

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

Tema de Tesis:

**PARAMETROS INMUNOPATOGENICOS EN LA INFECCION
EXPERIMENTAL
MURINA CON HUEVOS DE TOXOCARA CANIS**

Tesista: Médica Marta Cecilia Minvielle

Director: Prof. Dr. Juan A. Basualdo

Lugar de trabajo: Cátedra de Microbiología y Parasitología.
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de La Plata.

Tesis presentada para optar al título de Doctora en Medicina.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

Decano: Prof. Dr. José Carlos Fassi

Vicedecano: Prof. Dr. Rodolfo Hernandez.

Secretario de Asuntos Académicos: Prof. Dr. Cesar Gomez Dumm.

Secretario del Honorable Consejo Académico: Prof. Dr. Bartolomé
Mayans.

Secretario de Extensión Universitaria: Dr. Enrique Perez Albizu.

Secretaria de Asuntos Estudiantiles: Prof. Dra. Flora Stoichevich.

Prosecretario Docente Asistencial: Prof. Dr. Miguel Vicente Salvioli.

Prosecretaria de Ciencia y Técnica: Prof. Dra. Nelba Tacconi de Gomez
Dumm.

Prosecretario de Postgrados: Dr. Jorge Clemente Raimondi.

Asesor de Gestión: Dr. Felipe Campoamor.

*A mi esposo,
mis hijos
y mis padres*

INDICE

INTRODUCCION

	página
A- Generalidades sobre Toxocarosis.....	7
B- Agente etiológico:	
- Clasificación.....	9
- Aspectos morfológicos del parásito adulto, de los huevos y de los estadios larvales.....	9
C- Ciclo biológico:	
- Natural.....	13
- Accidental: en el hombre y en los huéspedes paraténicos.....	17
D- Epidemiología de la Toxocarosis:	
- En animales.....	18
- En el ambiente.....	21
- En humanos.....	23
E- Conocimiento del problema.....	29
F- Toxocarosis Humana:	
- Aspectos clínicos.....	30
- Inmunopatogenia.....	40
- Diagnóstico.....	53

G- Profilaxis y tratamiento.....	57
H- Desafíos.....	59

OBJETIVOS

1- Analizar el ciclo biológico de *Toxocara canis* en ratones mediante infecciones experimentales con huevos del parásito en ratones.:

Primera etapa:

-Material y métodos.....	61
-Resultados.....	62
-Discusión y Conclusiones.....	63

Segunda etapa:

-Material y métodos.....	64
-Resultados.....	64
-Discusión y Conclusiones.....	65

2- Determinar el número de larvas (carga parasitaria) en distintos órganos del ratón luego de su infectación con huevos de *Toxocara canis*, para evaluar la posible relación entre la carga parasitaria y diferentes métodos de inoculación:

Primera etapa:

-Material y métodos.....	66
-Resultados.....	67
-Discusión y Conclusiones.....	68

Segunda etapa:

-Material y métodos.....	68
-Resultados.....	69
-Discusión y Conclusiones.....	69
3- Desarrollar una técnica serológica para evaluar la respuesta humoral anti- <i>Toxocara canis</i> :	
-Material y métodos.....	72
-Resultados.....	78
-Discusión y Conclusiones.....	80
4- Evaluar distintos parámetros inmunológicos celulares y humorales en la infección murina por <i>Toxocara canis</i> :	
-Material y métodos.....	81
-Resultados.....	82
-Discusión y Conclusiones.....	91
5- Conclusiones Finales.....	97
<u>RESUMEN</u>	101
<u>GLOSARIO</u>	107
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	109

INTRODUCCION

A-GENERALIDADES SOBRE TOXOCAROSIS:

Beaver y colaboradores (1952) describieron por primera vez un caso clínico de toxocarosis humana (confirmado por biopsia de hígado), bajo el nombre de larva migrans visceral. Desde entonces, se han publicado numerosos trabajos de investigación acerca de su principal agente: *Toxocara canis*, un nematodo de caninos que accidentalmente infecta al hombre. (Schacher J., 1959; Schantz P. and Glickman P., 1979; Barriga O., 1988 Lloyd S., 1993).

Clásicamente se aceptaban dos formas de toxocarosis humana: 1) el síndrome de larva migrans visceral (LMV) y 2) el síndrome de larva migrans ocular (LMO); pero en la actualidad se han descrito nuevos cuadros clínicos: la toxocarosis encubierta, la toxocarosis neurológica, la toxocarosis asmatiforme y la toxocarosis neurofisiológica. (Petithory J. et al., 1994) (Cuadro 1)

Cuadro 1: TOXOCAROSIS HUMANA (transmisión y formas clínicas)						
Caninos	⇒	Ambiente	⇒	Hombre	⇒	Toxocarosis humana
Huevos de <i>T. canis</i> en heces		Huevos infectantes		Infección por geofagia		Subclínica Toxocarosis encubierta L.M.O. L.M.V. Toxocarosis asmatiforme. Toxocarosis neurológica. Toxocarosis neurofisiológ.

La prevalencia de las formas clínicas de esta enfermedad varía de país a país y aún, dentro del mismo. Pues, si bien el reservorio de este parásito es el perro, la transmisión del perro al humano no es tan simple como parecía. Al principio la atención se centraba en la contaminación de la tierra del peridomicilio por materia fecal de perros parasitados por *T. canis*. Luego, se describieron los casos clínicos en personas cuyos peridomicilios

jamás alojaron perros, y esto ha concientizado sobre la amplia contaminación ambiental, especialmente de paseos públicos, lugares de juegos de niños y calles de la ciudad (Glickman L. and Schantz P., 1981; Holland et al., 1991; Minvielle et al., 1993)

Las investigaciones sobre epidemiología, inmunobiología e inmunopatología de esta parasitosis, contribuirán a la mejor comprensión de los cuadros clínicos de toxocarosis y permitirán implementar y evaluar estrategias de tratamiento de los casos, y programas de prevención en la población en riesgo.

B-AGENTE ETIOLÓGICO

-Clasificación:

Toxocara canis. es un nematodo, que pertenece al
reino Animalia,
subreino Metazoa,
phylum Nematoda,
clase Secernentea o Phasmidia,
orden Ascaridida,
superfamilia Ascaridoidea,
familia Ascarididae,
subfamilia Toxocarinae,
género *Toxocara* (*Neoáscaris*),
especie *T. canis*.

-Aspectos morfológicos del parásito adulto, de los huevos y de los estadios larvales:

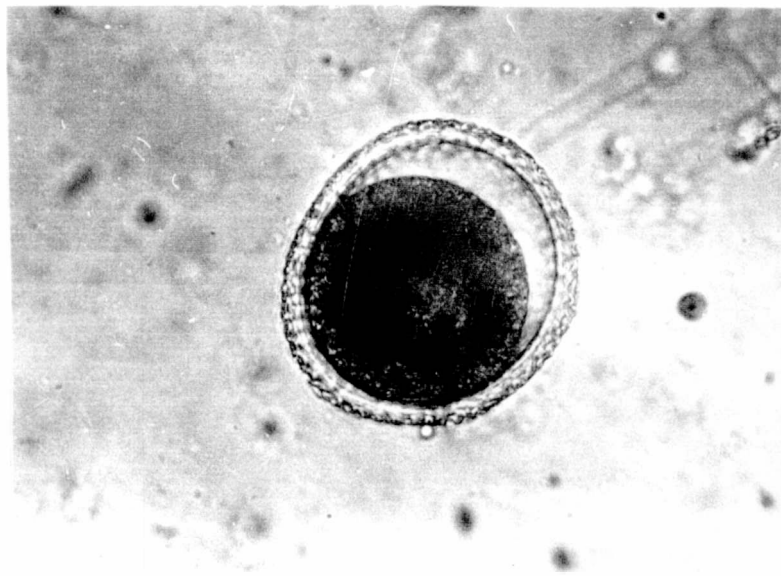
Los parásitos adultos miden entre 7 y 15 cm de longitud y 2-6 mm de diámetro, existiendo dimorfismo sexual (fotografía 1). Las hembras son mas grandes que los machos, y presentan una extremidad posterior cónica. Por el contrario, en los machos esta extremidad es curva y con dos espículas simples e iguales. Estos detalles morfológicos permiten la diferenciación macroscópica de los sexos, primer paso en el aislamiento de huevos de *T. canis* (Faust E., 1981).



Fotografía 1: *Toxocara canis* adultos.

Las hembras fértiles están repletas de huevos de forma ovoide o esférica que miden de 40 a 60 μm de diámetro menor por 50 a 75 μm de diámetro mayor y son de color oscuro (fotografía 2). En el momento de la postura contienen una sola célula; y se hallan cubiertos por tres capas sucesivas: una fina membrana interna predominantemente lipídica, una membrana intermedia compuesta de proteínas y quitina, y una gruesa cubierta exterior albuminoidea mamelonada muy típica. En 1994, Hassan A. y colaboradores observaron por microscopía electrónica la existencia de una cuarta capa que denominaron membrana uterina y que se encuentra internamente, rodeando a la célula primordial.

Los huevos son muy resistentes a las condiciones externas, pudiendo permanecer viables en los suelos durante meses (Schantz P. and Glickman L., 1979).



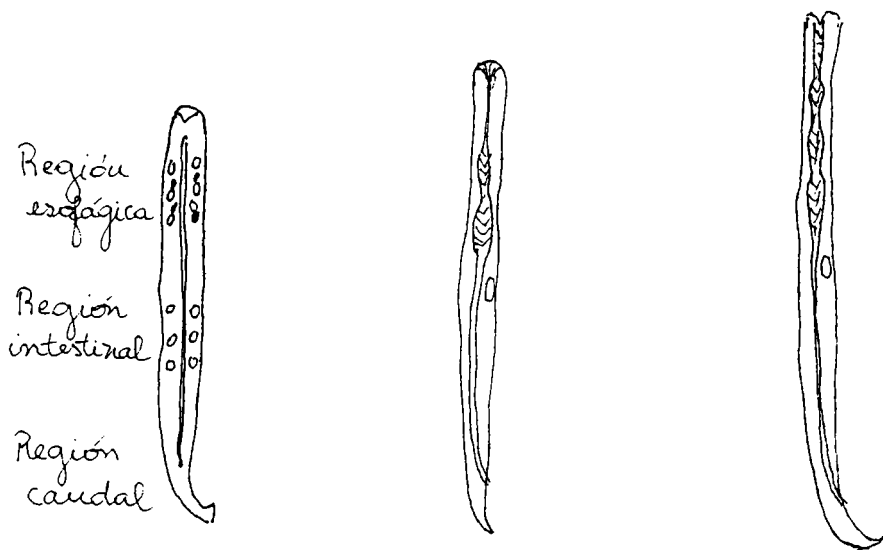
Fotografía 2: Huevo fértil de *Toxocara canis* (400 X).

T. canis presenta diferentes estadios larvales, algunos se desarrollan dentro de los huevos en el medio ambiente, y otros en su huésped habitual: el perro.

Primer estadio larval o L1 (figura 1a). Cuando la temperatura y humedad del medio ambiente son adecuadas, se desarrolla en el interior del huevo un embrión vermiforme en un lapso de 5 a 10 días. Presenta una extremidad anterior roma y una cola fina que termina en una pequeña protuberancia. Son visibles tres regiones: una región esofágica hialina con glóbulos refráctiles y gránulos oscuros, una región intestinal densa con esferas refractantes y una región caudal transparente. Esta larva mide aproximadamente 400 μm de longitud y 20 μm de ancho, y se encuentra arrollada dentro del huevo.

Segundo estadio larval o L2 (figura 1b). Este estadio se reconoce por la mayor definición de sus estructuras al microscopio óptico y su estilización. Presenta un cono bucal que semeja un embudo y puede notarse el poro excretor, el ano y el primordio genital. Mide alrededor de 500 μm de largo y 15 μm de ancho. Se encuentra arrollada, generalmente formando anillos en el interior de los huevos. Siempre existe una sola larva por huevo. Si el huevo contiene este estadio larval, se considera infectivo y es el que debe ser ingerido por el huésped para proseguir el ciclo. Este estadio larval queda libre en el intestino del hospedero y es capaz de atravesar la mucosa intestinal y distribuirse por diferentes órganos.

Tercer estadio larval o L3 (figura 1c). Este estadio se recupera del estomago de cachorros infectados. Tiene aproximadamente 1 mm de largo y en su cuerpo se destaca un lumen intestinal oscuro y una extremidad caudal levemente encorvada dorsalmente semejando un gancho. Este estadio no se desarrolla en los huéspedes accidentales.



1a: Primer estadio o L1. 1b: Segundo estadio o L2. 1c: Tercer estadio o L3.

Figura 1: Estadios larvales de *Toxocara canis*.

Cuarto estadio larval o L4 (figura 2a). Se recupera del estomago y del intestino de cachorros infectados. Mide alrededor de 1,5 mm al comienzo de esta muda y ya pueden observarse en ella las alas laterales y las diferencias entre ambos sexos. Cuando termina esta muda, estas larvas alcanzan una longitud de 17 a 20 mm.

Quinto estadio larval o adultos inmaduros (figura 2b). Se recuperan del intestino de cánidos infectados. Morfológicamente son muy semejantes a los adultos, salvo que su tamaño es menor, miden de 2 a 5 cm (Schacher J., 1959; Brunaska M. et al., 1995).

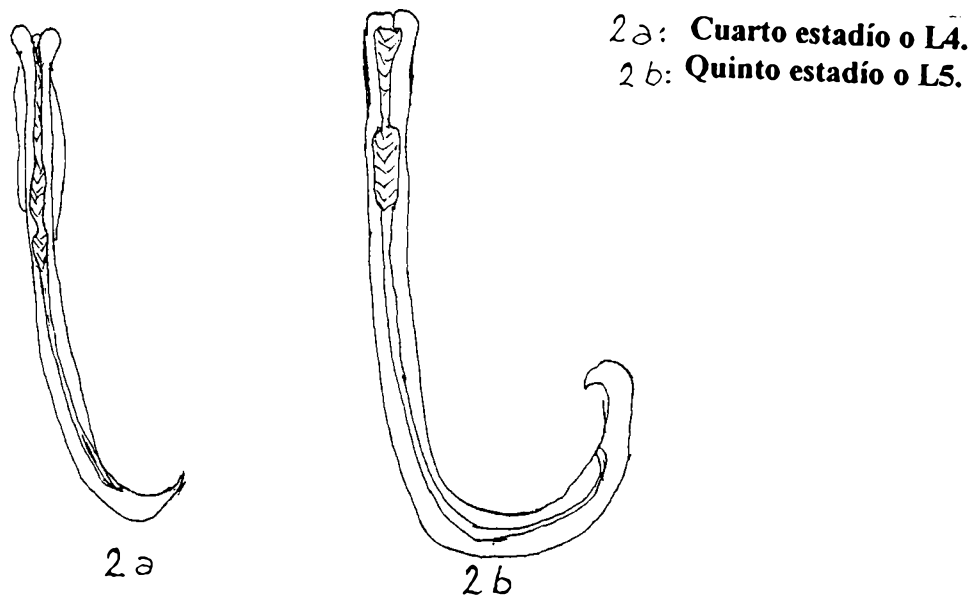


Figura 2: Estadios larvales de *Toxocara canis*.

C-CICLO BIOLÓGICO

- Natural (Figura 3)

Los nematodos adultos de *T.canis* tienen su hábitat en el intestino delgado de sus hospedadores definitivos: los caninos. Los parásitos hembras grávidas oviponen en la luz intestinal y los huevos salen al exterior con las heces del animal. Los huevos no son inmediatamente infectivos. El desarrollo larval dentro de los huevos varía según las condiciones de humedad y temperatura. Dentro de una temperatura de 15°C a 35°C y una humedad relativa del 85%, la mayoría de los huevos llegan a ser infectivos dentro de 2 a 5 semanas. Temperaturas superiores a 35°C causan inactivación de los huevos e inferiores a 15°C enlentecen el desarrollo larval, pero no los destruyen (O'Lorcain P., 1995). La mayoría de la literatura consultada considera huevo infectivo a aquel que aloja el segundo estadio larval o L2, aunque algunos autores han reportado dos mudas dentro del huevo y entonces para ellos, el estadio larval infectivo sería L3 (Araujo P., 1972, Okoshi S. and Usui M., 1968).

Los perros y otros cánidos pueden infectarse con *T.canis* mediante las siguientes vías:

- 1- Ingestión de huevos infectivos.
- 2- Ingestión de larvas presentes en los tejidos de huéspedes paraténicos.
- 3- Migración transplacentaria de las larvas desde la perra preñada a sus cachorros en desarrollo.
- 4- Pasaje transmamario de larvas a través de la leche de perras amamantadoras a sus crías.
- 5- Ingestión de adultos inmaduros (L5) presentes en el vomito y en las heces de cachorros infectados.

Cuando los huevos infectivos de *T.canis* son ingeridos por un perro, se liberan las larvas en el estómago y en el intestino delgado. Las larvas liberadas invaden la mucosa intestinal, ingresan a los vasos linfáticos y venosos, y la mayoría alcanzan el hígado dentro de las 24-48 horas. Luego pasan al corazón y a los pulmones por vía sanguínea, alcanzan los capilares alveolares y pasan a través de la barrera sangre-aire, ascendiendo por el árbol respiratorio hasta llegar a faringe donde son deglutidas. Estas larvas que han seguido la migración traqueal sufren dos mudas y completan el desarrollo a adultos en el intestino delgado. Los huevos aparecen en las heces cuatro o cinco semanas post-infección (figura 3).

En los perros mayores de 6 meses, y dependiendo del número de huevos ingeridos, algunas larvas no siguen la ruta traqueal sino que ingresan

en las venas pulmonares y se distribuyen por la circulación sistémica a través del cuerpo donde pueden recuperarse de los tejidos somáticos especialmente de los pulmones, hígado, riñones y músculos esqueléticos. Las larvas también han sido halladas en cerebro, pero aun faltan estudios que demuestren si existe acumulación progresiva en el sistema nervioso del animal en desmedro del numero de larvas en músculo.. Esta distribución se conoce como migración somática y las larvas permanecen latentes durante años. (Glicman L. and Schantz P., 1981)

La edad del perro en el momento de la infección determina la relativa proporción de larvas que prosiguen la migración traqueal o la migración somática. En perros menores de 5 semanas, casi todas las larvas siguen la migración traqueal, mientras que en perros mayores de 6 meses la mayoría de las larvas seguirán la migración somática. La dosis infectiva también es otro factor que influye en el modelo de migración. Dosis menores de 1000 huevos promueven la migración traqueal, mientras que dosis superiores facilitan la migración somática.

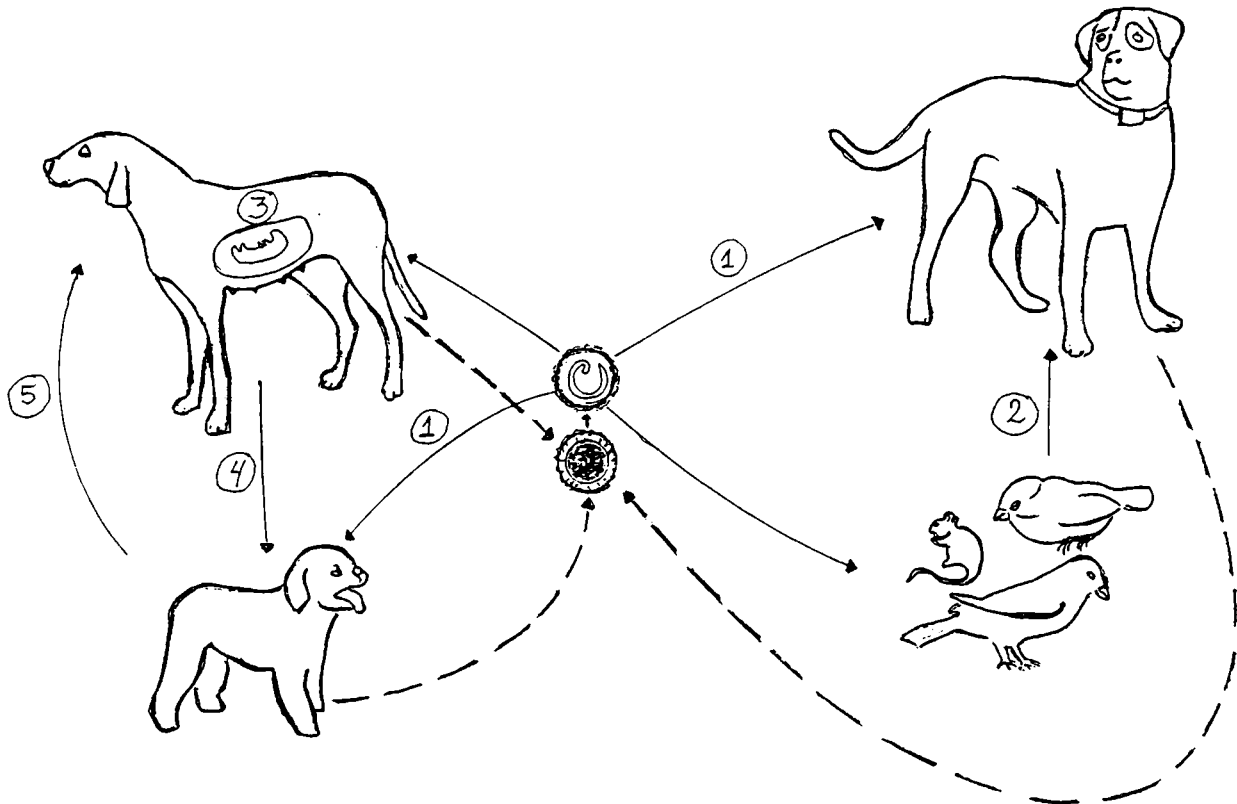
Los huevos de *T.canis* también pueden ser infectivos para un sinnúmero de especies no caninas, incluyendo el ser humano. Este fenómeno se conoce con el nombre de paraténisis. Huéspedes paraténicos en toxocarosis son gusanos de tierra, ratones, ratas, conejos, pollos, cerdos, palomas, ovejas, etc. Como la larva permanece viva en el huésped paratenico (hasta 6-9 años), la ingestión de los tejidos puede infectar al predador. Si es un cánido, las larvas completan su desarrollo en el tracto alimentario. Las larvas liberadas en el intestino no siguen la ruta traqueal en estos huéspedes y por ello no sufren mudas.

La infección prenatal de los cachorros ocurre cuando las larvas migran transplacentariamente desde la perra. Estas larvas , que pudieron ser adquiridas por la perra antes o durante la preñez, se "activan" por mecanismos desconocidos y retornan al sistema sanguíneo. La migración transplacentaria ocurre después del día 42 de la preñez, posiblemente como resultado de la estimulación hormonal. Se conoce que la transmisión ocurre en consecutivas preñeces de perras en ausencia de reinfecciones. Las larvas permanecen en el hígado de los cachorros infectados prenatalmente hasta el nacimiento, y en ese momento pasan al pulmón y prosiguen la migración traqueal, y maduran en el intestino. Los huevos pueden aparecer en las heces aproximadamente a la cuarta semana de vida (Burke T. and Robertson E., 1985)(figura 3).

Las hembras que amamantan también pueden transmitir larvas a sus cachorros en la leche. Si la perra se infecta durante las primeras semanas de la preñez, el numero de larvas transmitidas transplacentariamente excede el numero transmitido por vía mamaria.. Si la infección ocurre en las ultimas semanas, la transmisión transmamaria se incrementa (Sprent J., 1961).

También puede producirse el "retorno" de la infección en la perra amamantadora; la perra se recontamina generalmente por el hábito de limpiar a sus cachorros e ingerir sus heces contaminadas con huevos de *T. canis*. Además, puede haber *T. canis* inmaduros en las heces de los cachorros, que al ser ingeridos por la madre, completan el ciclo en ella. Esta vía de infección debe tenerse en cuenta, pues es frecuente que se desparasite a los cachorros y se olvide a la madre (figura 3).

Figura 3: Ciclo biológico natural de *Toxocara canis*.



Vías de infección en cánidos:

- 1- Ingestión de huevos infectivos.**
- 2- Ingestión de larvas en huéspedes paraténicos.**
- 3- Migración transplacentaria de larvas.**
- 4- Pasaje transmamario de larvas.**
- 5- Ingestión de adultos inmaduros presentes en el vómito y en las heces de cachorros infectados**

Este parásito puede causar patología en los perros, especialmente si son cachorros. Ha sido observado como agente etiológico de neumonía parasitaria en cachorros recién nacidos asociada con la migración pulmonar de gran número de larvas adquiridas prenatalmente. Generalmente, ocasiona

una patología intestinal en cachorros que se caracteriza por vómitos, diarreas y lento desarrollo del crecimiento del animal. Puede ocasionar la muerte en infecciones masivas de 300-400 gusanos por animal (Lloyd S., 1985).

Los perros adultos ocasionalmente pueden portar un bajo numero de gusanos, y raramente manifiestan patología intestinal (Christensson D., 1988).

Los cachorros parasitados constituyen el mayor reservorio de *T.canis*. El nivel de contaminación producido por una perra y sus cachorros parasitados en la inmediata vecindad de su hábitat es enorme. Si tenemos en cuenta que *T.canis* adultos tienen una vida media de 4 meses, y cada hembra puede producir 200.000 huevos por día y la carga intestinal de gusanos puede ir de uno a cientos de gusanos; los animales infectados pueden contaminar el ambiente diariamente con millones de huevos (Barriga O., 1988).

-Ciclo biológico accidental:

El hombre se infecta mediante la ingestión de huevos de *T.canis* (presentes en la tierra contaminada) que contienen el estadio larval infectivo (L2), el cual se libera de sus envolturas en el intestino delgado proximal, y las larvas liberadas penetran la mucosa, migrando hacia el hígado siguiendo la circulación portal. Continuando por el sistema venoso, penetran en el pulmón y posteriormente en la circulación sistémica. Cuando las larvas son mas grandes (en diámetro) que los capilares sanguíneos, su progreso se ve impedido, y ellas pueden activamente atravesar la pared del vaso y migrar al tejido circundante. Las larvas se distribuyen por todo el organismo, y han sido descritas en el hígado, pulmones, corazón y cerebro. La migración larval, deja trazos de hemorragias, necrosis y células inflamatorias; la mayoría parecen permanecer "dormidas" por muchos años y luego continúan su migración. Eventualmente, algunas son encapsuladas y destruidas por la respuesta inmune del huésped, mientras que otras aparentemente serían protegidas encapsulándolas.(figura 4)

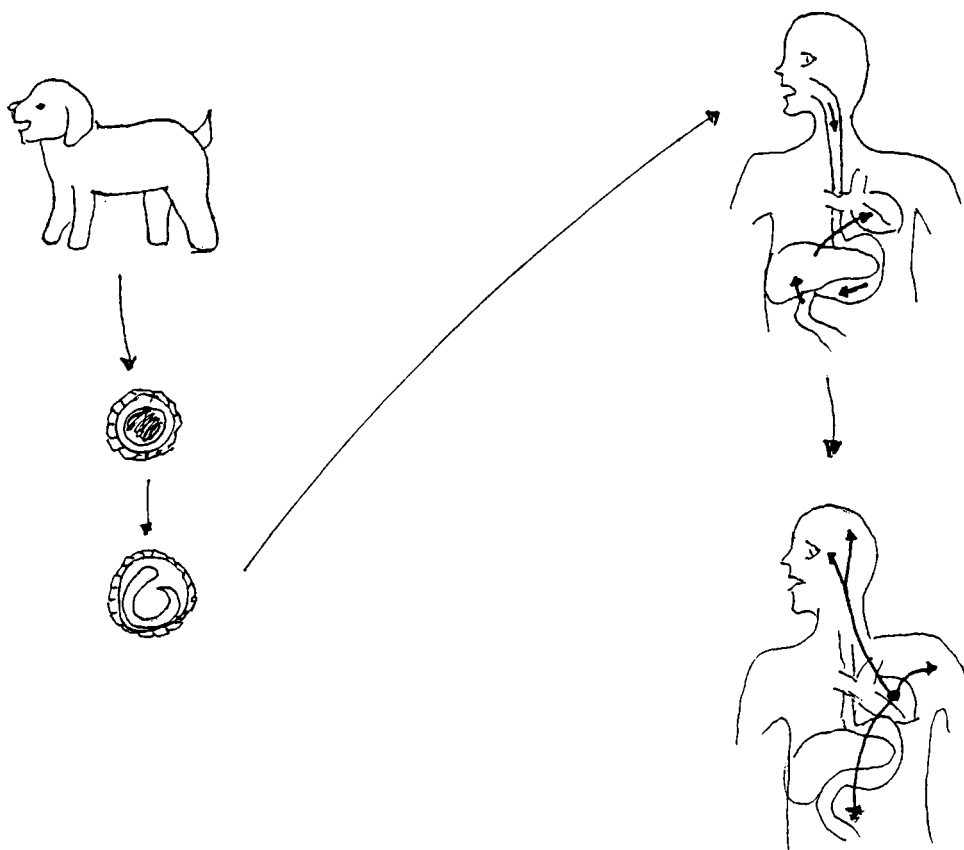


Figura 4: Ciclo biológico accidental de *Toxocara canis*.

D-EPIDEMIOLOGIA

-Toxocarosis en animales

- *T.canis* en perros

Existen numerosos estudios sobre la prevalencia de la infección en mascotas urbanas y en perros callejeros en el mundo. Aunque la mayoría de los estudios revelan alta frecuencia de toxocarosis en perros menores (3 a 6 meses), también se describe esta infección en perros adultos aunque en menor proporción (Pereira et al., 1991; Lloyd S., 1993; Pezzani et al., 1996).

Estudios originales de Greeve R.(1971) y Oshima T.(1976) describen la infección oral de cachorros menores de 5 semanas con 1000 a 1500 huevos de *T.canis* seguidas de migración traqueal de las larvas y desarrollo de *T.canis* adultos en sus intestinos. Los cachorros mayores de 5 semanas presentan mayor resistencia a esta ruta de migración y a la infección con parásitos adultos. A los 3 meses se infectan pero con dificultad (Greeve R., 1971; Oshima T.,1976), mientras que perros de 6 meses adquieren la parasitosis solamente con grandes dosis de huevos. Los perros adultos se consideraban resistentes a la infección oral con huevos y a la migración traqueal de las larvas, pero ahora es evidente que una proporción de perros adultos tienen *T.canis* en sus intestinos y pueden adquirir esta infección por las siguientes rutas:

a)-Infección oral con huevos con posterior migración traqueal de las larvas.

Se ha demostrado experimentalmente que la infección oral de perros adultos con huevos larvados, puede conducir a la migración traqueal de larvas y a la infección intestinal con parásitos adultos. La dosis de huevos es importante. Así, cachorros de la raza Beagle de 2 meses desarrollan infección por *T.canis* adultos luego de dosis de 50 a 1000 huevos, pero no cuando son infectados con 10.000 huevos. Mientras que los Beagles adultos y los Greyhounds adultos que ingieren 100 a 200 huevos también desarrollan la vía migratoria traqueal. El periodo pre-patente fue de 30 días o más (Lloyd S., 1986).

b)-Migración somática de larvas.

Es posible que las larvas de los tejidos somáticos puedan activarse y subsecuentemente seguir la ruta traqueal y llegar al intestino. Es el caso descrito de las perras parturientas y de las larvas inyectadas subcutáneamente que siguieron la ruta traqueal (Maizels R.y Meghji M.1984).

c)- Ingestión de huéspedes paraténicos.

Las larvas de *T.canis* de huevos ingeridos, migran somáticamente en un amplio rango de huéspedes paraténicos. Estos incluyen ratas, ratones, conejos, animales domésticos y aves (Maruyama S. et al., 1994). La sobrevivencia en estos huéspedes puede ser prolongada, de 3 a 9 años. También, las larvas pueden transferirse de los tejidos de un huésped paraténico a otro por canibalismo y consecuentemente se produce su acumulación (Maruyama S. et al., 1994). Cuando el huésped paraténico es ingerido por el perro, las larvas pueden reactivar su desarrollo hacia la madurez en el intestino del perro.

Las larvas resisten temperaturas de - 20° C después de la muerte del huésped paraténico durante 4 semanas. Los roedores moribundos en invierno pueden ser una fuente de infección por algún tiempo y la congelación de la comida antes de dar a comer a los perros no necesariamente (Warren E., 1969) previene la transferencia de la infección. El período pre-patente en tales infecciones es de 19 días.

Factores que influyen en la susceptibilidad a la infección en perros adultos:

La susceptibilidad de la infección en perros adultos ha sido estudiada respecto a diversos factores (O'Lorcain P., 1994). Se ha descrito una susceptibilidad individual o de raza para muchos helmintos, y de la misma forma ocurre para *T.canis*. Las razas Beagles y Greyhounds pueden ser infectadas reiteradamente indicando que no existe un mecanismo que frene la reinfección. También pueden ser importantes los efectos hormonales en la susceptibilidad a la infección. La infección frecuentemente se registra en perros adultos machos, y existe una producción de huevos tres veces más alta en hembras en metaestro comparada con hembras en otros estadios del ciclo reproductivo u ovariectomizadas. El ambiente también parece influenciar la prevalencia de la infección. Es más alta en perros vagabundos y callejeros y en perros de perreras comparado con mascotas. Un estudio llevado a cabo en Australia, demostró una prevalencia del 35-55 % en perros vagabundos respecto al 1-5% en perros mascotas (Lloyd S., 1993). Aún no ha sido determinada la influencia relativa de las diferentes dietas, el número de los tratamientos antihelmínticos y los niveles de exposición a la infección versus la innata susceptibilidad entre los diferentes grupos de perros y /o entre las diversas razas caninas (Soulsby E., 1991).

