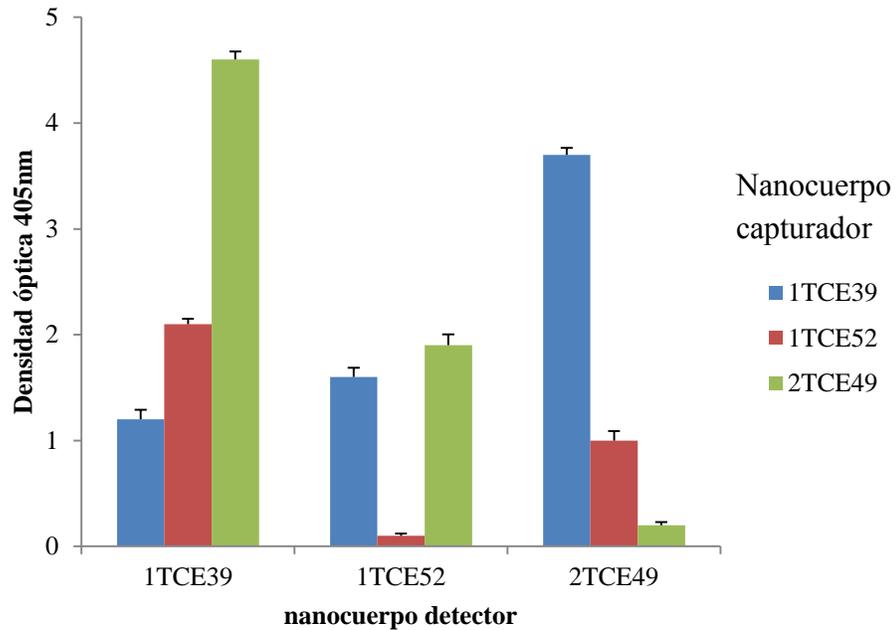


Figura 10. Identificación de la mejor combinación de nanocuerpos para el ELISA sándwich doble anticuerpo.

Posteriormente, se descartó que el par de Ncs seleccionados mostrara reacción cruzada con antígenos de *A. lumbricoides* o *A. suum*. La Figura 11 muestra los resultados del análisis de la especificidad de la combinación de Ncs que se seleccionó para el ELISA sándwich doble anticuerpo.

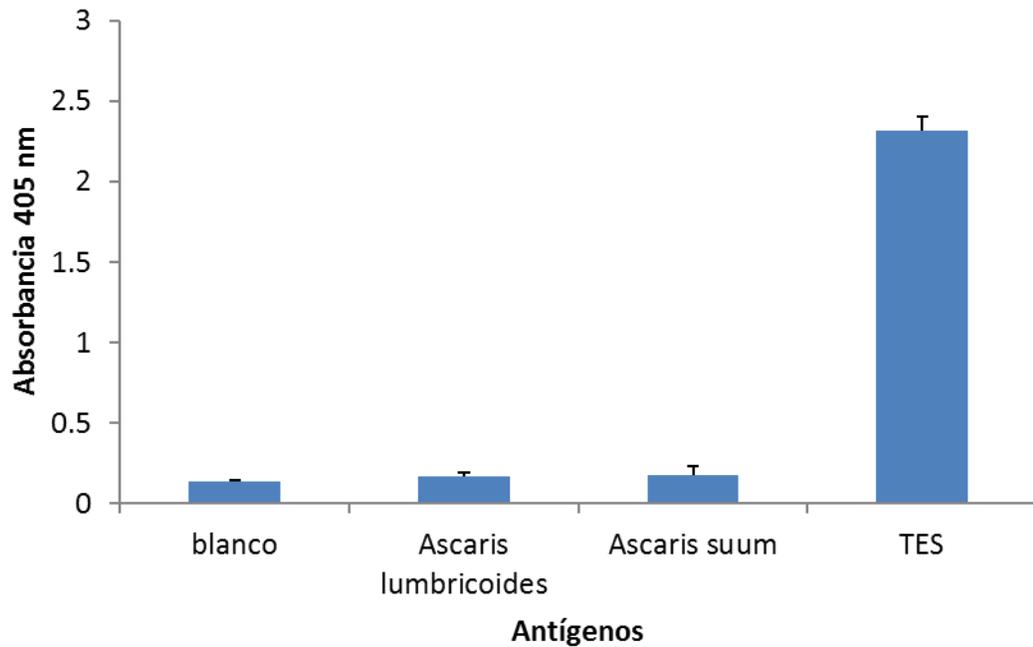


Figura 11. Especificidad de la combinación de nanocuerpos 2TCE49-1TCE39, que se ensayó mediante ELISA sándwich doble anticuerpo.

Seguidamente, se procedió a normalizar las condiciones del ELISA sándwich doble anticuerpo para la detección de los TES circulantes (Figura 12). Las condiciones del ELISA optimizado fueron las siguientes: recubrimiento con el Nc 2TCE49 bivalente biotinilado a concentración de 0,78  $\mu\text{g/mL}$ , nanocuerpo 1TCE39-biotinilado a concentración de 0,016  $\mu\text{g/ml}$  y tiempo de incubación con el sustrato de 18 min. La figura 13 muestra la curva que se obtuvo usando el ELISA sándwich doble anticuerpo optimizado para detectar TES en un sistema simulado usando suero humano. El límite de detección fue de 0,640  $\text{ng/mL}$ .

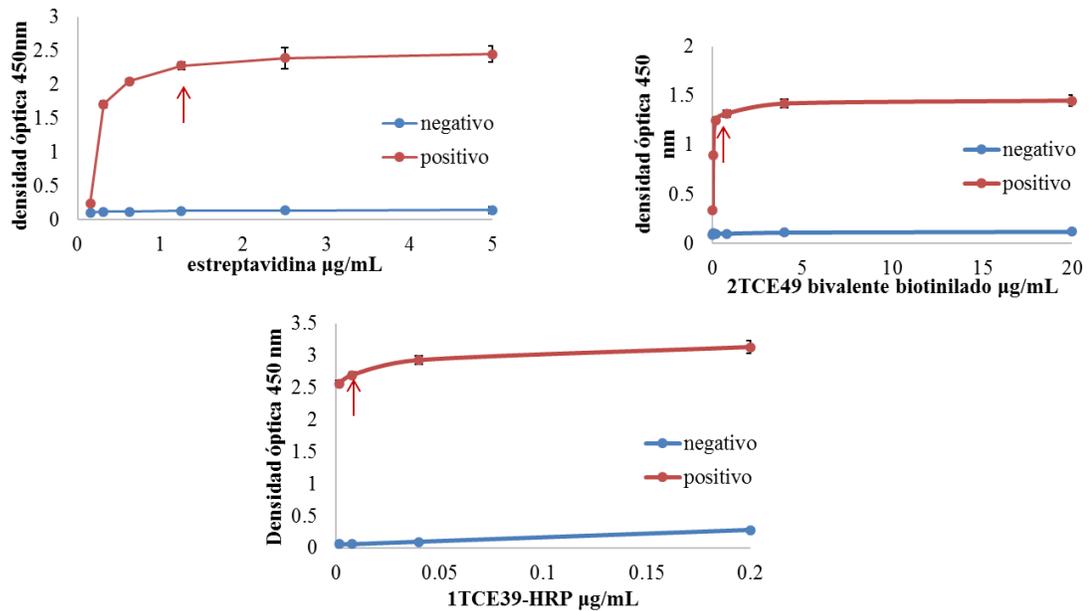


Figura 12. Normalización del ELISA sándwich doble anticuerpo basado en nanocuerpos para la detección de antígenos de excreción-secreción larvales de *Toxocara canis*. Normalización de la oncentración de recubrimiento con streptavidina (A), de la concentración del nanocuerpo 2TCE49 bivalente biotinilado (B) y de la concentración del nanocuerpo 1TCE39 conjugado con peroxidasa de rábano picante (C).

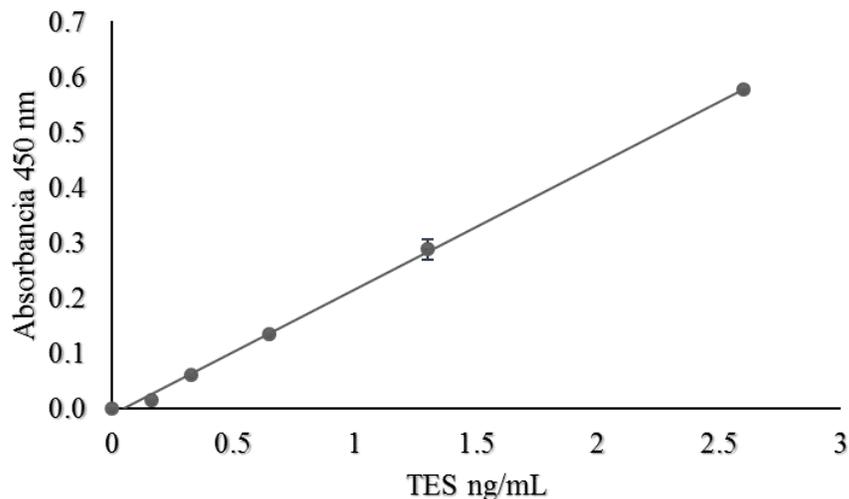


Figura 13. Curva standard del ELISA doble anticuerpo basado en nanocuerpos, que detecta antígenos de excreción-secreción larvales de *Toxocara canis* que se usaron en diluciones dobles seriadas en un sistema simulado en suero ( $R^2=0,997$ ). El nanocuerpo 2TCE49 se usó bivalente biotinilado como captador y el nanocuerpo 1TCE39 se usó conjugado a peroxidasa como detector.

Desde el descubrimiento de Ncs, se ha dedicado un considerable número de investigaciones a su aplicación al diagnóstico. Algunos ejemplos incluyen la detección de una aldolasa de fructosa-1,6 bifosfato glicosomal glucosómica específica de *Trypanosoma congolense* en un formato ELISA sándwich doble anticuerpo (110) o un ELISA doble anticuerpo direccional basado en estreptavidina biotina para detectar la influenza H5N1(111). Ambos casos son representativos de ELISAs sándwich doble anticuerpo diseñados en diferentes formatos para la detección de un agente infeccioso. El ELISA normalizado en la presente investigación difiere de esos EIE ya que como unidades de captura los Ncs se usan bivalentes y biotinilados.

Los Ncs bivalentes poseen una mayor capacidad, con respecto a las construcciones monovalentes, para neutralizar un objetivo determinado (112, 113). Asimismo, las construcciones pentavalentes e incluso decavalentes se han desarrollado con éxito, como una forma de aumentar la avidéz de los aglutinantes de baja afinidad (114, 115). Sin embargo, según la literatura revisada, esta es la primera vez que los Ncs biotinilados bivalentes se clonaron, produjeron y se probaron como unidades de captura en un formato de ELISA sándwich doble anticuerpo direccional.

Teniendo en cuenta lo expresado anteriormente, se obtuvieron nanocuerpos específicos *anti-TES* y con ellos se desarrolló un EIE de tipo ELISA sándwich doble anticuerpo, que detecta los antígenos diana en el orden de los picogramos en un sistema simulado.

