

## **ESTUDIO SEROEPIDEMIOLÓGICO PROSPECTIVO, SOBRE TOXOCAROSIS HUMANA EN BAHÍA BLANCA (Provincia de Buenos Aires) ARGENTINA**

Costamagna SR<sup>1</sup>, Baillie E<sup>1</sup>, Racca L<sup>2</sup>, Marro A<sup>2</sup>; Bin L<sup>2</sup>; Pirles M<sup>2</sup>; Schiaffino L<sup>2</sup>, Echenique C<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Parasitología Clínica, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR.

San Juan 670. B8000ICN-BAHIA BLANCA, Argentina.

E-mail: rcosta@uns.edu.ar

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Rosario

### **RESUMEN**

La población del barrio Villa Nocito de Bahía Blanca (Prov. Buenos Aires, Argentina) posee un alto grado de carencias. En estudios previos los autores demostraron que 2,7% de heces de perros, halladas en la vía pública de ese sector, tenían huevos de *Toxocara canis*. En el presente trabajo investigamos prevalencia de anticuerpos para *T. canis* en 94 sueros de personas, de ambos sexos, residentes en ese barrio, cubriendo todas las edades. Se utilizaron dos test de ELISA (uno LMD Toxocara Serology y otro fabricado en laboratorio) y como prueba confirmatoria Técnica de Immunoblotting (WB). Para análisis estadístico se utilizó prueba de Fisher y software EPIDAT 3.1, 2006.

Los resultados mostraron una seroprevalencia para *T. canis* de un 18%. La sensibilidad promedio de los test de ELISA fue de 96,79% con un Valor Predictivo del Resultado Positivo del 86,55%, sin diferencias significativas entre ambas, frente al WB. No se encontraron asociaciones de riesgo con significancia estadística para las siguientes situaciones: sexo, edad, utilización de agua potable, tipo de baño, contacto con animales y tierra, viajes, antecedentes de parasitosis y presencia de signos o sintomatología especial. Si bien el porcentaje de serología positiva fue mayor entre quienes utilizaban pozo ciego para eliminar excretas, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (p: 0,14).

Nuestros resultados demostraron una seroprevalencia para *T. canis* menor a la hallada por otros autores en 1994 y es concordante con la escasa presencia de huevos de *T. canis* en heces de perros del sector.

### **SUMMARY**

The population of Villa Nocito Quarter in Bahía Blanca, Buenos Aires Province, Argentina, lives with many shortcomings. Previous findings by authors of the present study indicate that 2.7% of dogs' faeces in the streets of this quarter contained *Toxocara canis* eggs. Prevalence of antibodies for *T. canis* in 94 sera of female and male persons of different ages and living in Villa Nocito Quarter was thus studied in the present research. To this end, two ELISA tests (an LMD Toxocara Serology test and another fabricated in the lab) and Immunoblotting (WB) technique were used. Fisher test and EPIDAT 3.1 2006 software were used for the statistical analysis.

Results indicated an 18% seroprevalence for *T. canis*. The average sensitivity indicated by the two ELISA tests reached 96.79% with a Positive Result Predictive Value of 86.55% with no significant differences between the two tests with respect to WB. No statistically significant risk associations were detected in relation to: sex, age, use of potable water, type of bathroom, contact with animals and with the soil, trips, parasitosis antecedents, and presence of particular symptoms. Although positive serology was higher among those using septic-well to defecate with respect to those using regular bathrooms, this difference was not statistically significant.

Results from the present research not only indicate a lower seroprevalence for *T. canis* with respect to that reported by other researchers in 1994 but also agree with the low presence of *T. canis* eggs in dogs' faeces in the study area.

## INTRODUCCIÓN

Si bien el perro es el mejor amigo del hombre, hay que tener en cuenta que esta mascota puede ser portadora de parásitos causales de enfermedad para el hombre, especialmente para los niños. Pese a que ascarídeos del perro y del gato como *Toxocara canis* (Werner, 1782) Johnston, 1916 y *Toxocara cati* (Schrank, 1788) Brumpt, 1927, no logran continuar o cerrar su ciclo en el hombre, su estudio adquiere importancia sanitaria ya que como parásitos extraviados, sí logran infestar al humano y producir enfermedad, por los estadios larvarios erráticos, conocidos como Larva Migrans Visceral (LMV) y Larva Migrans Ocular (LMO) ambas frecuentes en todo el mundo.

La mayoría de los cachorros nacen infestados, porque adquieren esta parasitosis por vía transplacentaria de la perra o gata infestada. La elevada prevalencia y la siembra indiscriminada de deposiciones de perros y gatos en la vía pública y áreas de recreación, donde juegan los niños, y los frecuentes hábitos de geofagia en éstos, hacen que esta patología adquiriera relevancia. Los huevos de *Toxocara* sp, al momento de la eliminación son inmaduros, necesitando entre

20 y 30 días para que se forme la larva infestante (L2) para el perro, el gato (según la especie) o el hombre.