En un estudio llevado a cabo en 1000 perros de diferentes edades y sexo del partido de La Plata (Pereira D. et al., 1991) se determinó una

prevalencia del 10% de toxocarosis, pero si consideramos solamente los perros de hasta 6 meses la prevalencia ascendió al 28,2% y al 2,9% en perros mayores..

La prevalencia hallada en perros adultos de diferentes ciudades de Francia fue relevada por diversos estudios llevados a cabo por Bailenger (1955) que encontró un 17%, Biava halló en 1977 un 8,4% y Petithory un 2,6% en 1990. La disminución de la prevalencia fue atribuida a los programas de control que llevaron a cabo los franceses durante los años 1985-1990. Se calcula que entre el 5 y el 20 % de los perros de Europa son portadores de esta parasitosis (Pezzani B., 1996).

El número de gusanos por perro ha sido determinado por diversos autores. Lloyd S., (1993) contó de 2 a 12 gusanos en 16 perros vagabundos adultos en Lituania y Vanparijs O.(1991) reportó una variación de 1 a 82 (media: 14) gusanos por perro en canes vagabundos de Bélgica.

La salida diaria de huevos en las heces tiene un impacto muy importante. Diferentes autores registraron desde 10 a 2490 huevos por gramo de heces en cachorros de perreras (Hayden D., 1991; Lloyd S., 1993). El potencial significado de un cachorro como fuente de contaminación ambiental con huevos de *T.canis* se ve ilustrado con el estudio llevado a cabo en un criadero de Greyhounds en el sudeste de Inglaterra en el cual las muestras fecales fueron tomadas semanalmente de 20 cachorros no tratados. No se detectaron huevos hasta el día 14, pero el día 21 se contaron hasta 107.500 huevos por gramo de heces (media: 10.500 huevos). El día 28 se alcanzó el máximo, con 11.500 huevos por gramo con un pico secundario más bajo en la sexta semana (casi 8.000 huevos por gramo). El primer pico es indudablemente atribuido a la maduración de los gusanos adquiridos por los cachorros en el útero, y podemos especular que el segundo pico puede indicar una nueva vía de infección transmitida por el calostro o por la leche. La puesta de huevos cayó a cero entre las 10 y 12 semanas de edad.

La fecundidad de los gusanos es mas baja en perros adultos bien cuidados. Debemos tener en cuenta que 1/3 de las infecciones no son detectadas por las técnicas coproparasitológicas rutinarias (Kornblatt A., 1979).

***T.canis* en otros caninos:**

La infección con *T.canis* es particularmente común en zorros rojos (*Vulpes vulpes*) con alta prevalencia en Wales (63%), Netherlands (73,7%), etc. Se describe una media de 4,5 gusanos con un máximo de 29 por zorro, La infección es menos frecuente en coyotes (*Canis latrans*), lobos (*Canis*

lupus) y chacales (*Canis mesomelas*) (Hackett F., 1980). Se ignora si en la República Argentina existen estos nematodos en animales silvestres.

Aunque la prevalencia de la infección en animales ha sido reportada repetidamente, es muy rara la bibliografía sobre el potencial biótico (número, fecundidad, sobrevivencia, porcentaje de reinfección) de estos nematodos en perros. También es escasa la información sobre factores que condicionan las diferentes cargas parasitarias de los perros adultos versus los perros menores de 6 meses, la importancia de la contaminación del ambiente de los perros mascotas versus perros vagabundos y de los porcentajes de reinfecciones en las diferentes razas caninas y en los diversos grupos de perros.

Epidemiología en el ambiente

Los huevos evacuados por los perros son no-embriados y así, contrariando la creencia popular, el contacto directo con el perro no transmite la infección.

Es importante el contacto con los huevos en la tierra (geohelmintiasis). De las heces de un perro fuertemente parasitado se dispersan gran número de huevos. Puede ocurrir una significativa asociación entre LMV y LMO y pertenencia de cachorros, pero el factor de riesgo claramente asociado con los casos de toxocarosis es la geofagia y la pica. Además, la cubierta de los huevos de *T.canis* es muy pegajosa. La adherencia a los dedos, juguetes y alimentos, con la subsecuente ingestión es un factor que debe ser tenido en cuenta pues puede implicar la adquisición de la parasitosis en una situación doméstica.

En general, el 50% de los pacientes con toxocarosis clínica nunca tuvieron perros o estrecho contacto con un perro. Esto permite aseverar que la mayoría de las infecciones humanas derivan de la tierra contaminada de los paseos públicos, pero otros lugares de infección o rutas de transmisión deben ser consideradas. Pegg E.(1975) encontró muestras de tierra positivas para *T.canis* en parques y jardines de Londres. Smith R.y colaboradores (1984) hallaron huevos en los juegos y jardines donde no había heces visibles. El estudio llevado a cabo en materia fecal canina recolectada en aceras de la ciudad de La Plata reveló una frecuencia de 10,7% de huevos de *T.canis* y del 13,0 % en los paseos públicos de esta ciudad (Minvielle M.et al., 1993).

La mayoría de los reportes realizados de muestreos de parques y áreas recreacionales han mostrado una alta frecuencia de muestras positivas (O'Lorcain P., 1994). Menos estudios han sido llevados a cabo en los jardines de casas de familia. En un estudio en Irlanda, encontraron mayor contaminación por *T.canis* en las muestras recogidas de los jardines de las casas que en los paseos públicos (Holland C. et al., 1991). Esto puede reflejar una tendencia irlandesa de dejar los perros o mascotas en sus propios jardines antes que llevarlos a los paseos públicos. En Estados Unidos se ha demostrado que entre el 10 y el 32 % de las muestras de tierras recolectadas de parques y áreas de recreación están contaminadas con huevos de *T.canis* (Pezzani B., 1996) .Otros estudios sobre materias fecales caninas recogidas de jardines, parques y áreas recreacionales se resumen en la tabla siguiente.

Tabla N° 1: Deteccion de huevos de *Toxocara canis* en materia fecal canina recolectada en paseos públicos (pp) y en jardines particulares (j) de diversas ciudades.

Localidad	% de positivos	N° de muestras	Referencia
Kansas, USA(pp)	21	282	Dada et al. (1979)
Louisiana,USA (pp)	0,4	1.529	Smith et al. (1984)
Birmingham, UK(pp)	25	80	Borg et al. (1973)
Glasgow, UK(pp)	29	80	Borg et al. (1973)
London, UK (pp)	27	400	Borg et al. (1973)
London, UK (pp)	66	503	Snow et al. (1987)
Minas Gerais, Brazil (pp)	23,07	39	Costa et al.(1994)
Dublin, Irlanda (pp)	6	53	Holland et al. (1991)
Baltimore, USA(j)	11	146	Childs (1985)
Louisiana, USA (j)	10	30	Smith et al (1984)
Kansas, USA (j)	17,5	23	Dada et al. (1979)
Kansas, USA (j)	39,1	23	Dada et al. (1979)
London, UK (j)	5,2	250	Pegg (1975)
Dublin, Irlanda (j)	28	36	Holland et al.(1991)

La dispersión que realizan los artrópodos también debe ser tenida en cuenta. Las moscas ingieren hasta 1-3 mg de heces en 2 o 3 horas; y pueden ingerir huevos de helmintos como el de *T.canis*. Los huevos de *T.canis* han sido hallados en un 2,4% y en un 2,1% de moscas silvestres atrapadas en Nigeria (Lloyd S., 1993). La dispersión que hace la mosca de huevos de cestodos provenientes de heces es de 80 metros pero la diseminación de la infección por otros insectos y animales es suficiente para inducir infecciones hasta 1 km desde la deposición contaminada del perro. Aunque los huevos de *T.canis* deben embrionar, las moscas son atraídas por las heces luego de un considerable tiempo de producidas. El embrionamiento puede ocurrir luego de la dispersión, por eso es que la diseminación a partir de las moscas debe ser investigado (Glickman L. and Schantz P., 1981).

La transmisión potencial de un huésped paraténico a otro ha sido confirmada pues se han recuperado larvas de hígados de pollos que previamente habían ingerido ratones infectados. Las larvas también han sido transferidas de gusanos de tierra a pollos y a ratones (Dubinsky P. et al.,1995). Las larvas de *T.canis* han sido identificadas en alimentos provenientes de animales y de aves, por lo tanto la adquisición de las mismas por humanos al ingerir estos alimentos insuficientemente cocidos puede ser posible. La adquisición indirecta de *T.canis* de alimentos de origen animal requiere mayor evaluación.

-Epidemiología en humanos:

El hombre es un hospedador accidental en el ciclo de *T.canis*, que se infecta por la ingesta de los huevos larvados. Estos huevos eclosionan y las larvas penetran en la mucosa del intestino delgado y por los canales vasculares migran por todo el cuerpo pudiéndoselas encontrar en cualquier tejido u órgano.

Es una parasitosis extendida tanto en los países desarrollados como en los que la estructura sanitaria, cultural y social es deficitaria.

Hoy la enfermedad está ampliamente distribuída, aunque la incidencia es relativamente baja. La toxocarosis humana ha sido descrita en España, Inglaterra, Francia, Bélgica, Italia, Polonia, Alemania, Austria, Grecia, Hungría, Irlanda e Israel. En Asia se ha descrito en Rusia, India y en Japón. En América ha sido reconocida en Argentina, Chile, Uruguay, Colombia, Venezuela, Méjico y en Estados Unidos. En Africa descrita en Egipto, Uganda, etc. La distribución de esta parasitosis está al presente

limitada por la capacidad de los médicos para detectarla y por el uso de test inmunológicos específicos.

En general, la toxocarosis es más probable en climas tropicales. Existe un mayor riesgo de infección en los habitantes de áreas periurbanas y rurales porque no desparasitan sus mascotas. También hay mayor riesgo de seropositividad entre los miembros de una familia de un paciente con toxocarosis (Holland C. et al., 1991; Noemi I. et al., 1994)).

Con el desarrollo de una técnica de ELISA basada en la detección de anticuerpos anti antígenos excretores /secretores (Ag. E/S), ha sido posible llevar a cabo estudios sobre seroprevalencia.

El porcentaje es el mismo en mujeres como en varones (Magnaval J. et al., 1994). Los menores de 12 años están más frecuentemente (80%) enfermos que los adultos (20%) (Pethithory J. et al., 1990). La edad de los pacientes de este estudio varió entre 3 y 56 años. La toxocarosis ocular en hermanos ha sido reportada; por esto, cuando se detecta un caso en un niño, todos los hermanos de la familia deben ser examinados (Pollard Z., 1979).

La toxocarosis enfermedad es más común en niños y esto ha sido relacionado a la geofagia. Los estudios de seroprevalencia en la infancia publicados recientemente van desde un 7 a un 80% (alguna de 1995)

Kenny V. et al. (1987) evaluaron los títulos de anticuerpos antitoxocara por la técnica de ELISA en 302 niños hospitalizados de 2 a 5 años de edad. Tomando un título de corte de 1:32, el 8,6% de los niños resultaron positivos. Pero si este descendía a 1:8, el porcentaje ascendía a 18,9%.

Taylor M. y colaboradores (1988) reportaron estudios llevados a cabo sobre grupos familiares en los cuales al menos un niño de la familia tenía asma. Encontraron una seroprevalencia antitoxocara del 8% en los menores de 15 años y del 3% en los mayores. El título de corte fue de 0,3 unidades de densidad óptica.

Holland C. y colaboradores (1991) informaron datos ampliados sobre esas familias y su ambiente incluyendo una comparación de los títulos de anticuerpos antitoxocara por la técnica de ELISA medidos en dos laboratorios de referencia (de Londres y de Glasgow). Analizaron 129 muestras pareadas de suero de adultos y de niños de esas familias. Con un título de corte de 0,3 para la medición realizada en Londres resultó un 6,2% de sueros positivos, mientras que un título de 1:50 usado en Glasgow dio un 48,8% de positivos. Si el título de corte se elevaba a 1:800 la seropositividad caía al 6,9%.

En el mundo, la seropositividad ha sido reportada variando desde 86% en un área rural del Caribe hasta 1,80% en Venezuela. Las comparaciones entre países son casi imposibles pues la poblaciones

estudiadas y los títulos de corte varían ampliamente. En la tabla siguiente se dan algunos datos relevados en distintos países:

Tabla N° 2: Frecuencia de detección de anticuerpos antitoxocara por la técnica de ELISA en diferentes poblaciones.

País/ región	Población estudiada	% de positivos	Autor y año
Caribe	Rural-niños	86	Thompson-86
Hawaii	Niños-asma	28	Desowitz-81
Escocia	Urbana-hospital.	14	Embril-88
Escocia	Rural-hospital.- niños	19,50	Embril-88
Irlanda	Urbana-hosp- niños	19	Kenny-87
Irlanda	Rural-hospital.- niños	8,60	Kenny-87
Inglaterra	Niños	14,30	Josephs-81
Nueva York	Niños	5,40	Marmor-87
Irlanda	Adultos-niños- asma	52	Holland-91
Norte de Italia	Adultos sanos	3,98	Genchi-90
Stuttgart- Alemania	Adultos sanos	4,80	Kimming-91
Norte de Brasil	Niños con eosinofilia	40,00	Virginia-91
Holanda	Niños sanos	11,00	Van Gemund-89.
Salamanca (España)	Niños sanos	6,50	Conde García-89
Barcelona (España)	Adultos	3,60	Portus-89
España	Adultos y niños con eosinofilia	14,10	Portus-89
Suecia	Adultos sanos	7,00	Ljungstrom-89
Egipto	Adultos enfermos	40,00	Safar-90
Venezuela	Adultos	1,80	Lynch-88
Venezuela	Indios amazónicos	34,90	Lynch-88
Nueva Zelandia	Adultos sanos	2,80	Clement-87
Argentina	Adultos y niños enfermos	63,00	Bellegarde-89.
Federación Rusa	Adultos y niños enfermos	6,8	Avdiukhina T-94

Los relevamientos seroepidemiológicos en muchos países del mundo sugieren que la infección por *T.canis* puede ocurrir frecuentemente. Si bien la enfermedad se detecta más en niños, existe un pequeño incremento de la seropositividad (utilizando la técnica de ELISA) con la edad, el cual podría ser explicado por la prolongada respuesta inmune de los individuos después de la infección. En algunos países de Europa se asume que la infección en el ambiente es constante, lo que lleva a calcular una incidencia que oscila entre un 2 a un 5 % por año (Knapen F. and Buijs J., 1993).

Es interesante comparar los relevamientos seroepidemiológicos para anticuerpos antitoxocara con los anticuerpos antiáscaris ya que ambas infecciones pueden ocurrir en los mismos individuos pues sus ciclos comparten el embrionamiento en tierra (geohelmintiasis) y posterior ingesta de huevos infectivos. Es por ello que se insiste mucho sobre la especificidad de los métodos serológicos usados (Cuellar C. et al., 1995). En un estudio realizado en Suiza (Ljungstrom I. and Knapen F., 1989) que incluyó pacientes con diagnóstico presuntivo de toxocarosis, se detectaron anticuerpos contra ambos parásitos (*Ascaris* y *Toxocara*) en casi el 50% de los casos. Podríamos postular que tienen las dos parasitosis, que una parasitosis se contrajo primero y otra después pero la memoria inmunológica persiste para las dos, o que la técnica falla en su especificidad.

Las larvas pueden vivir largo tiempo en los huéspedes humanos, durante el cual no se multiplican. Puede ocurrir que sólo pocas larvas causen enfermedad clínica aparente si se establecen en un sitio crítico (globo ocular por ejemplo). Es entonces importante detectar títulos de anticuerpos tanto altos como bajos. Se considera que los títulos serológicos están directamente relacionados con el número de larvas, pero no existe un consenso general a este concepto porque la respuesta humoral antitoxocara persiste durante prolongados periodos (años) y decae lentamente. Los estudios sobre respuesta humoral son muy escasos en la literatura..

Los títulos de corte usados son diferentes según los laboratorios de origen de los equipos de ELISA. Así en Estados Unidos generalmente utilizan 1:32, en los laboratorios de Inglaterra 1:50 porque desean reducir las reacciones cruzadas con los anticuerpos anti-A y anti-B de los grupos sanguíneos y existen equipos comerciales que expresan su título en unidades de densidad óptica .

Al intentar realizar una evaluación general de la seroepidemiología de la toxocarosis se presentan serias dificultades ya que:

- No hay un acuerdo universal para la expresión de los títulos. Algunos usan unidades de densidad óptica y otros usan unidades de dilución de suero.
- La metodología puede variar de laboratorio a laboratorio.
- Tampoco existe un título de corte acordado. No debemos olvidar que en toxocarosis ocular suele haber menores títulos de anticuerpos.
- Las poblaciones estudiadas no son uniformes. La mayoría de los estudios están hechos sobre niños y/o adultos que asisten a los hospitales y esto no es representativo de la población normal.
- Otras enfermedades pueden afectar los títulos en toxocarosis. Desowitz R. et al. (1981), ha llamado la atención sobre la alta seropositividad en niños asmáticos hawaianos respecto de los no-asmáticos. Ya se mencionó el problema de reacción cruzada con *Ascaris lumbricoides* y Santillán y colaboradores han detectado otras parasitosis que cruzan serológicamente con toxocarosis. (1995)

El problema reside en decidir el rango "normal" para los títulos antitoxocara. Esa normalidad podría decidirse sobre los títulos de los que tienen evidencias externas de toxocarosis. Pero no detectaría las toxocarosis encubierta y la ocular, que suelen transcurrir con títulos serológicos de anticuerpos dentro de lo que consideramos rangos "normales". Realmente se necesitan mayores estudios sobre seroepidemiología y dinámica de anticuerpos antitoxocara en poblaciones humanas.

Poseción de perros y seropositividad:

En Irlanda, Kenny V. et al. (1987) realizaron un estudio relacionando la posesión de perros y la seropositividad con un título de corte de 1:8 y encontraron una relación significativa, pero no informaron si esta asociación continuaba dándose si el título de corte asciende a 1:32. Otro estudio llevado a cabo por Holland C. et al. en 1991, no pudo evidenciar tal

asociación. La controversia aún persiste entre los diferentes grupos de investigadores.

Los cachorros parasitados son una importante fuente de huevos de *T.canis*. Podemos esperar así, que la gente con regular contacto con las heces de los cachorros tenga una exposición más frecuente con mayor riesgo de infección con *T.canis* que la población general. En un estudio llevado a cabo por Woodruff A.y colaboradores en 1989, el 15,7% de 102 cuidadores de perros fueron positivos para el test de ELISA que empleaba antígenos E/S, en contraste con el 2,6% de los seropositivos de 922 sueros representativos de la población en general. Los cuidadores de perros tienen un doble incentivo para implementar el control de *T.canis*, uno para mejorar el estado de sus animales y otro para proteger su propia salud (Fisher M. et al., 1994).

Infección transplacentaria en humanos:

La migración transplacentaria de larvas previamente "adormecidas" ocurre en perros y ha sido sugerido que la infección por esta vía podría ocurrir en el humano.

Para examinar este aspecto, O'Connor P.(1993) realizó un estudio en Israel de sangre de cordón y de sangre materna . En los sueros de sangre de cordón se detectaron los mismos niveles de anticuerpos totales que en los sueros maternos. Los sueros de cordón positivos fueron examinados para detectar anticuerpos IgM antitoxocara. Todos fueron negativos sugiriendo que la infección transplacentaria no ocurrió en el grupo estudiado.

Lo que no está claro en los estudios de seroprevalencia es la morbilidad de la infección por *T.canis*. La infección asintomática serológicamente comprobada ha sido descrita, pero si es la excepción o la regla, habrá que comprobarlo.

E-CONOCIMIENTO DEL PROBLEMA

Hay poco grado de conocimiento en la gente sobre el perro como fuente de toxocarosis humana. Solamente los padres de niños afectados son concientes acerca de la enfermedad de sus hijos, la cual perciben como adquirida, quizá de una mascota familiar o más frecuentemente de un perro que nunca tuvieron.

Internacionalmente, en Estados Unidos, un fallo por 1,5 millones de dólares a un vendedor de mascotas por daño, dolor y sufrimiento a un niño con amaurosis uniocular, ha incrementado el interés del problema. En Inglaterra se ha realizado un "acuerdo de partes" con una intendencia local en un caso en que los padres demandaron por la ceguera bilateral de su hijo que consideraron debida a toxocarosis contraída en un parque público que se encontraba bajo el control de esa intendencia. Esto puede parecer extraño, pero debemos tener en cuenta que el síndrome de LMO puede ser ocasionado por pequeña cantidad de larvas que pueden ser adquiridas en una sola fuente de contaminación (Lloyd S., 1993).

El número de perros incrementa en el mundo. En Inglaterra contabilizaron 4,4 millones en 1963 y 7,3 millones en 1988. En la Comunidad Europea 29 millones en 1985 y en Estados Unidos 52-54 millones. En la República Argentina se considera que existe un perro cada cinco-diez habitantes. En la ciudad de La Plata, se estimaron 80.000 perros en 1994 (Radman N., Informe Interno -Facultad de Ciencias Veterinarias). El aumento se debe a los beneficios aportados por la compañía de los perros, pero debemos ser concientes también de lo que significa potencialmente un perro parasitado.

Si deseamos minimizar el riesgo de esta enfermedad en el hombre y en los animales, el número de huevos de *T.canis* en el ambiente debe ser reducido y consecuentemente debemos diseñar e instaurar programas de control.

F-TOXOCAROSIS HUMANA

-Aspectos clínicos:

Al presente, se describen siete síndromes de toxocarosis humanas denominados larva migrans ocular (LMO), larva migrans visceral (LMV), toxocarosis encubierta (TC), toxocarosis asmátiforme, neurológica, neurofisiológica y subclínica (Petithory J. et al., 1994).

Es poco frecuente que los profesionales de la salud consideren a la infección por *T.canis* como una posible causa asociada a los diferentes ítems mencionados en la tabla N° 3. Solamente recuerdan la toxocarosis cuando hay eosinofilia y/o niveles elevados de IgE pues entonces asocian a los parásitos (Zawawy L. Et al., 1995).

Tabla N°3: Síntomas y signos asociados a Toxocarosis humana

Características clínicas y de laboratorio asociadas con toxocarosis humana	Dolor abdominal. Hepatomegalia. Anorexia. Náuseas. Vómitos. Letargia. Disturbios del sueño o de la conducta. Neumonía. Tos/Broncoespasmos. Faringitis. Adenitis cervical. Cefaleas. Dolor de extremidades. Fiebre moderada. Eosinofilia. Serología antitoxocara positiva.
La ausencia de eosinofilia no excluye la toxocarosis.	

No todas las infecciones por *T.canis* se acompañan de eosinofilia. En realidad la eosinofilia parece estar relacionada con la edad y se observa más a menudo en niños que en adultos. Beaver P.(1962) reportó que en aproximadamente el 80 % de los casos los eosinófilos representan más del

10% de los leucocitos circulantes. En la experiencia de Taylor M. y colaboradores (1988), la eosinofilia no fue esencial para el diagnóstico, pero apareció como una característica asociada a los casos severos en chicos.

Eosinofilia "inexplicada" es un término a menudo usado en pacientes en los cuales no se puede encontrar la causa de la misma. Un estudio llevado a cabo por Taylor M. en 1993 encontró que un 35% de estos casos de inexplicable eosinofilia se asociaron a infección por *T. canis* de acuerdo a los métodos serológicos. Debemos tomar con reserva estos resultados pues la técnica de ELISA presenta problemas de especificidad como ya mencionamos, y podrían existir otros nematodos causantes de la eosinofilia..

Las isohemaglutininas anti-A y anti-B parecen también estar asociadas con LMV en humanos y en animales de experimentación y son producidas en respuesta hacia los epitopes de los antígenos E/S sintetizados y secretados por las larvas que son semejantes a los determinantes inmunogénicos A y B de los grupos sanguíneos humanos (Smith H. et al., 1983).

Larva migrans visceral(LMV):

Fülleborn reconoce la potencial infectividad del género *Toxocara* respecto al ser humano en 1921., pero recién en la década de 1940 se reconoce un síndrome producido por ascáridos en niños, caracterizado por persistente eosinofilia. Se observaron granulomas eosinofílicos en hígados de niños con eosinofilia en 1947. Varios años más tarde, las larvas de estos nematodos fueron identificadas en los granulomas hepáticos y en el cerebro de un niño. Beaver y colaboradores, identificaron larvas de *T. canis* en una biopsia hepática y propusieron el término larva migrans visceral (LMV) que consistía en eosinofilia, hepatoesplenomegalia y broncoespasmo en 1952. La infección era más probable en jóvenes y con fuerte predominio masculino. Una historia de pica era un hallazgo común.

LMV ocurre típicamente en niños de 6 meses a 3 años de edad, quienes han tenido una historia de geofagia o estrecha asociación con cachorros, y menos frecuentemente en adultos. Las características clínicas de LMV incluyen una prolongada y alta eosinofilia, a menudo en combinación con (en orden de frecuencia descendente) hepatomegalia, hipertermia, compromiso pulmonar, síntomas gastrointestinales, disturbios del sistema nervioso central, compromiso cutáneo y miocarditis (Ehrard T. et al, 1979; Saralegui Y. et al., 1994)). El compromiso pulmonar ocurre en el 42% de los adultos y en el 72% de los chicos con LMV aunque es raro

una descompensación respiratoria severa. Los síntomas pulmonares generalmente incluyen asma, bronquitis aguda o neumonitis con un 50% de pacientes que muestran radiológicamente infiltrados pulmonares transitorios (Beshear J. et al., 1973). La mayoría de los niños con LMV tienen un elevado título de aglutininas anti-A y anti-B porque las larvas de *Toxocara* contienen en su superficie o secretan antígenos que estimulan la producción de isohemaglutininas.

Los raros casos fatales de toxocariasis, resultan del extenso compromiso del miocardio, del sistema nervioso central o de una exagerada respuesta inmune (Bouchard O. et al., 1994).

La presencia de larvas y de granulomas eosinofílicos en el sistema nervioso central en biopsias o en autopsias, sugiere que los signos neurológicos resultan de la destrucción mecánica del tejido o de la reacción a los antígenos secretados (Sommer C. et al., 1994).

Las manifestaciones neurológicas incluyen descargas focales o generalizadas y desordenes en la conducta, que han sido reportados hasta en un 28% de pacientes con LMV. El líquido cefalorraquídeo puede contener elevado número de eosinófilos (Kurnar J. et al., 1994).

Las convulsiones ocurrieron en algunos pacientes. En algunos casos, estas pudieron ser originadas por la fiebre, pues resolvieron con la terapéutica antipirética adecuada. En el modelo murino, las larvas de *T. canis* pueden ser halladas en el cerebro. Esto resulta en alteraciones de las funciones cognitivas de los ratones infectados (Hay, 1984). Las larvas de *T. canis* también han sido halladas en autopsias cerebrales humanas (Nelson, 1990).

T. canis ha sido cuestionado como causa frecuente o importante de enfermedad neurológica. Woodruff A. y colaboradores (1966) desarrollaron una prueba cutánea -con un antígeno somático- para detectar la infección previa y encontraron una positividad del 2,1% en personas aparentemente sanas y del 7,5% en personas con epilepsia. Postularon entonces, que o la infección por *T. canis* podía causar epilepsia o que los epilépticos son más propensos a contraer toxocarosis. Debemos aclarar que las pruebas cutáneas en toxocarosis tienen serias dificultades de especificidad. Más recientemente, Glickman L. y colaboradores (1981), testearon 84 niños epilépticos y 108 controles no epilépticos, y encontraron que los epilépticos tenían títulos de anticuerpos antitoxocara significativamente más altos. No obstante, no observaron ninguna diferencia entre los títulos de niños con epilepsia idiopática y aquellos con epilepsia de causa conocida. Además, la pica, el retardo mental y la hiperactividad están comúnmente asociadas con la epilepsia, y estas condiciones predisponen a los epilépticos para contraer la infección por *T. canis*. Se concluye que no hay evidencias que soporten el argumento de que *T. canis* sea una causa importante de epilepsia en

chicos. Al mismo tiempo, es cierto y aparente que *T.canis* puede y entra al sistema nervioso central de algunos niños que han ingerido huevos infectivos y que las consecuencias pueden ser serias (Arpino et al., 1990).

Las principales manifestaciones de la toxocarosis que aparecen en la bibliografía consultada se resumen en la tabla siguiente:

Tabla N° 4: Signos y síntomas en Toxocarosis (evidenciadas serológicamente). Comparación de estudios:

Característica	% de pacientes con la característica			
	Snyder-1961	Huntley-1963	Taylor-1988	Guillespie-1993
Pica	100	90	-	10
Fiebre	55	80	33	39
Tos	20	80	68	46
Disnea	20	63	51	28
Dolor abdominal	-	-	63	32
Trastornos en el desarrollo	-	39	-	4
Anemia	40	-	-	4
Asintomáticos	9	13	-	12
Varones	75	66	-	60
Eosinofilia	100	100	-	77
Hepatomegalia	85	65	26	15
Esplenomegalia	40	-	8	11
Linfadenopatías	-	8	62	21
Broncospasmo	-	43	-	17
Lesiones en piel	-	22	5	32
Convulsiones	33	46	-	4

Estos estudios revelaron que la fiebre, la tos, el dolor abdominal y los trastornos en el desarrollo son signos y/o síntomas anteriormente ignorados en toxocarosis.

El dolor abdominal es un síntoma curioso, dado que *T.canis* no es capaz de completar el ciclo biológico en el huésped humano y los gusanos

adultos no desarrollan en el intestino. A pesar de esto, el dolor abdominal ha sido hallado en varios estudios sobre toxocarosis (Van laethen J. et al., 1994). Quizá pueda asociarse a la hepatoesplenomegalia (Bhatia V. et al., 1994). Taylor M.(1993) expresa que este dolor abdominal es muy raro en niños menores de 5 años y que la mayor frecuencia se presenta entre los 9 y 10 años. Este mismo autor presentó un estudio en 1988 con un 61% de pacientes con títulos antitoxocara superiores a 0,3 unidades de densidad óptica que tenían dolor abdominal. Esto sustenta la idea de que los dolores abdominales recurrentes sin causa aparente en niños mayores pueden ser debidos a toxocarosis.

De particular interés son los casos de diagnóstico serológico de toxocarosis en pacientes sin signos ni síntomas. La toxocarosis clínicamente inaparente es frecuentemente informada en los países donde la serología se realiza de rutina en los pacientes pediátricos.

Los signos y síntomas de un cuadro agudo de larva migrans visceral pueden ser fácilmente confundidos con la multiplicidad de cuadros febriles de los niños pequeños (Jacob C. et al., 1994).

La tos y el broncoespasmo son importantes signos de larva migrans visceral (Buijs J. et al., 1994). La historia natural de la interacción de la larva 2 dentro de los pulmones de los seres humanos es desconocida. El exámen histológico de pulmones de ratones infectados con *T.canis* muestran una inflamación multifocal persistente, donde se observan eosinófilos, macrófagos y muchos linfocitos (Buigs y col., 1990). Esta respuesta inflamatoria esta presente por más de cuatro semanas (Buijs J. et al., 1995). Una clara asociación entre larva migrans visceral y persistente hiperreactividad bronquial debe esperarse en los resultados de posteriores estudios.

Desowitz R.y colaboradores (1981), comunicaron en Hawaii una seroprevalencia de 6,4% en 96 niños no asmáticos con un rango de edad de 1 a 18 años y un 28% en chicos asmáticos del mismo rango de edad.

Taylor M.y colaboradores(1988), revisaron los datos de 30 familias y compararon los sujetos seropositivos para toxocarosis y los que referían episodios de disnea. El 47,4% que presentaron disnea tenían títulos superiores a 1:50. Estas variaciones respecto al trabajo de Desowitz podrían deberse a variaciones raciales, a una genética predisposición a la atopía en los miembros de familias irlandesas o a problemas de especificidad en las técnicas serológicas utilizadas. Una comparación con sujetos de familias libres de asma se requiere para hacer una verdadera comparación con los hallazgos en Hawaii.

Existe un estudio que intentó asociar la seropositividad antitoxocara y anormalidades del área cognitiva en seres humanos, pero esta relación fue

rechazada cuando los grupos fueron estratificados por clases sociales (Worley et al., 1984).

En el presente, no es posible medir diferencias significativas en las funciones cognitivas con un test, el cual ha de ser convenientemente aplicado a gran número de niños. La validez de realizar esta metodología ha sido muy cuestionada. La relación entre infección por *T.canis* y déficit neurológico aún permanece dudosa y necesita mayores estudios.

Larva migrans ocular (LMO):

El síndrome de larva migrans ocular (LMO) fue reconocido por primera vez por Wilder, quien en 1950 describió este síndrome en un grupo de pacientes quienes habían sufrido una enucleación ocular con el diagnóstico presuntivo de retinoblastoma. En este grupo de 47 pacientes, las larvas o material hialino residual asociado a las mismas fueron vistos en 23 casos. Las larvas fueron posteriormente identificadas por otros patólogos como *Toxocara spp.*

En 1961, Duguid describe 28 casos de lesiones granulomatosas centrales en la retina que aparentaban un retinoblastoma pero en las que se observó *T.canis*. También se han reportado lesiones periféricas en retina y en el segmento anterior del ojo provocadas por este parásito (Glickman L. and Schantz P., 1981).

Las larvas de *T.canis* son capaces de invadir casi todas las estructuras del ojo. Cuando esto sucede puede ocurrir un daño significativo. No obstante, es considerado un fenómeno relativamente raro, ya que los oftalmólogos ven esporádicos casos. En la experiencia de Gillespie (1993), de 118 pacientes con resultado positivo para el diagnóstico serológico de toxocarosis, 1/3 fueron enviados debido a la presencia de síntomas oculares. Pero cuando se obtuvieron detalles clínicos más completos de estos pacientes, la revisión de las historias clínicas estableció la pérdida significativa de la visión en la mitad de ellos.