Solo unos pocos estudios se han realizado con el objetivo específico de detectar TES circulantes en la TH. Por ejemplo, se notificó un ELISA tipo sándwich doble anticuerpo usando el anticuerpo monoclonal 14D3, cuyo límite de detección fue 4 ng/mL, sin reactividad cruzada con antígenos del estadio adulto de *T. canis*, *A. lumbricoides*, *A. sum* o *Dirofilaria immitis* (57). Por su parte, otro ELISA sándwich doble anticuerpo se desarrolló con anticuerpo monoclonal TCMAB-12 para capturar TES y anticuerpo policlonal de conejo para su detección. En este formato, el límite de detección del ensayo fue también de 4 ng/mL (58). Recientemente, se publicó el desarrollo de un ELISA sándwich doble anticuerpo modificado con anticuerpos policlonales para la captura y con un anticuerpo monoclonal (INP-1E4G4C2) para la detección. Los resultados del presente estudio coincidieron con los obtenidos por esos autores. En ese caso se estimó un límite de detección de 440 pg/mL. Estos autores señalaron que detectaron entre 470 pg/mL y 10 ng/mL de antígeno, en las muestras analizadas, pero solo después de tratarlas con EDTA para propiciar la disociación de los inmunocomplejos circulantes (59).

### **III.3. Determinación de la cinética de antígenos de excreción-secreción larvales/anticuerpos IgG específicos en suero, durante la infección murina experimental con *T. canis*.**

#### **III.3.1. Modelo experimental murino de toxocarosis**

En la presente investigación, como parte del proceso de desarrollo del EIE, se recurrió a la infección experimental en un modelo animal, para conocer la cinética en suero, de los antígenos que se reconocen en el ELISA-Ncs. Para desarrollar los experimentos se seleccionó

el modelo murino ya que, según una revisión de la literatura, entre las especies de animales que se han usado como modelos de hospedero paraténico, para estudiar el efecto de la migración de las larvas, el ratón ha sido de los más utilizados por la similitud entre los cambios que se producen en el animal infectado y los que ocurren en la TH (116).

Diferentes líneas de ratones varían en cuanto a la susceptibilidad a la infección por *Toxocara*. Mientras que algunas líneas son más resistentes, otras retienen un gran número de larvas en sus tejidos. Por ejemplo, los ratones de la línea BALB/c, que se seleccionó para el presente estudio, se muestran excepcionalmente susceptibles a la infección por *T. canis*; en estos ratones la carga larval es mayor cuando se comparan con otras líneas de ratones (116). Debido a esta particular susceptibilidad, los ratones BALB/c resultaron el modelo más apropiado en varios estudios relacionados con el efecto de la dosis de inoculación en el daño a nivel del cerebro y en las estructuras de los ojos, o con la posible conexión con el desarrollo de asma bronquial de tipo alérgica (80, 84, 85). Los ratones BALB/c también se han utilizado para estudiar la respuesta inmune humoral y celular que se produce a consecuencia de la infección por *T. canis* (117-119).

En el estudio de infección experimental de ratones BALB/c con *T. canis* no se observaron problemas de bienestar en los animales, asociados a los procedimientos de inoculación. Durante el seguimiento, no se detectó piloerección y los animales no mostraron problemas relacionados con el acicalamiento, la locomoción, la respiración, ni se observaron convulsiones; tampoco se observó comportamiento agresivo, ni heridas que así lo indicaran.

La ausencia de síntomas clínicos relacionados con la toxocarosis en ratones infectados experimentalmente ya se había señalado cuando se determinaron las diferencias en varias líneas de ratones (BALB/c, C3H, C57Bl, DBA y NMRI) en cuanto a la distribución larval y al curso fisiopatológico de la infección (120). Estos autores encontraron que, aunque la carga larval es mayor en ratones BALB/c, estos animales usualmente no muestran signos clínicos de infección, mientras que varios ejemplares de otras líneas murieron entre las semanas 17-21 pos-infección, luego de mostrar signos relacionados con afectaciones del sistema nervioso central. Estas manifestaciones clínicas pueden ser: somnolencia, cifosis, paresia, incoordinación de movimientos y temblor (120, 121). La presencia de esos síntomas se ha asociado con la utilización de altas dosis de parásitos para realizar la infección experimental. Por ejemplo, las dosis en esos casos han llegado a alcanzar los 1000 parásitos (116).

Transcurridos 45 días después de la infección, se demostró que todos los animales inoculados con el parásito albergaban larvas en los tejidos. La presencia de larvas en el cerebro, el hígado y en los pulmones se confirmó bajo microscopio óptico, luego de digestión ácida de los tejidos (Figura 14).

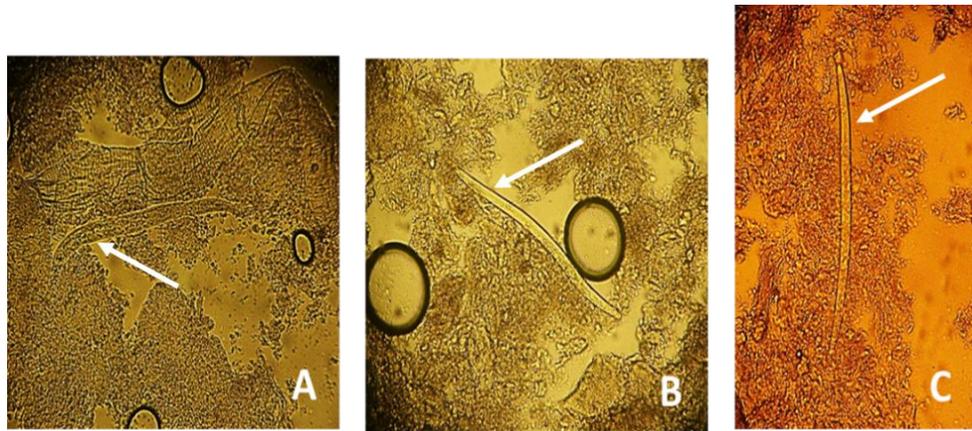


Figura 14. Larvas observadas en tejido cerebral (A y B) y pulmonar (C) de ratones BALB/c infectados con *Toxocara canis* luego de maceración de los tejidos en ácido clorhídrico (0,5%), magnificación 200x.

De manera general, el cerebro fue el órgano más afectado, seguido de los pulmones ( $P < 0,05$ ) en cuanto a la intensidad de la infección. En cuanto al hígado, solo un ratón contenía una única larva en este órgano, el animal pertenecía al G1. La mediana del total de larvas encontradas en cada animal por grupo estuvo asociada con la dosis inoculada ( $P < 0,05$ ) y fue mayor en los animales inoculados con larvas que en los inoculados con huevos embrionados, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla 5).

Tabla 7. Mediana e intervalo del número de larvas de *Toxocara canis* por animal, que se observaron luego de maceración en ácido clorhídrico de los tejidos de vísceras de ratones BALB/c transcurridos 45 días de la infección experimental.

Viscera	Mediana (intervalo) n/grupo=7			
	Vía oral		Vía intraperitoneal	
	H50	H100	L50	L100
Cerebro	2 (0-3)	4 (3-6)	3 (2-5)	6 (5-9)
Pulmones	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	1 (1-2)
Hígado	0 (0-1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	2 (1-3) <sup>a</sup>	4 (3-6) <sup>b</sup>	3 (2-5) <sup>a</sup>	7,5 (5-9) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Muestran diferencias significativas P=0,0001; prueba Kruskal-Wallis

De forma general se ha planteado que una vez inoculados los animales, el comportamiento migratorio de las larvas en órganos y tejidos comprende dos fases: la fase hepatopulmonar y la fase mio-neurotrópica. La primera ocurre durante la primera semana después de la infección cuando las larvas alcanzan el hígado y los pulmones; la segunda, cuando las larvas migran a través del cuerpo y se acumulan en el Sistema Osteomioarticular y en el cerebro (122). Se considera que una larva encapsulada puede permanecer viable hasta 10 años después de la infección (123).

Hallazgos posteriores permitieron concluir que la migración de las larvas es un proceso continuo, que muy probablemente no consiste solo en una simple ruta unidireccional desde la pared del intestino, a través de los pulmones para finalizar en el cerebro y se propone que las larvas podrían acumularse en el cerebro pero que migran y se redistribuyen de forma continua dentro del hospedero paraténico (83). Por lo tanto, las larvas pueden dejar el cerebro para migrar por los tejidos y continuar de nuevo su camino hacia el cerebro. Las evidencias que se

han aportado para esta suposición son el examen histopatológico del hígado en el día 35 pos infección, que reveló la presencia de larvas migratorias que no estaban rodeadas por una reacción inflamatoria. Por otra parte, en la misma sección de tejido, se detectaron granulomas de diferentes edades (124). Esto indicó la posibilidad de que ocurra migración larval continua a través del hígado, aunque probablemente se tratara de un número pequeño de larvas.

En la presente investigación, se encontraron larvas en el cerebro de todos los animales que se inocularon con el parásito y fue en este órgano donde se encontró una mayor carga larval. Anteriormente ya se había publicado evidencia cuantitativa de la acumulación de larvas en el cerebro (116). Esto unido al hecho de que la larva en el cerebro no está encapsulada o rodeada de células inmunes, se considera ventajoso para el parásito (125). Además, se considera que la acumulación de larvas en el cerebro es una forma en la que el parásito se mantiene vivo y se puede transmitir a un hospedero definitivo que ingiera tejido cerebral procedente de un murino infectado (116).

### **III.3.2. Detección de antígenos de excreción secreción larvales de *T. canis* circulantes en suero y de anticuerpos IgG anti-*T. canis***

En la figura 15 se muestra la cinética de la circulación de los antígenos que reconocen los nanocuerpos y de la producción de anticuerpos séricos de tipo IgG contra los TES, en los grupos experimentales de ratones. En los grupos de ratones a los que se administraron huevos embrionados (grupos H50 y H100), los valores de absorbancia obtenidos mediante el ELISA

sándwich doble anticuerpo, se incrementaron sostenidamente a partir del tercer día (Figura 15A). Los valores de absorbancia en ambos grupos se diferenciaron estadísticamente solo en los días 12, 15 y 21 ( $P<0,05$ ).

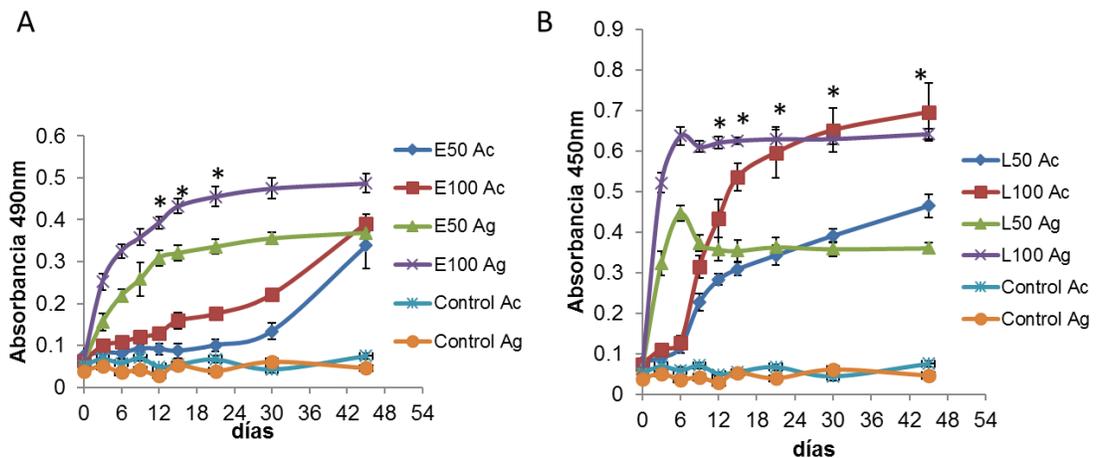


Figura 15. Cinética de los niveles de producción de anticuerpos (Ac) séricos de tipo IgG contra antígenos de excreción-secreción larvales y de la liberación de antígenos (Ag) que se reconocen en el ELISA basado en nanocuerpos, en ratones infectados experimentalmente con *Toxocara canis*. Cada punto representa la media de siete muestras independientes. A: ratones infectados con 50 o 100 huevos embrionados por vía oral. B: ratones infectados con 50 o 100 larvas por vía intraperitoneal. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis (\* $p<0,05$ ).