La infestación en humanos, generalmente niños, ocurre cuando se ingieren huevos larvados de *Toxocara* sp. Una vez en el tubo digestivo, las L2 liberadas llegan a la circulación y continúan el ciclo, que si se tratara del hospedador normal (perro o gato) sería hacia los pulmones, pero como el hombre se comporta como un hospedador anómalo y accidental, esta larva, muy activa, se "extravía" y como no puede continuar su ciclo de manera normal se dirige erráticamente y sin rumbo predecible hacia diferentes órganos, fundamentalmente hígado, cerebro y ojo, donde se ubica, extracelularmente, formándose, en algunos casos, granulomas eosinofílicos como respuesta inflamatoria al parásito, para provocar la muerte del nematode, aunque habitualmente permanece viable y activa por un año o más. El daño de esta larva es fundamentalmente mecánico y por la reacción inflamatoria e inmunológica, muchas veces agravada por sensibilizaciones previas asintomáticas.

La sintomatología dependerá del número de

larvas presentes y del órgano elegido. Si la larva se dirigió al ojo se formará la llamada LMO, con afectación de la retina, siendo posible confundirlo con un retinoblastoma. La lesión habitualmente es unilateral y puede estar acompañada por estrabismo. La LMV, más frecuente en niños de menos de 5 años de edad, se presenta con fiebre, hepato y esplenomegalia, signos y síntomas respiratorios como broncoespasmos, eosinofilia de hasta un 70%, hipergamaglobulinemia tipo IgM e IgG. Nefritis y miocarditis y compromisos del SNC también están descriptos. Muchas veces es asintomática, detectándose simplemente la eosinofilia que orienta hacia el diagnóstico inmunológico (Costamagna, 2008).

El diagnóstico es habitualmente inmunoserológico, mediante test de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). También se utilizan una intradermorreacción con antígeno del parásito e inmunofluorescencia indirecta.

Estudios previos demostraron que el 83,3% de los sectores estudiados del Arroyo Napostá, que atraviesa la ciudad de Bahía Blanca, están contaminadas con huevos de parásitos (Costamagna y col, 2002 y 2005), que la tasa de infestación por *Toxocara* sp. encontrada en heces de perros de la ciudad fue de 7% (Torno y col. 1996) y que en Bahía Blanca, con 300000 habitantes existen más de 18000 perros vagabundos y 50000 perros con dueño (Luciani, 1998).

La población del barrio Villa Nocito de Bahía Blanca posee un alto grado de carencias. Estudios previos demostraron que un 87% de las heces de perros, halladas en ese sector, tenían parásitos de importancia zoonótica. Si bien *Ancylostoma* sp., fue el más prevalente, del total de muestras positivas se detectaron huevos de *Toxocara* sp. en el 10,3% de ellas

(estando larvados un 33,3%) significando una prevalencia real del 2,7% (Baillie y col, 2007). Además, un 87,9% de los niños del sector estudiado, presentaban parásitos intestinales (Costamagna y col, 2002).

Por todo lo expuesto, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la seroprevalencia para *Toxocara canis*, en un estudio prospectivo, en la población del Barrio Villa Nocito, en la ciudad de Bahía Blanca, durante el período 2007- 2008 y secundariamente validar dos métodos de ELISA para detectar anticuerpos anti-*Toxocara canis* frente a Inmunoblotting, y relacionarlos con presencia de *Toxocara* sp., en heces de perros de la vía pública en este sector.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se extrajeron muestras de sangre de 94 pacientes, 81 mujeres y 13 hombres, residentes en el barrio Villa Nocito (Bahía Blanca, Argentina) (Fig 1 y 2) cubriendo todas las edades, para determinar anticuerpos de tipo IgG para *T. canis*, registrándose datos socioculturales y sanitarios, con el consentimiento pertinente para cada caso.



Fig 1: Sector estudiado Villa Nocito



**Fig 2:** Bahía Blanca (Flecha) Argentina. Bahía Blanca, Argentina (1)

Se utilizaron dos kits de ELISA, uno comercial: LMD Toxocara Serology Microwell ELISA, código: 241000 y otro fabricado en laboratorio (ELISA Dra. Gabriela Echenique), y como prueba confirmatoria la Técnica de Inmunoblotting (WB). Para el análisis estadístico se utilizaron la prueba de Fisher y software EPIDAT 3.1, 2006.