La infección ocular es más frecuente en hombres (2:1) y usualmente hallada en adolescentes. La pérdida de la visión es generalmente unilateral, pero han sido descritos signos bilaterales en el 3% de los casos (Benitez J. et al., 1995). Los pacientes con enfermedad ocular tienen una baja concentración de anticuerpos en comparación con las formas viscerales de esta enfermedad. Este hecho tiene importancia en el diagnóstico de laboratorio de esta parasitosis ya que los reactivos deben tener suficiente sensibilidad para detectar estos casos.

En las primeras revisiones sobre toxocarosis ocular, el granuloma fue la complicación más frecuentemente hallada. La mayoría en el polo posterior del ojo. La toxocarosis es aún hoy un importante diagnóstico diferencial de retinoblastoma en pacientes pediátricos (Lopez R. et al., 1995). Como la habilidad para realizar el diagnóstico ha mejorado, otras lesiones además del clásico granuloma en el polo posterior, han sido reportadas. Así, los granulomas pueden ser hallados también en retina periférica.

La endoftalmitis y la uveítis son causas importantes de pérdida visual en la fase aguda de la enfermedad. La posterior fibrosis es la causa más importante de la pérdida de la visión en la mayoría de las lesiones crónicas. Otras causas menos comunes de pérdida visual incluyen hipopión, abscesos vítreos, neuritis óptica, queratitis, uveítis o larvas móviles en la cavidad del vítreo. En algunos casos puede observarse un "trayecto subretinal" rodeado de células inflamatorias, el cual probablemente represente la ruta migratoria de la larva. La persistente eosinofilia, leucocitosis y los elevados niveles de isohemaglutininas generalmente asociados con LMV, usualmente no ocurren en la enfermedad ocular (Shields J., 1984)

Los síntomas oculares asociados con la infección por *T.canis* tienden a ser hallados en pacientes de más edad que aquellos con síntomas viscerales. Generalmente son niños de 4 a 6 años de edad. Los pacientes con LMO generalmente no tienen una historia de geofagia tan evidente o una asociación estrecha con cachorros y probablemente tengan una carga larvaria menor que los pacientes con LMV.

El diagnóstico de LMO por hallazgo de las larvas de *T.canis* en muestras de ojos patológicos es hoy considerado como un caso de diagnóstico impropio. Las larvas son raramente observadas en la examinación oftalmoscópica (Petithory et al., 1990). El diagnóstico de LMO debería basarse en test inmunológicos (Glickman et al., 1979, Petithory, 1990). Robertson et al. (1988) descubrieron un antígeno específico de *T.canis* en el suero de casos de LMO. Este antígeno puede ser usado como un nuevo acercamiento hacia el diagnóstico de LMO.

El diagnóstico diferencial con retinoblastoma es difícil y, considerando las serias consecuencias que el tratamiento (enucleación) incluye, es necesario un estricto criterio diagnóstico.

La serología presenta serias dificultades. Algunos datos bibliográficos se resúmen a continuación: Un caso de retinoblastoma descrito por Pollard Z. y colaboradores en 1979 tuvo una falsa reacción positiva. Inversamente, un test de ELISA con un título de 1/4 para *T.canis* fue considerado no-significativo en una niña de cuatro años, quien consecuentemente fue

sometida a una enucleación por diagnóstico presuntivo de retinoblastoma. Posteriormente se halló una larva de *T.canis* en la muestra anatomopatológica. Un niño de 5 años de edad presentó hallazgos clínicos consistentes con toxocariasis ocular, eosinofilia sanguínea y títulos no significativos repetitivos (1/2) en el test de ELISA para Toxocara. El ojo fue enucleado y aparecieron fragmentos de larvas dentro de un granuloma en la cavidad vítrea.

Los resultados serológicos negativos y eosinofilia sanguínea normal son debidos a la barrera fisiológica existente entre la sangre y los fluidos oculares. Así, la inyección de varios miles de larvas vivas de *Ascaris suum* en el humor vítreo de cobayos solamente originó anticuerpos específicos de tipo IgE en el suero de la mitad de los casos mientras que siempre se halló IgE específica en el humor acuoso (Donnelly J.et al., 1977).

Las reacciones serológicas positivas y la hipereosinofilia solamente ocurre en el caso de una importante reacción inflamatoria que permite a los antígenos pasar la barrera ojo-sangre o en el caso que LMO se asocie con LMV, lo cual es infrecuente.

La síntesis de inmunoglobulina local en el ojo, permite el uso de pruebas inmunológicas usando el humor vítreo y/o acuoso. Estas pruebas se consideran indispensables para asegurar el diagnóstico de LMO.

Los criterios principales para el diagnóstico de LMO establecidos por Pethitory J.y colaboradores en 1990 son los siguientes:

- lesiones oculares,
- eosinofilia en humor acuoso o en humor vítreo,
- test inmunológico positivo para antígenos de nematodos en el humor acuoso o en el humor vítreo.

En los casos en que el diagnóstico diferencial con retinoblastoma es más difícil, las enzimas acuosas pueden ser de ayuda. La proporción de la lactato dehidrogenasa (LDH) acuosa/plasmática es mayor que 1:1 en retinoblastoma pero no en toxocarosis ocular, y la proporción de la fosfoglucoisomerasa es mayor que 2:1 (acuoso/plasma) en retinoblastoma pero no en toxocarosis ocular (Shields J., 1984).

Existe un importante estudio inmunológico realizado por Pethitory J.y colaboradores (1994) sobre LMO. Fueron llevados a cabo en el humor acuoso y en el fluido sub-retinal puro de pacientes con patologías oculares compatibles con LMO. Los humores acuosos controles fueron obtenidos de doce donantes de córnea. Utilizaron técnicas de doble difusión en gel de agarosa con 20 µl de fluido intraocular en un pocillo central y en los

pocillos periféricos colocaron antígenos de *Ascaris suum* adultos, *T. canis* adultos, E/S de *T. canis* y E/S de *T. cati*. A veces agregaban los antígenos de *Taenia solium*, *Candida albicans* o *Hypoderma lineatum* o de quiste hidatídico si los signos clínicos hacían sospechar alguna de estas patologías. Los resultados inmunológicos en el humor vítreo fueron satisfactorios con los antígenos de adultos de *A. suum*, ineficaces con el antígeno total de *T. canis* adulto y muy satisfactorios con los antígenos E/S, ya que no dieron falsos negativos. Además, todos los pacientes con toxocarosis fueron positivos con una técnica de ELISA desarrollada para detectar el antígeno E/S de *T. canis* en el humor vítreo. Estos dos métodos necesitan muy poco fluido ocular (10 a 20 µl) y el test de Ouchterlony permite determinar con una sola muestra varios antígenos de parásitos que puedan infectar el ojo. Los doce controles normales de humor vítreo fueron negativos para todos los test con los antígenos estudiados.

Evaluaron la eosinofilia sanguínea que apareció elevada en el 30 % de los casos. Así, podemos decir que la eosinofilia sanguínea no es un criterio absoluto para el diagnóstico de LMO. Los estudios citológicos de los fluidos de las vitrectomías o de humor acuoso demostraron en los casos de toxocarosis ocular una reacción linfocítica con o sin células plasmáticas, lo que implica una estimulación antigénica. Todos los pacientes tuvieron eosinofilia en el fluido de la vitrectomía o en el humor acuoso, por lo tanto puede ser considerado un criterio diagnóstico pero debemos aclarar que la presencia de eosinófilos no es específica de LMO y puede ser observada en otras helmintiasis oculares y en hipodermosis.

La concentración de IgE en los fluidos vítreos y en el humor acuoso fue dependiente de la concentración sérica de IgE salvo en dos pacientes con toxocarosis ocular en que los niveles de esta inmunoglobulina fueron muy altos indicando una síntesis local de IgE.

Los sueros fueron solamente positivos para anticuerpos antitoxocara en dos de cada tres casos. Además hay que tener en cuenta que los adultos "sanos" dan seropositividad para el test de ELISA del 2 al 5 % en los países desarrollados.

Existen diferencias en el modelo de ocurrencia entre LMV y LMO. Es raro que la infección por *T. canis* resulte en una concurrencia de ambos síndromes. En un estudio de 254 personas con LMO, solamente cinco tenían un síndrome de LMV asociado con los signos oculares (Glickman L. and Schantz P., 1981). Dos niños tuvieron LMO cuatro y diez años después del diagnóstico inicial de LMV, pero la secuela ocular luego de una LMV es infrecuente. El promedio de edad de los pacientes con LMO es más alto que aquellos con LMV, y la geofagia o pica no es un hallazgo prominente. La eosinofilia persistente y pronunciada que generalmente acompaña al síndrome de LMV, esta virtualmente ausente en LMO.

Larvas de nematodos implicadas en LMO: Otras larvas de nematodos diferentes a *Toxocara sp.* han sido halladas en lesiones oculares, por ejemplo *Baylascaris sp.*, larva de 40 mm x 1,25 mm (Beaver P. and Bowman D., 1984), larvas de *Hexameta sp.* de 9 mm x 0,5 mm (Goodart R. et al., 1985), y larvas del ascárido *Baylisascaris procyonis* (Kazacos K. et al, 1984).

Sprent J. (1956) ha demostrado que luego de la infección experimental de ratones con huevos embrionados de *T.cati*, alrededor del 20% de las larvas fueron hallados en el cerebro, hígado y pulmones. Esto muestra la capacidad migratoria de *T.cati* y refuerza la idea de que son capaces de jugar el mismo rol que las larvas migrantes de *T.canis*.

Los estadios infectivos de *T.canis* y de *T.cati* tienen casi la misma morfología, difiriendo solamente en su diámetro máximo. En los cortes de tejidos, las larvas de *T.canis* pueden exhibir un diámetro máximo de 14 a 20 μm y en *T.cati* es de 12 a 16 μm . El diagnóstico de larvas de *Toxocara* puede ser hecho sobre la base de una buena sección transversa a nivel del intestino medio. Las secciones longitudinales o las secciones transversas a otros niveles del intestino proveen muy pocos caracteres exclusivos de especie y solamente raras veces permiten la identificación en una sola sección. Así, en secciones histológicas, el diagnóstico entre las dos especies es muy difícil de hacer y puede ser imposible.

La mayoría de los anticuerpos monoclonales contra los antígenos E/S de *T.canis* reaccionan contra los antígenos E/S de *T.cati* (Maizels et al., 1987).

Toxocarosis encubierta (TC):

La TC describe los signos y síntomas de pacientes con toxocarosis que no pueden ser ingresados en la categoría de LMV o LMO. Los síntomas son generalmente inespecíficos pero cuando se agrupan forman un síndrome reconocible (Bass J. et al, 1983). Síntomas tales como hepatomegalia, tos, disturbios del sueño, dolor abdominal, cefaleas y trastornos de la conducta se han asociados con títulos elevados de anticuerpos antitoxocara. (Taylor et al., 1987). Otras manifestaciones incluyen anorexia, adenitis cervical, dolores de extremidades, disnea y fiebre.

Notamos la diversidad en las presentaciones clínicas y en el curso de los síndromes de larva migrans ocular, visceral y toxocarosis encubierta. Se

enfatisa la necesidad de reconocer esta enfermedad en sus formas leves o cuando no tiene sus clásicas descripciones. Esto podría facilitarse si se incluyera a la toxocarosis en el diagnóstico diferencial de numerosas patologías de la infancia tales como disnea infantil, trastornos del desarrollo, convulsiones, dolor abdominal, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía generalizada, eosinofilia y trastornos de la conducta o del sueño.

Es preciso realizar posteriores estudios que cuantifiquen la morbilidad de la infección por *T.canis* y así podremos conocer el impacto que ella causa en los niños. Debemos tener siempre presente el amplio rango de presentaciones clínicas.

Inmunopatogenia:

A pesar de que los síntomas y los signos de LMO, LMV, TC y otros difieren, es probable que la patogénesis de la enfermedad sea similar en todos los síndromes. Las larvas se liberan en el intestino delgado del hombre y penetran la pared intestinal, migran hacia el hígado y hacia los pulmones y salen de los mismos por las venas pulmonares hacia el corazón y hacia la circulación general. Los estadios iniciales tienen una distribución por vía hemática, aunque la migración a través de los tejidos y de las cavidades del cuerpo también ocurre (Abo-Shehada et al., 1984). Las larvas son transportadas a través del sistema vascular hasta que alcanzan un capilar de igual o menor diámetro que ellas al cual penetran mecánicamente y con la ayuda de enzimas proteolíticas secretadas, migran extensivamente por los tejidos blandos del cuerpo incluyendo el hígado, pulmones, corazón, etc. donde pueden causar signos y síntomas indicativos de LMV, TC u otros, y en el ojo LMO.

Las larvas migrantes dejan trayectos hemorrágicos y áreas de necrosis en sus estelas. Las larvas no migran continuamente, sino que tienden a "descansar" periódicamente para luego continuar su migración (Smith H., 1991). Además, pueden volver hacia atrás a través de la ruta que ya habían recorrido. Durante estos períodos de movimientos reducidos las larvas pueden llegar a ser un foco para una respuesta inflamatoria mediada por el sistema inmune. La migración larval estimula una respuesta inflamatoria generalizada en el huésped; y tempranamente se da una leucocitosis con eosinofilia, monocitosis, neutropenia y linfocitopenia. En algunas situaciones se genera un granuloma eosinofílico alrededor de la larva y puede entonces ser inmovilizada y destruída por la respuesta del huésped.

No obstante, las larvas no siempre son destruidas y son capaces de moverse y liberarse del foco inflamatorio (Ghafoor S. et al., 1984). Los granulomas maduros exhiben un área central de necrosis rodeadas por células epiteliales, células gigantes de cuerpo extraño, tejido conectivo fibroso, granulocitos y linfocitos, y las lesiones más antiguas muestran una capa bien desarrollada de células epiteloides y tejido fibroso denso. La larva, si esta presente, puede aparecer intacta o degenerada con o sin una capsula residual hialina (Shields, 1984). La mayoría de las patologías asociadas con las infecciones por *T. canis* resultan del daño del tejido causado por la respuesta inflamatoria mediada por el mecanismo inmune y por los productos biológicos activos tales como proteasas liberadas por las larvas. La acción in vivo de los productos excretados y/o secretados por *T. canis* (TES) ha sido descrita por Maizels et al (1991): pueden ocurrir lesiones inflamatorias agudas y crónicas a la vez dentro del mismo tejido, indicando que la patogénesis de las lesiones está induciéndose continuamente durante la infección.

Glickman L. y Schantz P. (1981) sugirieron que las manifestaciones clínicas y patológicas de los síndromes de LMV y de LMO estaban relacionadas con la carga parasitaria del huésped. Para estos investigadores, la carga parasitaria de los pacientes con LMO era menor que la carga de los pacientes con LMV, quienes podían tener hasta 30 larvas por gramo de tejido hepático. Glickman L. et al (1981) demostraron que los niveles de anticuerpos en perros estaban estrictamente relacionados con la dosis, y esto podría extrapolarse a los humanos también. Estos autores también encontraron que los niveles de anticuerpos eran más altos en LMV que en LMO, pero más altos aún lo eran en los casos combinados de LMO y LMV. Presentaron la hipótesis de que la menor masa antigénica no alcanzaba para estimular una respuesta inmune tal que eliminara a las larvas, entonces estas podían migrar por prolongados periodos de tiempo. Experimentos en primates indican que las larvas pueden persistir por 10 o más años, tiempo en que eventualmente puede entrar al ojo y causar la enfermedad ocular. Así, cuando la carga parasitaria es menor, la respuesta inmune falla en atrapar a las larvas en el hígado, órgano donde mayor muerte de *T. canis* se produce, y así se impide la migración a través del cuerpo (Akao N., 1985). El “entrapamiento” (en inglés: trapping) es descrito en toxocarosis experimental como la capacidad del sistema inmune de detener la migración larvaria en algún órgano. Especialmente se ha descrito en hígado (liver trapping). En las dosis infectivas altas, la respuesta inmune atrapa larvas en órganos tales como el hígado y los pulmones dando lugar a síntomas clínicos relativamente tempranos después de la infección. Con dosis elevadas, las larvas pueden sobrepasar los efectos del filtro

hepático y la respuesta inmune asociada. Esto puede permitir la concurrencia de LMV y LMO, ocasionalmente con miocarditis y/o síntomas neurológicos asociados.

La hipotética relación que establecieron Glikman L. y Schantz P. en 1981 entre las manifestaciones clínicas, toxocarosis, dosis, periodo de incubación, y título de anticuerpos están resumidas en la tabla N° 5:

Tabla N°5: Relaciones hipotéticas en toxocarosis establecidas por Glikman L. y Schantz P. en 1981

Toxocarosis	Edad del paciente al diagnóstico	Dosis infectante	Período de incubación	Título de Ac. por ELISA
Visceral	Joven (5 años)	Moderada a alta	Corto (días o meses)	Alto (> 1:16)
Ocular	Mayor (>12 años)	Baja	Largo (meses a años)	Bajo (<1:512)
Visceral y ocular	Muy joven (<5 años)	Muy alto	Muy corto (días)	Muy alto (>1:1024)

Dodge J.(1980) ofreció también una teoría para explicar los mecanismos relacionados con las dosis y los modelos migratorios en humanos. El propone que, en los niños con ingestión de gran número de huevos (relacionado con sus hábitos de conducta), las larvas son destruidas en el hígado antes de que tengan chance de seguir. En personas de más edad infectadas con pocos organismos (menor contacto con la tierra contaminada), las larvas escapan del hígado y continúan hasta alcanzar los capilares retinianos. En este lugar crítico atraviesan los capilares o se paran abruptamente o vuelven a penetrar las paredes de los vasos causando el daño por acción mecánica.

Algunas hipótesis alternativas tratan de explicar el porqué una larva puede lograr acceso al ojo sin provocar signos sistémicos. Zinkham W.(1978) sugiere que la larva que ha alcanzado el ojo pertenece a una "categoría" menos antigénica que las larvas presentes en otros tejidos y no despiertan una respuesta inmune, y que así pudieron escapar del hígado. Esto es improbable dado que estas mismas larvas son capaces de estimular la producción de anticuerpos en el globo ocular; y los títulos en el humor vítreo a menudo exceden los títulos séricos de pacientes con LMO (Petithory J.et al., 1994).

Si bien la distinción entre LMV y LMO en base al número de larvas migrantes que infectaron al individuo es aceptable clínicamente, es una simplificación. Glickman L. y Schantz P.(1981) sugieren que la dosis crítica de infección a la cual es mas probable desarrollar LMV que LMO gira entre 100-200 larvas, pero esto parte de la creencia de que la infección estimula una respuesta inmune de similar calidad en cada uno de los individuos infectados. Además, el periodo de tiempo en que las larvas pueden migrar a través de los tejidos blandos del cuerpo produciendo y depositando TES podría extenderse cuando los individuos se infectan con pequeño número de larvas porque, de acuerdo a Glickman y Schantz, la masa antigénica es demasiado pequeña para estimular una respuesta protectora. La cantidad de TES producida por una larva individual en cultivo se ha estimado entre 9 pg y 8 ng de proteína por día (Badley J.et al., 1987), lo cual si es producido in vivo diariamente por 100 larvas (el límite superior para LMO), podría generar hasta 800 ng de proteína diariamente, o 0,3 mg de TES anualmente. Si uno extrapola tales valores a lo largo de 5 años (el tiempo que le toma para desarrollar los signos y síntomas al síndrome de LMO), a menos que los TES sean inmunomoduladores, una cantidad similar de TES podría depositarse si 1000 larvas (diez veces la dosis crítica mínima para LMV) pudieran sobrevivir in vivo durante 1 año (tiempo aproximado que pueden tomarse los signos y síntomas de LMV para ocurrir). Pero si la mayor proporción de muerte de larvas se produce con altas dosis debido a la inducción de protección estimulada por la gran masa antigénica, menor cantidad de TES puede producirse.

Aunque es probable que haya una infección dependiente de la dosis para la inducción de LMV o LMO, la cuestión de si el título de anticuerpos, la patología y los signos y síntomas clínicos son dependientes primariamente del número de larvas presentes o del volumen de los productos TES secretados en el periodo de vida de las larvas, aún no ha sido dilucidada. Con la hipótesis de la dosis crítica es difícil elucidar la significancia de la heterogeneidad de la respuesta inmune humoral anti-TES y anti-superficie larval, y los roles (si es que los hay) de los varios isotipos de inmunoglobulinas en la inducción de la protección. En *T.canis* no han sido descritos "antígenos protectores", aunque la vacunación de animales de experimentación con TES es una buena promesa y varios mecanismos para la muerte larvaria han sido sugeridos (Smith H.et al, 1991).

El síndrome de Toxocarosis encubierta (TC) fue reconocido posteriormente a la hipótesis de Glickman L. y Schantz P. de 1981 y fue propuesto para definirla como "infección clínicamente inaparente con o sin eosinofilia" con un título de anticuerpos positivos. Se ha demostrado un rango en el título de anticuerpos anti-TES en estos pacientes que pueden coincidir con el espectro de anticuerpos de LMV o de LMO. Los títulos

altos pueden sugerir una dosis infectiva alta, múltiple infección o la continua producción de TES por un pequeño número de larvas durante un prolongado periodo de tiempo. La sobrevivencia de estas larvas puede depender de su habilidad de evadir la respuesta protectora del huésped o de la imposibilidad del huésped de montar esa respuesta.

Por un trabajo de Badley J. y colaboradores en 1987, se evidenció que las larvas fijadas y posteriormente incubadas con suero de animales inmunizados, revelaban un depósito uniforme de anticuerpos sobre la superficie larval. Alternativamente, cuando las larvas vivas se incubaban con los anticuerpos antes de su fijación, la superficie larvaria aparecía separada. La noción de una superficie larvar dinámica fue aceptada.

Estos hallazgos fueron corroborados por microscopía electrónica; las larvas presentan una superficie uniforme que, luego de 30 minutos de incubación con inmunosuero o con células inmunes, evidencia un rayado de la superficie externa de la epicutícula. Las células que se unen a las larvas son predominantemente eosinófilos. Las larvas se examinaron por un periodo de doce horas y no hubo evidencia de mayor daño a la cutícula o a la epicutícula.

Las larvas pueden desprenderse de esta cubierta exterior luego de la exposición a los anticuerpos o a las células y constituye el material excretor/secretor de *T.canis* (TES). Si se combina este material con suero inmune, este disminuye su capacidad para unirse a la superficie de nuevas larvas. En la misma serie de experimentos, encontraron que el complemento puede unirse directamente a la superficie larval en una forma no muy uniforme y las larvas incubadas con suero adsorbido con TES no evidenciaron unión de complemento en sus superficies.

Cuando se cultivan in vitro las larvas de *T.canis* elaboran grandes cantidades de TES y podemos pensar que estos antígenos son similares a los producidos in vivo y que pueden contribuir a la patogénesis de esta infección.

En ratones infectados, la respuesta de anticuerpos anti-TES aparece tempranamente, alrededor de una semana post-infección y persiste por lo menos hasta la semana 26 en un estudio de Bowman D.y col. (1987). No hubo una disminución de la respuesta por IgM en todo el estudio, lo que sugiere un defecto en el cambio de isotipo o que existe algo antigénicamente diferente en los productos TES, o ambas cosas. En este mismo estudio hubo evidencias de la presencia de inmunocomplejos solubles TES-antiTES que estuvieron presentes en la circulación dentro de la primera semana de infección y que persistieron durante el tiempo que duró el estudio. Los antígenos presentes en los inmunocomplejos se estimaron en una

concentración de 25-75 ng/ml, y las concentraciones de antígenos estuvieron correlacionados con el nivel de infección. Además del potencial aporte a la patología como resultado del depósito de los inmunocomplejos, estos también pueden contribuir a la modulación de la respuesta inmune.

Los TES están presentes en los inmunocomplejos circulantes y también han sido descritos en los tejidos de animales infectados (Parsons J. et al., 1986). Usando inmunohistoquímica, fue posible observar el depósito de TES en infecciones agudas de manera sinuosa sugiriendo la migración larval. En las infecciones crónicas, los TES pudieron ser localizados dentro de los granulomas, tanto en los que contenían larvas como en los que no las contenían. El hallazgo de TES dentro de granulomas en ausencia de larvas y particularmente el hallazgo de tractos verminosos son observaciones que confirman que la liberación de los TES se realiza a partir de la cubierta superficial del parásito.

Diversos estudios han mostrado que los productos TES están compuestos por un conjunto de moléculas que exhiben determinantes antigénicos parecidos pero no idénticos a los epitopes expresados en la superficie larval (Maizels R. et al., 1984). Los productos TES son principalmente cinco moléculas antigénicas que determinadas por geles de SDS-PAGE tienen una masa molecular relativa de 32, 55, 70, 120 y 400 kDa (Maizels R. et al., 1991). Son proteínas glicosiladas, que poseen un 40 % de su peso en hidratos de carbono (Smith H. et al., 1983).

Las larvas de *T. canis* producen una proteasa de tipo elastasa muy potente, en suficientes cantidades para degradar la matriz proteica extracelular alrededor de larvas vivas (Robertson B. et al., 1989). Esta proteína es empleada por la larva para migrar a través del tejido conectivo.

La actividad acetilcolinesterasa es muy evidente en los productos TES, pero faltan aún más estudios para evaluar su rol.

Las enzimas antioxidantes son probablemente una defensa crítica para protegerse de los reactivos intermediarios oxigenados de los macrófagos activados y de los granulocitos. Existen evidencias de actividad superóxido-dismutasa en los productos TES (Maizels R. et al., 1990).

Los productos TES tienen también efectos sobre el sistema inmune. Inducen eosinofilia en ratones cuando se administran en grandes cantidades, provocan una respuesta de tipo Th2 en pacientes humanos produciendo IL4 (estimulante del cambio de isotipo en las células B y amplificador de la respuesta por IgE) e IL5 (la principal citoquina de diferenciación de los eosinófilos).

Las larvas infectivas de *T. canis* muestran una típica cubierta rica en carbohidratos que aparece como una cubierta vellosa de 10 nm y separada por una distancia similar de la epicutícula (Maizels R. and Page A., 1990).

Las nuevas evidencias sugieren que esta cubierta superficial, que contiene algunos de los antígenos TES, está destinada a ser una estructura lábil que se libera ante el ataque de los anticuerpos o de las células efectoras (Page A. et al., 1992). Las larvas se desprenden de esta cubierta superficial salvo que estén metabólicamente detenidas.

Esta cubierta superficial se dispersa con etanol, un descubrimiento realizado cuando las muestras se prepararon para microscopía electrónica. El análisis de este material liberado en etanol mostró una preponderancia del TES-120, la llamada nematomucina. En contraste, TES-32 y TES-70 permanecieron asociadas a la cutícula luego de la pérdida de la cubierta superficial, y solamente se solubilizaron ante la presencia de detergente.

El componente TES-120 es el que más se libera. Si bien esto ocurre lentamente in vitro, lo hace rápidamente in vivo pues así la larva evade el ataque inmunológico. Es más difícil especular cómo se liberan TES-32 y TES-70 pues su ambiente en la cutícula y en la epicutícula es más hidrofóbico.

Usando inmunelectromicroscopía con anticuerpos monoclonales se han encontrado sitios internos que contienen antígenos que luego son excretados/secretados (Page A. et al., 1992).

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la cubierta superficial y contra los productos TES se localizaron en dos grandes organelas dentro del cuerpo larval: la glándula esofágica que termina en la cavidad bucal y la glándula secretora de la mitad del cuerpo que termina en el poro excretor que se encuentra en la cutícula. Como excepción, el TES-32 solamente se detectó en la epicutícula. Por lo tanto, los principales componentes TES se derivan de estos dos órganos secretores, desde los cuales pasan a la cubierta superficial o son secretados al exterior como elementos solubles, salvo TES-32 que es transportado por una vía trans-cuticular. El TES-400 no pudo detectarse, pero es probable que sea directamente secretado desde estas dos organelas mediante alguna asociación con la superficie del parásito. En ambas organelas se sintetiza el mismo precursor que luego recibe modificaciones específicas de las enzimas tisulares. En estas organelas están los sitios de glicosilación, pero la síntesis polipeptídica no debe estar muy lejos, porque se sabe que los intermediarios no-glicosilados poseen una vida media muy corta (Page A. and Maizels R., 1992).

Parece que las larvas de *T. canis* concentran su esfuerzo metabólico en una continua producción de moléculas para la cutícula y la cubierta superficial, las cuales median funciones bioquímicas y fisicoquímicas en la evasión parasitaria de la respuesta inmune del huésped.

Mientras que la muerte de la larva ocasionada por la respuesta inmune ha sido demostrada in vivo en animales de experimentación

(Zyngier F., 1974) o in vitro por la acción de anticuerpos (Smith H., 1991) la cronicidad de la infección en humanos sugiere que la larva puede evadir la respuesta inmune. Siguiendo a la demostración de que la superficie externa del segundo estadio larval es antigénica y que el recambio de antígenos de superficie expuestos es metabólicamente dependiente Smith H. y colaboradores (1988) argumentaron que la rápida muda de antígenos de superficie expuestos proveería al segundo estadio larval de un mecanismo para evadir la citotoxicidad celular anticuerpo dependiente, mecanismo que destruiría in vivo a la larva y que podría explicar la ausencia de larvas o de fragmentos de larvas en las lesiones. En adición, se ha sugerido que los depósitos de estos antígenos en los tejidos del huésped, distantes de la migración larval podrían redireccionar la reactividad inmune desde la superficie larvaria hacia estos depósitos, induciendo mayor patología in vivo. La evasión inmune de las cubiertas superficiales larvarias ha sido demostrada en una variedad de sistemas experimentales in vitro (Fattah et al., 1986; Badley et al. 1987).

Posteriores investigaciones han demostrado que los anticuerpos presentes en el suero de conejos infectados, pero no de conejos inmunizados con los productos TES liberados por larvas cultivadas in vitro, no solamente se unen a las superficies externas de larvas viables por un tiempo prolongado de tiempo, sino que también causan una mayor muerte celular in vitro (Smith H., 1991). Estos hallazgos in vitro proveen la evidencia de que los anticuerpos no solamente sirven para la reducción del recambio de antígenos superficiales en ausencia de células, sino también para el gradual incremento de la calidad larvicida, y se sugiere que un anticuerpo protector puede estar presente en tales sueros.

Las larvas infectivas originan una fuerte y persistente respuesta inmune en humanos, dando leucocitosis, eosinofilia e hipergammaglobulinemia, y en particular la producción de IgM, IgG e IgE anti productos TES. El estudio de la respuesta inmune en la infección por *T.canis* es importante por las siguientes razones:

- a) El diagnóstico directo de toxocarosis es casi imposible. La distribución de las larvas puede ser extensiva pero no puede asegurarse que estén presentes en el material de biopsia (por ej. en los granulomas), y los humanos infectados normalmente no excretan parásitos o elementos parasitarios (por ej. huevos o larvas). Además el amplio rango de los síntomas clínicos que no son patognomónicos conduce a confusiones.

b) La mayor parte de la patología es debida a la respuesta inmune inflamatoria y

c) El parásito es extraordinariamente persistente en el huésped inmunocompetente y los signos y síntomas clínicos pueden aparecer mucho tiempo después de la ingestión de huevos infectivos.

Mediante un test de ELISA diseñado para detectar isotipos de anticuerpos, Smith H. (1991) determinó la prevalencia de los anticuerpos anti-*TES* totales, y de los del tipo IgG, IgE e IgM en los sueros de pacientes diagnosticados como seropositivos. El título de corte fue 1:50. Se detectaron niveles variables de IgG, IgE e IgM anti-*TES* en estos sueros indicando que los principales isotipos de anticuerpos son producidos por estos pacientes que tenían LMV o LMO. IgG fue el isotipo predominante en el 52% de los casos, y la IgM o la IgE fueron más altas que la IgG en el 23% de los casos. El análisis de los sueros que fueron colectados a través de un periodo de 2 o 3 años, mostraron que los tres isotipos siguieron detectándose aunque con disminución en los títulos, lo que indica que a pesar de que ocurre una “maduración” de la respuesta inmune, la respuesta por IgM no es transitoria en toxocarosis.

Se piensa que como los epitopes expuesto en la cubierta superficial de las larvas son ricos en hidratos de carbono, los paratopes de los anticuerpos estan dirigidos contra estos carbohidratos y son los que principalmente se unen a la superficie larval, y que alguna consecuencia protectora para el huésped puede surgir de esto. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los polipéptidos del *TES*, no se unen a la superficie de larvas metabólicamente detenidas, pero pueden unirse a la superficie secretada, que incluye los depósitos de *TES*, lo que indica que los epitopes polipeptídicos en o sobre la superficie larval estan cubiertos y solo son reconocidos luego de que esta cubierta es secretada. (Maizels R. et al., 1987). Extrapolando esta situación a la infección humana, se sugiere que los paratopes antipolipeptídicos se unen menos que los paratopes anticarbohidratos a la superficie larval, pero se unen preferentemente a los epitopes polipeptídicos de los depósitos de *TES*. Las consecuencias biológicas de la producción de anticuerpos antipolipeptídicos pueden ser dos: primero, el atrapamiento larval y muerte que depende de la citotoxicidad anticuerpo dependiente podría reducirse permitiendo a una gran proporción de larvas sobrevivir, y segundo, el abundante depósito de *TES* por la incapacidad de matar a las larvas trae como consecuencia un incremento en la patología, resultando en un aumento de los signos y síntomas. Un desbalance en la proporción entre los paratopes anti-

carbohidratos y los antipolipeptídicos podría explicar el vasto rango de signos y síntomas clínicos asociados a la toxocarosis humana, sin tener en cuenta la dosis crítica infecciosa.