En cuanto a la detección de anticuerpos IgG, los valores de absorbancia, obtenidos para las muestras de los animales del grupo H50, comenzaron a incrementarse de manera sostenida a partir del día 15 hasta el día 45. El comportamiento fue similar en los ratones del grupo H100 sin que se encontraran diferencias significativas con el grupo G1 (Figura 15A).

En los grupos L50 y L100, la captura de antígenos alcanzó su máximo valor en el sexto día para descender ligeramente en el noveno día y luego mantenerse estable hasta el final del experimento. Los valores de absorbancia, obtenidos por las muestras de los animales del grupo L100, fueron estadísticamente superiores a los obtenidos por el grupo L50, a partir del día 12 ( $P < 0,05$ ). Los niveles séricos de anticuerpos IgG específicos en los grupos L50 y L100 comenzaron a incrementarse desde el noveno día, para continuar incrementándose hasta el final del experimento (Figura 15B). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos L50 y L100, en cuanto a la detección de IgG.

Al comparar los dos grupos de animales infectados con 50 parásitos se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la captura de antígenos, pero solo entre el tercer y el noveno día luego de la infección experimental ( $P < 0,05$ ). Lo mismo ocurrió cuando se compararon los valores de absorbancia entre los animales infectados con 100 huevos embrionados o con 100 larvas ( $P < 0,05$ ). Con respecto a la detección de anticuerpos IgG específicos, al comparar entre ellos, los grupos inoculados con 50 o con 100 parásitos se encontraron diferencias estadísticamente significativas desde el noveno día hasta el final del experimento ( $P < 0,05$ ).

Las investigaciones que se han dedicado a estudiar la respuesta inmune luego de la infección experimental en ratones han encontrado que la magnitud de este tipo de respuesta es directamente proporcional al número de huevos administrados en el hospedero paraténico (126). Se ha encontrado que inóculos tan bajos como 5 huevos son suficientes para provocar una respuesta inmune detectable (119). Estos autores también encontraron que los niveles de

anticuerpos detectados al administrar entre 5 y 125 huevos embrionados se incrementaron desde la segunda hasta la cuarta semana pos infección. Nuestros resultados están en concordancia con estos hallazgos. Similares resultados obtuvieron otros investigadores (101).

Cuando los ratones se infectaron con larvas, los niveles de anticuerpos se incrementaron más temprano, con respecto a los animales infectados con huevos embrionados, este hecho había sido descrito anteriormente (101). Esto pudiera deberse a que las larvas inoculadas por vía intraperitoneal alcanzan el torrente sanguíneo más rápido que aquellas que emergen de los huevos en el intestino del hospedero. En el torrente sanguíneo los parásitos encuentran los diversos actores y se produce el reconocimiento inmunológico.

En todos los animales a los que se les administró el parásito, se detectó la presencia de antígenos circulantes desde el tercer día pos infección. Los niveles de antígenos permanecieron detectables hasta el final del experimento, lo que indicó la presencia de larvas vivas, como se demostró cuando se analizaron los tejidos transcurridos 45 días pos infección en las vísceras analizadas. En los animales infectados con larvas, los niveles de antígenos circulantes descendieron ligeramente después de la primera semana pos infección, para luego mantenerse estables hasta el final del experimento. Este hecho pudiera corresponderse con el incremento de los niveles de anticuerpos IgG en suero que pudieran unir los antígenos y removerlos de la circulación. Similares hallazgos notificaron otros autores que también desarrollaron EIE para la detección de antígenos circulantes (56, 101).

El análisis de los resultados en conjunto nos indica que es posible detectar antígenos séricos circulantes con el nuevo ELISA doble anticuerpo modificado desarrollado sin tener que recurrir a la disociación de los inmunocomplejos circulantes. Sobre todo, si se tiene en cuenta que, el tamaño del inóculo empleado es comparable con lo que ocurre en el humano, a diferencia de otros estudios que han utilizado hasta 2000 huevos embrionados para la infección experimental. Aunque la dosis infectiva del parásito para el humano se desconoce, se presume que las cargas parasitarias son bajas en la mayoría de las infecciones (83). Se pudo corroborar además, que los antígenos diana, perduran en el tiempo y sus niveles parecen estar relacionados con la cantidad de larvas presentes en los tejidos, cuestión que debe ser objeto de una investigación que abarque un intervalo más amplio en cuanto al tamaño del inóculo y explore el comportamiento en la etapa crónica de la infección.

#### **III.4. Evaluación de los ensayos inmunoenzimáticos desarrollados frente a la regla de oro**

El uso de los TES constituyó un avance con respecto al uso de antígenos somáticos en el desarrollo de EIE para el diagnóstico indirecto de la toxocarosis (127). Hasta el presente varios EIE se han optimizado que varían en cuanto al tipo de antígeno utilizado (productos nativos de las larvas de *T. canis*, TES nativos o recombinantes, glicanos o TES deglicosilados) y a la clase o subclase de anticuerpo que detectan (1).

De manera general, los inmunoensayos basados en el uso de TES presentan una elevada sensibilidad y especificidad. Estos EIE necesitan ser validados exhaustivamente en diferentes condiciones y en varios países. Además, no están exentos de limitaciones, por ejemplo: no

permiten distinguir entre una infección pasada y una reciente y se notifica la ocurrencia de reacciones cruzadas con otros helmintos (1).

En el presente trabajo, luego de la optimización de los EIE, la evaluación con muestras de suero permitió determinar los valores de los indicadores de desempeño, que se muestran en la tabla 8. Los EIE indirectos mostraron elevados valores de los indicadores de desempeño, sin embargo, el ELISA sándwich doble anticuerpo basado en Ncs, aunque mostró gran especificidad, reconoció como positivas solo 8 de las 61 muestras de pacientes cubanos con cuadro clínico de toxocarosis; esto significa una sensibilidad de 21%. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguna de las muestras ensayadas de ascariosis, trichuriasis, enterobiosis o infección por ancilostomídeos, en ninguno de los EIE.

Tabla 8. Indicadores de desempeño de los EIE desarrollados frente a la regla de oro.

Indicadores de desempeño (IC 95%)	IgG-ELISA	IgG <sub>4</sub> -ELISA	ELISA-Ncs
Sensibilidad	93,4% (86,4-100)	85,2% (75,5-94,9)	13,1% (3,8-22,4)
Especificidad	96,2% (92,0-100)	97,1% (93,5-100)	100% (99,5-100)
VPP	93,4% (86,4-100)	94,5% (87,6-100)	100% (93,8-100)
VPN	96,2% (92,0-100)	91,9% (86,4-97,4)	66,5% (29,1-44,4)
Kappa	0,89 (0,82-0,96)	0,84 (0,76-0,92)	0,16 (0,06-0,26)
Reacciones cruzadas	No detectadas		

En el presente trabajo, el uso de la FBPM-TES permitió normalizar 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, en la primera investigación que aparece en la literatura, sobre el uso de TES en un EIE de tipo ELISA se obtuvieron valores de sensibilidad igual a 78,3 y 92,3% de especificidad (128), mientras que, en estudios posteriores, se notificaron valores de 80 y 93%, respectivamente (109). Por otra parte, la primera evaluación de un estuche comercial (Biokema-Affinity Products, Crissier-Lausanne, Switzerland) resultó en una sensibilidad diagnóstica de 91% y una especificidad de 86% (129). Otros estuches comerciales muestran un rendimiento similar (51). Más 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 (55).

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. 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 jugar un papel importante en el diagnóstico diferencial de la toxocarosis. De manera general, otros autores informaron de reacciones cruzadas con otras especies de helmintos de los géneros *Filaria*, *Trichinella*, *Strongyloides* y

*Fasciola*, al desarrollar EIE indirectos que se basan en TES sin fraccionar (109, 129). Es de destacar que no se encontró reactividad cruzada en los ELISAs desarrollados en la presente investigación, con las principales helmintiasis que afectan a la población cubana.

Los niveles elevados de IgG<sub>4</sub> se asocian con infección activa en otras infecciones por helmintos como la filariosis y la oncocercosis (130, 131). El presente estudio apoya la idea de que el uso adicional de un ELISA indirecto específico para la subclase IgG<sub>4</sub>, unido a uno para la clase IgG, puede mejorar el serodiagnóstico de *Toxocara*. Cuando ambas pruebas son positivas y los síntomas clínicos, así como otros resultados de laboratorio son indicativos de una infección por *Toxocara*, entonces existe una mayor probabilidad de que el caso sea verdaderamente positivo. Anteriormente se informó una sensibilidad de 64% y una especificidad de 71% para un ELISA que detecta IgG<sub>4</sub> anti-*Toxocara*, pero que se basó en el uso de TES sin fraccionar (132). Los resultados descritos en el presente estudio concuerdan con los publicados por diversos investigadores que utilizaron antígenos TES en ELISA de tipo indirecto, lo que avala la aplicación de los ELISAs desarrollados en el presente estudio para el diagnóstico indirecto de infecciones por *Toxocara* en humanos.

Por otro lado, los inmunoensayos desarrollados pueden ser aplicados en estudios epidemiológicos, entre ellos en la realización de una encuesta nacional. En la literatura relacionada con Toxocarosis, abundan los estudios de la prevalencia en grupos de riesgo, escolares, residentes de comunidades con bajo nivel socioeconómico, con condiciones clínicas específicas (asma, epilepsia), pero son escasas las investigaciones de la prevalencia a nivel nacional. Por ejemplo, se determinó la seroprevalencia en la población de Dinamarca en 2009,

---

que resultó en 2,4% y se consideró baja comparada con otros países europeos (133). Por su parte, en E.U.A. la seroprevalencia a *Toxocara* fue de 5,1%, según resultados de la encuesta nacional de salud y nutrición, realizada entre 2011 y 2014 (134). Más recientemente se estimaron el número de personas seropositivas en la población general de las regiones designadas por la OMS y la seroprevalencia global que alcanzó 19% (135). En Cuba, tampoco existe el antecedente de encuesta nacional para determinar la seroprevalencia de toxocarosis humana. Los inmunoensayos desarrollados nos permitirán estimar la seroprevalencia de la TH en Cuba lo que pudieran vincularse al estudio de la seroprevalencia de otras entidades zoonóticas parasitarias como la toxoplasmosis.