*Test de ELISA Dra. Gabriela Echenique:* Los anticuerpos específicos contra antígenos de excreción / secreción de larvas L<sub>2</sub> de *T. canis* (TES) se determinaron en los sueros de los pacientes mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) utilizando antígeno TES obtenido de acuerdo a la técnica de Savigny. La dilución para los sueros fue 1/64. La Lectura de densidad óptica (DO) se efectuó a 490 nm en lector de placa Dynatech Laboratories MRX. Límite de corte: 0,300. Todos los sueros se procesaron por triplicado.

Procedimiento: **Coating** o cubierta de los pocillos con el antígeno TES.

1. **Lavados:** los pocillos se lavaron con buffer PBS a pH: 7.4 y 0.1 % Tween 20.

2. **Bloqueo:** con buffer PBS, pH: 7.4 / leche descremada 1.5 %, 1 hora a 37 °C.

3. **Lavados:** ídem paso 2.

4. **Dilución de sueros de pacientes:** 1/64.

5. **Siembra de sueros:** 50 µl de suero (1/64) a 37 °C, 90 minutos, en cámara húmeda. También se sembraron 2 controles positivos (débil y fuerte) y 2 negativos.

6. **Lavados:** ídem paso 2.

7. **Incubación con anticuerpo secundario:** cada suero se incubó con anti-IgG humana (Sigma) marcada con peroxidasa, a una concentración de 1/5000, 90 minutos a 37 °C.

8. **Lavados:** ídem paso 2.

9. **Agregado del sustrato:** peróxido de hidrógeno 60 mM en buffer citrato 50 mM pH: 3.2 y tetrametilbencidina (TMB) 10 mM en ácido clorhídrico 0.1 N, 30 minutos, a temperatura ambiente.

10. Se detuvo la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N.

11. **Lectura de DO:** a 490 nm

#### Técnica de Inmunoblotting (WB)

a) Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes: SDS-PAGE (10%) bajo condiciones experimentales según el método de Laemmli. Las proteínas de TES fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, las que fueron incubadas durante 1 hora con los sueros de los pacientes dilución 1/64.

b) Transferencia e Inmunodetección de proteínas en membrana de nitrocelulosa (Western Blotting): las membranas fueron enfrentadas durante una hora, con proteína A conjugada con fosfatasa alcalina. Se utilizó anti-IgG humana conjugada con fosfatasa alcalina.

Las diferentes bandas del antígeno fueron detectadas por la reacción de color de fosfatasa utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfatasa (BCIP) con nitro blue tetrazolium (NBT).

## RESULTADOS

Los resultados mostraron una seroprevalencia para *T. canis*, para el sector estudiado, de 18%. La sensibilidad promedio de los kits de ELISA utilizados (LMD Toxocara Serology y Test de ELISA Dra. Gabriela Echenique) fue de 96,79% con un Valor Predictivo del Resultado Positivo del 86,55%, sin diferencias significativas entre ambas, frente al WB. Al aplicar el test de rangos con signo de Wilcoxon se concluye que ambos kit permiten determinar el mismo valor ( $p=0.856364$ )

No se encontraron asociaciones de riesgo con significancia estadística para las siguientes situaciones: sexo, edad, utilización de agua potable, tipo de baño, contacto con animales y tierra, viajes, antecedentes de parasitosis y presencia de signos o sintomatología especial. Si bien el porcentaje de serología positiva para *T. canis* fue mayor entre quienes utilizaban pozo ciego para eliminar excretas, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p: 0,14$ ). Se observó asociación entre serología positiva para *T. canis* y la realización de viajes ( $P: 0,04$ ).

## CONCLUSIONES

La toxocarosis humana es la resultante de la prevalencia de esta parasitosis en perros y de la cantidad de éstos que comparten el ambiente con el hombre. Nuestros resultados, en lo referente a prevalencia de *T. canis* en heces de perros, colectadas de la vía pública en el barrio de Villa Nocito de la ciudad de Bahía Blanca (Argentina) mostraron que era del 2,7% con un 33,3% de huevos larvados, o sea, infestantes (Baillie y col, 2007) lo que ratifica la elevada resistencia de los huevos en el medio ambiente (Borchert, 1975) ya que las condiciones climáticas del sector

estudiado son extremas, si bien la colecta de heces de perros se realizó en noviembre de 2006, con una temperatura que osciló desde los 12-26° C.

La seroprevalencia de *T. canis* en humanos, demostrada en el presente estudio, mediante dos técnicas de ELISA e Immunoblotting (WB) fue de 18% y los dos tests de ELISA utilizados arrojaron resultados satisfactorios, con una buena correlación entre ambos y el WB.

Estudios realizados en población pediátrica de Bahía Blanca en 1994, utilizando test de ELISA, determinaron una inmunoprevalencia para Toxocarosis de 44,2%, (Gentili y col, 1994). Dos años después, Torno y col demostraron una prevalencia de 7% para *Toxocara* en heces de perros de la vía pública en la misma ciudad.