En 1988, Smith H. y col. presentaron un trabajo en el cual incubaron suero de pacientes con LMV, LMO y TC a 2°C y a 37°C con larvas vivas. La diferencia de temperatura en las incubaciones detiene o no metabólicamente a las larvas. Mediante una IFI (Inmunofluorescencia Indirecta) observaron que todos los sueros del grupo de LMV y LMO presentaron anticuerpos que se unieron a la superficie de las larvas incubadas a 2°C, con una fluorescencia uniforme y que cubría toda la superficie larval. Solo un 11% mostró una adherencia a la superficie de las larvas mantenidas a 37°C y la fluorescencia apareció granular y cubriendo parte de la superficie. No pudieron relacionar la unión de los anticuerpos a la superficie larval a temperatura fisiológica con los títulos de anticuerpos anti-TES o con otros criterios inmunológicos tales como eosinofilia o linfocitosis. En adición, tampoco demostraron algún efecto larvicida con el suero incubado con larvas a 37°C. Pero es evidente que las larvas metabólicamente activas se desprenden de algunos de sus epitopes antigénicos aún cuando se cultivan *in vitro*, lo que no sabemos es si la velocidad o la frecuencia con que lo hacen es la misma que cuando se encuentran *in vivo*.

De los sueros de TC testeados, un 60% tenía anticuerpos que se unieron a la superficie larval a 2°C y la fluorescencia fue mas débil que con los sueros de LMV y LMO. Mientras que los niveles de anticuerpos totales del grupo TC fueron semejantes a los de LMV/LMO, la reactividad de los mismos sobre la superficie larval fue diferente.

La eosinofilia y los niveles elevados de IgE se asocian con la mayoría de los síndromes producidos por *T. canis*, y el entrapamiento y muerte de las larvas en los granulomas eosinofílicos ha sido demostrado *in vivo*, dando crédito al concepto de que los eosinófilos y la IgE pueden mediar la muerte de las larvas. En 1/3 de los sueros de pacientes con LMV o LMO se detecta IgE que se une a la superficie de las larvas metabólicamente detenidas (reconoce epitopes hidrocarbonados), pero no a las larvas mantenidas a 37°C. Solamente un 4% de los pacientes con TC presentan IgE que se une a la superficie larval a 2°C y ninguno presenta IgE unida a la superficie de larvas mantenidas a 37°C. Se considera que la incapacidad para unirse a la superficie larval de estos sueros es debida a las bajas concentraciones de anticuerpos anti-TES dirigidos contra los epitopes hidrocarbonados de TES.

Los resultados obtenidos por los estudios con fluorescencia indican que existen diferentes capacidades para reconocer o unirse a la cubierta superficial de las larvas entre los anticuerpos de sueros de pacientes con LMV, LMO y TC.

Podemos llegar a la conclusión de que las IgE de los pacientes con LMV y LMO reconocen preferentemente epitopes de tipo hidrocarbonados y que las IgE de los pacientes con TC reconocen preferentemente epitopes polipeptídicos, y estas últimas reaccionan directamente contra los depósitos de TES in vivo, con el consecuente aumento de la patogénesis por la respuesta inflamatoria. Esto podría explicar el amplio rango de signos y síntomas asociados a la TC.

Smith H. y col. (1988) han reportado diferencias entre la reactividad de los sueros de pacientes de Dublin (Irlanda) y de Toulouse (Francia). En los sueros de Toulouse los anticuerpos IgM, IgG e IgE contra los antígenos E/S de la LII de *T. canis* fueron sumamente elevados. En los sueros de Dublin, los anticuerpos IgM e IgG fueron también muy altos pero solo el 38% tuvo anticuerpos IgE detectables. En un ensayo in vitro de unión a la superficie larval, los sueros de Toulouse se unieron con la superficie de las larvas, pero el 78% de los sueros de Dublin no lo hicieron. Tales uniones son un prerrequisito para la citotoxicidad anticuerpo dependiente, la cual se cree es un mecanismo por el cual se entranpan las larvas y mueren. La capacidad de estos dos grupos de suero para proveer tal mecanismo parece diferir. Esto podría relacionarse con la edad, pues los sueros de Toulouse eran de adultos y los de Dublin eran de niños. Otro factor de importancia podría ser la gran proporción de asmáticos en el grupo de Dublin. Si este es realmente un factor asociado a la disminución o falla de las inmunoglobulinas anti-Toxocara, entonces estos hallazgos pueden ser una característica de los asmáticos más que de los sujetos de Dublin, sugiriendo que los asmáticos pueden producir anticuerpos ineficientes o insuficientes. Si esto fuera así, no sería sorpresa hallar que los asmáticos producen mayores cantidades de anticuerpos pero incapaces de unirse a los antígenos que persisten indefinidamente.

Es interesante pensar que las larvas de *T. canis*, que están detenidas en el segundo estadio larval en una variedad de huésped paraténicos en los cuales pueden sobrevivir por prolongados periodos de tiempo, han desarrollado una respuesta de sobrevida para contrarrestar los numerosos y variados mecanismos de defensa que ellas pudieran encontrar. Si el mismo mecanismo puede ser efectivo en tan diversos huéspedes paraténicos como aves, gusanos de tierra y humanos, lo desconocemos. Características tales

como la cronicidad y la persistencia de la infección por *T.canis*, a pesar de la producción de una respuesta humoral y celular, implica que las larvas evaden los efectos de los sistemas inmune e inflamatorio del huésped humano. Si estos mecanismos son puramente evasivos o inmunoregulatorios es tema de debate. El humano responde a la infección por *T.canis* mediante la producción de anticuerpos de tipo IgG, IgM e IgE dirigidos contra la cubierta superficial de la larva, lo cual permite la producción de una respuesta inflamatoria aguda o crónica en los sitios de depósito de TES (Smith H., 1991). Una proporción de estos anticuerpos también se une a la superficie de larvas metabólicamente detenidas. Estos anticuerpos capaces de unirse a la superficie están presentes en el suero de individuos con LMV o LMO y su producción parece ser independiente de la presencia de los síntomas y signos. Solamente una pequeña proporción de pacientes tiene anticuerpos que se unen a las superficies de larvas metabólicamente activas, pero fue imposible demostrar algún efecto larvicida similar al encontrado en sueros de conejos infectados (Smith, 1991). De estos resultados se sugiere que si el metabolismo y el recambio de superficie de la larva se reducen, los anticuerpos que se unen (demostrados en los sueros de pacientes con LMV y LMO) pueden ser la base del mecanismo inmune que genera el entrapamiento y muerte de las larvas. Algunos posibles mediadores podrían ser las proteínas de fase aguda u otros productos de la respuesta aguda inflamatoria. Esto podría explicar en parte la cronicidad de la infección en los pacientes estudiados. En aquellos pacientes con los síntomas y signos clásicos de LMV, los títulos de anti-TES fueron detectados por al menos tres años. Extrapolando los datos obtenidos con el suero de conejos infectados, la inducción de la capacidad larvicida en el suero humano puede depender de una muy alta dosis infecciosa o de múltiples reinfecciones.

Dos principales diferencias pueden ser identificadas entre la respuesta de anticuerpos entre los grupos con LMV/LMO y el grupo TC. Primero, la capacidad de los anticuerpos del grupo TC de unirse a la superficie de larvas metabólicamente detenidas fue menor que los del grupo LMV/LMO; y segundo, si bien el espectro de anticuerpos totales entre estos grupos fue semejante, aproximadamente el 50% del grupo TC tuvo títulos de IgE anti-TES mas bajos (< 1:50).

La respuesta inmune del grupo TC sería diferente. La presentación clínica de TC es diferente, pudiendo tener adenitis cervical, dolor abdominal y disnea (>del 10% de los pacientes), dolor de extremidades, debilidad, esplenomegalia y rash cutáneo (< del 5% de los pacientes) y ha sido demostrado que la actividad in vitro de los anticuerpos de este grupo de pacientes es diferente.

Por las evidencias disponibles, podemos especular que los pacientes con TC pueden tener una similar exposición a los huevos infectivos que los grupos LMV/LMO, pero son menos capaces de destruir su carga parasitaria. Además, como una gran proporción de la respuesta inmune humoral está dirigida contra la superficie secretada de la larva, más patología por larva, podría resultar. La migración crónica de un relativamente pequeño número de larvas en una variedad de tejidos y órganos, en los cuales estimulan la respuesta inflamatoria contra los TES, puede producir el amplio rango de signo y síntomas clínicos asociados con TC.

Una compleja interacción huésped -parásito permite la prolongación de la sobrevivencia de las larvas infectivas de *T.canis* dentro de una amplia variedad de huéspedes paraténicos. El parásito puede protegerse a sí mismo del ataque mediante la liberación de una densa capa de glicoproteínas antigénicas las cuales evitan el contacto directo de las células inflamatorias del huésped con la epicutícula. Tanto el parásito como el huésped pueden beneficiarse cuando se forman los granulomas maduros alrededor de larvas estacionarias que reducen el contacto del parásito con la respuesta del sistema inmune del huésped. La respuesta inmune que se desarrolla luego de una exposición inicial hacia los antígenos larvarios, resulta eficaz para detener a una gran proporción de nuevas larvas (de una segunda exposición) que permanecen dentro del hígado de los animales sensibilizados y no migran hacia otras partes del cuerpo. El entrapamiento larvario dentro del hígado no ocurre en ratones atímicos y puede parcialmente efectuarse mediante la transferencia adoptiva de esplenocitos inmunes, sugiriendo que es un fenómeno controlado por la población de las células T. Además, las evidencias sugieren que el control del fenómeno del entrapamiento hepático está relacionado con los genes del sistema mayor de histocompatibilidad.

Mientras que algunas de estas inferencias son especulativas, es indudable que en toxocarosis humana, existe una heterogeneidad en la respuesta de anticuerpos hacia las larvas. El segundo estadio larval parece ser muy exitoso para evadir la respuesta protectora en la mayoría de los huéspedes humanos. La demostración de la variabilidad biológica en los anticuerpos de casos de toxocarosis humana puede ayudar a aclarar estos mecanismos que promueven el desarrollo de protección en oposición a patología.

Uno de los más intrigantes fenómenos en la biología de los parásitos es la paraténisis. La forma infectante de varias larvas de nematodos es capaz de concentrarse en un relativamente alto número y sostenerse a sí mismo en tiempo y espacio. Esto optimiza la sobrevivencia de muchos parásitos y asegura la distribución de un adecuado número de larvas infectivas en el nicho óptimo para la transmisión hacia el huésped definitivo (En *T.canis* los cánidos predadores).

Varios mecanismos pueden estar implicados en el desarrollo de esta interacción huésped-parásito estable y prolongada. El huésped responde con reacciones inespecíficas inflamatorias y específicas del sistema inmune. La longevidad de las larvas indican que estas respuestas no son muy efectivas para eliminar el parásito, pero pueden afectar el comportamiento de *T.canis* dentro del animal y la patogenicidad de la infección. El parásito a su vez, puede intentar modular o evitar estas respuestas del huésped para incrementar su sobrevivencia.

Diagnóstico:

Los estudios inmunológicos son necesarios porque la demostración de larvas migrando en los tejidos es teóricamente posible pero extremadamente rara en la práctica.

Muchos métodos inmunológicos y reactivos antigénicos han sido descritos para evidenciar la presencia de larvas de *T.canis* migrando en el hombre.

Solamente pocas metodologías fueron aceptadas como test de rutina en los laboratorios. La evaluación de la sensibilidad de las técnicas encuentra dificultades pues el criterio para establecer el diagnóstico clínico o el diagnóstico parasitológico (por biopsia) es difícil. La especificidad también es difícil de establecer, porque existen individuos con toxocarosis subclínica que varían de un país a otro. Las reacciones cruzadas también presentan problemas, pues un paciente que ha adquirido toxocarosis puede estar parasitado por otros geohelminthos concomitantemente.

Se presenta una breve descripción de las técnicas utilizadas en el serodiagnóstico de la toxocarosis humana:

Inmunodifusión: La inmunodifusión es una prueba de desarrollo relativamente fácil pero de poca sensibilidad en comparación con otras

pruebas. Fue muy usada en los primeros estudios y podría ser útil con componentes antigénicos mas específicos. Petithory et al. (1990), testearon una variedad de antígenos de helmintos con sueros de personas con diferentes helmintiasis y un antígeno de *Ascaris suum* fue reactivo en 44 de 45 (mas del 90 %) de los casos sospechosos de larva migrans visceral. En animales de laboratorio, fundamentalmente conejos y cobayos, también se han estudiado anticuerpos precipitantes con varios preparados antigénicos. La mayoría de ellos resultó dar reacciones cruzadas (Fernando S., 1968, Glickman et al., 1978). La técnica de microprecipitación desarrollada por Petithory y colaboradores en 1994 es una muy buena metodología para detectar anticuerpos antitoxocara en humor acuoso de pacientes con LMO.

Contrainmunolectroforesis: Esta técnica combina la velocidad de la electroforesis con la especificidad de la inmunodifusión, y se obtienen resultados en menos tiempo. Han sido preparados diversos materiales antigénicos para usar en esta metodología. Así, Yossef et al. (1991) utilizaron un macerado de vermes adultos y Magnaval et al. (1987) un extracto de órganos genitales de *Ascaris suum* hembras. Ambos reportaron gran sensibilidad de la técnica con formación de varios arcos de precipitación.

Aglutinación: Esta técnica ha sido utilizada fundamentalmente en su variante indirecta utilizando como soporte glóbulos rojos y como reactivos los extractos de vermes adultos (Liesegang 1977). De Savigny (1975) utilizó como antígeno el material excretor/secretor de las L2 en cultivo. Esta técnica demostró mayor sensibilidad que las anteriores pero al probarse con sueros humanos de diferentes helmintiasis, produjo discordancia en sus resultados.

Inmunofluorescencia: Esta técnica, fundamentalmente en su variante indirecta ha sido utilizada por diferentes autores. Los reactivos probados han sido vermes adultos, huevos y larvas en suspensión de *T. canis*. Algunos autores la consideran útil para el diagnóstico de esta zoonosis por su adecuada sensibilidad y elevada especificidad (Bisseru et al., 1988). Como inconvenientes se han citado el manejo de larvas vivas cuyo uso no es práctico en la rutina de laboratorio y el costo de un microscopio de fluorescencia.

Fijación de complemento: Este procedimiento es una de las técnicas mas sensibles en el diagnóstico de las parasitosis, pero sus limitaciones estan dadas por lo engorroso de la técnica, y porque pequeñas variaciones entre los antígenos probados han dado grandes diferencias en los resultados.

Fundamentalmente se han utilizados extractos de vermes adultos como reactivos antigénicos (Fernando, 1968).

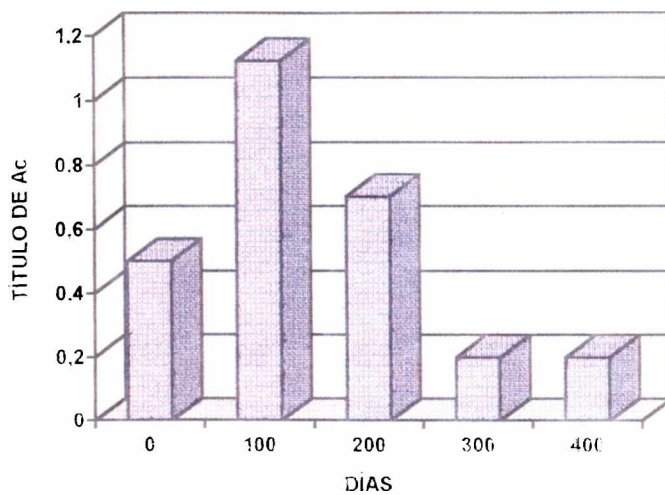
Elisa (Enzimoimmunoensayo): Ha sido utilizada por la mayoría de los investigadores y en la actualidad se comercializan equipos de origen estadounidense y europeo. Utilizan como reactivo el material excretor/secretor de las larvas de *T.canis*. En un primer instante causó grandes esperanzas su desarrollo pues demostró una sensibilidad importante. Pero en el presente se describen sus problemas de inespecificidad (Santillan et al., 1995; Cuellar C. et al., 1995; Ljungstrom I. and Knapen F., 1989)) que hace discutible sus resultados, fundamentalmente en poblaciones con elevado índice de parasitosis afines como es nuestro país. Su sensibilidad es difícil de evaluar pues los casos clínicos causados por una sola larva (por ej LMO) o al menos por un número limitado de larvas infectivas, no se acompañan por altos niveles de anticuerpos específicos. A veces la serología falla al detectar LMO histológicamente probadas.

El significado de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas durante la infección aún no está bien aclarado. En particular, la determinación de Ac IgE necesita más estudios de seguimiento clínico.

En nuestro país no existen estudios amplios para evaluar la sensibilidad y especificidad de esta técnica, por eso se necesitan relevamientos seroepidemiológicos para su mayor conocimiento.

La información acerca de la curva de anticuerpos antitoxocara en humanos es escasa. Taylor y colaboradores han reportado un estudio en pacientes con LMV durante un periodo de varios meses (Taylor et al., 1988). El gráfico N°1 muestra los cambios en los títulos en unidades de densidad óptica. La experiencia de Taylor y col. con estos pacientes sugiere que los títulos caen gradualmente en un período de tres años. La velocidad de la caída es presumiblemente un balance entre la pérdida de la memoria inmunológica y su estimulación por la continua ingestión de huevos viables o reactivación de larvas "adormecidas".

Gráfico N° 1: Evolución de los títulos de anticuerpos anti-Toxocara (en Densidades Ópticas.) en pacientes estudiados por Taylor y col., 1988.



La interpretación de los títulos antitoxocara es muy difícil. Es extremadamente raro observar un paciente al comienzo de la enfermedad y por lo tanto, el aumento en el título de anticuerpos ha sido notificado por muy pocos autores. Estos título descienden muy lentamente. El nivel serológico de anticuerpos ha sido usado como indicador de la severidad de la infección y esto tiene muchísima inexactitud.

Los rangos de anticuerpos antitoxocara para el diagnóstico de toxocarosis aguda, pueden estar sobreestimados pues pueden permanecer en circulación luego del clearance del parásito, y los antígenos E/S contienen determinantes antigénicos que pueden causar falsos positivos, ya que reaccionan con sueros anti-áscaris, con anticuerpos de serogrupo del sistema ABO y con otras parasitosis.

G-PROFILAXIS Y TRATAMIENTO:

La toxocarosis es una enfermedad prevenible. Los programas de tratamiento deben concentrarse sobre la perra y los cachorros que son los que más contaminan el ambiente. Un amplio rango de antihelmínticos caninos con probada eficacia contra *T. canis* está disponible. Con un período prepatente mínimo de 16 días para la infección prenatal en la perras y sus cachorros, el tratamiento debe comenzar dentro de las dos semanas luego de la parición. El tratamiento se repite diez-quince días después para remover la infección que adquieren subsecuentemente de la leche y de los huevos ingeridos hasta que los cachorros alcancen las 8-12 semanas de edad. Aunque esta terapéutica no elimina el 100% de los gusanos, existe un marcado efecto. El tratamiento debe repetirse en posteriores preñeces.

Desafortunadamente, no todos los propietarios son concientes de la necesidad de tales tratamientos debido a que la perra y sus cachorros aparecen activos y "sanos" a pesar de la presencia moderada de gusanos. Se estima que solo el 15% de los veterinarios recomiendan a sus dueños el tratamiento a menos que el cliente lo requiera. Muchas perras y sus cachorros no son llevadas nunca al veterinario. Una continua educación debe darse a los veterinarios y a sus clientes para asegurar el adecuado nivel de tratamiento.

Muchos dueños no saben o no creen que su perro pueda estar infectado y por eso no lo tratan. El perro puede cargar con un número de gusanos pero estar sano, comer bien y tener un fino pelaje. El tratamiento ha de repetirse profilácticamente cada 3-6 meses. Si el perro come carne cruda (19 días de período prepatente en perros que ingirieron huéspedes paraténicos) deben hacerse tratamientos más frecuentes.

Mientras se controla la infección en los animales mascota, queda el rol de los perros vagabundos que se transfieren la infección unos a otros y también con los mascotas.

Varias drogas han sido utilizadas en el tratamiento de la toxocarosis humana. No obstante, los derivados benzimidazólicos han solamente demostrado una moderada eficacia sobre los síntomas clínicos: 53% de recuperación para el albendazole (Sturchler et al. ,1989), 57% para el mebendazole y 47 al 50 % para el thiabendazole (Magnaval y Charlet, 1987). En un estudio doble ciego, el placebo fue hallado ser tan efectivo como el mebendazole sobre los síntomas clínicos (Magnaval et al., 1992). La mejor elección en terapia de toxocarosis parece ser la diethyl-carbamazina. En estudios controlados "Diethylcarbamazine versus placebo", esta droga indujo una significativa disminución en los valores de

y en el título de anticuerpos antitoxocara de tipo IgE, mientras que estos parámetros no variaron significativamente en el grupo control (Magnaval, 1993).

El modelo experimental murino de la infección ocular indica que la mayoría de la reacción inflamatoria está dirigida contra el antígeno E/S, más que a la larva. Teniendo en cuenta esto, es claro que la terapia de la enfermedad ocular debe ser predominantemente anti-inflamatoria. La terapia antihelmíntica es de importancia secundaria y puede ser útil cuando se da en combinación con esteroides, especialmente si se da en forma temprana en el curso de la infección.

Deben asociarse medidas profilácticas a la terapia antitoxocara. Así, la desparasitación de cachorros tres veces al año, limpieza de los jardines, correcta cocción de los menudos de pollo y una cuidadosa higiene de las manos antes de las comidas pueden evitar posibles reinfecciones.

Costo económico de la toxocarosis:

Este costo fue evaluado en 1989 por especialistas europeos. Durante tres meses, cada paciente atendido en consultorio en el laboratorio por un problema de toxocarosis fue examinado por un residente especializado en epidemiología. Los costos por atención profesional, terapéutica, investigaciones biológicas, endoscópicas y radiológicas; además de la estadía en el hospital, y pérdida de días de trabajo fueron chequeadas. El costo medio para un caso de toxocarosis fue estimado por la Seguridad Social en 620 Libras.

H-DESAFIOS

*Los profesionales médicos están comenzando a reconocer el síndrome de larva migrans visceral como un síndrome relativamente frecuente en chicos y adultos y los estudios poblacionales en muchos países han mostrado que la toxocarosis subclínica no es infrecuente. Por esto se considera necesario:

- *Poner atención en la educación de los profesionales médicos y veterinarios y también en el público general.
- *Estandarizar los métodos para medición de anticuerpos.
- *Estandarizar los antígenos usados en estos test.
- *Identificar la variación antigénica (si la hay) en *T.canis* de acuerdo a la localización geográfica.
- *Estandarizar los títulos de corte para seropositividad.
- *Evaluar la seroprevalencia en poblaciones normales (no hospitalizadas).
- *Evaluar la relación entre los títulos de anticuerpos y los síntomas en grandes poblaciones.
- *Evaluar la prevalencia de larva migrans ocular.
- *Investigar los factores que favorecen la ocurrencia de larva migrans visceral comparado con larva migrans ocular.
- *Investigaciones posteriores son necesarias para la mejor caracterización de los componentes específicos de especie en los antígenos E/S ya sea para propósitos diagnósticos y epidemiológicos, como para estudiar las posibles influencias en los mecanismos inmunes del huésped.

OBJETIVOS:

1-Analizar el ciclo biológico de *Toxocara canis* mediante infecciones experimentales con huevos del parásito en ratones.

2-Determinar el número de larvas (carga parasitaria) en distintos órganos del ratón luego de su infectación con huevos de *Toxocara.canis* para evaluar la posible relación entre la carga parasitaria y diferentes métodos de inoculación.

3-Desarrollar una técnica serológica para evaluar la respuesta humoral anti-*Toxocara canis*.

4-Evaluar distintos parámetros inmunológicos celulares y humorales en la infección murina por *Toxocara canis*.

OBJETIVO 1:

1- Analizar el ciclo biológico de *T. canis* mediante infecciones experimentales con huevos del parásito en ratones.

Se ha desarrollado en dos etapas:

Primera etapa: Se realizaron diversas experiencias con el fin de lograr una metodología adecuada para obtener huevos de *T. canis* libre de contaminantes. Esta metodología es esencial para lograr huevos que desarrollen el estadio larval infectivo y así poder inocular animales de laboratorio con el fin de obtener un modelo experimental biológico adecuado.

Material y métodos para obtener huevos de *T. canis* libres de contaminantes

Se seleccionaron 50 materias fecales caninas positivas para huevos de *T. canis*, por examen al microscopio óptico previa realización de la técnica coproparasitológica de Fullborn (Feldman R., 1983). El número de materias fecales seleccionadas fue suficiente para llevar a cabo diferentes técnicas de cultivo parasitológico.

También se utilizaron doce ejemplares hembras de *T. canis* adultos obtenidos a partir de la desparasitación de cachorros infectados naturalmente.

Con la materia fecal de animales positivos para huevos de *T. canis* se desarrollaron las siguientes experiencias:

1- Coprocultivo con el método en tiras de papel de filtro de Harada Mori (Feldman R., 1983). Esta técnica consiste en recortar tiras de papel secante o de filtro de 12 x 120 mm y untar su tercio medio con una delgada capa de heces contaminadas. Introducir la tira en un tubo de ensayo que contenga unos 3 ml de agua estéril libre de cloro, de modo que el extremo inferior contacte con el agua. De este modo, se sembraron cinco muestras de diferente origen a temperatura de laboratorio. Fueron controladas periódicamente por microscopía óptica.

2- Coprocultivo según la técnica de Corticelli-Lai (Feldman R., 1983). Esta técnica consiste en colocar en una caja de Petri una porción espesa de materia fecal contaminada que se humedece continuamente. Con esta metodología se realizaron dos modificaciones. En uno de los casos fue utilizada agua de canilla, y en el otro agua formolada al 0,5%. Con la

primera variante se cultivaron cinco muestras diferentes, todas a temperatura de laboratorio. Con la segunda variante se cultivaron también cinco muestras, de las cuales tres se incubaron a temperatura ambiente y dos a 37°C. Fueron controladas periódicamente por microscopía óptica.

3- Técnica desarrollada en el laboratorio de la Cátedra de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.. A partir de la totalidad de una materia fecal positiva, se aplicó la técnica de concentración de Fulleborn, con el objeto de obtener un sobrenadante rico en huevos y medianamente limpio de restos propios de la materia fecal. Una vez obtenido el sobrenadante, se lo diluyó rápidamente con agua formolada al 0,5% para evitar la acción nociva sobre los huevos de la solución sobresaturada de CINa y eliminar una probable contaminación microbiana y/o micótica. Se dejó a temperatura ambiente en el medio líquido y se controló por microscopía óptica.

4- Obtención de huevos a partir de las hembras. Los ejemplares adultos hembras se cortaron y por compresión del soma, se extrajeron los huevos y restos uterinos. Se lavaron con HONa al 1% para removerles el mucus. El pool de huevos obtenidos se dividió en dos lotes; el primero fue resuspendido en ácido sulfúrico 0,1N y formol al 0,5% y el segundo en formol al 0,5% solamente. Se incubaron a temperatura de laboratorio y se controlaron periódicamente por microscopía óptica.

Resultados

1- Coprocultivo con el método de Harada Mori: Las observaciones periódicas no revelaron la presencia de larvas en el líquido del fondo del tubo, luego de dos meses y teniendo en cuenta los resultados negativos este método fue descartado.

2-Coprocultivo con el método de Corticelli-Lai:

a) Variante en agua de canilla. Las observaciones microscópicas revelaron un desarrollo sumamente lento. Recién a los tres meses aparecieron huevos con larvas en su interior.

b) Variante en formalina a temperatura de laboratorio: como en el caso anterior, las observaciones revelaron la aparición de huevos larvados luego de tres meses de incubación.

c) Variante en formalina a 37°C: las observaciones no demostraron desarrollo larval dentro de los huevos.

3-Coprocultivo según la técnica desarrollada en el laboratorio de la Cátedra de Microbiología y Parasitología. En la observación realizada el día

quince de la incubación, ya fue posible encontrar huevos con larva I en movimiento. Pasados siete días más, ya había huevos con larvas en estadio II en su interior.

4-Cultivo de huevos obtenidos a partir de ejemplares hembras: En la incubación con H_2SO_4 se observó a los ocho días el desarrollo larvario (60% del total). En la incubación con H_2SO_4 + formol 0,5% se observó a los ocho días un gran número de huevos larvados (98%).

Discusión y Conclusiones.

De las experiencias realizadas en la obtención y cultivo de huevos de *T.canis* para su posterior uso en infecciones experimentales, se puede deducir que:

-Técnica de Harada Mori: El fracaso de este método de cultivo en tiras de papel de filtro puede atribuirse a la presencia de elevada cantidad de material contaminante e impurezas que influyen desfavorablemente en el desarrollo larval.

-Técnica de Corticelli-Lai: El lento desarrollo de las larvas dentro de los huevos puede atribuirse a la misma razón que en el caso anterior cuando se incubó a temperatura de laboratorio, mientras que a 37°C no solo se produjo una interferencia por el crecimiento bacteriano, sino que esa temperatura inactiva el desarrollo larval.

-Técnica desarrollada en el laboratorio: El éxito de esta técnica se debió sin duda a la disminución de las impurezas del medio de cultivo debido a que los huevos se separan de contaminantes groseros. Además este es un método líquido y no semisólido como los anteriores, lo que favorece el desarrollo de los estadios larvarios. Por eso es que los suelos arcillosos donde se acumula el agua y se deshace la materia fecal canina por las lluvias son favorecedores de la contaminación con huevos infectivos.

-Cultivo de huevos obtenidos a partir de hembras de *T.canis*. Este método superó a los anteriores en su rendimiento. Es una forma de lograr un cultivo de huevos infectantes puro, numeroso y de rápida obtención, pero hay que contar con la provisión de los ejemplares adultos, hecho bastante difícil en nuestro medio a pesar de que la mayoría de los cachorros están infectados.

Es difícil lograr que los dueños remitan los parásitos luego de ser expulsados.

-Por lo expuesto, se propone este último método para obtener huevos infectivos para inoculación experimental, y como método alternativo el desarrollado en el laboratorio de la Cátedra pues es mucho más accesible obtener materia fecal de cachorros parasitados que eliminar al medio un promedio de 1000 a 2000 huevos por gramo de materia fecal.

Segunda etapa : Se ensayaron diferentes metodologías que permitieran la inoculación experimental en animales de laboratorio con el fin de estudiar la evolución de la larva II de *T.canis*.

Material y métodos para inoculación experimental de huevos de *T.canis*

La obtención de huevos de *T.canis* se realizó siguiendo la metodología anteriormente elegida cultivándolos en H₂SO₄ y formol al 0,5%. Una vez logrado el desarrollo larval, se lavó en solución fisiológica por sucesivas centrifugaciones.

Se inocularon 30 ratones hembras Swiss CF1 de 25-30 grs. de peso a través del anzuelo alimenticio. La dosis fue de 150 huevos larvados de *T.canis* en 0,5 ml de solución fisiológica. Los ratones fueron sacrificados los días 2, 5, 8, 14, 21, 30, 45, 60 y 90 posteriores a la inoculación.

Para determinar la ruta migratoria de las larvas se procesaron diferentes órganos: hígado, pulmón, bazo, riñón, corazón, porción proximal de intestino delgado, músculos de los miembros posteriores. Fueron analizados a través de la técnica de homogeneización y posterior digestión enzimática. El cerebro fue analizado a través de la observación directa entre porta y cubreobjeto por aplastamiento del tejido.

Resultados

Se expresan en la Tabla N° 6:

Tabla N°6: Detección de larvas de *T.canis* en toxocarosis experimental murina.

Organos analizados	Días post-inoculación								
	2	5	8	14	21	30	45	60	90
Cerebro	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Hígado	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Pulmón	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Corazón	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Bazo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Riñón	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Músculo esquelético	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Intestino delgado	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Referencia: + presencia de larvas
 - ausencia de larvas

Discusión y Conclusiones:

Analizando los resultados se observa que las larvas migran hacia los tejidos dentro de las primeras 48 hr post-inoculación (p.i.).

Luego de atravesar la mucosa intestinal, se encuentran en el hígado. Algunas larvas se dirigen rápidamente a pulmón previo pasaje por corazón (días 2 a 5), pero otras realizan este pasaje más tardíamente (días 14-21).

En riñón aparecen en dos oleadas (días 5 y 21), las cuales coinciden con la presencia de larvas en el corazón.

A partir del quinto día son detectadas en cerebro, localización donde aparentemente se "estancarían", ya que son halladas sistemáticamente en todas las necropsias siguientes (días 8, 14, 21, 30, 45, 60 y 90).

A partir del octavo día se detectan larvas en músculo esquelético del tren posterior, apareciendo luego en forma reiterada en las sucesivas necropsias.

No fue posible detectar larvas en bazo a lo largo de la experiencia. El por qué las larvas evaden un órgano rico en células de la respuesta inmune y se acumulan en cerebro y músculos que aparentemente tienen menor capacidad de rechazo inmunológico es una observación que ya surge de estas experiencias preliminares. Tampoco fueron observadas en el intestino delgado, lo que hace postular el no-retorno de larvas al intestino por vía de la tráquea o esófago como está descrito en los huéspedes definitivos (caninos).

OBJETIVO 2:

-Determinar el número de larvas (carga parasitaria) en distintos órganos del ratón luego de su infectación con huevos de *Toxocara canis* para evaluar la posible relación entre la carga parasitaria y diferentes métodos de inoculación.