Hasta el presente solo se han realizado unos pocos estudios con el objetivo específico de detectar TES circulantes en muestras clínicas. El primero utilizó el anticuerpo monoclonal Tcn-2 para la captura y el mismo anticuerpo monoclonal para la detección, en un ELISA de dos sitios. Para la realización de este EIE primero recubrieron una placa de microtitulación con un anticuerpo monoclonal, mientras que, en otra placa incubaron las muestras que contenían los antígenos con un conjugado formado por el mismo anticuerpo monoclonal unido a la enzima peroxidasa. Posteriormente, transfirieron la mezcla incubada a la placa recubierta para continuar con el EIE. De veintiocho muestras positivas analizadas, diecinueve fueron positivas por este ELISA, sin embargo, una proporción significativa de muestras con otras infecciones por helmintos también fueron positivas (136). En 1999, un estudio que se realizó en zonas rurales con infección reciente por *A. lumbricoides*, detectó 39,5% de los casos seropositivos mediante un ELISA sándwich doble anticuerpo con suero policlonal de cobayo y conejo (137). En 2007, se desarrolló un ELISA tipo sándwich doble anticuerpo que utilizó

suero policlonal de conejo anti-*TES* para la captura y un conjugado anti-IgG humana marcada con peroxidasa para la detección. Se informó una sensibilidad de 90% en un conjunto de 45 muestras positivas, aunque no se mencionaron los detalles técnicos del procedimiento ni el origen de las muestras (138). Posteriormente, se notificó el desarrollo de un ELISA sándwich doble anticuerpo con el anticuerpo monoclonal TCMAB-12 para capturar *TES* y con anticuerpos policlonales de conejo para la detección (58). Con este EIE se detectaron cuatro de nueve muestras positivas, sin reactividad cruzada con antígenos de otros nematodos. Recientemente, utilizando un ELISA sándwich doble anticuerpo con anticuerpos policlonales para la captura y un anticuerpo monoclonal (INP-1E4G4C2) para la detección, se informó una sensibilidad que no superó 31% en muestras clínicas, a pesar de haber provocado la disociación de los inmunocomplejos circulantes (59).

Aunque la sensibilidad diagnóstica del ELISA-Ncs en el presente estudio fue baja, este EIE representa un avance con respecto a intentos anteriores de detectar los antígenos circulantes en suero durante la TH, debido a que no es necesario disociar los inmunocomplejos para realizar la detección, debido a la mayor sensibilidad del inmunoensayo y con la consiguiente simplificación de la técnica y acortamiento del tiempo de realización. Además, debido a las características de la parasitosis en el humano y a la ausencia de prueba de oro para realizar la comparación, no es posible confirmar la presencia de larvas migrantes en los pacientes positivos y se desconoce si el estado de hipobiosis afecta la producción de *TES*. Por otro lado, las propiedades de los nanocuerpos como unidades modulares que permiten la bioconjugación, el marcaje y la generación de constructos multivalentes posibilitan la exploración y generación de nuevos formatos de EIE de sensibilidad incrementada (87).

Un ejemplo de esos formatos es el sensor electroquímico que se basa en la medición de una señal eléctrica que se registra mediante un transductor electroquímico que puede ser clasificado como amperométrico, potenciométrico, conductométrico o medidor de la impedancia, en dependencia del tipo de señal. Un ejemplo adicional es el inmunosensor electroquimioluminiscente que es una combinación de electroquímica y medición de luminiscencia en espectro visible (139). Cuando se aplica potencial en los electrodos, se excita la superficie del electrodo. Entonces se transfiere un electrón entre moléculas y se mide la luz que se emite como resultado. Este sensor disminuye el límite de detección en tres órdenes de magnitud comparado con sensores electroquímicos (140).

### **III.5. Consideraciones generales**

El desarrollo de EIE ha jugado un importante rol en el mejoramiento del diagnóstico de algunas enfermedades parasitarias y para el estudio epidemiológico de otras (141). Inicialmente las reacciones serológicas tuvieron un valor limitado por las dificultades para obtener buena sensibilidad, especificidad y reproducibilidad. Esto está dado fundamentalmente por la forma empírica de la preparación de antígenos, que en sus inicios eran productos crudos con los cuales se obtenían resultados de poca exactitud. El desarrollo de nuevos métodos de separación y purificación de fracciones antigénicas mejoraron los parámetros de desempeño de los diferentes métodos. Un ejemplo que nos ilustra este cambio es lo obtenido en el presente estudio, en el que se normalizaron EIE para el diagnóstico indirecto de la toxocarosis basados en el uso de una fracción nativa de los TES.

Por otro lado, el uso de Ncs bivalentes biotinilados, se optimizó un ELISA sándwich doble anticuerpo con el cual fue posible detectar TES en muestras séricas de pacientes, aunque la sensibilidad del EIE dista de ser la ideal. Sin embargo, las propiedades de los Ncs permiten explorar nuevos formatos de EIE para lograr, límites de detección más bajos que permitan sortear el reto que presupone los bajos niveles de antígenos circulantes en la TH.

Finalmente, deseamos destacar que los resultados de la presente investigación apoyan activamente al Programa Nacional De Zoonosis del Ministerio de Salud Pública de Cuba, a través de la incorporación de los EIE desarrollados al algoritmo diagnóstico de la toxocarosis en Cuba. En el futuro estos EIE podrán ser aplicados a la evaluación de muestras clínicas a través de la red nacional de salud o a muestras procedentes de áreas vulnerables de otros países de variados contextos epidemiológicos.



# *Conclusiones*

## CONCLUSIONES

- Se desarrollaron ELISAs indirectos para la detección de IgG e IgG<sub>4</sub> anti-*T. canis* a partir de la FBPM-TES, que no mostraron reactividad cruzada con otros helmintos lo que avala el uso del antígeno fraccionado para el diagnóstico serológico específico.
- Se desarrollaron Ncs específicos contra los TES, que posibilitaron optimizar un ELISA sándwich doble anticuerpo que no mostró reacciones cruzadas y que detecta los TES en el rango de los picogramos en un sistema simulado.
- Se demostró que el ELISA sándwich doble anticuerpo basado en Ncs detecta los antígenos parasitarios circulantes en el suero de ratones BALB/c infectados experimentalmente con el parásito, que se mantuvieron en niveles detectables durante todo el experimento, lo que constituye una prueba de concepto y avala su evaluación con muestras clínicas.
- Los EIE ELISA-IgG y ELISA-IgG<sub>4</sub> mostraron buenos indicadores de desempeño, lo cual avala su aplicación en el diagnóstico de la TH.
- El ELISA-Ncs resultó específico, pero su baja sensibilidad indica la necesidad de explorar otros formatos de EIE, que permitan mejorar este indicador de desempeño.



# *Recomendaciones*

## RECOMENDACIONES

- Evaluar el desempeño de los EIE indirectos que se desarrollaron en la presente investigación, en variados contextos epidemiológicos
- Estudiar la circulación de los antígenos que reconoce el ELISA sándwich doble anticuerpo basado en nanocuerpos, en la fase crónica de la infección murina experimental
- Evaluar la utilidad de inmunosensores electroquímicos basados en Ncs para el diagnóstico de la TH
- Desarrollar una estrategia para la obtención de antígenos de excreción-secreción de bajo peso molecular de larvas de *Toxocara canis* con el empleo de la tecnología de ADN recombinante.



# *Referencias bibliográficas*

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ma G, Holland CV, Wang T, Hofmann A, Fan CK, Maizels RM, *et al.* Human toxocariasis. *The Lancet Infectious diseases*. 2018;18(1):e14-e24.
2. Overgaauw PA, van Knapen F. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Veterinary parasitology*. 2013;193(4):398-403.
3. Holland CV. Knowledge gaps in the epidemiology of *Toxocara*: the enigma remains. *Parasitology*. 2017;144(1):81-94.
4. Chen J, Liu Q, Liu GH, Zheng WB, Hong SJ, Sugiyama H, *et al.* Toxocariasis: a silent threat with a progressive public health impact. *Infectious diseases of poverty*. 2018;7(1):59.
5. Alba-Hurtado F, Muñoz-Guzman MA. Toxocarosis: From a One Health perspective. In: Morales-Montor J, Río-Araiza VHD, Bello RH, editors. *Parasitic Helminths and Zoonoses - From Basic to Applied Research*. London: IntechOpen; 2022.
6. Sariego I, Kanobana K, Junco R, Vereecken K, Núñez F, Polman K, *et al.* Frequency of antibodies to *Toxocara* in Cuban schoolchildren. *Tropical medicine & international health*. 2012;17(6):4.
7. 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 in parasitology*. 2014;30(9):456-64.
8. Magnaval JF, Fabre R, Maurieres P, Charlet JP, de Larrard B. Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitology research*. 1991;77(8):697-702.
9. Holland C, Smith HV, editors. *Toxocara: the enigmatic parasite*. UK: CABI Publishing; 2006.
10. Smith H, Holland C, Taylor M, Magnaval JF, Schantz P, Maizels R. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trends in parasitology*. 2009;25(4):182-8.
11. Deckers N, Saerens D, Kanobana K, Conrath K, Victor B, Wernery U, *et al.* Nanobodies, a promising tool for species-specific diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis. *International journal for parasitology*. 2009;39:625-33.
12. Stijlemans BA, De Baetselier P, Caljon G, Van Den Abbeele J, Van Ginderachter JA, Magez S. Nanobodies as tools to understand, diagnose, and treat african trypanosomiasis. *Frontiers in immunology*. 2017;8:724-6.
13. Pinto JE, Goosens J, Ding J. Development of a Nanobody-based lateral flow assay to detect active *Trypanosoma congolense* infections. *Scientific reports* [Internet]. 2018; 9019. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26732-7>.
14. Soulsby EJJ. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. Séptima edición ed. México D.F.: Nueva Editorial Interamericana; 1987.
15. Bowman D. Chapter three - The anatomy of the third-stage larva of *Toxocara canis* y *Toxocara cati*. *Advances in parasitology*. 2020;109:39-61.
16. Sprent JF. Observations on the development of *Toxocara canis* (Werner, 1782) in the dog. *Parasitology*. 1958;48(1-2):184-209.
17. Sariego I, Kanobana K, Rojas L, Speybroeck N, Polman K, Nunez FA. Toxocariasis in Cuba: a literature review. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(2):e1382. Epub 2012/03/06.
18. Brunaska M, Dubinsky P, Reiterova K. *Toxocara canis*: ultrastructural aspects of larval moulting in the maturing eggs. *International journal for parasitology*. 1995;25(6):683-90.