Otros estudios señalan para Argentina, un 10% de positividad entre donantes de sangre en la ciudad de Guleguaychú (Minvielle y col, 2000), un 39% de positividad en habitantes de la ciudad de La Plata (Radman, 2000) y 37,9% en niños entre 1 y 14 años de la ciudad de Resistencia, Chaco (Alonso y col, 2004).

Pese a que los resultados están dentro de lo hallado en otras latitudes, hemos iniciado acciones de educación y concientización en la ciudad, a fin de que en un mediano plazo podamos disminuir aún más las tasas de seroprevalencia para *Toxocara* humanos, y muy especialmente las infestaciones de perros y la presencia de heces de los mismos y de gatos en la vía pública y areneros de jardines maternos y plazas, a través del Voluntariado Universitario de nuestra cátedra: “*Erradicando parásitos de jardines maternos y escuelas, con amor, solidaridad, conocimiento y responsabilidad*”

*social y ciudadana”*  
(<http://www.lasparasitosis.com.ar>).

Para finalizar, consideramos pertinente reproducir parte del Informe Técnico 277 de la OMS, de 1964: “Helminthos transmitidos por el suelo”, cuando, en su introducción, hace referencia a la importancia desde el punto de vista de la Salud Pública, de las diferentes helmintosis y señala: “*puede decirse, sin exageración que los gusanos parásitos minan la salud de las poblaciones humanas prácticamente en todas las regiones del mundo. Incluso en los países más desarrollados, donde las helmintosis son relativamente benignas o poco frecuentes, las que existen se consideran acertadamente como nocivas*”.

**Agradecimientos:** A la Honorable Cámara de Diputados de la Provincia de Buenos Aires, al Honorable Concejo Deliberante e Intendente de Bahía Blanca, por declarar de interés provincial y municipal estas investigaciones. A la *Fundación Alberto J. Roemmers* por la financiación del presente estudio.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Alonso J, López M, Bojanich M y Marull J. Infección por *Toxocara canis* en población adulta sana de un área subtropical de Argentina. *Parasitología Latinoamericana*. 59: 61 - 64, 2004
2. Baillie E, Argañín L y Costamagna SR. Contaminación de la vía pública con parásitos de importancia zoonótica, en un sector de Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev AMBB*. 16(2):29-33, 2007.
3. Borchert, Alfred. *Parasitología veterinaria*. Primera edición, editorial ACRIBIA. Zaragoza, España. 1975, pp. 221-225.
4. Costamagna SR, García S, Visciarelli E y Casas N. Epidemiología de las parasitosis en la ciudad de Bahía Blanca (Argentina). *Parasitología Latinoamericana*; 57(3-4):103-110, 2002.
5. Costamagna SR, Visciarelli E, Lucchi L y Basualdo J. Investigación de parásitos de importancia sanitaria en aguas del arroyo Napostá, aguas de recreación y de consumo en la

ciudad de Bahía Blanca (Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Parasitología Latinoamericana*. 60(3-4):122-126, 2002.

6. Costamagna SR. Larva Migrans Visceral. En: Parasitosis Regionales. Editores: Costamagna SR y Visciarelli E. Editorial: EdiUNS. Bahía Blanca, Argentina. 2da. Edición, 2008. pp. 435.

7. De Savigny, D.H. - "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. *Journal of Parasitology*, 61: 781-782, 1975.

8. De Savigny, D.H.; Voller, A. & Woodruff, A.W. - Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *Journal Clinical Pathology*, 32: 284-288, 1979.

9. Gentili A, Lejtman N, Gabbarini J, González M. Toxocariosis. Estudio epidemiológico clínico en humanos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, Vol. XXVIII (2):257-262, 1994.

10. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, 1970.

11. Luciani A. La otra cara de las mascotas. *La Nueva Provincia*, 12 de julio de 1998:12-13.

12. Minvielle M C, Taus M R, Raffo A et al. Seroprevalence of Toxocariasis in blood donors of Gualeguaychú, Argentina. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 94: 373-5, 2000.

13. OMS-Informe Técnico Nro. 277 "Helminthos transmitidos por el suelo", 1964.

14. Radman N E, Archelli S M, Fonrouge RD et al. Human Toxocarosis. Its seroprevalence in the city of La Plata. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 281-5, 2000.

15. Torno Cafasso O, García S, Prat M, Santamaría B. Enteroparásitos del perro en un sector de Bahía Blanca, Argentina. *Parasitología Al Día*, 20:144-146, 1996.

16. Wilcoxon, F. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics*, 1:80-83, 1945.