En la literatura consultada, solamente se menciona la infectación de animales de laboratorio utilizando la intubación esofágica. Con este método existen inconvenientes con la anestesia y regurgitación del contenido inoculado por lo tanto se decidió probar otra metodología de infectación -el anzuelo alimenticio- para tratar de optimizar los resultados. En un primer momento se compararon dos métodos alternativos para la inoculación experimental y en una segunda instancia se evaluó la influencia del ayuno en dicha inoculación.

Materiales y métodos utilizados para comparar dos métodos de inoculación oral

Se usaron ratones hembras Swiss CF 1, adultos, de 25 a 30 g de peso obtenidos del Laboratorio Central de Salud Pública de la provincia de Buenos Aires.

Los huevos infectivos se obtuvieron de la misma forma que en la técnica descrita en el objetivo 1.

Todo el material de vidrio fue siliconado para prevenir la adhesión y pérdida de huevos.

El cultivo de huevos larvados fue centrifugado y resuspendido en solución fisiológica. Para estimar la cantidad de huevos en el inóculo, esta suspensión fue homogeneizada y luego se contaron los huevos por microscopía óptica.

El inóculo fue de 200 huevos por ratón. Las metodologías de inoculación ensayadas fueron:

- A.- Intubación esofágica, a través de cánula y con anestesia leve con eter. (grupo 1)

B.- Inoculación con anzuelo alimenticio: se embebió un pequeño trozo de alimento con el inóculo. Se esperó la ingesta total del trozo alimenticio. Para lograr que esto se realizara con rapidez, cada ratón fue sometido a un tiempo de ayuno (agua ad libitum) previo de 7 hr. (grupo 2)

Procesamiento del material: los ratones fueron sacrificados a las 48 y 120 hr p.i. Se examinaron el hígado y los pulmones con el fin de determinar el número de larvas recuperadas. Para ello se siguió la técnica de digestión enzimática y homogeneización manual.

Resultados

Los resultados de esta experiencia se muestran en la tabla N° 7. Cuando se utilizó la técnica del anzuelo alimenticio se recuperó mayor cantidad de larvas en el hígado a las 48 hr p.i. y en los pulmones a las 120 hr p.i. hubo una diferencia significativa en la recuperación larval a las 48 hr p.i. ($p < 0,01$) pero no lo fue a las 120 hr.

Tabla N° 7: Recuperación larval de ratones infectados con huevos de *T.canis* variando el método de inoculación.

Tiempo post-inoculación	Grupo 1: recuperación larval en hígado y pulmones por intubación esofágica			Grupo 2: recuperación larval en hígado y pulmones por anzuelo alimenticio		
	\bar{x}	SD	%	\bar{x}	SD	%
48 hr	84,60	4,10	42,30	131,66	3,85	65,83
120 hr	29,00	2,94	14,50	15,33	2,05	7,66

Discusión y Conclusiones:

Aunque la intubación esofágica ha sido utilizada desde Sprent en 1952, esta metodología experimentada trata de imitar la infección natural.

La recuperación larval usando la técnica del anzuelo alimenticio superó a la lograda con la técnica tradicional, con una significativa diferencia a las 48 hr. p.i. Estas experiencias revelan que el método del anzuelo alimenticio tuvo mejor rendimiento. El método de evaluación realizado (observación de larvas en el pellet del homogenado de hígado) es el citado por la literatura para evaluación de infectación en toxocarosis murina. Por lo tanto las diferencias halladas no pueden ser atribuidas al método de observación larvaria. El método es más natural que la intubación esofágica.

Material y métodos para evaluar la influencia del ayuno en la recuperación larval

Se utilizaron cuatro grupos de ratones similares a la experiencia anterior.

La obtención de los parásitos y el procesamiento de los huevos de *T. canis* fue realizada de la misma manera que se describió previamente.

La inoculación de los animales se realizó siguiendo la técnica del anzuelo alimenticio. La dosis infectante fue de 200 huevos larvados por ratón. Antes de la inoculación, los ratones fueron sometidos a diferentes tiempos de ayuno (agua ad libitum):

- Grupo A: 4 hr
- Grupo B: 10 hr
- Grupo C: 15 hr
- Grupo D: 20 hr

Todos los animales fueron alimentados ad libitum luego de dos hr p.i. El alimento que se utilizó antes y después de la infección fue alimento balanceado para animales de laboratorio.

Los ratones fueron sacrificados a las 48 hr p.i.. La presencia de larvas fue analizada en el hígado y en los pulmones siguiendo las técnicas previamente descriptas.

Resultados

Los resultados se muestran en la tabla N°8. Se presenta la media, el desvío standard y el porcentaje de larvas recuperadas a las 48 hr p.i. como resultado del procesamiento de hígado y pulmón de los distintos grupos de ratones inoculados.

Existió un significativo incremento ($p = < 0,001$) en la recuperación larval cuando el tiempo de ayuno previo fue de 10 hr, comparado con la recuperación que se obtuvo cuando el tiempo de ayuno fue de 4 hr.

Con tiempos de ayuno más prolongados (15 y 20 hr) no se obtuvo incremento manifiesto respecto del ayuno de 10 hr, en el porcentaje de larvas recuperadas.

Tabla N° 8: Recuperación de larvas a las 48 hr en hígado y pulmón de ratones infectados con huevos larvados de *Toxocara canis* variando el tiempo de ayuno previo a la inoculación.

Ayuno previo	Recuperación larval			
	Tiempo (hr)	\bar{x}	DS	%
4		71,33	2,62	35,66
10		175,00	3,55	87,50
15		165,66	4,98	82,83
20		169,00	3,26	84,50

Discusión y Conclusiones:

La recuperación de larvas de *T.canis* en el hígado y pulmón de ratones infectados presenta amplias variaciones en la literatura consultada. Así, Oshima (1961) reportó una recuperación del 95 % a las 44 hr p.i., utilizando como método de inoculación la intubación esofágica. Usando la misma técnica, otros autores presentaron resultados menores. Ishii (1959) obtuvo el 10,4%, Piergili Fioretti (1989) el 70% y El Sahzly et al.(1991) entre el 10 y el 20%. Esta variabilidad en la recuperación de larvas puede deberse a diferentes factores mencionados por Schantz (1989) como la vía de inoculación, peso de los ratones, longevidad de los huevos, etc.

El presente trabajo fue diseñado para investigar si el tiempo de ayuno previo a la inoculación de huevos infectivos aumenta o disminuye la recuperación de larvas en hígado y pulmón a las 48 hr p.i.

Se demostró que, utilizando la vía oral de inoculación, el tiempo de ayuno incide en el porcentaje de larvas recuperadas. Con 4 hr de ayuno previo, la recuperación de larvas fue cercana al 36%, mientras que con ayunos de 10 a 20 hr, la recuperación osciló alrededor del 80% con una diferencia significativa.

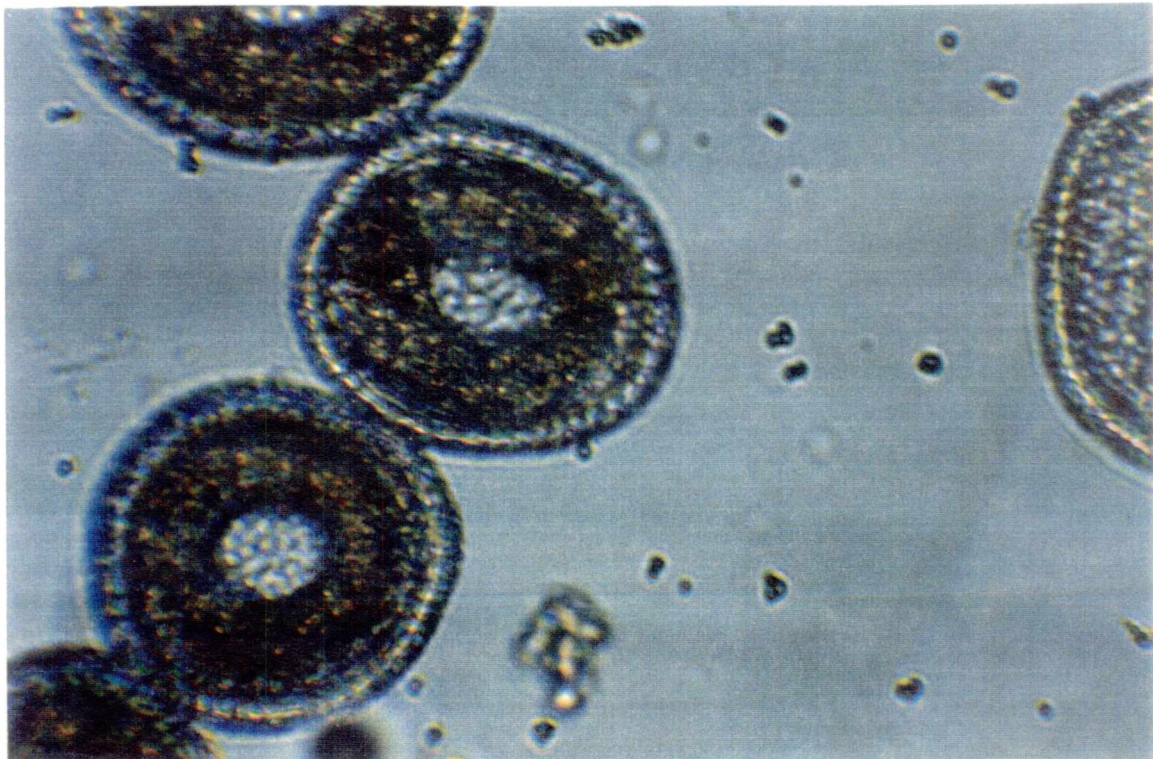
El mayor porcentaje de larvas se obtuvo con un ayuno previo de 10 hr. Mayores tiempos no incrementaron sustancialmente los resultados de la recuperación, Si tenemos en cuenta que varias horas de ayuno provocan un aumento de la acidez gástrica y causan además mayor éstasis intestinal, podemos pensar que tales factores favorecen la decorticación de los huevos de *T.canis* ingeridos y la posterior penetración de larvas en la mucosa intestinal. Esto causaría mayor arribo de larvas al hígado y pulmón de los animales infectados cuando los tiempos de ayuno oscilan dentro de las 10-15 hr.

OBJETIVO 3:

-Desarrollar una técnica serológica para evaluar la respuesta humoral anti-*Toxocara canis*.

Se procedió a desarrollar una metodología que permita obtener una suspensión de larvas de *T. canis* con el fin de ser utilizada en la producción de antígenos Excretor/secretor (Ag. E/S), somático larval (Ag. S/L) y de huevos embrionados (Ag. H/E) para implementar el desarrollo de una técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Los huevos infectivos (fotografía 3) se obtuvieron siguiendo los pasos descritos anteriormente.



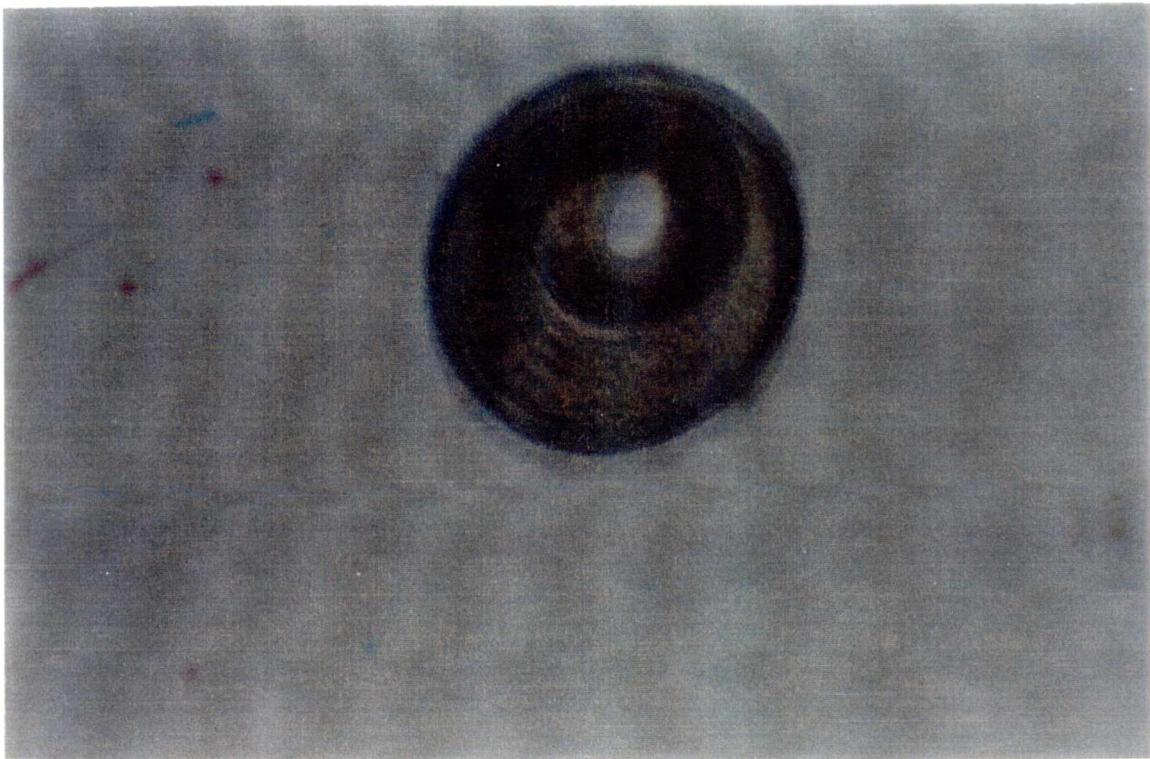
Fotografía 3: Huevos infectivos de *Toxocara canis* (400 X).

Material y métodos para obtener huevos decorticados

Este paso es necesario para lograr la salida de larvas infectantes de las envolturas del huevo. Para esto se procedió a su neutralización con buffer fosfato pH 7 pues la suspensión se hallaba en solución de ácido sulfúrico. Se lavaron posteriormente dos veces con agua destilada. Luego se resuspendieron en hipoclorito de sodio al 6%, donde se los incubó a 35-37°C durante diez-veinte minutos. Se comprobó por microscopía óptica la desaparición de la membranas corticales externa y media, quedando rodeadas solamente por la membrana vitelina. Por sucesivos lavados con MEM (minimum essential medium- Difco Laboratories) más ATB (antibióticos) y ATF (antifúngico) se extrajo el hipoclorito de sodio remanente.

Resultados

Se obtuvo la evidente decorticación visible al microscopio óptico como se muestra en la fotografía 4



Fotografía 4: Huevo decorticado de *Toxocara canis* (400 X).

Material y métodos para obtener larvas en estadio II libres

Se llevaron a cabo diversas pruebas con el fin de provocar la salida de las larvas infectantes de los huevos decorticados: La bibliografía consultada describía una estimulación térmica (thermic shock) para provocar esta salida. Por lo tanto se realizaron las siguientes experiencias para lograrlo:

Los huevos decorticados de *T.canis* se suspendieron en 5ml de MEM adicionado de ATB y ATF y se incubaron en baño maría de la siguiente manera:

Tubo 1	-----80°C-----	2"
2	-----80°C-----	5"
3	-----80°C-----	30"
4	-----80°C-----	1'
5	-----60°C-----	15'
6	-----50°C-----	30'
7	-----40°C-----	60'
8	-----35°C-----	60'

Resultados

Al observar al microscopio óptico el efecto de estas incubaciones, las larvas de los tubos 1 a 7 perdieron su vitalidad. En los tubos 3 y 4 se observó ruptura de las membranas y de las larvas. En los tubos 1, 2, 6 y 7 se observaron la mayoría de las membranas intactas pero las larvas resultaron muertas. Solamente en el tubo 8 se observó que las larvas aún vivían pero las membranas vitelinas permanecían íntegras.

Por esto se decidió una segunda experiencia:

Nuevamente huevos decorticados con el estadio L2 en su interior se fraccionaron en tubos que se incubaron en MEM + ATB +ATF a 35°C a diferentes lapsos: 5, 10, 24 y 72 hr. Se observó que a medida que transcurrían las horas a esa temperatura, las larvas por sí mismas rompían las membranas que las envolvían y salían al medio con activos movimientos.

Conclusiones

Si bien la literatura consultada refería un shock térmico para producir la salida de las larvas, esto no pudo realizarse con éxito en ninguna de las experiencias realizadas en nuestro laboratorio. Por el contrario, cuando se realizó la experiencia a temperaturas no tan elevadas (35°C) y por tiempos prolongados (72 hr), el número de larvas que lograron escapar de sus membranas vitelinas fue alrededor del 98%.

Material y métodos para la ruptura de huevos larvados

Luego de obtener los huevos larvados como se describió anteriormente, se procedió a lavarlos con solución fisiológica y a realizar su recuento. La concentración obtenida fue de 400 huevos /ml.

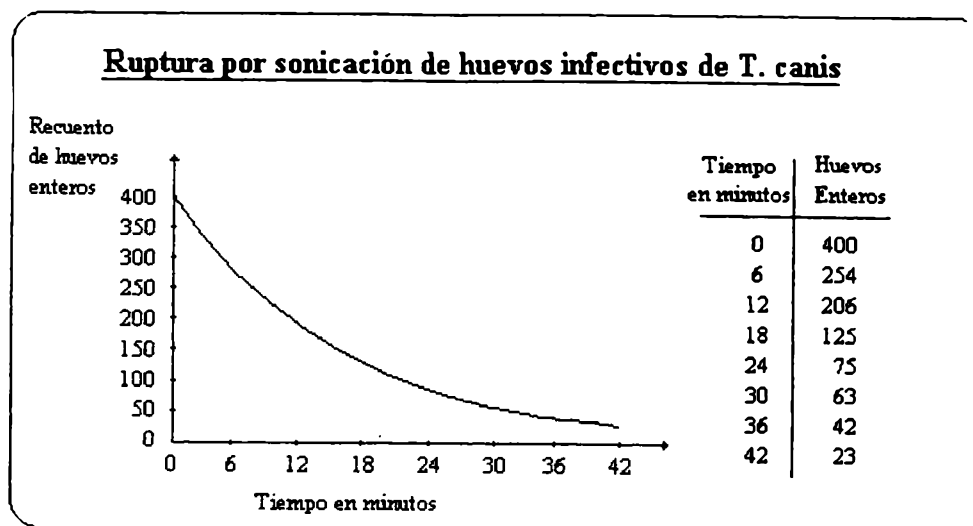
-Ruptura de los huevos: la misma se realizó con aplicación de ultrasonido mediante un Heat System Ultrasonic Sonicator Model W-185-Fc, con baño de hielo. Se realizaron siete sesiones de sonicación de seis minutos cada una. Luego de cada sesión se procedió al recuento de huevos que quedaban íntegros con el fin de conocer la dinámica de la ruptura de los huevos.

-Obtención de fracción antigénica: toda la suspensión obtenida post-sonicación fue centrifugada a 2000 g durante 30 minutos. Se descartó el precipitado. En la fracción sobrenadante donde se espera encontrar sustancias antigénicas, se determinó la concentración proteica siguiendo el método de Lowry.

Resultados:

En el gráfico N° 2 se expresan los resultados de la ruptura por sonicación de los huevos infectivos de *T.canis*.

Gráfico N°2:



La concentración proteica del antígeno obtenido fue de 500 µg/ml.

Material y métodos para obtener el Ag. S/L de *T. canis*

La incubación de huevos, decorticación de los mismos y salida de larvas de sus ovoenvolturas se realizó siguiendo las metodologías previamente descriptas.

-Purificación de la suspensión larval: este paso se considera crítico es esta técnica pues es necesario separar los somas larvarios de las membranas de huevos que quedan luego de la decorticación larvaria. Con este propósito se utilizó la filtración en el aparato de Baerman. El filtro elegido fue Folded Filter 595 1/2 de Schleider and Schnell. La filtración se realizó durante 48 horas a una temperatura de 35-37°C.

-Recolección de las larvas: las larvas que atravesaron activamente el filtro fueron colectadas y resuspendidas en MEM + ATB + ATF.

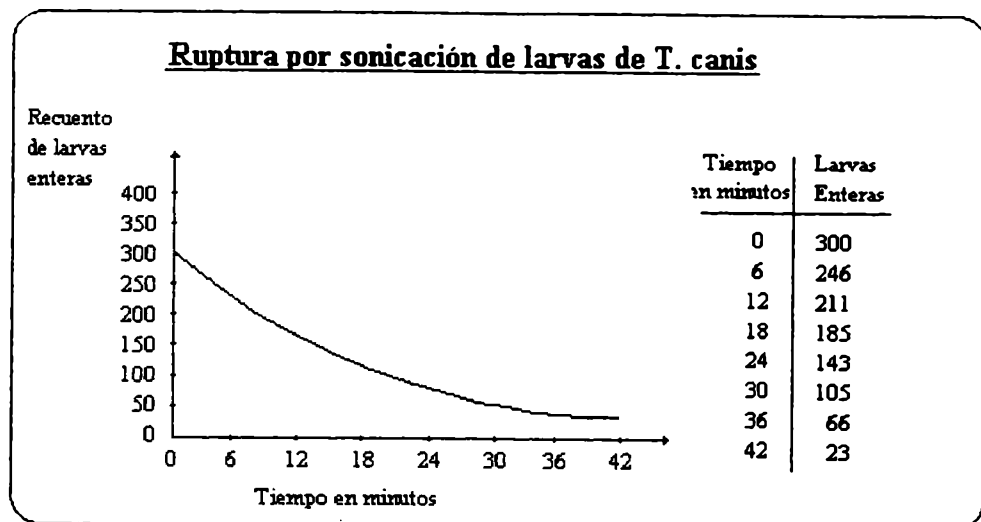
-Ruptura de los somas larvales: se utilizó la sonicación mediante un sistema Heat Systems Ultrasonic Sonicator Model W-185-Fc, con baño de hielo. se realizaron siete sesiones de seis minutos cada una.

-Obtención de la fracción antigénica: luego de la sonicación, la suspensión fue centrifugada a 2000 g durante 30 minutos. Se determinó la concentración proteica en el sobrenadante por el método de Lowry.

Resultados

La concentración de larvas obtenidas fue de 300 por ml. En el gráfico N°3 se presentan los resultados de la ruptura de los somas larvarios. la concentración proteica del antígeno somático larval fue de 100 µg/ml.

Gráfico N° 3:



Material y métodos para obtener el Ag. E/S de L2 de *T. canis*:

Se repitieron todos los pasos descritos hasta obtener un cultivo puro de larvas .

-Cultivo de larvas y obtención del material secretado-excretado: Las larvas se cultivaron en MEM adicionado de ATB (Penicilina 200 UI/ml y Estreptomina 350 µg/ml) y ATF (Nistatina 1500 UI/ml). La concentración larval fue de 1000 larvas por ml. Se colocaron en frascos de cultivo conteniendo 10 ml cada uno. La temperatura de cultivo fue de 35-37°C. Una vez por semana, se controlaban posibles contaminaciones por turbidez e indicadores de pH, y la viabilidad larval mediante microscopía óptica. El medio de cultivo de los frascos considerados correctos (menos del 5% de mortalidad y libres de contaminación) se aspiraba asepticamente. Luego se reponía el mismo volumen con medio fresco estéril.

-Concentración del medio colectado: el medio de cultivo recolectado se concentró con polietilenglicol 6000 y se dializó contra PBS 0,01 M pH 7. Se

procedió a realizar la técnica de Lowry para medir su concentración proteica.

Resultados

El producto final de la concentración y diálisis fueron 20 ml de una solución de sustancias excretadas-secretadas por el estadio de L2 de *T.canis*. La concentración proteica fue de 250 µg por ml.

Material y métodos para la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta

En la literatura consultada, siempre se encontró que la técnica de IFI para toxocarosis se desarrolló con antígenos en suspensión, lo que hace perder mucha sensibilidad a esta técnica. Por esto, se probaron diferentes métodos para lograr fijar los antígenos en portaobjetos preparados para fluorescencia (Glass Tecnica Company).

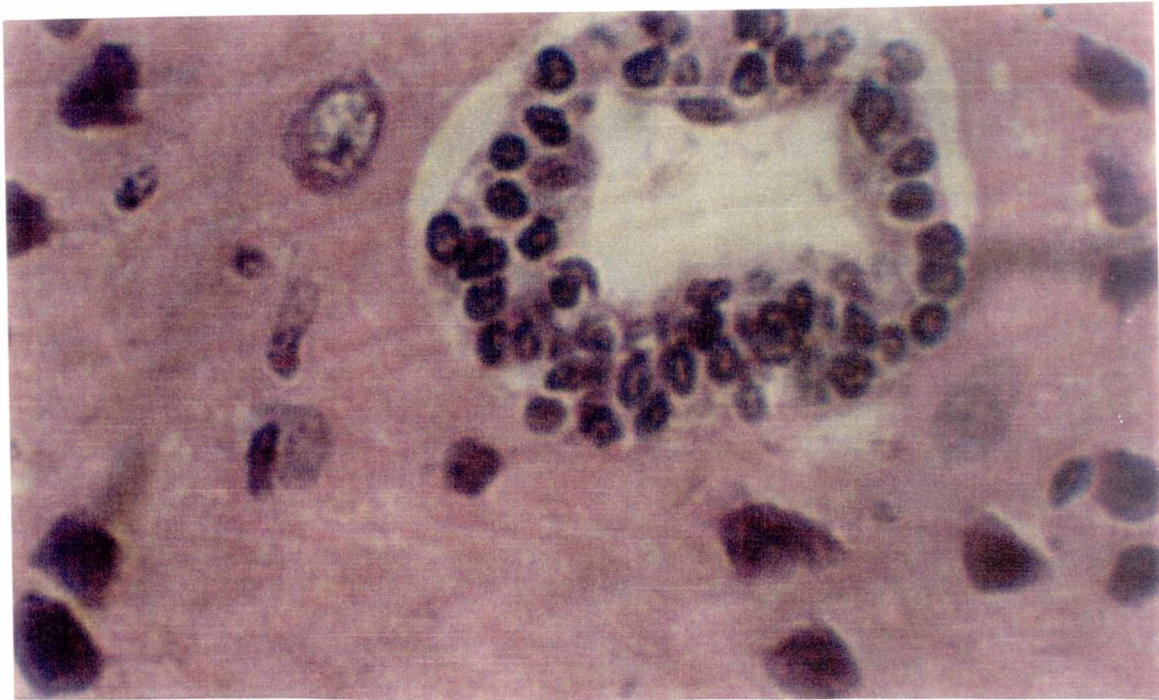
Los antígenos utilizados fueron los siguientes:

- Huevos larvados: enteros (Ag. H/L)
extracto antigénico (Ext. Ag. H/L)
- Larvas estadio II: enteras (Ag. S/L) en solución fisiológica.
en corte de tejido cerebral.
extracto (Ext. Ag. S/L)
- Material excretor-secretor: (Ag. E/S)

Los materiales antigénicos fueron adheridos al portaobjetos según diferentes técnicas acordes al tipo de material. Así, los cortes de tejido cerebral con larvas en su interior (fotografía 5) fueron pegados con albúmina bovina y posteriormente desparafinados y deshidratados por los sucesivos pasajes por xilol y alcoholes clásicos (etanol 96°) para cortes histológicos, y luego sumergidos en PBS 0,15 M -pH 8,5.

Los Ag. H/L, Ext. H/L, Ext. S/L y E/S fueron adheridos con una solución de metanol 75% más ácido acético 25% dejando a temperatura ambiente en cámara húmeda durante 45-60 minutos.

El Ag. S/L en solución fisiológica se adhirió dejándolo secar a temperatura ambiente sobre el portaobjetos y luego fijándolo con calor.



Fotografía 5: Corte de tejido cerebral con una larva en anillo de *Toxocara canis*. Coloración con hematoxilina-eosina. (400 X.)

Los pasos siguientes fueron comunes a todos los antígenos probados. El material antigénico se incubó con suero positivo para toxocarosis por la técnica de Elisa aportado por el laboratorio de Serología del Hospital Garrahan. También se incubó con suero negativo para esta parasitosis aportado por el mismo laboratorio. También se utilizó como control negativo la incubación con solución fisiológica. La incubación fue de 60 minutos a 37°C.

Posteriormente se lavaron con PBS 0,15 M pH 8,5 y se cubrieron con antigammaglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína (Biocientífica S.A.) diluída al 1%. Se dejó incubar a 37°C durante 45 minutos en cámara húmeda. Luego se lavó nuevamente con PBS, se dejó escurrir y se montó en glicerina tamponada. Se observó al microscopio de fluorescencia dentro de las dos horas de finalizados todos los pasos.

Resultados y Discusión

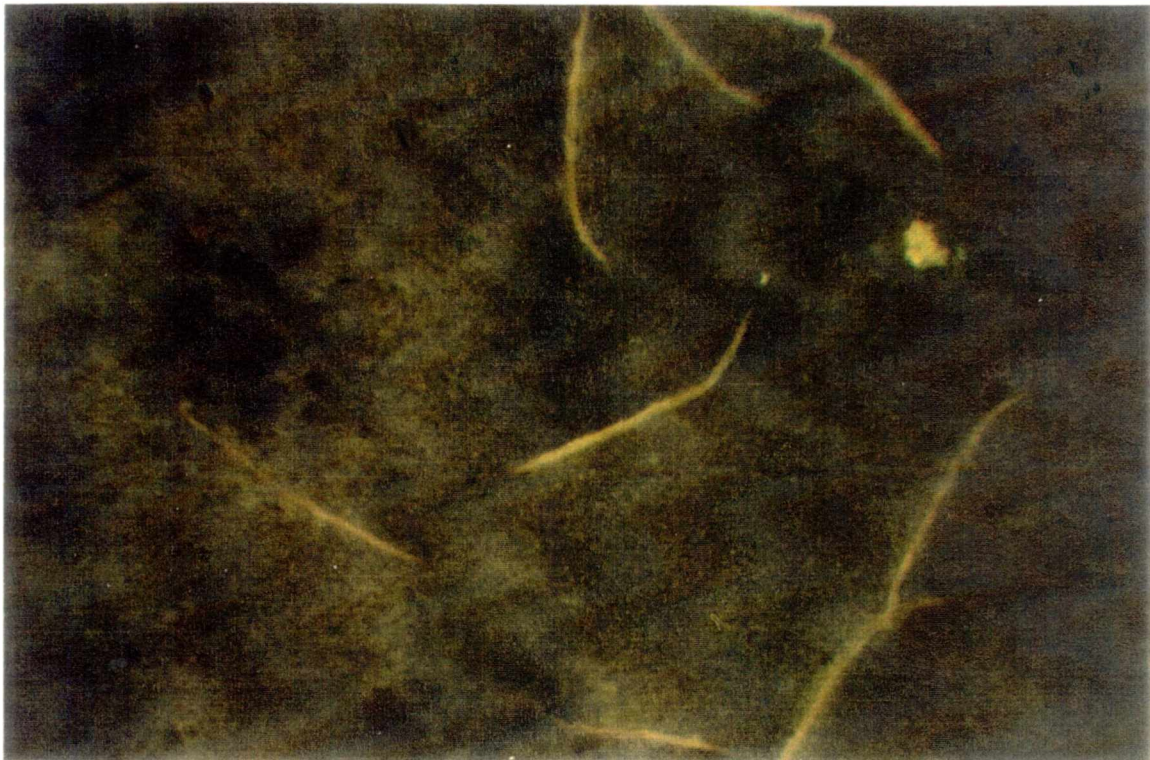
-Ext. Ag H/L, Ext. Ag. S/L y Ag. E/S: No se observó fluorescencia en los sueros de pacientes infectados ni en los controles negativos. Podría

deberse a que el procedimiento de pegado de los antígenos fracasó o que las concentraciones proteicas de estos materiales antigénicos no es suficiente para esta técnica. Quizá podría mejorarse concentrando aún más estas sustancias.

-Ag. H/L: Los huevos manifestaron fluorescencia tanto con los sueros de pacientes positivos como con los controles negativos, aunque con menor intensidad en estos últimos. La fluorescencia era más verdosa en los sueros positivos y más amarillenta en los sueros controles negativos. Se consideró que esta diferencia podría tener una apreciación pasible de subjetividad y que existe cierto grado de autofluorescencia en la cubierta exterior de los huevos que otorgaban inespecificidad a la técnica.

-Ag S/L: -En corte de tejidos: La fluorescencia apareció en los sitios donde había larvas y fue nítidamente diferente a la fluorescencia inespecífica del resto del tejido cerebral. Con los sueros controles negativos apareció una fluorescencia inespecífica del tejido cerebral.

-En solución fisiológica: La fluorescencia fue nítida, enmarcando a los somas larvarios. En los controles negativos no apareció fluorescencia y el resto del campo fue mucho más limpio que con cualquiera de los otros antígenos ensayados (fotografías 6 y 7).



Fotografía 6: Técnica de IFI sobre larvas de *Toxocara canis* fijadas por calor. (100 X)



Fotografía 7: Técnica de IFI sobre larvas de *Toxocara canis* fijadas por calor. (400 X)

Conclusiones

En las experiencias realizadas, resultaron como elementos antigénicos mas adecuados para la técnica de IFI con material adherido al portaobjeto, los somas larvarios enteros tanto en corte de tejido como en solución fisiológica. Este último material resultó más adecuado porque no presentó fluorescencia inespecífica de fondo. Esta técnica fue utilizada para evaluar la respuesta inmune humoral en ratones con toxocarosis experimental murina (objetivo 4) cambiando la incubación con antigamma-globulina humana por una antigammaglobulina murina marcada con isotio-cianato de fluoresceína (Sigma Immuno Chemicals).

OBJETIVO 4:

-Evaluar distintos parámetros inmunológicos celulares y humorales en la infección murina por *Toxocara canis*.

Este objetivo también se llevó a cabo en dos etapas. En la primera se evaluó la relación entre la respuesta celular y la carga parasitaria en toxocarosis experimental. En la segunda etapa se aplicó la técnica de inmunofluorescencia indirecta desarrollada en la Cátedra para evaluar la respuesta humoral en toxocarosis experimental.