19. Health. Toxocariasis. 2016 [updated 2021 de agosto de 2021]; Available from: [https://lib.dr.iastate.edu/cfsph\\_factsheets/134](https://lib.dr.iastate.edu/cfsph_factsheets/134).
20. Sperotto RL, Kremer FS, Aires Berne ME, Costa de Avila LF, da Silva Pinto L, Monteiro KM, *et al.* Proteomic analysis of *Toxocara canis* excretory and secretory (TES) proteins. *Molecular and biochemical parasitology*. 2017;211:39-47.
21. Wilder HC. Nematode endophthalmitis. *Tr Am Acad Ophth*. 1950;55:99-109.
22. Beaver PC, Snyder CH, Carrera GM, Dent JH, Lafferty JW. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans; report of three cases. *Pediatrics*. 1952;9(1):7-19.
23. Nichols RL. The etiology of visceral larva migrans. I. Diagnostic morphology of infective second-stage *Toxocara* larvae. *The Journal of parasitology*. 1956;42:349-62.
24. Fillaux J, Magnaval JF. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Veterinary parasitology*. 2013;193(4):327-36.
25. Dent JH, Nichols RL, Beaver PC, Carrera GM, Staggers RJ. Visceral larva migrans; with a case report. *The American journal of pathology*. 1956;32(4):777-803.
26. Gonzalez-Quintela A, Gude F, Campos J, Garea MT, Romero PA, Rey J, *et al.* *Toxocara* infection seroprevalence and its relationship with atopic features in a general adult population. *International archives of allergy and immunology*. 2006;139(4):317-24.
27. Ahn SJ, Ryoo NK, Woo SJ. Ocular toxocariasis: clinical features, diagnosis, treatment, and prevention. *Asia Pacific allergy*. 2014;4(3):134-41.
28. Ahn SJ, Woo SJ, Jin Y, Chang YS, Kim TW, Ahn J, *et al.* Clinical features and course of ocular toxocariasis in adults. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(6):e2938.
29. Martinez-Pulgarin DF, Munoz-Urbano M, Gomez-Suta LD, Delgado OM, Rodriguez-Morales AJ. Ocular toxocariasis: new diagnostic and therapeutic perspectives. *Recent patents on anti-infective drug discovery*. 2015;10(1):35-41.
30. Glickman LT, Magnaval JF, Domanski LM, Shofer FS, Lauria SS, Gottstein B, *et al.* Visceral larva migrans in French adults: a new disease syndrome? *American journal of epidemiology*. 1987;125(6):1019-34.
31. Magnaval JF, Glickman LT, Dorchie P, Morassin B. Highlights of human toxocariasis. *The Korean journal of parasitology*. 2001;39(1):1-11.
32. Finsterer J, Auer H. Neurotoxocarosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2007;49(5):279-87. Epub 2007/11/21.
33. Sanchez SS, Garcia HH, Nicoletti A. Clinical and magnetic resonance imaging findings of neurotoxocarosis. *Frontiers in neurology*. 2018;9:53.
34. Berger S. *Infectious Diseases of the World: Guideon*; 2021.
35. Overgaauw PA, van Zutphen L, Hoek D, Yaya FO, Roelfsema J, Pinelli E, *et al.* Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. *Veterinary parasitology*. 2009;163(1-2):115-22.
36. El-Tras WF, Holt HR, Tayel AA. Risk of *Toxocara canis* eggs in stray and domestic dog hair in Egypt. *Veterinary parasitology*. 2011;178(3-4):319-23.
37. Pautova EA, Shchuchinova LD, Dovgalev AS. The development and survival of *Toxocara Canis* eggs in the natural climatic conditions of Gorno-Altai. *Meditinskaiia parazitologii i parazitarnye bolezni*. 2015(2):42-4.
38. Rubinsky-Elefant G, Hirata CE, Yamamoto JH, Ferreira MU. Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 2010;104(1):3-23.

39. Magnaval JF, Michault A, Calon N, Charlet JP. Epidemiology of human toxocariasis in La Reunion. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994;88(5):531-3.
40. Stensvold CR, Skov J, Møller LN, Jensen PM, Kapel CMO, Petersen E, *et al.* Seroprevalence of human toxocariasis in Denmark. *Clinical and vaccine immunology: CVI*. 2009;16(9):1372-3.
41. Fu CJ, Chuang TW, Lin HS, Wu CH, Liu YC, Langinlur MK, *et al.* Seroepidemiology of *Toxocara canis* infection among primary schoolchildren in the capital area of the Republic of the Marshall Islands. *BMC infectious diseases*. 2014;14(261):1-7.
42. Poepl W, Herkner H, Tobudic S, Faas A, Mooseder G, Burgmann H, *et al.* Exposure to *Echinococcus multilocularis*, *Toxocara canis*, and *Toxocara cati* in Austria: a nationwide cross-sectional seroprevalence study. *Vector Borne Zoonotic Diseases*. 2013;13(11):798-803.
43. Dutra GF, Pinto NS, de Avila LF, Dutra PC, Telmo Pde L, Rodrigues LH, *et al.* Risk of infection by the consumption of liver of chickens inoculated with low doses of *Toxocara canis* eggs. *Veterinary parasitology*. 2014;203(1-2):87-90.
44. Krotten A, Toczyłowski K, Oldak E, Sulik A. Toxocarosis in children: poor hygiene habits and contact with dogs is related to longer treatment. *Parasitology research*. 2018;117(5):1513-9.
45. Rajesh S, Patidar Y, Rastogi A, Bihari C. Image of the month: Hepatic visceral larva migrans. *The American journal of gastroenterology*. 2015;110(4):497. Epub 2015/04/09.
46. Cortez RT, Ramirez G, Collet L, Giuliani GP. Ocular parasitic diseases: a review on toxocariasis and diffuse unilateral subacute neuroretinitis. *Journal of pediatric ophthalmology and strabismus*. 2011;48(4):204-12.
47. Pawlowski Z. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *Journal of helminthology*. 2001;75(4):299-305.
48. Yoon SY, Baek S, Park SY, Shin B, Kwon HS, Cho YS, *et al.* Clinical course and treatment outcomes of toxocariasis-related eosinophilic disorder. *Medicine*. 2018;97(37):e12361.
49. Iddawela D, Ehambaram K, Bandara P. Prevalence of *Toxocara* antibodies among patients clinically suspected to have ocular toxocariasis: A retrospective descriptive study in Sri Lanka. *BMC ophthalmology*. 2017;17(1):50.
50. de Visser L, Rothova A, de Boer JH, van Loon AM, Kerkhoff FT, Canninga-van Dijk MR, *et al.* Diagnosis of ocular toxocariasis by establishing intraocular antibody production. *American journal of ophthalmology*. 2008;145(2):369-74.
51. Smith H, Noordin R. Diagnostic limitations and future trends in the serodiagnosis of human toxocariasis. In: Holland C, Smith H, editors. *Toxocara: the enigmatic parasite*. UK: CABI Publishing; 2006. p. 89-112.
52. Yamasaki H, Araki K, Lim PKC, Zasmy N, Mak JW, Taib R, *et al.* Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(4):1409-13.
53. Fong MY, Lau YL, Init I, Jamaiah I, Anuar AK, Rahmah N. Recombinant expression of *Toxocara canis* excretory-secretory antigen TES-120 in *Escherichia coli*. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2003;34(4):723-6.
54. Mohamad S, Azmi NC, Noordin R. Development and evaluation of a sensitive and specific assay for diagnosis of human toxocariasis by use of three recombinant antigens (TES-26, TES-30, and TES-120). *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(6):1712-7.

55. 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 neglected tropical diseases*. 2015;9(10):e0004168.
56. Robertson BD, Burkot TR, Gillespie SH, Kennedy MW, Wambai Z, Maizels RM. Detection of circulating parasite antigen and specific antibody in *Toxocara canis* infections. *Clinical and experimental immunology*. 1988;74(2):236-41.
57. Yokoi K, Kobayashi F, Sakai J, Usui M, Tsuji M. Sandwich ELISA detection of excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* larvae using a specific monoclonal antibody. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2002;33(1):33-7.
58. Ishiyamna S, Ono K, Rai SK, Uga S. Method for detecting circulating *Toxocara canis* antigen and its application in human serum samples. *Nepal Medical College journal: NMCJ*. 2009;11(1):9-13.
59. Rodriguez-Caballero A, Martinez-Gordillo MN, Medina-Flores Y, Medina-Escutia ME, Meza-Lucas A, Correa D, *et al.* Successful capture of *Toxocara canis* larva antigens from human serum samples. *Parasites & vectors*. 2015;8:264.
60. Wang Z, Shibata M, Nguyen YTH, Hayata Y, Nonaka N, Maruyama H, *et al.* Development of nested multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of *Toxocara canis*, *Toxocara cati* and *Ascaris suum* contamination in meat and organ meats. *Parasitology international*. 2018;67(5):622-6.
61. Li MW, Lin RQ, Chen HH, Sani RA, Song HQ, Zhu XQ. PCR tools for the verification of the specific identity of ascaridoid nematodes from dogs and cats. *Molecular and cellular probes*. 2007;21(5-6):349-54.
62. Borecka A, Gawor J. Modification of gDNA extraction from soil for PCR designed for the routine examination of soil samples contaminated with *Toxocara* spp. eggs. *Journal of helminthology*. 2008;82(2):119-22.
63. Borecka A. Differentiation of *Toxocara* spp. eggs isolated from the soil by the PCR-linked RFLP method. *Helminthologia*. 2004;41(4):185-7.
64. Durant JF, Ireng LM, Fogt-Wyrwas R, Dumont C, Doucet JP, Mignon B, *et al.* Duplex quantitative real-time PCR assay for the detection and discrimination of the eggs of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* (Nematoda, Ascaridoidea) in soil and fecal samples. *Parasites & vectors*. 2012;5:288.
65. Khademvatan S, Abdizadeh R, Tavalla M. Molecular characterization of *Toxocara* spp. from soil of public areas in Ahvaz southwestern Iran. *Acta tropica*. 2014;135:50-4.
66. Moura MQ, Macedo MRP, Terto W, Avila L, Leivas Leite FP, Scaini CJ, *et al.* Detection of *Toxocara canis* DNA in tissues of experimentally infected mice. *Acta tropica*. 2018;187:51-6.
67. Hotez PJ, Wilkins PP. Toxocariasis: America's Most Common Neglected Infection of Poverty and a Helminthiasis of Global Importance? *PLoS neglected tropical diseases*. 2009;3(3):e400. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000400>.
68. Magnaval JF, Dorchie P, Glickman L. *Toxocara* species (Toxocariosis). In: Yu VL, *al. e*, editors. *Antimicrobial therapy and vaccines*. 2nd ed. Pittsburgh PA, USA: ESun Technologies LLC; 2005.
69. Vidal JE, Sztajn bok J, Seguro AC. Eosinophilic meningoencephalitis due to *Toxocara canis*: case report and review of the literature. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2003;69(3):341-3.

70. Fernández JE, López-Hidalgo A, Sitchao N. Larva migrans visceral. Reporte de siete casos del hospital militar escuela "Dr. Carlos J. Finlay". Revista cubana de medicina tropical. 1974;26:1-2.
71. Montalvo AM, Espino AM, Escalante G, Finlay CM. Study of the seroprevalence of toxocariasis in an infantile population in the City of Havana. Revista cubana de medicina tropical. 1994;46(3):156-8.
72. Dumenigo B, Lau N, Bravo JR. Prevalence of *Toxocara canis* in dogs in the City of Havana. Revista cubana de medicina tropical. 1994;46(2):99-102.
73. Laird RM CD, Reyes EM, García R, Prieto V. *Toxocara* sp. en parques y zonas públicas de Ciudad de La Habana. Rev Cubana Hig Epidemiol. 1995;58:116-8.
74. Hernández R, Núñez F, Pelayo L. Potencial zoonótico de las infecciones por helmintos intestinales en perros callejeros de Ciudad de La Habana. Revista cubana de medicina tropical. 2007;59:234-40.
75. Gómez L, Rueda T, Pulido C, Sanchez-Roman J. Ocular toxocariasis. A case report. Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia. 2008;83(1):49-52.
76. Luis MC, Moroño M, Cabrera R, González M, Morales MS, Silva R. Larva migrans ganglionar: Presentación de un caso. Revista Cubana de Pediatría [Internet]. 2003 dic 04 2019; 75(1). Sariego I, Kanobana K, Rojas L, Speybroeck N, Polman K, Núñez FA. Toxocariasis in Cuba: a literature review. PLoS neglected tropical diseases [Internet]. 2012; 6:e1382. doi:10.1371/journal.pntd.0001382
78. Chang M, Fernandez L, Rodriguez B, Rodriguez V, García L, Vila I. Toxocariasis ocular en el adulto asociada a cirugía de vitrectomía mínimamente invasiva. Revista Cubana de Oftalmología [Internet]. 2018 17 dic. 2021; 31(1). Available from: <http://www.revoftalmologia.sld.cu/index.php/oftalmolog>.
79. O'Reilly-Noda D, Miña-Oliveros L, Menéndez-Hernández Y. Toxocariasis ocular. A propósito de un caso. Revista Médica Electrónica [Internet]. 2018 17 Dic. 2021; 40(6). Available from: <http://www.revmedicaelectronica.sld.cu/index>.
80. Hamilton CM, Stafford P, Pinelli E, Holland CV. A murine model for cerebral toxocariasis: characterization of host susceptibility and behaviour. Parasitology. 2006;132(Pt 6):791-801.
81. Summers B, Cypess RH, Dolinsky ZS, Burright RG, Donovan PJ. Neuropathological studies of experimental toxocariasis in lead exposed mice. Brain research bulletin. 1983;10(4):547-50.
82. Holland CV, Cox DM. *Toxocara* in the mouse: a model for parasite-altered host behaviour? Journal of helminthology. 2001;75(2):125-35.
83. Othman AA. Therapeutic battle against larval toxocariasis: are we still far behind? Acta tropica. 2012;124(3):171-8.
84. Pinelli E, Dormans J, Fonville M, van der Giessen J. A comparative study of toxocariasis and allergic asthma in murine models. Journal of helminthology. 2001;75(2):137-40.
85. Ollero MD, Fenoy S, Cuellar C, Guillen JL, Del Aguila C. Experimental toxocariosis in BALB/c mice: effect of the inoculation dose on brain and eye involvement. Acta tropica. 2008;105(2):124-30.
86. Huang L, Muyldermans S, Saerens D. Nanobodies: proficient tools in diagnostics. Expert Rev Mol Diagn. 2010;10:777-85.
87. Muyldermans S. A guide to: generation and design of nanobodies. The FEBS Journal. 2020;288:2084-102.

88. Yang E, Shah K. Nanobodies: Next Generation of Cancer Diagnostics and Therapeutics. *Front Oncol* [Internet]. 2020; 10(1182).
89. Hyunjung B, Kyoung-ho S, Yong-hwan K, Sanhoon C. An improved helper phage system for efficient isolation of specific antibody molecules in phage display. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(5).
90. Conrath K, Lauwereys M, Galleni M, Matagne A, Frere JM, kinne J, *et al.* Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the *Camelidae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2001;45:2807-12.
91. Cloutier SM, Couty S, Terskikh A, Marguerat L, Crivelli V, Pugnieres M, *et al.* Streptabody, a high avidity molecule made by tetramerization of *in vivo* biotinylated, phage display-selected scFv fragments on streptavidin. *Mol Immunol.* 2000;37:1067-77.
92. Dafei C, Gang W, Fang L, Huizhong L, Shanshan L, Haiying Z, *et al.* The optimization system for preparation of TG1 competent cells and electro transformation. *Microbiology open* [Internet]. 2020; 9(7). doi: 10.1002/mb03.1043
93. Ahmedani A, Aljuboori M. Expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Method* [Internet]. 2018. doi: 10.13140/RG.2.2.15148.16000
94. Mozgovoi AA. Ascaridia of animals and man and the disease caused by them. *Osnovy Nematodologii.* 1953;2(6):532-4.
95. Savigny DH. *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. *The Journal of parasitology.* 1975;61(4):781-2.
96. Alcantara-Neves NM, dos Santos AB, Mendonca LR, Figueiredo CA, Pontes-de-Carvalho L. An improved method to obtain antigen-excreting *Toxocara canis* larvae. *Experimental parasitology.* 2008;119(3):349-51.
97. Schagger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols* [Internet]. 2006; 1(1). Available from: <http://www.nature.com/natureprotocols>.
98. Vincke C, Gutierrez C, Wernery U, Devoogdt N, Hassanzadeh-Ghassabeh G, Muyldermans S. generation of single domain antibody fragments derived from camelids and generation of manifold constructs. In: Chames P, editor. *Antibody engineering: methods and protocols.* Second edition ed: Springer Sciences+Business media; 2012. p. 145-76.
99. Sanger F, Niclen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1977;74:5463-7.
100. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 6.0. *Molecular Biology and Evolution.* 2013;30:2725-9.
101. Rodriguez-Caballero A, Martinez-Gordillo MN, Caballero-Salazar S, Rufino-Gonzalez Y, Ponce-Macotella M. *Toxocara canis*: Analysis of the kinetics of antigen release and antibody production in an *in vivo* model for the detection of past or present infection. *Veterinary parasitology.* 2017;243:183-7.
102. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1997;1:159-74.
103. Morton DB. *Removal of blood from laboratory animals and birds.:* Laboratory animal Ltd Royal Society of Medicine Press; 2001.
104. Badley JE, Grieve RB, Bowman DD, Glickman LT, Rockey JH. Analysis of *Toxocara canis* larval excretory-secretory antigens: physicochemical characterization and antibody recognition. *The Journal of parasitology.* 1987;73(3):593-600.

105. del Aguila C, Cuellar C, Guillen JL. Excretory/secretory antigen of *Toxocara canis*: recognition profiles of polyclonal and larvicidal monoclonal antibodies. *Parasite immunology*. 1988;10(2):237-41.
106. Williamson HJ, Allardyce RA, Clemett RS, Hidajat RR. Serum and neutrophils alter the rate of excretory/secretory antigen release by *Toxocara canis* infective larvae *in vitro*. *Parasite immunology*. 1990;12(2):175-87.
107. Maizels RM, de Savigny D, Ogilvie BM. Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite immunology*. 1984;6(1):23-37.
108. Meghji M, Maizels RM. Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Molecular and biochemical parasitology*. 1986;18(2):155-70.
109. Speiser F, Gottstein B. A collaborative study on larval excretory/secretory antigens of *Toxocara canis* for the immunodiagnosis of human toxocariasis with ELISA. *Acta tropica*. 1984;41(4):361-72.
110. Odongo S, Sterckx YGJ, Stijlemans BA, Pillay D, Baltz T, Muyltermans S, *et al.* An Anti-proteome Nanobody Library Approach Yields a Specific Immunoassay for *Trypanosoma congolense* Diagnosis Targeting Glycosomal Aldolase. *PLoS neglected tropical diseases* [Internet]. 2016; 10: e0004420. doi:10.1371/journal.pntd.0004420.
111. Zhu M, Gong X, Hu Y, Ou W, Wan Y. Streptavidin-biotin-based directional double Nanobody sandwich ELISA for clinical rapid and sensitive detection of influenza H5N1. *Journal of Translational Medicine*. 2014;12:352.doi: 10.1186/s12967-014-0352-5.
112. Hmila I, Saerens D, Ben Abderrazek R, Vincke C, Abidi N, Benlasfar Z, *et al.* A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming. *FASEB J*. 2010;24:3479-89.
113. Unger M, Eichhoff AM, Schumacher L, Strycio M, Menzel S, Schwan C, *et al.* Selection of nanobodies that block the enzymatic and cytotoxic activities of the binary *Clostridium difficile* toxin CDT. *Scientific reports*. 2015;5:7850.
114. Zhang J, Li Q, Nguyen TD, Tremblay TL, Stone E, To R, *et al.* A pentavalent single-domain antibody approach to tumor antigen discovery and the development of novel proteomics reagents. *J Mol Biol*. 2004;341:161-9.
115. Stone E, Hiramata T, Tanha J, Tong-Sevinc H, Li S, MacKenzie CR, *et al.* The assembly of single domain antibodies into bispecific decavalent molecules. *Journal of immunological methods*. 2007;318:88-94.
116. Strube C, Heuer L, Janecek E. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Veterinary parasitology*. 2013;193(4):375-89.
117. Pinelli E, Withagen C, Fonville M, Verlaan A, Dormans J, van Loveren H, *et al.* Persistent airway hyper-responsiveness and inflammation in *Toxocara canis*-infected BALB/c mice. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2005;35(6):826-32.
118. Chieffi PP, Santos SV, Queiroz ML, Lescano SA. Human toxocariasis: contribution by Brazilian researchers. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2009;51(6):301-8.
119. Fonseca GRE, Santos SVD, Chieffi PP, Paula FM, Gryscek RCB, Lescano SAZ. Experimental toxocariasis in BALB/c mice: relationship between parasite inoculum and the IgG immune response. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2017;112(5):382-6.
120. Epe C, Sabel T, Schnieder T, Stoye M. The behavior and pathogenicity of *Toxocara canis* larvae in mice of different strains. *Parasitology research*. 1994;80(8):691-5.

121. Cox DM, Holland CV. Relationship between three intensity levels of *Toxocara canis* larvae in the brain and effects on exploration, anxiety, learning and memory in the murine host. *Journal of helminthology*. 2001;75(1):33-41.
122. Abo-Shehada MN, Herbert IV. The migration of larval *Toxocara canis* in mice. II. Post-intestinal migration in primary infections. *Veterinary parasitology*. 1984;17(1):75-83.
123. Beaver PC. Toxocarosis (visceral larva migrans) in relation to tropical eosinophilia. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales*. 1962;55:555-76.
124. Othman AA, El-Shourbagy SH, Soliman RH. Kinetics of Foxp3-expressing regulatory cells in experimental *Toxocara canis* infection. *Experimental parasitology*. 2011;127(2):454-9.
125. Dunsmore JD, Thompson RC, Bates IA. The accumulation of *Toxocara canis* larvae in the brains of mice. *International journal for parasitology*. 1983;13(5):517-21.
126. Kayes SG. Inflammatory and immunological responses to *Toxocara canis*. In: Holland C, Smith H, editors. *The enigmatic parasite*. Cambridge, USA: CABI Publishing; 2006. p. 158-73.
127. de Savigny DH, Voller A, Woodruff AW. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *Minerva. Journal of clinical pathology*. 1979;32(3):284-8.
128. Glickman L, Schantz P, Dombroske R, Cypess R. Evaluation of serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1978;27(3):492-8.
129. Jacquier P, Gottstein B, Stingelin Y, Eckert J. Immunodiagnosis of toxocarosis in humans: evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. *Journal of clinical microbiology*. 1991;29(9):1831-5.
130. Kwan-Lim GE, Forsyth KP, Maizels RM. Filarial-specific IgG4 response correlates with active *Wuchereria bancrofti* infection. *Journal of Immunology*. 1990;145:4298-305.
131. Lucius R, Kern A, Seeber F, Pogonka T, Willenbacher J, Taylor HR, *et al.* Specific and sensitive IgG<sub>4</sub> immunodiagnosis of onchocerciasis with a recombinant 33 kD *Onchocerca volvulus* protein (OV33). *Tropical Medicine Parasitology*. 1992;43:139-45.
132. Watthanakulpanich D, Smith HV, Hobbs G, Whalley AJ, Billington D. Application of *Toxocara canis* excretory-secretory antigens and IgG subclass antibodies (IgG1-4) in serodiagnostic assays of human toxocariasis. *Acta tropica*. 2008;106(2):90-5.
133. Stensvold CR, Skov J, Moller LN, Jensen PM, Kapel CM, Petersen E, *et al.* Seroprevalence of human toxocariasis in Denmark. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2009;16(9):1372-3.
134. 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 neglected tropical diseases*. 2017;11(7):e0005818.
135. 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 neglected tropical diseases* [Internet]. 2019; 13.
136. Gillespie SH, Bidwell D, Voller A, Robertson BD, Maizels RM. Diagnosis of human toxocariasis by antigen capture enzyme linked immunosorbent assay. *Journal of clinical pathology*. 1993;46(6):551-4.
137. Luo ZJ, Wang GX, Yang CI, Luo CH, Cheng SW, Liao L. Detection of circulating antigens and antibodies in *Toxocara canis* infection among children in Chengdu, China. *The Journal of parasitology*. 1999;85(2):252-6.
138. Iddawela R, Rajapakse R, Perera N, Agatsuma T. Characterization of a *Toxocara canis* species-specific excretory-secretory antigen (TcES-57) and development of a double sandwich

ELISA for diagnosis of visceral larva migrans. The Korean journal of parasitology. 2007;45(1):19-26.