Primera etapa:

Materiales y métodos para evaluar la relación entre la carga parasitaria y la respuesta inmune en toxocariasis experimental

La obtención de los huevos larvados de *T.canis* se realizó mediante las técnicas expuestas anteriormente.

Mediante la técnica del anzuelo alimenticio (ver objetivo 2), se inocularon ratones hembras Swiss CF 1 hembras de un peso oscilante entre 25 y 30 gr (x 25, 935 gr) obtenidos del Laboratorio Central de Salud Pública de la provincia de Buenos Aires.

Los ratones infectados se dividieron en cinco grupos para ser sacrificados a distintos tiempos p.i. Todos los ratones recibieron una sola dosis desafío con:

- grupo 1: control (sin inocular).
- grupo 2: 50 huevos larvados por ratón.
- grupo 3: 100 huevos larvados por ratón.
- grupo 4: 200 huevos larvados por ratón.
- grupo 5: 2000 huevos larvados por ratón.

Los huevos no infectivos no fueron contados en el inóculo. Ratones integrantes de cada grupo fueron sacrificados a las 5-10-20-26-32-48-120-192-336 y 504 hr p.i.

La recuperación de larvas por órgano analizado se llevó a cabo de la siguiente manera:

a) Procesamiento de hígado y pulmones:

- Lavado del órgano con solución fisiológica.
- Homogeneizado del mismo en homogeneizador manual.
- Resuspensión del homogeneizado en pepsina 1% (pH 1,5).
- Centrifugado y eliminación del sobrenadante.
- Resuspensión del pelet en solución fisiológica.
- Observación microscópica con conteo directo de larvas.

b) El cerebro se analizó a través de la observación directa microscópica entre portaobjetos y cubreobjetos.

El análisis de los Índices esplénico (I.E.) , hepático (I.H.) y pulmonar se desarrolló según el procedimiento descrito por Simonsen (1962) para evaluar reacciones de rechazo de injertos. Consiste en pesar los ratones (tanto los infectados como los del grupo control) y posteriormente extraer asépticamente el hígado y el bazo para pesar cada uno de ellos. Luego se establece la relación entre el peso del ratón y cada uno de los órganos extraídos. Por último, se calculan los índices según las siguientes razones:

$$\text{Índice} = \frac{(\bar{x} \text{ del peso del órgano} / \bar{x} \text{ del peso total del ratón}) \text{ infectados}}{(\bar{x} \text{ del peso del órgano} / \bar{x} \text{ del peso total del ratón}) \text{ controles.}}$$

El resultado superior a uno (1) se toma como demostrativo del aumento del tamaño del órgano por la infección larval.

Posteriormente se relacionaron los índices obtenidos para cada grupo con el número de larvas presentes en los órgano analizado.

Eosinofilia periférica: su determinación fue llevada a cabo solamente en los grupos 1 y 5. La sangre periférica fue obtenida del seno ocular con capilares de microhematocrito. Se realizaron extendidos sanguíneos y posteriormente se colorearon con May Grundwal Giemsa. Se observaron al microscopio óptico y se contaron para evaluar su porcentaje.

Resultados:

Recuperación de larvas del hígado: La recuperación larvaria en los cuatro grupos se observa en el gráfico N° 4. El pico de recuperación

coincidió en todos los grupos y fue observado a las 48 hr p.i.. Los valores fueron decreciendo pero fue notorio un nuevo incremento en los grupos 4 y 5 después de las 336 hr p.i.

Recuperación de larvas de los pulmones: Se muestra en el gráfico N° 5. El número de larvas halladas fue menor que en el hígado, y con similar distribución.

Recuperación de larvas del cerebro: Se observa en el gráfico N° 6. En el grupo 2 la primera recuperación larvaria se dio a las 504 hr p.i., en los grupos 3 y 4 fue a las 336 hr p.i. y en el grupo 5, a las 192 hr p.i.

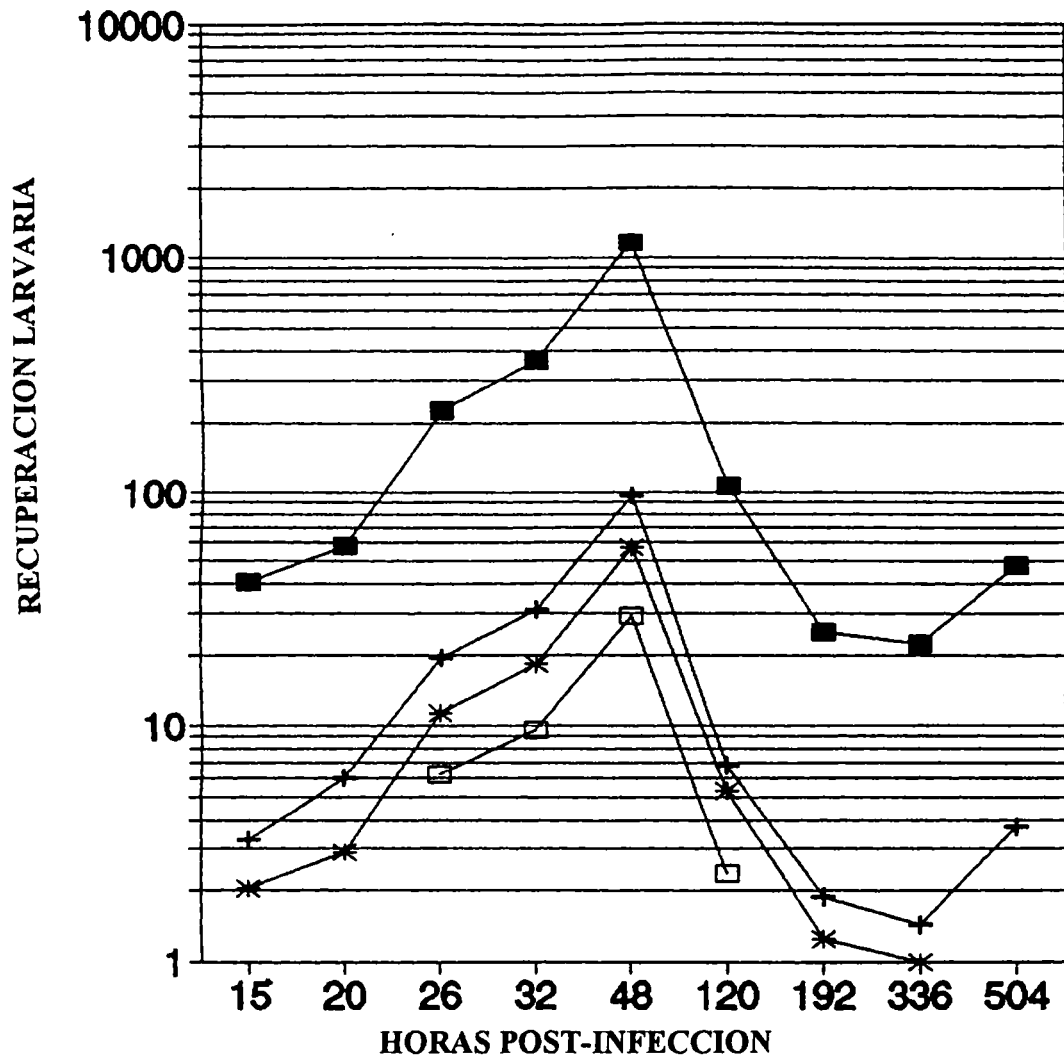
Índice esplénico: Su evolución se observa en el gráfico N° 7. Los grupos 4 y 5 superan el valor uno a las 120 hr p.i., mientras que el grupo 3 lo hace a las 192 hr p.i., y el grupo 2 a las 336 hr. p.i. Los grupos 2 y 3 disminuyen los valores a las 504 hr p.i., mientras que los ratones de los grupos 4 y 5 continúan con valores superiores a uno.

Índice hepático: Su evolución se observa en el gráfico N° 8. El grupo 5 supera levemente el valor uno a las 192 hr p.i., permanece así hasta las 336 hr. p.i. y alcanza valores cercanos a 1,6 a las 504 hr. p.i. El grupo 4 supera el valor uno a las 120 hr p.i. y va incrementándose progresivamente hasta las 504 hr. p.i., pero sin llegar a los valores del grupo anterior. En el grupo 3 superó el valor uno a las 336 hr p.i. para volver a la normalidad a las 504 hr p.i. Este índice en el grupo 2, fue levemente superior a uno a las 120 hr p.i., luego fue progresivamente incrementándose hasta las 336 hr p.i. y retornó a valores normales a las 504 hr p.i.

Índice esplénico: Se observa en el gráfico N° 9. Los primeros grupos en superar el valor uno fueron los número 4 y 5, haciéndolo a las 120 hr p.i., luego decrecieron a la hora 192 p.i. y nuevamente se incrementaron hasta las 504 hr. p.i. En el grupo 3 se elevó a las 192 hr p.i. y luego decreció gradualmente hasta la hora 504 p.i. En el grupo 2 se elevó a las 336 hr p.i. y regresó a las 504 hr p.i. a los valores normales.

Eosinofilia: Se muestra en el gráfico N° 10. Se compara el porcentaje de eosinófilos entre el grupo no inoculado y el grupo 5 (inoculado con 2000 huevos larvados). En el grupo infectado se detectó un pico a las 192 hr p.i. que disminuyó lentamente a las 504 hr p.i.

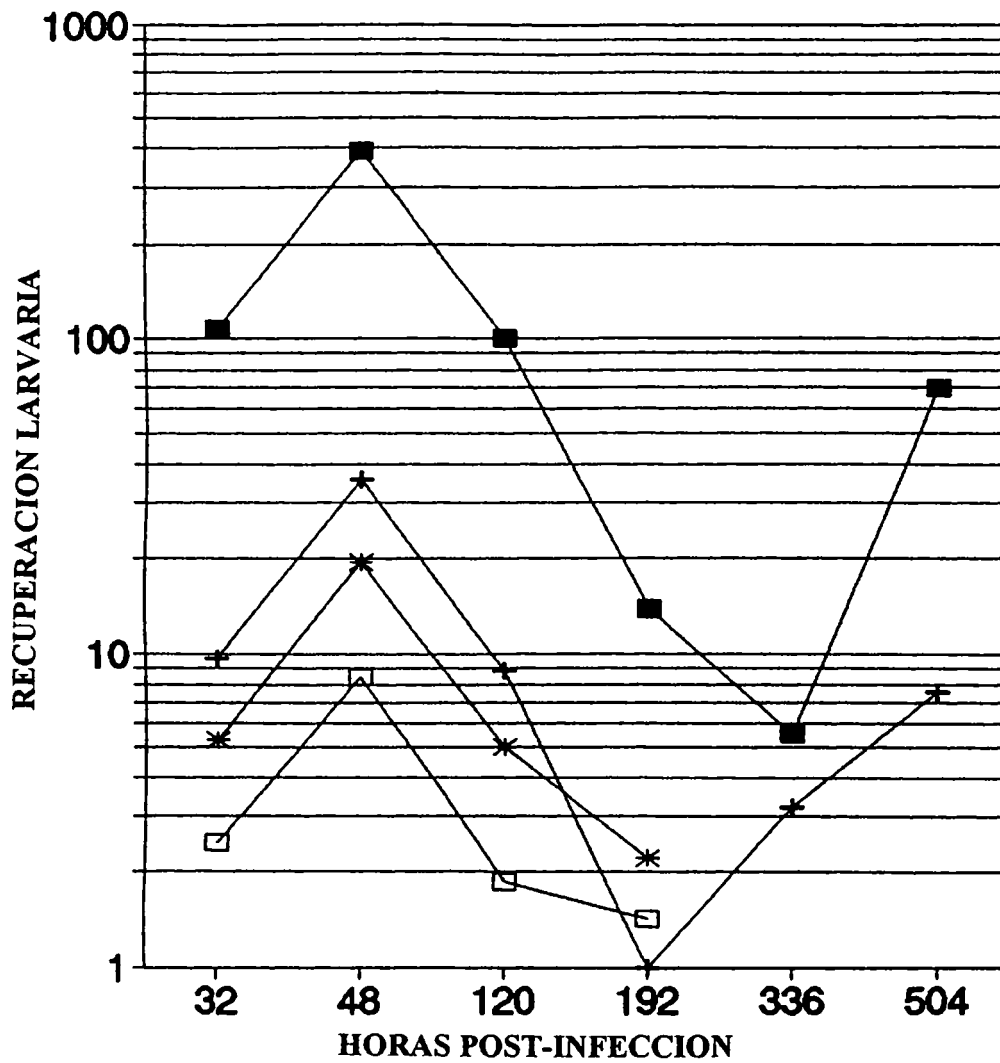
Gráfico N° 4: Recuperación de larvas en hígado de ratones inoculados con diferentes dosis de huevos infectivos de *Toxocara canis*.



DOSIS DE HUEVOS INFECTIVOS:

- GRUPO 5: 2000
- +— GRUPO 4: 200
- *— GRUPO 3: 100
- GRUPO 2: 50

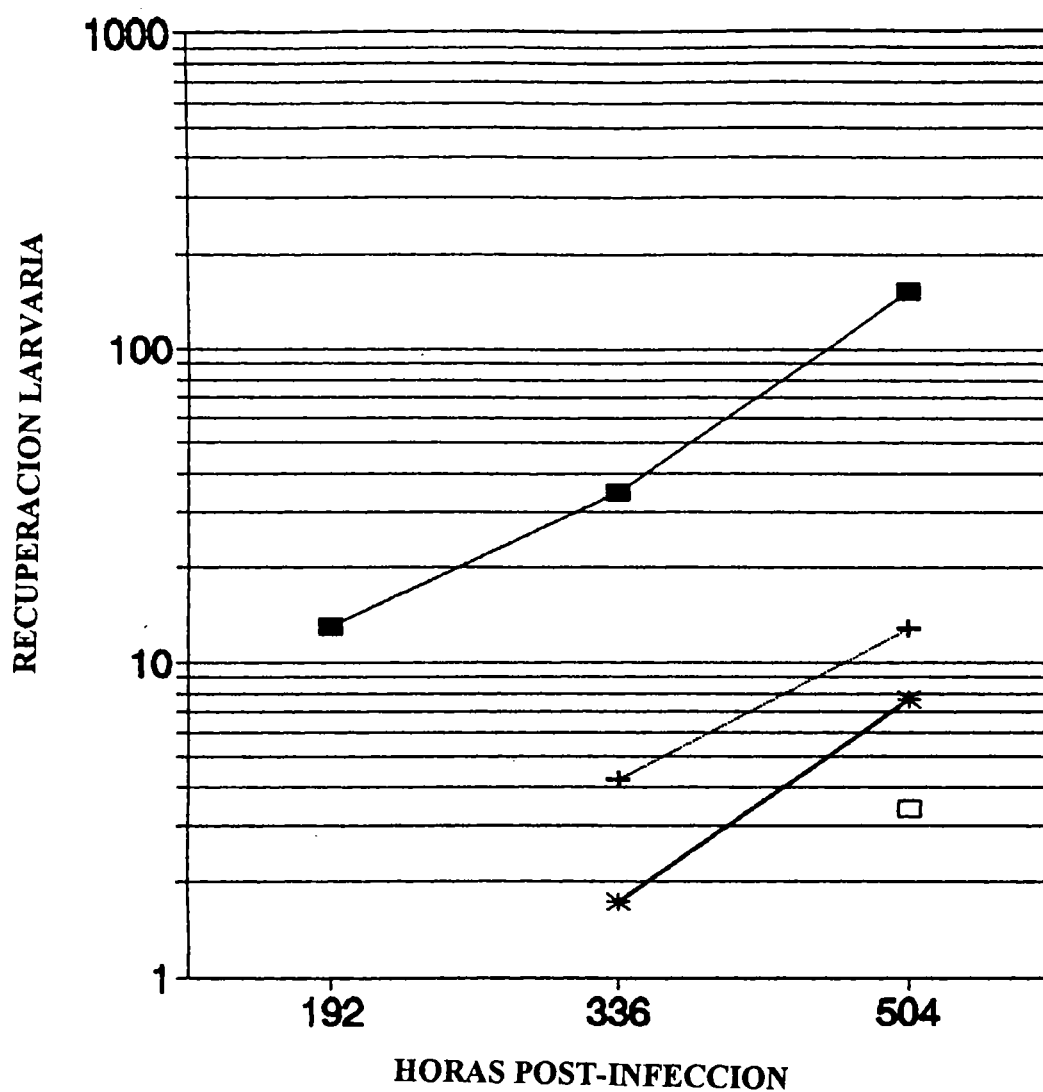
Gráfico N° 5: Recuperación de larvas en pulmones de ratones inoculados con diferentes dosis de huevos infectivos de *Toxocara canis*.



DOSIS DE HUEVOS INFECTIVOS:

- GRUPO 5: 2000
- + GRUPO 4: 200
- * GRUPO 3: 100
- GRUPO 2: 50

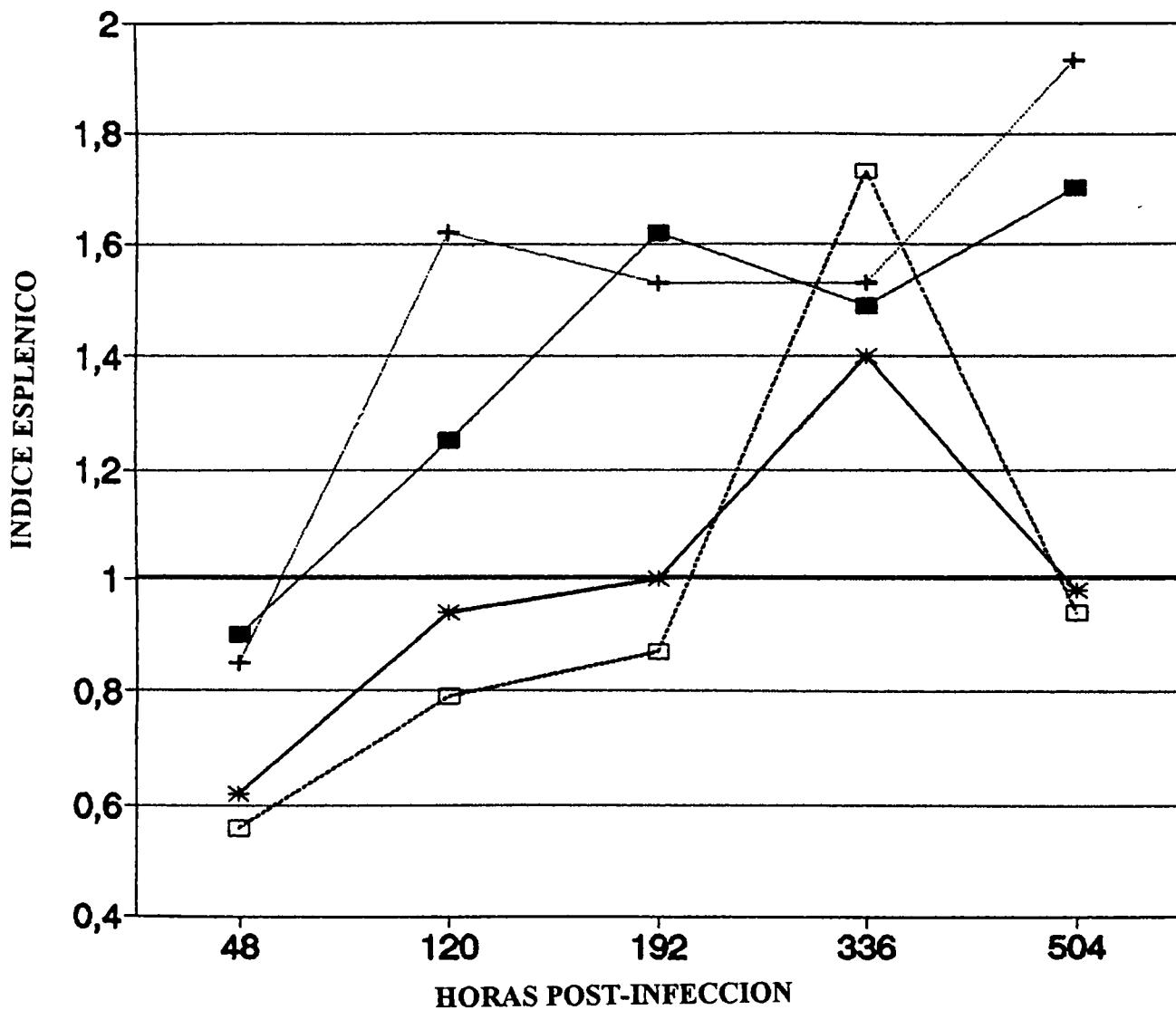
Gráfico N° 6: Recuperación de larvas en cerebro de ratones inoculados con diferentes dosis de huevos infectivos de *Toxocara canis*.



DOSIS DE HUEVOS INFECTIVOS:

- GRUPO 5: 2000
- + GRUPO 4: 200
- * GRUPO 3: 100
- GRUPO 2: 50

Gráfico N° 7: Evolución del índice esplénico (IE) en ratones inoculados con diferentes dosis de huevos infectivos de *Toxocara canis*.



DOSIS DE HUEVOS INFECTIVOS:

- GRUPO 5: 2000
- + GRUPO 4: 200
- * GRUPO 3: 100
- GRUPO 2: 50

Gráfico N° 8: Evolución del índice hepático (IH) en ratones inoculados con diferentes dosis de huevos infectivos de *Toxocara canis*.

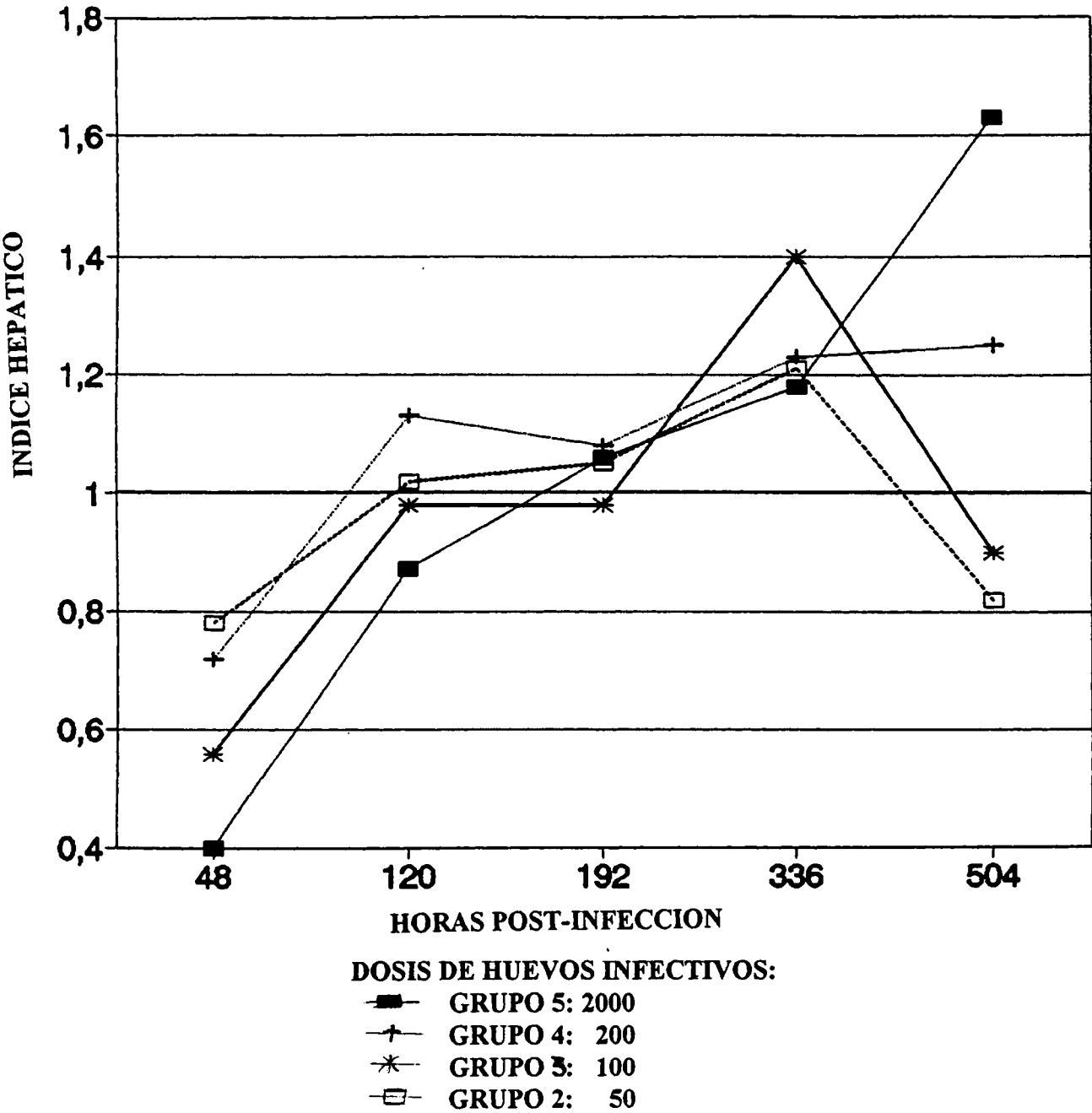
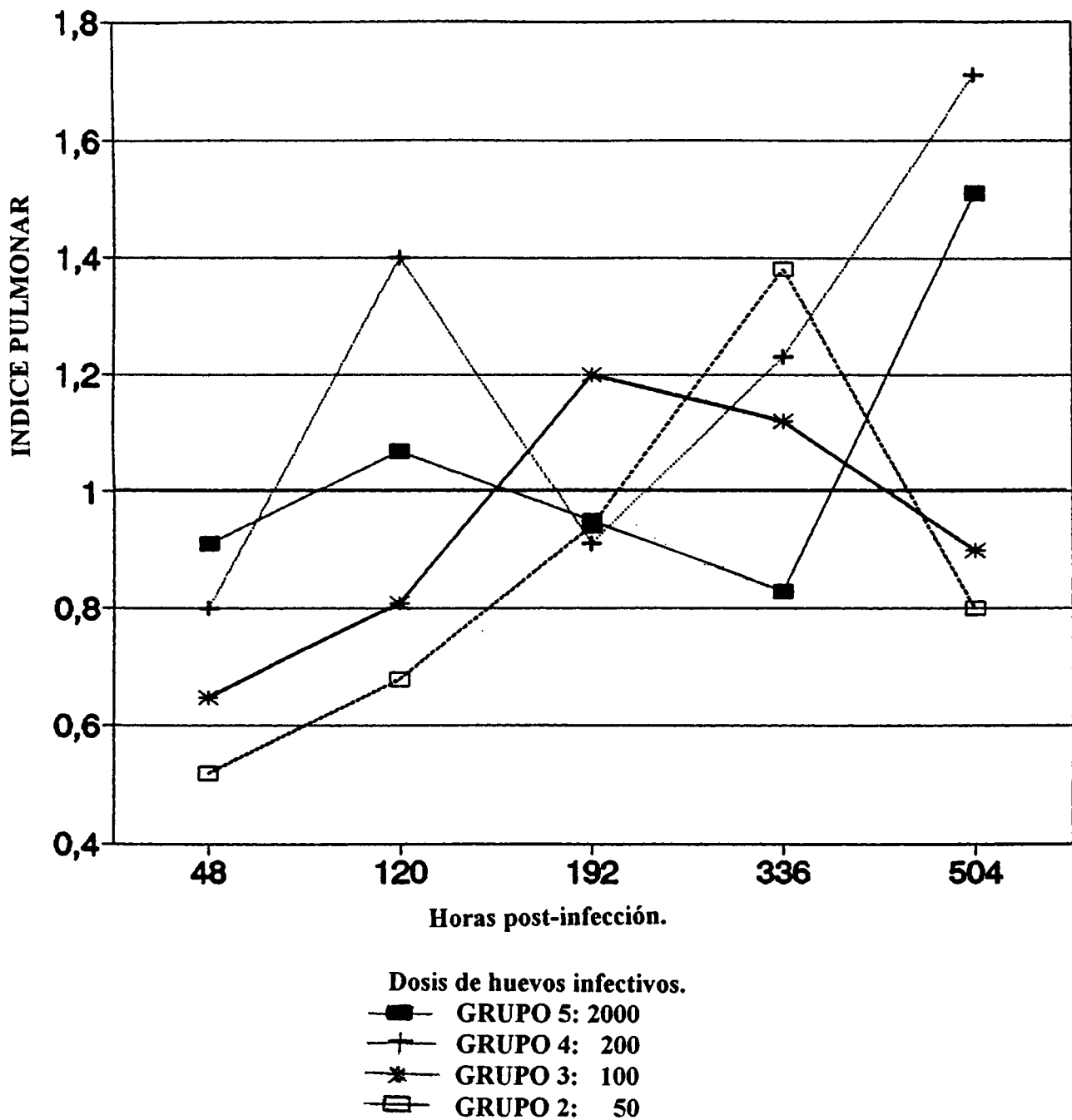


Gráfico N° 9: Evolución del índice pulmonar (IP) en ratones inoculados con diferentes dosis de huevos infectivos de *Toxocara canis*.



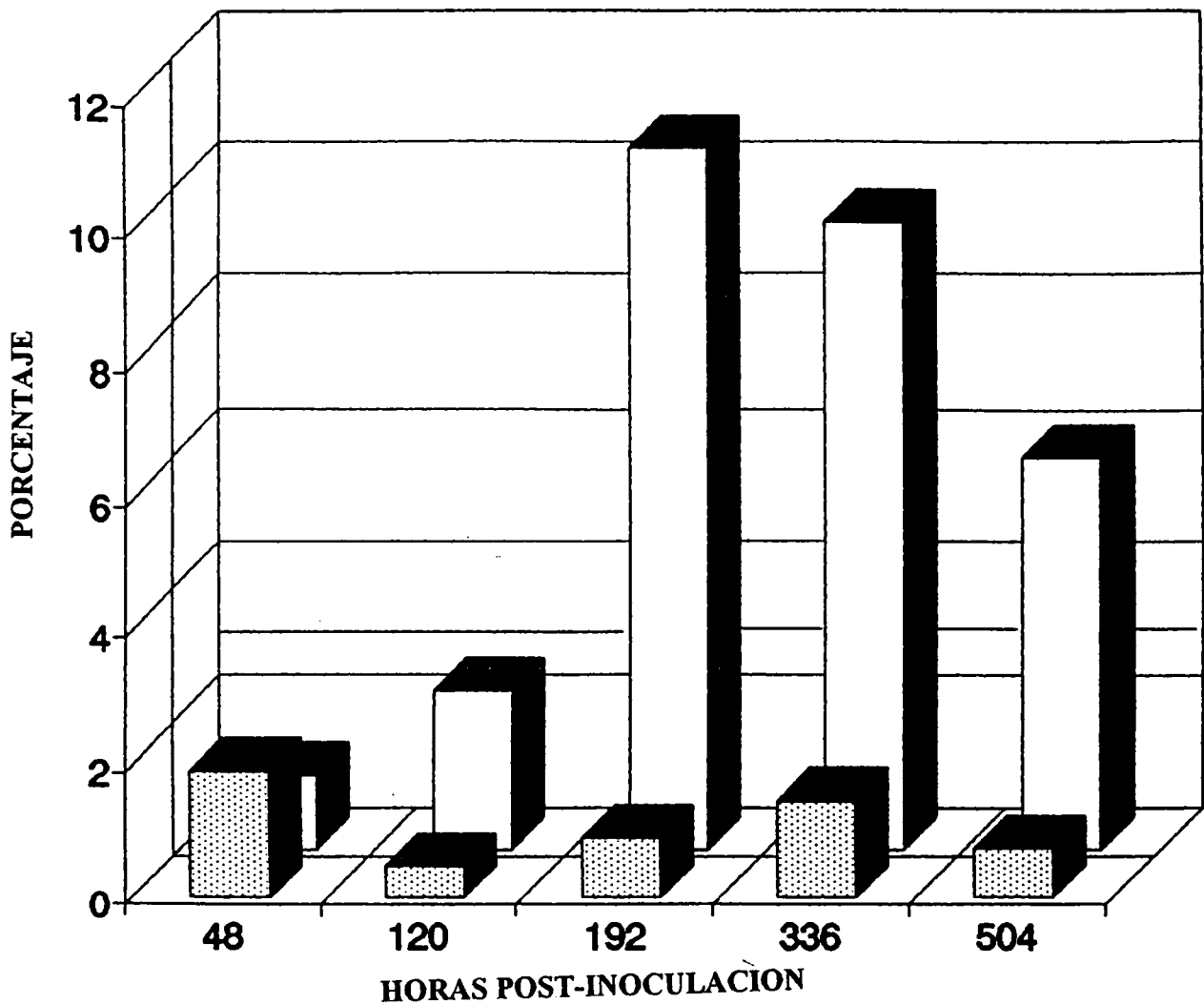


Gráfico N° 10: Comparación de los porcentajes de eosinófilos en sangre periférica de ratones inoculados con 2000 huevos infectivos de *Toxocara canis* respecto de ratones control.