139. Mollarasouli F, Kurbanoglu S, Ozkan SA. The role of electrochemical immunosensors in clinical analysis. Biosensors [Internet]. 2019; 9. Available from: <https://doi.org/10.3390/bios9030086>.

140. Chatterjee S, Fujimoto MS, Hsuan Y, kargupta R, Soltis J, Motkuri RK, *et al*. Improving the sensitivity of electrochemical sensors through a complementary luminiscent mode. A new spectroelectrochemical approach. Sensors and Actuators B: Chemical. 2019;284:663-74.

141. Alhadj M, Farhana A. Enzyme linked Immunosorbent assay. StatPearls publishing. Treasure island (FL). 2022.



*Anexos*

## Anexo 1

Secuencias nucleotídicas de los nanocuerpos específicos contra antígenos de excreción-secreción larvales de *Toxocara canis*.

```

*          20          *          40          *          60          *          80          *          100
1TCE19 : CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAACCTGGGGGGTCTCTGAGGCTCTCCTGTAAGCCTC-----TGGATTCCGCTTTCGAGC : 91
1TCE25 : CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAAGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC-----TGGATTCACTTTAGAAC : 91
1TCE21 : CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGGTCTCTGAGACTCGCCTGCGAAGCCTC-----TGGCGTCACTTTCAATG : 91
1TCE39 : CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAAGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTC-----TGGATTCCGCTTCGATG : 91
2TCE18 : CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAAGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTC-----TGGATTCCGCTTCGATG : 91
1TCE49 : CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAAGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTAAGCCTC-----TGGATTCACTTTGGCGC : 91
1TCE52 : CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAAGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTAAGCCTC-----TGGATTCACTTTGGCGC : 91
1TCE37 : CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAAGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC-----TGGTATCACTTTGGATT : 91
1TCE24 : CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAAGCTGGGGACTCTCTGAGACTTACCTGTACAGCCTCG-----TGGACGCTCCTTCAGCG : 94
1TCE69 : CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAAGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACAGCCTCTGA-----TGGACGCTCCTTCAGCG : 94
1TCE92 : CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGATTTGGTGCAAGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCTGTACAGCCTCTGG-----TGGACGCTCCTTCAGTG : 94
2TCE90 : CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAAGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCGCTGTACAGCCTCTGG-----TGGACGCTCCTTCAGTG : 94
2TCE24 : CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAAGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACAGTCTCCATCCTCTGGAGACACCTTCAGCG : 100
2TCE61 : CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGATTTGGTGCAAGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACAGTCTCCATCCTCTGGAGACACCTTCAGCG : 100
2TCE87 : CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGATTTGGTGCAAGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACTGCCTCTATGCTTCTGGAGCAGCCTTCAGTG : 100
2TCE44 : CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGATCGGTGCAAGCTGGGGACTCGCTGAGGCTCTCCTGTGTGCCTC-----CGGAGGATCTTCAGTG : 91
2TCE13 : CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAAGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGAAGTCTC-----TACTGCATCTTCAGTA : 91
2TCE19 : CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGATTTGGTGCAAGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGAAGTCTC-----TACTGCATCTTCAGTA : 91
2TCE78 : CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAAGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGAAGTCTC-----TACTGCATCTTCAGTA : 91
2TCE49 : CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGATTTGGTGCAAGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTATATTTCTC-----TGGAGCATCTTCAGTA : 91

*          120          *          140          *          160          *          180          *          200
1TCE19 : ATTTAGCCATAGGCTGGTTCCGCCAGGAGCCAGGGAAGGAGCGTGGGGGGTGTGATATATAGTATTAGTATGGCAGC---ACATACATACAGACTC : 188
1TCE25 : GTTATGCCATAGGCTGGTTCCGCCAGGAGCCAGGGAAGGAGCGTGGGGGGTGTGATATATAGTATTAGTATGGCAGC---ACGATATAGAAACGC : 188
1TCE21 : ATCATTCATAGGCTGGTTCCGCCAGGAGCCAGGGAAGGAGCGTGGGGGGTGTGATATATAGTATTAGTATGGCAGC---GAT---ACATATATAGAAAGC : 182
1TCE39 : ATTCGGTCTGATACCTGGTTCCGCCAGGAGCCAGGGAAGGAGCGTGGGGGGTGTGATATATAGTATTAGTATGGCAGC---ACATTCGTTATGGACTC : 188
2TCE18 : ATTCGGTCTGATACCTGGTTCCGCCAGGAGCCAGGGAAGGAGCGTGGGGGGTGTGATATATAGTATTAGTATGGCAGC---ACATTCGTTATGGACTC : 188
1TCE49 : ACTATAGTATAGGCTGGTTCCGCCAGGAGCCAGGGAAGGAGCGTGGGGGGTGTGATATATAGTATTAGTATGGCAGC---ACACACTATACAGACTC : 188
1TCE52 : ACTATAGTATAGGCTGGTTCCGCCAGGAGCCAGGGAAGGAGCGTGGGGGGTGTGATATATAGTATTAGTATGGCAGC---ACACACTATACAGACTC : 188
1TCE37 : ATTTAGCCATAGGCTGGTTCCGCCAGGAGCCAGGGAAGGAGCGTGGGGGGTGTGATATATAGTATTAGTATGGCAGC---ACAGACTATGAGACTC : 188
1TCE24 : ATCTTGACATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAATTTGTAGCAGCCGTTATTTGGCTCGGTTAAGCAGATATATACAGCAGACTC : 194
1TCE69 : ATCTTGACATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAATTTGTAGCAGCCGTTATTTGGCTCGGTTAAGCAGATATATACAGCAGACTC : 194
1TCE92 : ATCTTGACATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAATTTGTAGCAGCCGTTATTTGGCTCGGTTAAGCAGATATATATATGAGACTC : 194
2TCE90 : ATCTTGACATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAATTTGTAGCAGCCGTTATTTGGCTCGGTTAAGCAGATATATATATGAGACTC : 194
2TCE24 : ACTATGACCTGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAATTTGTAGCAGCCGTTATTTGGCTCGGTTAAGCAGATATATATATGAGACTC : 200
2TCE61 : ACTATGACCTGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAATTTGTAGCAGCCGTTATTTGGCTCGGTTAAGCAGATATATATATGAGACTC : 200
2TCE87 : ACTATGACATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAATTTGTAGCAGCCGTTATTTGGCTCGGTTAAGCAGATATATATATGAGACTC : 200
2TCE44 : TTCTTCCATAGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAATTTGTAGCAGCCGTTATTTGGCTCGGTTAAGCAGATATATATATGAGACTC : 188
2TCE13 : TCAATTCATAGGCTGGTTACCGCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGGAGTGGTCCGCTTTATTAAGTATGATAGTATATAC---AAAGACTATGGCAGACTC : 188
2TCE19 : TCAATTCATAGGCTGGTTACCGCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGGAGTGGTCCGCTTTATTAAGTATGATAGTATATAC---AAAGACTATGGCAGACTC : 188
2TCE78 : TCAATTCATAGGCTGGTTACCGCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGGAGTGGTCCGCTTTATTAAGTATGATAGTATATAC---AAAGACTATGGCAGACTC : 188
2TCE49 : TCAATGCGTGGCTGGTTACCGCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGGAGTGGTCCGCTTTATTAAGTATGATAGTATATAC---GAA---TATAGAGACTC : 185

*          220          *          240          *          260          *          280          *          300
1TCE19 : CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGTAAACCGCCAGAGAACCGGTGTATCTGCAAAATGAACAACCTGAAACCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGT : 288
1TCE25 : TGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGCAGCAACCGTAAAGAACCGGTGTATCTAGCAATGAGCAGCCTGAAACCCGAGCAGCAGCCGTTTATTACTGT : 288
1TCE21 : CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAAAGACGACCGCCAGAACCGGTGTATCTCAAAATGACTCGCCTGAGACTGAGGACTCGGCCAATTTATTACTGT : 282
1TCE39 : CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCGTGACAGCTCTAAGAACCGGTGGATCTAGAAATGGTCAACTTGAACCCGAGGACACGGCCGTTTATTACTGT : 288
2TCE18 : CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCGTGACAGCTCTAAGAACCGGTGGATCTAGAAATGGTCAACTTGAACCCGAGGACACGGCCGTTTATTACTGT : 288
1TCE49 : TGTAAAGGGTCGATTACCATCTCCAAAGACGATCCGAGAAATCGGTTGATCTAACAATGAACAACCTGAAGGTTGAGGATACGGCCGTTTATTACTGT : 288
1TCE52 : TGTAAAGGGTCGATTACCATCTCCAAAGACGATCCGAGAAATCGGTTGATCTAACAATGAACAACCTGAAGGTTGAGGATACGGCCGTTTATTACTGT : 288
1TCE37 : CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCTGGACAATCAAGAACCGGTGTACTGCAAAATGAACAACCTGAAACCTGAAGACACGGCCGTTTATTACTGT : 288
1TCE24 : CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAAAGACGACCGCAGAACCTCGGTGGCTTGGATATGAACGCTCTGGGTCAGATGACTCCGCCAATTTATTACTGT : 294
1TCE69 : CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAAAGACGACCGCAGAACCGGTGACTTTGGATATGAACGCTCTGGGACAGAGGACTCCGCCAATTTATTACTGT : 294
1TCE92 : CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAAAGACGACCGCAGAACCTCGGTGGCTTGGATATGAACGCTCTGGGACAGAGACTCCGCCAATTTATTACTGT : 294
2TCE90 : CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAAAGACGACCGCAGAACCTCGGTGGCTTGGATATGAACGCTCTGGGACAGAGACTCCGCCAATTTATTACTGT : 294
2TCE24 : CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAAAGACGACCGCAGAACCTCGGTGACTTTGGATATGAGAAGTCTGGGACAGAGGACTCCGCCGTTTATTACTGT : 300
2TCE61 : CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAAAGACGACCGCAGAACCTCGGTGACTTTGGATATGAGAAGTCTGGGACAGAGGACTCCGCCGTTTATTACTGT : 300
2TCE87 : CAGGAAGGGCCGATTACCATCTCCAAAGACGACCGCAGAACCTCGGTGGCTTGGATATGAGAAGTCTGGGACAGAGGACTCCGCCGTTTATTACTGT : 300
2TCE44 : CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACGACCGCAGAACCGGTGTATCTGCAAAATGAACGCTGAAACCTGAGGACTCGGCCGTTTATTACTGT : 288
2TCE13 : CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAGAACTCCAGAACCGGTGGCTAGAGATGAACAACCTGAAACTGAGGACACGGCCGCTTATACCTGT : 288
2TCE19 : CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAGAACTCCAGAACCGGTGGCTAGAGATGAACAACCTGAAACTGAGGACACGGCCGCTTATACCTGT : 288
2TCE78 : CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAGAACTCCAGAACCGGTGGCTAGAGATGAACAACCTGAAACTGAGGACACGGCCGCTTATACCTGT : 288
2TCE49 : CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAAGAGACGACCGCAGAACCGTTTATCTGCAAAATGAAGACTGAGGACACGGCCGCTTATACTGT : 285