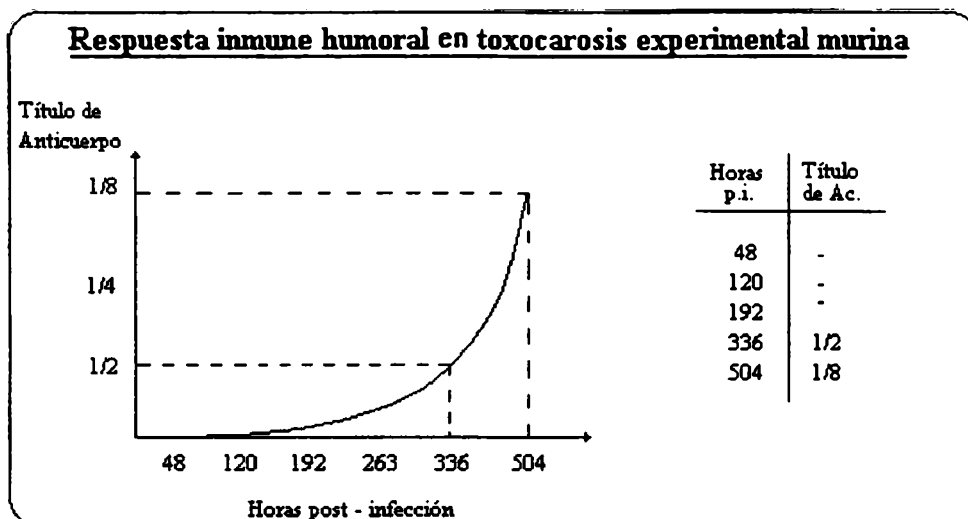
Material y métodos para evaluar la respuesta inmune humoral en toxocarosis experimental murina

Se evaluó la presencia de anticuerpos antitoxocara en los sueros obtenidos de ratones infectados con 2000 huevos larvados (grupo 5 de la experiencia anterior)

Se realizó la técnica de IFI descrita en el objetivo 4 con los sueros obtenidos a las 48-120-192- 336 y 504 hrs p.i.. Los sueros fueron incubados enteros y en diluciones 1:2, 1:4 y 1:8.

Resultados: se esquematizan en el gráfico N°11:

Gráfico N° 11:



Discusión y Conclusiones:

Estas experiencias determinaron que el arribo de las larvas al hígado se produce entre las 10 y 15 hr p.i. y que el mismo al pulmón ocurre entre las hr 26 y 32 p.i.

La migración larvaria en la infección experimental murina con un solo desafío de huevos infectivos de *T.canis* presentó un pico de recuperación en hígado y pulmón a las 48 hr. p.i., coincidiendo con Oshima T. (1961), y difiriendo de Piergili et al. (1989) quienes describen el pico en el segundo día en el hígado y en el tercero en el pulmón.

Se observó una gradual disminución de la recuperación larval en todos los grupos después de las 48 hr p.i.. Pero en los grupos 4 y 5 se produjo un nuevo incremento a las 504 hr p.i. tanto en hígado como en pulmones. Este segundo pico puede relacionarse con una redistribución larvaria en los ratones que son sometidos a dosis infectivas superiores a 200 huevos.

La fase neurológica en la infección masiva (2000 huevos), comenzó a las 192 hr p.i., dándose en forma más retardada en los desafíos con menores dosis. La recuperación de larvas en el cerebro se incrementó gradualmente en el transcurso de este estudio, pero aunque variaron los tamaños de los

inóculos y los tiempos de arribo al cerebro, el porcentaje de recuperación larval en cerebro fluctuó entre el 7 y el 8 % a las 504 hr p.i.

El índice hepático se incrementó en el grupo 4 durante las dos semanas p.i. Desde esta semana, los grupos con menores desafíos regresaron a sus índices normales, mientras que los grupos con mayores desafíos continuaron con sus respuesta inflamatoria hepática.

El índice esplénico se incrementó progresivamente a partir de la hora 120 p.i. en los grupos desafiados con 200 y 2000 huevos con su mayor valor a las 504 hr p.i. En los ratones infectados con 50 y 100 huevos el índice esplénico se incrementó a las 336 hr p.i. y luego regresó a la normalidad.

Comparando estos resultados del grupo 4 y aquellos hallados por Kayes et al.(1985) quienes utilizaron un inóculo de 250 huevos, se observan ligeras diferencias respecto al momento de la mayor respuesta esplénica dado que estos autores obtienen el mayor incremento entre los días 11 y 14 p.i..Pero nuestros resultados coinciden con los de Piergili et al. (1989).

A diferencia de Piergili et al. (1989), no encontramos importantes diferencias entre la respuesta hepática y pulmonar, y en los grupos con inóculos de 200 huevos o más, se observó un incremento casi equivalente en los tres índices orgánicos.

El hígado es reconocido como un sitio importante para controlar la migración de las larvas de *T.canis*. Puede ocurrir que las larvas permanezcan en el hígado humano asociadas con una hepatitis granulomatosa eosinofílica, un sello del síndrome de LMV.

Una simple infección oral de ratones inmunológicamente vírgenes con huevos infectivos de *T.canis* resulta en una rápida migración de larvas a través de hígado. Abo-Shedada and Hebert (1984) reportaron que el pico del número de larvas en el hígado se encontró dentro de los dos días post-infección coincidiendo con nuestros hallazgos. Luego el número de larvas declina y en el día 5 post-infección la mayoría de las larvas han continuado su migración a través de los pulmones y de otros sitios del cuerpo. Parsons and Grieve (1990) han reportado que en animales que previamente habían sido sensibilizados, una gran proporción de larvas permanecían dentro del hígado en lugar de continuar hacia otros tejidos tales como el cerebro. Este fenómeno se denomina entrapamiento hepático y hasta el presente sólo había sido descrito en la reinfección por *T.canis*. En este trabajo encontramos que este fenómeno puede darse sin necesidad de reinfecciones en dosis infectivas superiores a 200 huevos.

Los experimentos de Parsons y Grieve implicaron una sensibilización con 125 huevos infectivos en el día 0 y un desafío con 500 huevos infectivos en el día 28. El fenómeno de entrapamiento hepático ya pudo detectarse en el día 5 siguiendo la dosis desafío (Parsons and Grieve, 1990). En la experiencia llevada en la Cátedra de Microbiología y Parasitología

apareció en el día 21 p.i. Las larvas atrapadas pueden permanecer vivas, presumiblemente por la duración de la vida del ratón.

La respuesta humoral pudo detectarse a partir de las 336 hr p.i. (positivo 1:2) y ascendió a 1:8 en la hora 504 p.i. Si tenemos en cuenta que para esos tiempos se produjo en las infecciones mayores de 200 huevos la redistribución larvaria, es evidente que los anticuerpos no pudieron frenar tal fenómeno. Podemos postular también que esa reinvasión puede actuar como "booster" antigénico aumentando el título de anticuerpos que entonces llegarían a un nivel suficiente como para frenar la migración larvaria. Estos estudios preliminares deben ser confirmados haciendo necesario continuar la evaluación de la respuesta humoral antitoxocara superando los días p.i. del presente trabajo.

El pico máximo de anticuerpos detectado coincidió con el mayor valor del índice esplénico y de la eosinofilia sanguínea. Esta alcanzó su mayor incremento a las 192 hr p.i. (8 días). No coincidió con los incrementos de los índices pulmonares y hepáticos, pero coincidió con el mayor incremento del índice esplénico. El incremento de la eosinofilia fue previo al hallado por Kayes et al. (1985) y por Piergili et al (1989), quienes lo hallaron incrementado en el día 14 p.i.

El incremento de eosinófilos en las infecciones masivas coincide con la fuerte respuesta esplénica.

Por diferentes experimentos se ha encontrado que las células T cultivadas in vitro, estimuladas con antígenos parasitarios, son capaces de secretar preferentemente IL4 e IL5 denominado fenotipo de células Th2. Esto acontece con una persistente producción de anticuerpos (incluyendo las IgE vía IL4) y con eosinofilia (vía IL5), observado en las infecciones por helmintos y otros desórdenes mediados por IgE, tales como enfermedades atópicas. Se considera que la estimulación crónica de algunos antígenos parasitarios, que no provocan fuerte activación de macrófagos y alta producción de interferón alfa, permite la activación de células T que producen IL4 e IL5. En cambio, el fenotipo denominado Th1 incluye células con un importante rol efector en las reacciones inflamatorias asociadas con hipersensibilidad retardada y bajo título de anticuerpos, tales como ocurre en algunas infecciones asociadas a bacterias intracelulares. Las células Th1 tienen actividad mediada por citoquinas pero también pueden tener actividad citotóxica contra antígenos presentes en células

Los datos de estos estudios sugieren que la elevación en los niveles de inmunoglobulinas y la eosinofilia hallada en los ratones infectados con *T. canis* están relacionados con un aumento de la actividad de las células T con un modelo de secreción de citoquinas tipo Th2. Además, las citoquinas secretadas por las células Th2 pueden explicar algunas lesiones asociadas a

los parásitos, tales como la reacción inflamatoria eosinofílica y la formación de granulomas eosinofílicos (De Carli et al., 1993).

Qué rol juegan los eosinófilos?. Si bien se considera que protegerían al huésped en las infecciones helmínticas, los experimentos dando anticuerpos anti-IL5 que provocaron la depleción de los eosinófilos, no observaron un aumento en la sobrevivencia de los parásitos (Finkelman et al., 1991). Por esto, es que se piensa que la respuesta mediada por Th1 debe jugar algún rol protector.

Por ello podemos especular que la anormal expansión del subset Th2 y la concomitante reducción de las células Th1 durante la infección por *T.canis* son consecuencias inmunológicas de la relación huésped-parásito, más que un exitoso mecanismo efector contra el parásito.

Se ha descrito que *T. canis* puede sobrevivir indefinidamente en el ratón y quizá se deba a una supresión de la respuesta inmune del huésped.

En esta experiencia se demuestra que la migración de las larvas de *T.canis* estimula inmunológicamente al huésped. Pero esta respuesta inmune no es lo suficientemente "larvicida" y que, con el tiempo, la mayoría de las larvas se acumulan en el cerebro, lugar de baja inmunoreactividad.

Kayes y colaboradores (1984) realizaron un estudio en ratones CBA/J infectados con huevos de *T.canis* y encontraron que el pico máximo del IE se daba en la segunda semana p.i. En los resultados de este trabajo observamos un aumento de los índices esplénico y hepático el día ocho p.i., luego leve declinación (día catorce p.i.) y posteriormente un nuevo aumento que se da en el día veintiuno p.i.

En este trabajo la migración larvaria es "pobremente" frenada por la respuesta inmune, ya que un gran porcentaje de larvas no queda "atrapado" ni en hígado, ni en pulmón, y sigue su camino hacia el sistema nervioso central.

Glickman y Schantz (1981) han propuesto que la aparición del síndrome de LMO resulta de la infección con pocas larvas, las cuales no alcanzan a "despertar" la respuesta inmune y por eso alcanzan el sistema nervioso central u el ojo. Además, estos autores sostienen que si el inóculo parasitario que ingresa al huésped es grande, se estimula una respuesta inmune responsable de que la mayoría de los parásitos sean destruidos o encapsulados en granulomas fibróticos del hígado, bazo y pulmón, resultando así el síndrome de LMV.

Los resultados de nuestro trabajo no coinciden con la propuesta de los autores mencionados, porque las larvas, a pesar de la respuesta inmune, continúan su migración hacia el sistema nervioso central.

Podría ocurrir también que, si el inóculo parasitario es excesivamente grande, el sistema inmune del ratón inoculado; ingrese en una "parálisis

inmunológica" por exceso de antígenos. Pero entonces no se apreciarían los aumentos manifiestos de los índices esplénicos y hepáticos.

Por todo lo expuesto, consideramos que el número de larvas que ingresan al organismo no es el único factor que determina la aparición del síndrome de LMO o del síndrome de LMV, sino que factores relacionados con el huésped y la capacidad y velocidad con que este tarde en montar una respuesta inmune, debe también intervenir. Podemos decir que puede haber diferencias en las respuestas del huésped, ya que esta redistribución sólo ha sido descrita en los ratones utilizados por nuestro grupo de trabajo (Cepa Zwiss CF1). Extrapolando a lo que ocurre en el ser humano, habrá personas que desarrollan LMV, otras LMO, y otras las demás variantes. Por eso se necesitan estudios poblacionales que relacionen los principales marcadores HLA con los diferentes síndromes. En la actualidad se está investigando la relación entre la inmunogenética y el entrapamiento hepático. Los hallazgos de varios experimentos han demostrado que el entrapamiento hepático puede estar asociado tanto a los genes del sistema mayor de histocompatibilidad como a otros genes que probablemente sean más importantes (Epe C. et al, 1994).

Sugane y Oshima (1983) reportaron la incapacidad de ratones atímicos para realizar este fenómeno. Los ratones inmunizados con TES, fueron capaces del entrapamiento hepático (Parsons, 1990), aunque los niveles de entrapamiento fueron menores. Subsecuentes trabajos con una variedad de adyuvantes acuosos y aceitosos administrados con TES, han confirmado estos hallazgos (Grieve et al., 1993).

Una vez que el rol de la respuesta inmune fue inferida, el potencial mecanismo efector del entrapamiento hepático era el mecanismo basado en los eosinófilos. Los granulomas hepáticos eosinofílicos son un sello del síndrome de LMV, y son típicamente observados en animales infectados experimentalmente, y a menudo contienen larvas en su interior (Parsons et al., 1986). Para examinar el rol de los eosinófilos en el entrapamiento larval, ratones sensibilizados fueron depleccionados de eosinófilos a través del uso de anticuerpos monoclonales anti-L5 durante la inoculación de la dosis desafío. La eosinofilia sistémica fue completamente eliminada y los eosinófilos en el hígado de los animales sensibilizados/desafiados fueron virtualmente eliminados. No obstante, los animales con o sin eosinófilos fueron capaces del entrapamiento hepático (Parsons et al., 1993).

Los granulomas asociados con el entrapamiento hepático indican la probabilidad de una clásica respuesta tipo Th2 a la infección crónica helmíntica. Como ya se había demostrado que los eosinófilos no eran esenciales para el entrapamiento hepático, se pensó en la importancia de la IgE. Pero ya se había notado que los diferentes niveles de IgE anti-TES estaban relacionados con la genética de los animales inoculados y no con la

mayor o menor capacidad para el entrapamiento. Lo que sí llamó la atención fue que los niveles de anticuerpos anti-TES se mantenían sostenidos en el tiempo, y se trató de asociarlos al fenómeno estudiado. Pero la transferencia pasiva de anticuerpos de animales sensibilizados a vírgenes falló en producir el entrapamiento hepático (Parsons et al., 1990). Posteriormente se investigó el rol de la inmunidad celular mediante la transferencia de esplenocitos sensibilizados, lo que produjo un modesto incremento en la capacidad del entrapamiento. En la actualidad, se estudia el posible rol de las diferentes poblaciones de linfocitos en este fenómeno. Por los resultados preliminares, las células CD4 parecen tener un rol en el entrapamiento hepático y las CD8 parecen no tener nada que ver, pero es obvio que las células CD4 no son el único componente que interviene en este particular fenómeno.

En el modelo biológico murino y en el síndrome de LMV humano, la presencia de enfermedad hepática asociada con una respuesta granulomatosa hacia las larvas de *T.canis* esta bien reconocida. Pero esta respuesta granulomatosa parece no poder matar a la larva. Es evidente que hay una respuesta inmune asociada al huésped responsable del entrapamiento hepático. La palabra entrapamiento hace suponer que es el huésped el que está tomando la decisión de entrapar pero por qué no pensar que es el parásito el que ha tomado la decisión? El parásito permanece vivo, presumiblemente durante gran parte de la vida del huésped paraténico a pesar de la respuesta inmune que este haya montado. Además parecería que el parásito ha "elegido" el hígado como sitio preferido para su sobrevida.

Es mejor pensar que este sistema parásito-huésped paraténico es una clásica adaptación de la relación huésped parásito que debe ser estudiada en la interface de esta relación y no en una mutua exclusión. Permanecen muchas preguntas: primero, tiene el entrapamiento algún beneficio para el huésped, y así se prolonga la sobrevida del parásito? Con altas dosis desafío, significativamente pocas larvas siguen migrando hacia el cerebro. Segundo, por qué es el hígado el sitio elegido? Quizá lo sea por su gran capacidad regenerativa o es solamente un accidente en la ruta migratoria?. Hace la enfermedad hepática más susceptible a la predación al huésped paraténico, incrementando la transmisión de este parásito?. O es un intento del huésped para evitar la predación protegiendo áreas más sensibles al daño como el cerebro que produciría cambios en la conducta? Ciertamente esta infección crónica es compleja y se debe seguir estudiando para comprender la complejidad de la respuesta inmune a los parásitos metazoos.

CONCLUSIONES FINALES

Los trabajos sobre toxocarosis experimental constituyen la base para intentar explicar todos los fenómenos que acontecen en toxocarosis humana.

El trabajo desarrollado en esta Tesis fue avanzando progresivamente en la toxocarosis experimental.

Como primera instancia se realizaron diversas experiencias con el fin de lograr una metodología adecuada para obtener huevos de *T.canis* libres de contaminantes. Esta metodología es esencial para lograr huevos que desarrollen el estadio larval infectivo y así, poder inocular a los animales de laboratorio. Se probaron cuatro técnicas diferentes (una de ellas original) y sólo dos tuvieron resultados satisfactorios. La técnica desarrollada en el Laboratorio de Parasitología de la Cátedra de Microbiología y Parasitología aportó la originalidad del cultivo de huevos de *T.canis* a partir de materia fecal canina parasitada. La otra técnica que dio resultado (cultivo de huevos a partir de hembras de *T.canis*) es clásicamente utilizada por todos los autores y, si bien se considera de elección; en nuestro medio muchas veces es difícil obtener ejemplares adultos y, por esta razón la técnica desarrollada en la Cátedra puede usarse como alternativa válida en la obtención de huevos de *T.canis* libres de contaminantes.

Una vez obtenidos los huevos infectantes -con el estadio L2 en su interior- se ensayaron diferentes metodologías que permitieran la inoculación experimental en animales de laboratorio con el fin de estudiar la evolución de la larva II de *T.canis*. En la literatura consultada se menciona la infectación de los animales de laboratorio utilizando la intubación esofágica. Con este método existen inconvenientes con la anestesia y regurgitación del contenido inoculado, por lo tanto se decidió probar otra metodología de infectación -el anzuelo alimenticio- para tratar de optimizar los resultados. En un primer momento se compararon estos dos métodos alternativos para la inoculación experimental y en una segunda instancia se evaluó la influencia del ayuno en dicha inoculación.

La recuperación larval usando la técnica del anzuelo alimenticio superó a la lograda con la técnica tradicional, con una diferencia significativa en el número de larvas encontradas en el hígado y pulmón a las 48 hr p.i.

Además, se diseñaron diferentes experiencias modificando el tiempo de ayuno previo a la inoculación de los huevos infectivos para investigar si el ayuno podía constituir un factor que incidiera en la recuperación larvaria en hígado y pulmón a las 48 hr p.i.

Los resultados demostraron que, utilizando la vía oral de inoculación, el tiempo de ayuno incide en el porcentaje de larvas recuperadas. Con 4 hr de ayuno previo, la recuperación de larvas fue cercana al 36%, mientras que con ayunos de 10 a 20 hr, la recuperación osciló alrededor del 80%. Mayores tiempos de ayuno no incrementaron sustancialmente los resultados de la recuperación. Si tenemos en cuenta que varias horas de ayuno provocan un aumento de la acidez gástrica y causan además mayor éstasis intestinal, podemos pensar que tales factores favorecen la decorticación de los huevos de *T.canis* ingeridos y la posterior penetración de larvas en la mucosa intestinal, provocando una mayor recuperación en hígado y pulmón a las 48 hr. p.i.

Luego de estandarizar la metodología de obtención de huevos y de inoculación a los animales de laboratorio se procedió a desarrollar una técnica serológica que permitiera evaluar la respuesta humoral anti-toxocara en los animales infectados experimentalmente. Para esto, se ensayaron diferentes metodologías que permitieron obtener una suspensión larval de *T.canis* con el fin de ser utilizadas en la producción de diversos reactivos antigénicos: excretor/secretor (Ag. E/S), somático larval en corte de tejido cerebral y en solución fisiológica.(Ag. S/L), un extracto de somas larvarios (Ext. Ag. S/L), de huevos larvados enteros (Ag. H/L) y un extracto de huevos larvados (Ext. Ag. S/L). Estos fueron utilizados para desarrollar una técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detectar anticuerpos anti-toxocara aún no implementada en nuestro país.

En la literatura consultada, siempre se encontró que la técnica de IFI para toxocarosis se desarrolló con antígenos en suspensión, lo que hace peligroso el manejo de esta técnica desde el punto de vista de la bioseguridad. Por esto, se probaron diferentes métodos para lograr fijar los antígenos a portaobjetos. Posteriormente, se realizó la técnica de IFI con sueros positivos para toxocarosis (previa técnica de ELISA). Resultaron como elementos antigénicos más adecuados para la técnica de IFI con material adherido al portaobjeto, los somas larvarios tanto en corte de tejido cerebral como en solución fisiológica. Este último material fue seleccionado como reactivo antigénico de la técnica de IFI del laboratorio porque la fluorescencia fue nítida y con baja inespecificidad de fondo.

Con el desarrollo e implementación de esta técnica que permite la evaluación de la respuesta humoral antitoxocara, se prosiguió a estudiar la toxocarosis experimental murina evaluando las posibles relaciones entre la carga parasitaria y la respuesta inmune humoral y celular en ratones. Para ello, se inocularon con dosis creciente (50-100-200 y 2000 huevos larvados por ratón) a diferentes lotes de ratones Swiss CF1 y se sacrificaron en diversos tiempos post-inoculación que oscilaron entre 5 y 504 hr p.i.. En

todos los ratones se analizaron los siguientes parámetros: migración larvaria, índices orgánicos y eosinofilia (como evaluadores de respuesta inmune celular) y la presencia de anticuerpos antitoxocara en el suero (respuesta inmune humoral).

Las experiencias determinaron que el arribo de las larvas al hígado se produce entre las 10 y 15 hr p.i., dato no hallado previamente en la literatura. La migración larvaria encontrada en los diferentes órganos del ratón, coincidió con la reportada por otros investigadores, pero como hecho sobresaliente e inédito se encontró que con dosis superiores a 200 huevos infectivos, se produce una redistribución larvaria con un nuevo incremento en la recuperación en hígado y pulmón a las 504 hr p.i.. Este fenómeno, denominado entrapamiento había sido descrito por otros autores en hígado pero solo en ratones re-infectados con huevos de *T.canis*, En estas experiencias el entrapamiento se dió en hígado y pulmón y sin necesidad de re-infecciones pero con dosis superiores a 200 huevos.

Esta redistribución y entrapamiento hepático y pulmonar podrían estar relacionados a la cepa de ratones utilizadas en las experiencias, pero podría explicar el porqué de las recidivas en la signo-sintomatología del síndrome de LMV en humanos.

Si bien la respuesta humoral pudo detectarse a partir de las 336 hr p.i. y fue ascendiendo hasta el término de estas experiencias, no logró frenar la migración y re-distribución larvaria y muchas larvas arribaron al cerebro de los animales infectados.

Los resultados obtenidos demuestran que existe un aumento en el nivel de anticuerpos antitoxocara que se acompaña de eosinofilia periférica. Estos datos están relacionados con un aumento de la actividad de las células T que tienen un modelo de secreción tipo Th2.

Este perfil Th2 puede explicar algunas de las lesiones asociadas a toxocarosis como la reacción inflamatoria eosinofílica y la formación de granulomas eosinofílicos, pero no alcanza para frenar la migración larvaria. Por lo tanto, si extrapolamos a lo que ocurre en toxocarosis humana, el aumento en el nivel de anticuerpos antitoxocara y la eosinofilia no implican una respuesta “efectiva” capaz de frenar y destruir a las larvas evitando su migración. Por lo tanto, debe tener un mayor efecto larvicida la respuesta Th1 con mayor activación de macrófagos y producción de interferón gamma y de factor de necrosis tumoral.

Por todo esto, podemos pensar que, cuando una persona se infecta con huevos de *T.canis*; las formas de presentación de esta parasitosis no sólo estarán asociadas al número de larvas infectivas, sino al tipo de respuesta Th predominante. Si predomina la respuesta Th2 habrá gran reacción inflamatoria mediada por anticuerpos y por eosinófilos que no será suficiente para frenar la migración larvaria pero que puede ocasionar graves

lesiones al huésped. Por el contrario, si predomina la respuesta Th1, el efecto larvicida será mayor y el cuadro clínico probablemente será leve o pasará desapercibido.

Por todo lo expuesto, se considera que el número de larvas que ingresan al organismo no es el único factor (como clásicamente se afirmaba) que determina la aparición de los distintos síndromes asociados a toxocarosis; sino que factores relacionados con el huésped y la capacidad, calidad y velocidad con que este tarde en montar una respuesta inmune, deben también intervenir.

En el modelo biológico murino y en los síndromes de toxocarosis humana, la presencia de enfermedad hepática asociada con una respuesta granulomatosa hacia las larvas de *T.canis* esta bien reconocida. Pero esta respuesta granulomatosa parece no poder matar a la larva. Es evidente que hay una respuesta inmune asociada al huésped responsable del entrapamiento hepático. La palabra entrapamiento hace suponer que es el huésped el que está tomando la decisión de entrapar pero por qué no pensar que es el parásito el que ha tomado la decisión? El parásito permanece vivo, presumiblemente durante gran parte de la vida del huésped paraténico a pesar de la respuesta inmune que este haya montado. Además parecería que el parásito ha "elegido" el hígado como sitio preferido para su sobrevida.

Es mejor pensar que este sistema parásito-huésped paraténico es una clásica adaptación de la relación huésped parásito que debe ser estudiada en la interface de esta relación y no en una mutua exclusión. Permanecen muchas preguntas: primero, tiene el entrapamiento algún beneficio para el huésped, y así se prolonga la sobrevida del parásito? Con altas dosis desafío, significativamente pocas larvas siguen migrando hacia el cerebro. Segundo, por qué son el hígado y el pulmón los sitios elegidos? Quizá lo sea por su gran capacidad regenerativa o es solamente un accidente en la ruta migratoria?. Hace la enfermedad hepática o pulmonar más susceptible a la predación al huésped paraténico, incrementando la transmisión de este parásito?. O es un intento del huésped para evitar la predación protegiendo áreas más sensibles al daño como el cerebro que produciría cambios en la conducta? Ciertamente esta infección crónica es compleja y se debe seguir estudiando para comprender la complejidad de la respuesta inmune a los parásitos metazoos.

RESUMEN

Beaver y colaboradores (1952) describieron por primera vez un caso clínico de toxocarosis humana (confirmado por biopsia de hígado), bajo el nombre de larva migrans visceral. Desde entonces, se han publicado numerosos trabajos de investigación acerca de su principal agente: *T.canis*, un nematodo de caninos que accidentalmente infecta al hombre.

T.canis. es un nematodo, que pertenece al reino Animalia, subreino Metazoa, phylum Nematoda, clase Secernentea o Phasmidia, orden Ascaridida, superfamilia Ascaridoidea, familia Ascarididae, subfamilia Toxocarinae, género Toxocara (Neoáscaris), especie *T.canis*.

Las hembras fértiles están repletas de huevos de forma ovoide o esférica que miden de 40 a 60 μm de diámetro menor por 50 a 75 μm de diámetro mayor y son de color oscuro. En el momento de la postura contienen una sola célula; y se hallan cubiertos por tres capas sucesivas: una fina membrana interna predominantemente lipídica, una membrana intermedia compuesta de proteínas y quitina, y una gruesa cubierta exterior albuminoidea mamelonada muy típica.

El hombre se infecta mediante la ingestión de huevos de *T.canis* (presentes en la tierra contaminada) que contienen el estadio larval infectivo (L2), el cual se libera de sus envolturas en el intestino delgado proximal, y las larvas liberadas penetran la mucosa, migrando hacia el hígado siguiendo la circulación portal. Continuando por el sistema venoso, penetran en el pulmón y posteriormente en la circulación sistémica. Cuando las larvas son más grandes (en diámetro) que los capilares sanguíneos, su progreso se ve impedido, y ellas pueden activamente atravesar la pared del vaso y migrar al tejido circundante. Las larvas se distribuyen por todo el organismo, y han sido descritas en el hígado, pulmones, corazón y cerebro. La migración larval, deja trazos de hemorragias, necrosis y células inflamatorias; la mayoría parecen permanecer "dormidas" por muchos años y luego continúan su migración. Eventualmente, algunas son encapsuladas y destruidas por la respuesta inmune del huésped, mientras que otras aparentemente serían protegidas encapsulándolas.

Es importante el contacto con tierra contaminada con huevos (geohelmintiasis). De las heces de un perro fuertemente parasitado se dispersan gran número de huevos. Puede ocurrir una significativa asociación entre LMV y LMO y pertenencia de cachorros, pero el factor de riesgo claramente asociado con los casos de toxocarosis es la geofagia y la pica. Además, la cubierta de los huevos de *T.canis* es muy pegajosa. La adherencia a los dedos, juguetes y alimentos, con la subsecuente ingestión

es un factor que debe ser tenido en cuenta pues puede implicar la adquisición de la parasitosis en una situación doméstica.

Clásicamente se aceptaban dos formas de toxocarosis humana: el síndrome de larva migrans visceral (LMV) y el síndrome de larva migrans ocular (LMO); pero en la actualidad se han descrito nuevos cuadros clínicos: la toxocarosis encubierta, la toxocarosis neurológica, la toxocarosis asmatiforme y la toxocarosis neurofisiológica.

Es una parasitosis extendida tanto en los países desarrollados como en los que la estructura sanitaria, cultural y social es deficitaria.

Los relevamientos seroepidemiológicos en muchos países del mundo sugieren que la infección por *T.canis* puede ocurrir frecuentemente. Si bien la enfermedad se detecta más en niños, existe un pequeño incremento de la seropositividad (utilizando la técnica de ELISA) con la edad, el cual podría ser explicado por la prolongada respuesta inmune de los individuos después de la infección. En algunos países de Europa se asume que la presión de la infección en el ambiente es constante, lo que lleva a calcular una incidencia que oscila entre un 2 a un 5 % por año.

Las investigaciones sobre epidemiología, inmunobiología e inmunopatología de esta parasitosis, contribuirán a la mejor comprensión de los cuadros clínicos de toxocarosis y permitirán implementar y evaluar estrategias de tratamiento de los casos, y programas de prevención en la población en riesgo.

Los estudios de las larvas de *T.canis* in vitro han mostrado las grandes semejanzas que tienen con las larvas migrantes in vivo y esto confirma que los estudios in vitro sobre biología, bioquímica e inmunología del segundo estadio larval de *T.canis* son relevantes para aplicarlos a los comportamientos de este parásito en los huéspedes paraténicos y definitivos.

En este trabajo se desarrollaron diferentes técnicas para obtener un cultivo puro de huevos larvados de *T.canis* demostrándose que la técnica de Harada Mori es ineficaz para tal objetivo, la técnica de Corticelli-Lai es insatisfactoria y la técnica desarrollada (concentración previa con una solución salina sobresaturada) en el laboratorio de la Cátedra de Microbiología y Parasitología es eficaz. Se considera como método de elección para obtener huevos infectivos de *T.canis* para inoculación experimental la extracción de los mismos de parásitos hembras adultos (método tradicional), y como método alternativo el desarrollado en el laboratorio de la Cátedra pues es mucho más accesible obtener materia fecal

de cachorros parasitados que eliminan al medio un promedio de 1000 a 2000 huevos por gramo de materia fecal.

Se desarrolló y estudió el modelo experimental murino para toxocarosis. En una primera etapa se infectaron ratones con 150 huevos larvados de *T. canis* y se sacrificaron los animales en diferentes periodos post-infección para evaluar la migración larvaria en los diferentes órganos analizados. Se demostró que las larvas de este parásito atraviesan la mucosa intestinal para dirigirse al hígado donde se observaron a partir de las 48 hr p.i.. Algunas larvas van rápidamente a pulmón previo pasaje por corazón (días 2 a 5), pero otras realizan este pasaje más tardíamente (días 14-21). En riñón aparecen en dos oleadas (días 5 y 21), las cuales coinciden con la presencia de larvas en el corazón. A partir del quinto día son detectadas en cerebro, localización donde aparentemente se "estancarían", ya que son halladas sistemáticamente en todas las necropsias siguientes (días 8, 14, 21, 30, 45, 60 y 90). A partir del octavo día se detectan larvas en músculo esquelético del tren posterior, apareciendo luego en forma reiterada en las sucesivas necropsias.

En este trabajo se implementó una metodología alternativa de inoculación experimental de huevos embrionados de *T. canis* que semeja más a la infección natural denominada técnica del anzuelo alimenticio. La recuperación larval en hígado y pulmón a las 48 hr p.i. de ratones infectados usando esta técnica superó significativamente a la lograda con la técnica tradicional de intubación esofágica. El método de observación realizado (observación de larvas en el pellet del homogenado de hígado) es el citado por la literatura para evaluación de infectación en toxocarosis murina. Por lo tanto las diferencias halladas no pueden ser atribuidas al método de observación larvaria. El método es más natural que la intubación esofágica.

También se demostró que, utilizando la vía oral de inoculación , el tiempo de ayuno incide en el porcentaje de larvas recuperadas. Con 4 hr de ayuno previo, la recuperación de larvas fue cercana al 36 %, mientras que con ayunos de 10 a 20 hr, la recuperación osciló alrededor del 80% con una diferencia significativa respecto al grupo anterior.

Se procedió a inocular con diferentes dosis (50,100,200 y 2000 huevos larvados por ratón) para evaluar la influencia entre la carga parasitaria y distintos parámetros inmunológicos celulares y humorales en la toxocarosis experimental. De estas experiencias podemos concluir que las larvas de *T. canis* arriban al hígado entre las 10 y 15 hr p.i. en ratones infectados con huevos larvados mediante la técnica del anzuelo alimenticio.

La infección experimental murina con un solo desafío de huevos infectivos de *T. canis* presentó un pico de recuperación en hígado y pulmón a las 48 hr p.i. Se observó una disminución gradual de esta recuperación larval después de esta hora, pero cuando el inóculo fue igual o mayor a 200 huevos, se observó un segundo incremento en la recuperación larval tanto en el hígado como en los pulmones. Este dato sugiere una redistribución parasitaria y un entrapamiento hepático sin necesidad de dosis desafío. El fenómeno del entrapamiento hepático ha sido descrito con anterioridad por Parson and Grieve (1990) pero siempre ante la segunda dosis infectante. En este trabajo se demostró que este fenómeno puede darse sin necesidad de reinfecciones si la dosis infectiva es superior a 200 huevos.

El tiempo de arribo de las larvas al sistema nervioso central se produjo en una relación proporcionalmente inversa a la dosis desafío. No obstante, el mismo porcentaje de larvas (8%) se recuperaron en el día que corresponde a las 504 hr p.i.

Se procedió a desarrollar una metodología de Inmunofluorescencia Indirecta que permitiera evaluar la respuesta humoral antitoxocara en ratones infectados. Para ello se probaron diferentes antígenos: huevos larvados enteros y su extracto antigénico, larvas en estadio II enteras en solución fisiológica y en cortes de tejido cerebral, extracto antigénico de larvas en estadio II y material excretor-secretor de larvas en cultivo in vitro. En las experiencias realizadas, resultaron como elementos antigénicos más adecuados para la técnica de IFI con material adherido al portaobjeto, los somas larvarios enteros tanto en corte de tejido como en solución fisiológica. Este último material resultó más adecuado porque no presentó fluorescencia inespecífica de fondo.

Por medio de esta técnica, se evidenció una respuesta humoral antitoxocara en los ratones inoculados con 2000 huevos a partir de las 336 hr p.i. que fue ascendiendo hasta la hora 504 p.i. Si tenemos en cuenta que para esos tiempos se produjo la redistribución larvaria, es evidente que los anticuerpos no pueden frenar esta redistribución.

Los índices orgánicos en ratones infectados con altos inóculos, se mantuvieron aumentados en el tiempo, pero en aquellos infectados con menores inóculos, los índices retornaron a la normalidad antes. Estos resultados evidencian la directa relación entre la dosis infectiva y la respuesta inmune del huésped.

El incremento de eosinófilos en las infecciones masivas coincide con la fuerte respuesta esplénica.

Los datos de estos estudios sugieren que los niveles de inmunoglobulinas y la eosinofilia hallada en ratones infectados con *T. canis* están relacionados con un aumento de la actividad de las células T con un modelo de secreción de citoquinas tipo Th2.

Esto sugiere que la infección humana con *T.canis* estimula la respuesta de tipo Th2, pero también debemos tener en cuenta que la respuesta tipo Th1 es importante para la muerte de las larvas en la infección humana.

Se ha descrito que *T.canis* puede sobrevivir indefinidamente en el ratón y quizá se deba a una supresión de la respuesta inmune del huésped. En esta experiencia se demuestra que la migración de las larvas de *T.canis* estimula inmunológicamente al huésped. Pero esta respuesta inmune no es lo suficiente larvicida y las larvas pueden seguir su recorrido hacia el cerebro, lugar de baja inmunoreactividad. Podría ocurrir también que, si el inóculo es excesivamente grande, el sistema inmune del ratón inoculado ingrese en la denominada “parálisis inmunológica” por exceso de antígenos, Pero entonces no se apreciarían los aumentos manifiestos de los índices esplénicos y hepáticos.

Por todo lo expuesto, consideramos que el número de larvas que ingresan al organismo no es el único factor que determina la aparición del síndrome de LMO o del síndrome de LMV, sino que factores relacionados con el huésped y la capacidad y velocidad con que este tarde en montar una respuesta inmune, debe también intervenir. Podemos decir que puede haber diferencias en la respuesta del huésped, ya que esta redistribución sólo ha sido descrita en los ratones utilizados en este trabajo (Cepa Zwiss CF 1). Extrapolando a lo que ocurre en el ser humano, habrá personas que desarrollan LMV, otras LMO, y otras las demás variantes de toxocarosis.

Los profesionales médicos están comenzando a reconocer el síndrome de larva migrans visceral como un síndrome relativamente frecuente en chicos y adultos y los estudios poblacionales en muchos países han mostrado que la toxocarosis subclínica no es infrecuente. Por esto se considera necesario:

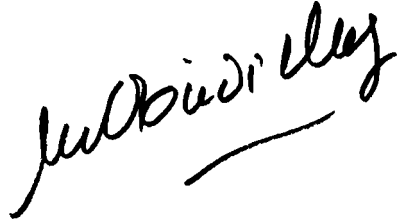
- *Poner atención en la educación de los profesionales médicos y veterinarios y también en el público general.
- *Estandarizar los métodos para medición de anticuerpos.
- *Estandarizar los antígenos usados en estos test.
- *Identificar la variación antigénica (si la hay) en *T.canis* de acuerdo a la localización geográfica.
- *Estandarizar los títulos de corte para seropositividad.
- *Evaluar la seroprevalencia en poblaciones normales (no hospitalizadas).
- *Evaluar la relación entre los títulos de anticuerpos y los síntomas en grandes poblaciones.
- *Evaluar la prevalencia de larva migrans ocular.

*Investigar los factores que favorecen la ocurrencia de larva migrans visceral comparado con larva migrans ocular.

*Investigaciones posteriores son necesarias para la mejor caracterización de los componentes específicos de especie en los antígenos E/S ya sea para propósitos diagnósticos y epidemiológicos, como para estudiar las posibles influencias en los mecanismos inmunes del huésped.



Prof. Dr. JUAN ANGEL BASUALDO FARJAT
PROFESOR TITULAR
CATEDRA de MICROBIOLOGIA y PARASITOLOGIA
FACULTAD de CIENCIAS MEDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



Dra. MARTA CECILIA MINVIELLE
PROFESORA ADJUNTA
CAT. DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA
FAC. CIENCIAS MEDICAS U.N.L.P.

GLOSARIO:

- Ag. E/S: antígenos excretados y/o secretados por L2 de *T.canis*.
- Ag. H/L: antígenos de huevos larvados de *T.canis*.
- Ag. S/L: antígeno somático de L2 de *T.canis*.
- Anti TES: anticuerpos contra los productos excretados y/o secretados por L2.
- ATB: antibióticos.
- ATF: antifúngicos.
- ELISA: técnica de enzimoinmunoensayo.
- Entrampamiento: fenómeno inmunológico que provoca la detención de L2 de *T.canis* en algunos órganos de ratones experimentalmente infectados.
- Epitopes: determinantes antigénicos.
- Ext. Ag. H/L: extracto antigénico de huevos larvados.
- Ext. Ag.S/L: extracto antigénico de somas larvarios.
- IE: índice esplénico.
- IFI: técnica de inmunofluorescencia indirecta.
- Ig E: inmunoglobulina E.
- Ig G: inmunoglobulina G.
- Ig M: inmunoglobulina M.
- IH: índice hepático.
- IP: índice pulmonar.

- L2: estadio larval II (infectivo) de *T.canis*.
- LMO: síndrome de larva migrans ocular.
- LMV: síndrome de larva migrans visceral.
- MEM: medio mínimo esencial para cultivo de L2.(Difco laboratories)
- Morbilidad: capacidad de producir daño.
- Mortalidad: capacidad de ocasionar la muerte.
- ng: nanogramos.
- Paraténicos: en toxocarosis, huéspedes no caninos que alojan L2 en sus tejidos
- pg: picogramos.
- p.i.: post-infección.
- Prepatente; periodo que transcurre desde la ingestión de huevos infectivos de *T.canis* hasta la aparición de huevos en la materia fecal del perro infectado.
- SDS-Page: geles de poliacrilamida utilizando dodecil sulfato de sodio.
- TC: toxocarosis encubierta.
- TES: productos excretados y/o secretados por L2 (tanto in vivo como in vitro)

BIBLIOGRAFIA

- Abo-Shedada: and Herbert I., 1984.
The migration of larval *Toxocara canis* in mice.
Vet. Parasitol. 17: 75-83.
- Akao N., 1985.
Immune responses to excretory-secretory products of second stage larvae of *Toxocara canis*: humoral immune response relating to larval trapping in the liver of reinfected mice.
Jap. J. Parasitol., 35: 135-140.
- Araujo P., 1972.
Observacoes pertinentes as primeiras ecdises de larvas de *Ascaris lumbricoides*, *A. suum* e *Toxocara canis*.
Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paul., 14: 83-90.
- Arpino C., Gattinara G., Piergili D. and Curatolo P., 1990.
Toxocara infection and epilepsy in children: a case-control study.
Epilepsia, 38: 33-36.
- Avdiukhina T. and Lysenko a., 1994.
How many patients with visceral toxocariasis in Russia?
Med. Parazitol., 1: 12-16.
- Badley J., Grieve R., Bowman D., Glickman L. and Rockey J.. 1987.
Analysis of *Toxocara canis* larval excretory-secretory antigens.
J. Parasitol., 73: 593-600.
- Barriga O., 1988.
A critical look at the importance, prevalence and control of toxocariasis and the possibilities of immunological control.
Vet. Parasitol, 29: 195-234.
- Bass J., Mehta K., Glickman L and Eppes B., 1983.
Clinically unapparent *Toxocara* infection in children.
New. Engl. J. Med., 308: 723-724.

- Beaver P., 1962.
Toxocariasis in relationship to tropical eosinophilia.
Bull. Soc. Path. Exot., 55 : 555-576.
- Beaver P. and Bowman D., 1984.
Ascaroid larva from the eye of a child in Uganda.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 33: 1272-1274.
- Bellegarde E., Santillán G., Corraro C., Deodatto E. and Gutierrez A., 1989.
Solicitud de inmunodiagnóstico de Larva Migrante Visceral en el Hospital Muñiz.
Libro de Resúmenes. Primer Congr. Arg. de Parasitosis, Cultura y Medio Ambiente. La Plata. Argentina.
- Benitez J., Herreros G., Guillen J., Fenoy S., Banares A. and García J., 1995.
Bilateral ocular toxocariasis demonstrated by aqueous humor enzyme linked immunosorbent assay.
Am. J. Ophthalmol., 119: 514-516.
- Beshear J. and Herdley J., 1973.
Severe pulmonary involvement in visceral larva migrans.
Am. J. Dis. Child., 125: 599-600.
- Bhatia V. and Sarin S., 1994.
Hepatic visceral larva migrans.
Am. J. Gastroenterol., 89: 624-627.
- Bisseru B. and Woodruff W., 1968.
The detection of circulating antibody in human toxocara infections using the indirect fluorescent antibody test.
J. Clin. Pathol., 21: 449-455.
- Borg D. and Woodruff A., 1973.
Prevalence of infective Toxocara species in public places.
Br. Med. J., 4: 470-473.
- Bouchard O., Arbib F., Paramelle B. and Brambilla C., 1994.
Acute eosinophilic pneumonia and the larva migrans syndrome.
Rev. Mal., Respir., 11: 593-595.

- Bowman D., Mika-Grieve M. and Grieve R., 1987.
Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*.
Am. J. Trop. Med. Hyg, 36: 75-82.
- Brunaska M., Dubinsky P. and Reiterova K., 1995.
Toxocara canis: ultrastructural aspects of larval moulting in the maturing eggs.
Int. J. Parasitol., 25: 683-690.
- Buijs J., Lokhorst W., Robinson J. and Nijkamp F., 1990.
Toxocara canis induced murine pulmonary inflammation.
Parasite Immunol., 16: 1-9.
- Buijs J., Borsboom G., Van Gemund J., Dongen P., Van Knapen F. and Neijens H., 1994.
Toxocara seroprevalence in 5 years old children: relation with allergic asthma.
Am. J. Epidemiol., 140: 839-847.
- Buijs J., Eghers M., Lokhorst W., Savelkoul H. and Nijkamp F., 1995.
Toxocara induced eosinophilic inflammation. Airway function and effect of anti-IL5.
Am. J. Respir. Med., 151: 873-878.
- Burke T. and Roberson E., 1985.
Prenatal and lactational transmission of *Toxocara canis* and *Ancylostoma caninum*: experimental infection of the bitch before pregnancy.
Int. J. Parasitol., 15: 485-490.
- Childs J, 1985.
The prevalence of *Toxocara* species ova in bayyards and gardens of Baltimore, Maryland.
Am. J. Public. Health., 75: 1092-1094
- Christensson D., 1988.
High latitude *Toxocara canis*.
Parasitol. Today, 4: 322-323.

-Clement R., Williamson H., Hidajat R., Allardyse R. and Stewart A., 1987.
Ocular *Toxocara canis* infections: diagnosis by ELISA.
Aust. N. Z. J. Ophthalmol., 15: 145-150.

-Conde Garcia L., Muro Alvarez A. and Simon Martin F., 1989.
Epidemiological studies on toxocariasis in a zone of western Spain.
Ann. Trop. Med. Parasitol., 83: 615-620.

-Costa Cruz J., Nunes R. and Buso A., 1994.
Presence of *Toxocara spp.* eggs in public squares of Uberlandia city, Minas Gerais, Brazil.
Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo., 36: 39-42.

-Cuellar C., Fenoy S. and Guillen J., 1995.
Cross-reactions of sera from *Toxascaris leonina* and *Ascaris suum* infected mice with *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina* and *Ascaris suum* antigens.
Int. J. Parasitol., 1995, 25: 731-739.

-Dada B. and Lindquist W., 1979.
Prevalence of *Toxocara sp* eggs in some public grounds and highway rest areas in Kansas.
J. Helminthol., 53: 145-146.

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

-Desowitz R., Rudoy R. and Barnwell J., 1981
Antibodies to canine helminth parasites in asthmatic and nonasthmatic children.
Int. Archs. Allergy. Appl. Immunol., 65: 361-366.

-Dodge J., 1980.
Toxocara canis: the risk of infection.
N. Z. Med. J., 91: 24-6.

-Donnelly J., Rockey J. and Soulsby E., 1977.
Intraocular IgE antibody induced in guinea pigs with *Ascaris suum* larvae.
Invest. Ophthalmol. Visual Sci., 16:976-981.

-Dubinsky P., Havasiova K., Petko B., Hovorka I. and Tomasovicova O., 1995.

Role of small mammals in the epidemiology of toxocariasis.
Parasitology, 110: 187-193.

-Duguid I., 1961.

Features of ocular infestation by *Toxocara*.
Br. J. Ophthalm., 45: 789-96.

-Ehrhard T. and Kernbaum S., 1979.

Toxocara canis et toxocarose humaine.
Bull. L'Inst. Pasteur, 77:225-287.

-Embril J., Tanner C., Pereira L., Staud M., Morrison E., and Gualazzi D., 1988.

Seroepidemiologic survey of *Toxocara canis* infection in urban and rural children.
Public Health, 102: 129-133.

-Epe C., Sabel T., Schnieder T. and Stoye M., 1994.

The behaviour and pathogenicity of *Toxocara canis* larvae in mice of different strains.
Parasitol Res., 80: 691-695.

-Fattah D., Maizels R., McLaren D. and Spry C., 1986.

Toxocara canis: interaction of human blood eosinophils with the infective larvae.
Exp. Parasitol., 61: 421-431.

-Faust E., 1981

Toxocara canis.
Parasitología Clínica, Editorial Salvat pág. 334.

Feldman R., 1983.

Guía para el Diagnóstico Parasitológico.
Federación Bioquímica de la Pcia. de Buenos Aires. Pág. 5-7.

-Fernando S., 1968.

Immunological responses of rabbits to *Toxocara canis* infection.
Parasitol., 58: 91-95.

- Fisher M., Jacobs D., Hutchinson M. and Dick I., 1994.
Studies on the control of *Toxocara canis* in breeding kennels.
Vet. Parasitol., 55: 87-92.
- Genchi C., Di Sacco B., Gatti S., Sangalli G. and Scaglia M., 1990.
Epidemiology of human toxocariasis in northern Italy.
Parasitologia, 32: 313-319.
- Ghafoor S., Smith H., Lee W., Quinn R. and Girdwood R., 1984.
Experimental ocular toxocariasis: a mouse model.
Br. J. Ophthalmol., 68: 89-96.
- Gillespie S., 1993.
Human toxocariasis (review).
Com. Dis. Report., 3: 140-143.
- Glickman L., Schantz P. and Cypess R., 1978.
Evaluation of serodiagnostic test for visceral larva migrans.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 27: 492-495.
- Glickman L., Schantz P. and Cypess R., 1979.
Canine and human toxocariasis: review of transmission, pathogenesis and clinical disease.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 175: 1265-1269.
- Glickman L. and Schantz P., 1981.
Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis.
Epidemiol. Rev., 3: 230-250.
- Glickman L., Dubey J. and Winslow L., 1981.
Serological response of ascarid-free dogs to *Toxocara canis* infection.
Parasitol., 82: 383-387.
- Goodart R., Riekhof F. and Beaver P, 1985.
Subretinal nematode. An unusual etiology for uveitis and retinal detachment.
Retina., 5:87-90.
- Greeve J., 1971.
Age resistance to *Toxocara canis* in ascarid-naive dogs.
Am. J. Vet. Res., 32: 1185-1192.

- Greeve R., Stewart V. and Parsons J., 1993.
Immunobiology of larval toxocariasis.
Toxocara and Toxocariasis, Brit. Soc. Parasitol. 117-120.
- Hackett F. and Walters T., 1980.
Helminths of the red fox in mid-Wales.
Vet. Parasitol., 7: 181-184.
- Hassan A. and Manawaty N., 1994.
Experimental murine toxocariasis: histopathological study of chronic renal infection, transplacental transmission and ultrastructural study of egg shell.
J. Egypt. Soc. Parasitol., 24: 333-339.
- Hay J. and Aitken P., 1984.
Experimental toxocariasis in mice and its effect on their behaviour.
Ann. Trop. Med. Parasitol., 78: 145-155.
- Hayden D. and van Kruiningen H., 1991.
Experimentally induced canine toxocariasis: laboratory examination and pathologic changes.
Am. J. Vet. Med. Ass., 199: 702-707.
- Holland C., O'Connor P., Taylor M., Hughes G., Girdwood R. and Smith H., 1991.
Families, parks, gardens and toxocariasis.
Scand. J. Infect. Dis., 23: 225-231.
- Huntley C., Costas M. and Lyerly A., 1963.
Visceral larva migrans syndrome: clinical characteristics and immunological studies.
Paediatrics, 36: 523-536.
- Jacob C., Pastorino A., Peres B., Mello E., Okay Y. and Oselka G., 1994.
Clinical and laboratorial features of visceral toxocariasis in infancy.
Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 36: 19-26.
- Josephs D., Bhinder P. and Thompson A., 1981.
The prevalence of Toxocara infection in a child population.
Public Health, London, 95: 273-275.

- Kayes S., 1984.
Spleen cell responses in experimental murine toxocariasis.
J. Parasitol., 73: 116-120.
- Kayes S., Omholt P. and Grieve R., 1985.
Immune responses of CBA/J mice to graded infections with *Toxocara canis*.
Infect. Immun., 48: 697-703.
- Kazacos K., Vestre W. and Kazacos E., 1984.
Raccoon ascarid larvae as a cause of ocular larva migrans.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 25: 1177-1183.
- Kennedy M., Maizels R., Meghji M., Young L., Qureschi F. and Smith H., 1987.
Species-specific and common epitopes on the secreted and surface antigens of *Toxocara cati* and *Toxocara canis* infective larvae.
Parasite Immunol., 9: 407-420.
- Kenny V. and Alwright S., 1987.
Seroprevalence of toxocariasis en a hospital based samle in Ireland.
Irish J. Med. Sci., 156: 361-363.
- Kimmig P., Naser K and Frank W., 1991.
Seroepidemiologic studies of human toxocariasis.
Hyg. Umweltmed., 191: 404-422.
- Knapen F., Buijs J., Kortbeek L. and Ljungstrom I., 1992.
Larva migrans syndrome: *Toxocara*, *Ascaris* , or both?.
Lancet, 340: August 29.
- Knapen F. And Buijs J., 1993.
Diagnosis of *Toxocara* infection.
Toxocara and Toxocariasis, Brit. Soc. Parasitol., 49-53.
- Kornblatt A. and Schantz P., 1979.
Veterinary and public health considerations in canine roundworm control.
J. Am. Vet. Med. Ass., 177: 1212-1215.

- Kurmar J. and Kimm J., 1994.
Toxocara canis and mielopathy.
Am. J. Neuroradiol., 15: 1918-1920.
- Liesegang T., 1977.
Atypical ocular toxocariasis.
J. Pediat. Ophthalmol., 14: 349-352.
- Ljungstrom I. and Knapen F., 1989.
An epidemiological and serological study of *Toxocara* infection in Sweden.
Scand. J. Infect. Dis., 21: 87-93.
- Lopez R., Suarez M., Gimeno L., García A., Fenoy S., Guillen J and Castellote L., 1995.
Ocular toxocariasis or retinoblastoma?
Enf. Infecc. Microbiol. Clin., 13: 242-245.
- Lynch N., Eddy K., Hodgen A., Lopez R. and Turner K., 1988.
Seroprevalence of *Toxocara canis* infection in tropical Venezuela.
Trans. Soc. Trop. Med. Hyg., 82: 275-281.
- Lloyd S., 1985.
Toxocara canis: infection, treatment and control.
Vet. Ann., 25: 368-375.
- Lloyd S., 1986.
Toxocariasis.
J. Sm. Anim. Pract., 27: 655-661.
- Lloyd S., 1993.
Toxocara canis: the dog.
Toxocara and Toxocariasis. Brit. Soc. Parasitol, 11-24.
- Magnaval J. and Charlet J., 1987.
Efficacité comparée du thiabendazole et du mebendazole dans le traitement de la toxocarose. Therapie, 42: 541-544.
- Magnaval J., Charlet J. and de Larrard B., 1992.
Etude double aveugle de l'efficacité du mebendazole dans les formes mineures de la toxocarose humaine.
Thérapie, 47: 145-148.

- Magnaval J. And Baixench M., 1993.
Toxocariasis in Midi Pyrinées region.
Toxocara and Toxocariasis. Brit. Soc. Parasitol., 63-70.
- Magnaval J., Michault A., Calon N. and Charlet J., 1994.
Epidemiology of human toxocariasis in la Reunion (Indian Ocean).
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 88:531-533.
- Maizels R. and Meghji M., 1984.
Repeated patent infection of adult dogs with *Toxocara canis*.
J. Helminthol., 58: 327-333.
- Maizels R., Kennedy M., Meghji M., Robertson B. and Smith H., 1987.
Shared carbohydrate epitopes on distinct surface and secreted antigens of the
parasitic nematode *Toxocara canis*.
J. Immunol., 139: 207-214.
- Maizels R. and Page A., 1990.
Surface associated glycoproteins from *Toxocara canis* larval parasites.
Acta Trop., 47: 355-364.
- Maizels R. and Robertson B., 1991.
Toxocara canis: secreted glycoconjugate antigens in immunobiology and
immunodiagnosis. Parasitic Nematodes. Taylor and Francis Ltd. London.:
95-115.
- Marmor M., Glickman L., Shofer F., Falch L., Rosemberg C., Cornblatt B.
and Friedman S., 1987.
Toxocara canis infection of children: epidemiologic and neuropsychologic
findings.
Amer. J. Publ. Health, 77: 554-559.
- Maruyama S., Yamamoto K. and Katsube Y., 1994.
Infectivity of *Toxocara canis* larvae from Japanese quails in mice.
J. Vet. Med. Sci., 56: 399-401.
- Minvielle M., Pezzani B. and Basualdo J., 1993.
Frequency of findings helminths eggs in canine stool samples collected in
public places from La Plata city, Argentina.
Bull. Chil. Parasitol., 48: 63-65.

- Nelson J., Frost J. and Schotet S., 1990.
 Unsuspected cerebral toxocara infection in a fire victim.
 Clin. Neuropathol., 9: 106-108.
- Noemi I., Rugiero E., Viovy A., Cortes P., Cerva J., Herrera M. and Cordovez J., 1994.
 Familial seroepidemiology of toxocariasis.
 Bull. Chil. Parasitol., 49: 52-59.
- O'Connor P., Taylor M. And Smith H., 1993.
 Transplacental infection of toxocariasis in humans.
 Toxocara and Toxocariasis. Brit. Soc. Parasitol., 77-78.
- Okoshi S. and Usui M., 1968.
 Experimental infection of mice, chickens and earthworms with *Toxascaris leonina*, *Toxocara canis* and *Toxocara cati*.
 Jpn. J. Vet. Sci., 30: 151-66.
- O'Lorcain P., 1994.
 Prevalence of *Toxocara canis* ova in public playgrounds in the Dublin area of Ireland.
 J. Helminthol., 68: 237-241.
- O'Lorcain P., 1995.
 The effects of freezing on the viability of *Toxocara canis* and *T. cati* embryonated eggs.
 J. Helminthol., 69: 169-171.
- Oshima T., 1976.
 Observations on the age resistance eosinophilia, and larval behaviour in helminth-free Beagles infected with *Toxocara canis*.
 Jpn. J. Parasitol., 25: 447-455.
- Page A. and Maizels R., 1992.
 Synthesis, glycosilation and secretion of serine/threonine-rich glycoproteins from *Toxocara canis* infective larvae.
 Parasitology, 105: 297-308.
- Page A., Rudin W. , Fluri E., Blaxter M. and Maizels R., 1992.
Toxocara canis: a labile antigenic surface coat overlying the epicuticle of infective larvae.
 Exp. Parasitol., 75: 72-86.

- Parsons J., Bowman D. and Grieve R., 1986.
Tissue localization of excretory-secretory antigens of larval *Toxocara canis* in acute and chronic murine toxocariasis.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 35: 974-981.
- Parsons J. and Grieve R., 1990.
Kinetics of liver trapping of infective larvae in murine toxocariasis.
J. Parasitol., 76: 529-536.
- Parsons J., Coffman R. and Grieve R., 1993.
Antibody to IL5 prevents blood and tissue eosinophilia but not liver trapping in murine larval toxocariasis.
Toxocara and Toxocariasis, Brit. Soc. Parasitol., 120-125
- Pegg E., 1975.
Dog roundworms and public health.
Vet. Rec., 97: 78-80.
- Pereira D., Basualdo J., Minvielle M., Pezzani B., Pagura E. y Demarco J., 1991.
Catastro parasitológico: Helmintiasis en canes. Area Gran La Plata. Sobre 1000 casos.
Vet. Argentina, 7: 165-172.
- Petithory J, Liotet S., Chaumeil C., Moisan F., Beddok A., Batellier L. and Brumpt L., 1990.
Le syndrome de larva migrans oculaire.
Rev. Fr. Lab., 207: 69-80.
- Petithory J., Beddok A and Quedoc M., 1994.
Ascariidiasis zoonoses: visceral larva migrans syndromes.
Bull. Acad. Natl. Med., 178: 635-645.
- Pezzani, B. y Radman N., 1996.
Larvas migrantes.
Microbiología Biomédica. Editorial Atlante. 736-740.
- Piergili D., Moretti A., Mughetti L. and Bruschi F., 1989.
Eosinophilia, granuloma formation, migratory behaviour of second stage larvae effect of the inoculum size.
Parassitologia, 31: 153-166.

- Pollard Z., Jarret W., Hagler W., Allain D. and Schantz P., 1979.
ELISA for diagnosis of ocular toxocariasis.
Ophthalmol., 86: 743-749.
- Portus M., Riera C. and Prats G., 1989.
A serological survey of toxocariasis in patients and healthy donors in
Barcelona (Spain).
Eur. J. Epidemiol., 5: 224-227.
- Robertson B., Burkot T., Gillespie S., Kennedy M., Wanbai Z. and Maizels
R., 1988.
Detection of circulating parasite antigen and specific antibody in *Toxocara
canis* infections.
Clin. Exp. Immunol., 74 :236-241
- Safar E., Azab M., Khalil H., Bebars M. and Khattab H., 1990.
Immunodiagnosics of *Toxocara canis* in suspected ocular and visceral
manifestations.
Parasitol., 37: 249-254.
- Santillan G., Guarnera E., Molina V. and Gutierrez A., 1995.
Polipéptidos metabólicos de *Toxocara.canis* que producen
inmunoreactividad cruzada.
Rev. Soc. Chil. Parasitol., 19:363 (449 A).
- Saralegui Y., Toledano M., Arriola J., Irazusta M. and Elorza J., 1994.
Hepatic toxocara infestation.
Rev. Esp. Enferm. Dig., 85: 479-481.
- Schacher J.F., 1959.
A contribution to the life history and larval morphology of *Toxocara canis*.
J. Parasitol., 43: 599-612.
- Schantz P and Glickman L., 1979.
Canine and human toxocariasis: the public health problem and the
veterinarians's role in prevention.
J. Am.Vet. Med. Assoc., 175: 1270-3.
- Shields J., 1984.
Ocular toxocariasis. A review.
Surv. Ophthalmol., 28: 361-381.

- Simonsen M., 1962.
Graft versus host reactions.
Prog. Allergy 6: 349-367.
- Smith H., Kusel J. and Girdwood R., 1983.
The production of human A and B blood group like substances by in vivo maintained second stage *Toxocara canis* larvae, their presence on the outer larval surfaces and their excretions/secretions.
Clin. Exp. Immunol, 54: 625-633.
- Smith R., Hagstead H. and Beard G., 1984.
Visceral larva migrans: a risk assesment in Baton Rouge, Louisiana.
Int. J. Zoonos., 11:189-194.
- Smith H., Hinson A., Girdwood R. and Taylor M., 1988.
Variation in antibody isotype responses in clinically covert toxocariasis.
Lancet, 2: 167-168
- Smith H., 1991.
Immune evasion and immunopathology in *Toxocara canis* infection.
Parasitic Nematodes., Ed. Taylor and Francis Ltd., London, 116-139.
- Snow K., Ball S. and Bewick J., 1987.
Prevalence of *Toxocara* species eggs in the soil of East London parks.
Vet. Rec., 120: 66-67.
- Snyder C., 1961.
Visceral larva migrans.
Paediatrics, 28: 85-91.
- Sommer C., Ringelstein E., Biniek R. and Glockner W., 1994.
Adult *Toxocara canis* encephalitis.
J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry., 57: 229-231.
- Soulsby E., 1991.
Parasitic zoonoses: new perspectives and emerging problems.
Health Hyg., 12: 66-77.
- Sprent J., 1961.
Post-parturient infection of the bitch with *Toxocara canis*.
J.Parasitol., 47: 284-85.

- Sturchler D., Schubarth P., Gualzata M., Gottstein B. and Oettli A., 1989.
Thiabendazole vs. Albendazole in treatment of toxocariasis.
Ann. Trop. Med. Parasitol., 83: 473-476.
- Sugane K. and Oshima T., 1983.
Trapping of large numbers of larvae in the livers of *Toxocara canis*
reinfected mice.
J. Helminthol., 57: 95-99.
- Taylor M., Keane C., O'Connor P. Girdwood r. and Smith H., 1987.
Clinical features of covert toxocariasis.
Scand. J. Infect. Dis., 19: 693-696.
- Taylor M., Keane C., O'Connor P., Mulvihill E. and Holland C., 1988.
The expanded spectrum of Toxocaral disease.
Lancet, 1 (8587): 692-695.
- Taylor M., 1993.
Toxocariasis in ireland.
Toxocara and Toxocariasis. Ed. Brit. Med. Soc. Parasitol., 71-80.
- Thompson D., Bundy D, Cooper E. and Schantz P., 1986.
Epidemiological characteristics of *Toxocara canis* zoonotic infection of
children en a caribbean community.
Bull. W.H.O., 64: 283-290.
- Van Laethem J., Jacobs F., Braude P., Van Gossum A and Deviere J.,
1994.
Toxocara canis infection presenting as eosinophilic ascites and
gastroenteritis.
Dig. Dis. Sci., 39: 1370-1372.
- Van Gemund J., Buijs J., Van Donguen P. and Van den Bergh J., 1989.
Seroprevalence of toxocara infection in young children in the city of the
Hague.
Trop. Geograph. Med., 41: 294-296.
- Vanparijs O., Hermans L. and van der Flaes L., 1991.
Helminth and protozoan parasites in dogs and cats in Belgium.
Vet. Parasitol., 38: 67-73.

- Virginia P., Nagakura K., Ferreira O. and Tateno S., 1991.
Serologic evidence of toxocariasis in Northeast Brazil.
Jpn. J. Med. Sci. Bio., 44: 1-6
- Warren E., 1969.
Infections of *Toxocara canis* in dogs fed infected mouse tissues.
Parasitology, 59: 837-841.
- Woodruff A., Bissler B. and Bowe J., 1966.
Infection with animal helminths as a factor in causing polyomyelitis and epilepsy.
Br. Med. J., 1:1576-9.
- Woodruff A., De Savigny D, and Jacobs D., 1989.
Study of Toxocaral infection in dog breeders.
Br. Med. J., 2: 1747-1748.
- Worley G., Green J., Frothingham T., Sturmer R., Walls K., Pakalnes V. and Ellis G, 1984. *Toxocara canis* infection: clinical and epidemiological associations with seropositivity in kindergarten children.
J. Infect. Dis., 149: 591-597.
- Yossef M., Handousa A, El-Naggar H. and El-Shazly M., 1991.
Toxocara canis antibodies by counter immunoelectrophoresis.
J. Egypt. Soc. Parasitol., 21: 567-570.
- Zawawy L., Nassery S., Azzouni M., Abou I., Temsahi M. and Awadalla H., 1995.
A study on patients with eosinophilia of suspected parasitic origin.
J. Egypt. Soc. Parasitol., 25: 245-255.
- Zinkham W., 1978.
Visceral larva migrans: a review and reassessment indicating two forms of clinical expression: visceral and ocular.
Am. J. Dis. Child., 132: 627-33.
- Zyngier F., 1974.
Histopathology of experimental toxocariasis in mice.
Ann. Trop. Med. Parasitol., 68: 225-228.