```

```
*          320          *          340          *          360          *          380          *          400
1TCE19 : GCAGGCG--CTCTCTTACTGCTGATATA-----GCGATATTTGACTGGGATTATGAGTACTGGGGCCGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAG : 376
1TCE25 : GCAGCAG--CTCACGAAACCGCTGACATA-----CCAATTATGGACTGGGAGTATCGCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAG : 376
1TCE21 : GCCGCAGAGATTTTGGAAAATGTGATACGTGGTCCACGTATCGCTGATTCTGGGGTTGACTACTGGGGCCAAAGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAG : 382
1TCE39 : GCAGCAGAGCCACAGCGTTATCCTGCCTGT-----CTCCCCCTCGATTATGCCTATGATTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAG : 379
2TCE18 : GCAGCAGAGCCACAGCGTTATCCTGCCTGT-----CTCCCCCTCGATTATGCCTATGATTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAG : 379
1TCE49 : GCGCGAGATCGGAGGCTTTATTTGGAACG-----GGCCTGGGGAGTAATGAATATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAG : 379
1TCE52 : GCGCGAGATCGGAGGCTTTATTTGGAACG-----GGCCTGGGGAGTAATGAATATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAG : 379
1TCE37 : GCGACAGATCGAAA---TCACGGAATGTTG-----TACCGGGGGCCCTGTGAGTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAG : 376
1TCE24 : GC---AGGTCGCCTCGGAATGGTGG-----CGATCGTTCTCTCTATGACTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAG : 379
1TCE69 : GC---AGGTCGCCTCGGAATGGTGG-----CGATCGTTCTCTTTATGACTATGATTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAG : 379
1TCE92 : GC---AGCACGCCTTGAATGGTAG-----CCGATCGTTCTCTTTATGACTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAG : 379
2TCE90 : GC---AGCACGCCTCGGAATGGTAG-----CCGATCGTTCTCTTTATGACTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAG : 379
2TCE24 : GC---AGGTCGCCTCGGAATGGTGG-----CGATCGTTCTCTTTATGACTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAG : 385
2TCE61 : GC---AGGTCGCCTCGGAATGGTGG-----CGATCGTTCTCTTTATGACTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAG : 385
2TCE87 : GC---AGGTCGCCTCGGAATGGTGG-----CGATCGTTCTCTTTATGACTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAG : 385
2TCE44 : GC---AGGGAGCCATGCTATTATGGATCGGC----CGAACCATATGGAGATAAGTACGACTATTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAG : 379
2TCE13 : AACCTGGGGCGCGATATCGCTTTGGTG-----TCTACTACCTGAGAACTTCGGTTTTTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAG : 376
1TCE19 : AACCTGGGGCGCGATATCGCTTTGGTG-----TCCACTACCTGAGAACTTCGGTTTTTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAG : 376
2TCE78 : AACCTGGGGCGCGATATCGCATTGGTG-----TCCACTACCTGAGAACTTCGGTTTTTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAG : 376
2TCE49 : AACCTAGGGGGCGGATTCACAGCGGAAGAG-----CATTTTACATTTGAGAAATTTGGCTTGTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAG : 379
```

```
*          420          *          440          *
1TCE19 : CGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCATCACCATCACTAG : 435
1TCE25 : CGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCATCACCATCACTAG : 435
1TCE21 : CGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCATCACCATCACTAG : 441
1TCE39 : CGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCATCACCATCACTAG : 438
2TCE18 : CGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCATCACCATCACTAG : 438
1TCE49 : CGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCATCACCATCACTAG : 438
1TCE52 : CGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCATCACCATCACTAG : 438
1TCE37 : CGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCATCACCATCACTAG : 435
1TCE24 : CGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCATCACCATCACTAG : 438
1TCE69 : CGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCATCACCATCACTAG : 438
1TCE92 : CGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCATCACCATCACTAG : 438
2TCE90 : CGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCATCACCATCACTAG : 438
2TCE24 : CGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCATCACCATCACTAG : 444
2TCE61 : CGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCATCACCATCACTAG : 444
2TCE87 : CGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCATCACCATCACTAG : 444
2TCE44 : CGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCATCACCATCACTAG : 438
2TCE13 : CGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCATCACCATCACTAG : 435
2TCE19 : CGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCATCACCATCACTAG : 435
2TCE78 : CGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCATCACCATCACTAG : 435
2TCE49 : CGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCATCACCATCACTAG : 438
```

## Anexo 2

Secuencias aminoacídicas de los nanocuerpos específicos contra antígenos de excreción-secreción larvales de *Toxocara canis*. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) aparecen resaltadas en negritas y subrayadas. El péptido AAA sirve de conector entre la secuencia del nanocuerpo y las colas de hemaglutinina y de poli-histidina.

```

*          *          *          *          *          *          *          *
1TCE92 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS--CGRSFSDLDMAWFRQAPGKREFVAAIILWLGSTDIYYADSVKGRFTISKDNAENSVVALDMNALGPFDSAIIYYC : 98
2TCE90 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS--CGRSFSDLDMAWFRQAPGKREFVAAIILWLGSTDIYYADSVKGRFTISKDNAENSVVALDMNALGPFDSAIIYYC : 98
1TCE24 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS--CGRSFSDLDMAWFRQAPGKREFVAAIILWLGSTDIYYADSVKGRFTISKDNAENSVVALDMNALGPFDSAIIYYC : 98
1TCE69 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS--DGRSFDLDMAWFRQAPGKREFVAAIILWLGSTDIYYADSVKGRFTISKDNAENSVVALDMNALGPFDSAIIYYC : 98
2TCE87 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASMLSGRAFDSDYDMAWFRQAPGKREFVAAIILWLGSTDIYYADSVKGRFTISKDNAENSVVALDMNALGPFDSAIIYYC : 100
2TCE24 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASPSSGDTFSDYDLAWFRQAPGKREFVAAIILWLGSTDIYYADSVKGRFTISKDNAENSVVALDMNALGPFDSAIIYYC : 100
2TCE61 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASPSSGDTFSDYDLAWFRQAPGKREFVAAIILWLGSTDIYYADSVKGRFTISKDNAENSVVALDMNALGPFDSAIIYYC : 100
2TCE18 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASPSSGDTFSDYDLAWFRQAPGKREFVAAIILWLGSTDIYYADSVKGRFTISKDNAENSVVALDMNALGPFDSAIIYYC : 100
2TCE44 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS--GGVFSLLAMAWFRQAPGKREFVAAFSWGGDTTFYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLKPEDSAIIYYC : 96
1TCE19 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS--GFAFDYAIGWFRQAPGKREFVAAISISDGSTYYPDSVKGRFTISSNNAKNTVYLQMNLSLKPEDSAIIYYC : 96
1TCE25 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS--GFTLERYAIGWFRQAPGKREFVAAISVSDGSTYYPDSVKGRFTISSNNAKNTVYLQMNLSLKPEDSAIIYYC : 96
1TCE49 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS--GFTLAHYAMGWFRQAPGKREFVAAVSALNGSTHYTDSVKGRFTISKDNAENSVVALDMNALGPFDSAIIYYC : 96
1TCE52 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS--GFTLAHYAMGWFRQAPGKREFVAAVSALNGSTHYTDSVKGRFTISKDNAENSVVALDMNALGPFDSAIIYYC : 96
1TCE37 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS--GITLDYIAIGWFRQAPGKREFVAAISNSDGSTYYPDSVKGRFTISSNNAKNTVYLQMNLSLKPEDSAIIYYC : 96
1TCE21 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS--GVTFDHISIGWFRQAPGKREFVAAISSSGTYYEDSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLKPEDSAIIYYC : 94
1TCE39 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS--GFAFDSDVYVWFRQAPGKREFVAAINNVDGHTFVMDSVKDRFISRDNNAKNTVYLQMNLSLKPEDSAIIYYC : 96
2TCE18 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS--GFAFDSDVYVWFRQAPGKREFVAAINNVDGHTFVMDSVKDRFISRDNNAKNTVYLQMNLSLKPEDSAIIYYC : 96
2TCE13 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS--TDIFSINSMGWFRQAPGKREFVAAITSDSHKDYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLKPEDSAIIYYC : 96
2TCE19 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS--TDIFSINSMGWFRQAPGKREFVAAITSDSHKDYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLKPEDSAIIYYC : 96
2TCE78 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS--TDIFSINSMGWFRQAPGKREFVAAITSDSHKDYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLKPEDSAIIYYC : 96
2TCE49 : QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS--GSIIFSINAVGWYRQAPGKREFVAAIGSGGDTEYRDSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLKPEDSAIIYYC : 95

*          *          *          *          *
1TCE92 : AARLGMVADRSLY-----DYDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH : 145
2TCE90 : AARLGMVADRSLY-----DYDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH : 145
1TCE24 : AGRLGMVADRSLY-----DYDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH : 145
1TCE69 : AGRLGMVADRSLY-----DYDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH : 145
2TCE87 : AGRLGMVADRSLY-----DYDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH : 147
2TCE24 : AGRLGMVADRSLY-----DYDYWGRGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH : 147
2TCE61 : AGRLGMVADRSLY-----DYDYWGRGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH : 147
2TCE44 : AASHAMDRPEPY---GDKYDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH : 145
1TCE19 : AGAL-FTADIA---IFD-WDEYWGRGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH : 144
1TCE25 : AAAH-ETADIP---IMD-WEYRYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH : 144
1TCE49 : ARDRRLYCGTG---LGS-NEYDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH : 145
1TCE52 : ARDRRLYCGTG---LGS-NEYDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH : 145
1TCE37 : ATDR-NHGMLY---RGP-CEYDYWQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH : 144
1TCE21 : AAEIFGKCDTWSYVSPD-SGVDYWKGKTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH : 146
1TCE39 : AAEPQRYPACL---PLD-YAYDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH : 145
2TCE18 : AAEPQRYPACL---PLD-YAYDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH : 145
2TCE13 : NLGGRYRFGVYYP-----ENFGFWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH : 144
2TCE19 : NLGGRYRFGVHYYP-----ENFGFWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH : 144
2TCE78 : NLGGRYRIGVHYYP-----ENFGFWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH : 144
2TCE49 : NLGGRYRSGRAFHSF-----ENFGLWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH : 145

```