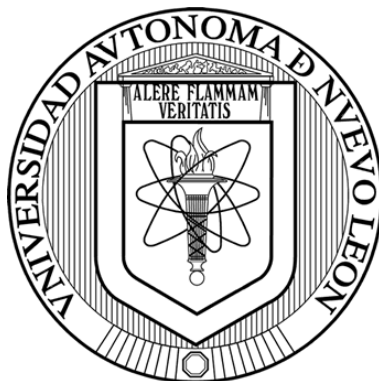


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS TES PARA EL DIAGNÓSTICO DE *Toxocara canis*
(Werner 1782) MEDIANTE UN ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A
ENZIMAS

Por

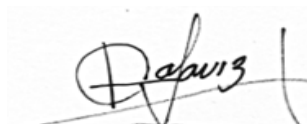
ANA CRISTINA GONZÁLEZ MORALES

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

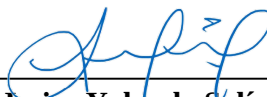
2025

EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS TES PARA EL DIAGNÓSTICO DE *Toxocara canis*
(Werner 1782) MEDIANTE UN ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A
ENZIMAS

Comité de Tesis



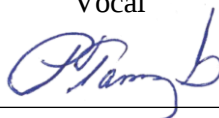
Dr. Lucio Galaviz Silva
Director



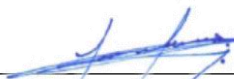
Dra. Luisa Yolanda Solís Soto
Secretario



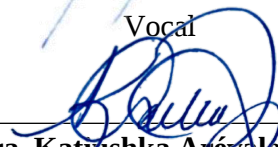
Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores
Vocal



Dra. Patricia Tamez Guerra
Vocal



Dra. María Porfiria Barrón González
Vocal



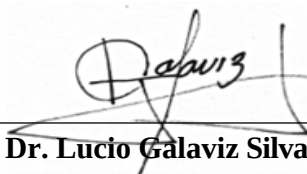
Dra. Katiushka Arevalo Niño
Subdirector de Posgrado



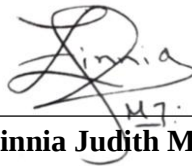
SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS TES PARA EL DIAGNÓSTICO DE *Toxocara canis*
(Werner 1782) MEDIANTE UN ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A
ENZIMAS

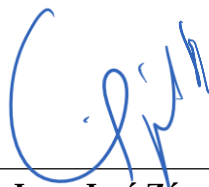
Director de Tesis



Dr. Lucio Galaviz Silva
Director



Dra. Zinnia Judith Molina
Director externo



Dr. Juan José Zárate Ramos
Asesor externo

AVISO DERECHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, PAICYT, UANL CN 357-15

AGRADECIMIENTOS

Culminar este doctorado ha sido un camino lleno de aprendizajes, desafíos y pérdidas que pusieron a prueba mi fortaleza en más de una ocasión. Hubo momentos en los que pensé en rendirme, en los que el dolor parecía mayor que la motivación, pero gracias a las personas que me rodearon y me sostuvieron en mis momentos más oscuros, hoy puedo ver este logro hecho realidad.

A mi padre Jorge Jaime González Puente, quien partió en medio de la pandemia, y cuya ausencia dejó un vacío inmenso en mi vida. Aunque no pudo ver este logro, sé que estaría orgulloso de mí. Este trabajo también es para él.

A mi madre María Margarita Morales Silva y mi hermana Karla Alejandra González Morales, por ser mi refugio, mi apoyo incondicional y por recordarme que siempre hay razones para seguir adelante, aun cuando el camino se vuelve cuesta arriba.

A mis amigas de toda la vida: Sam, Mary, Brenda y Sol, mis amigos de laboratorio: Jorge, Gabriel, Ana Karen, Karen, Viviana, Cynthia, Cecilia, Emelina y André quienes me sostuvieron en mis peores momentos y celebraron conmigo cada pequeño avance. Su compañía y aliento fueron fundamentales para no perderme en la desesperanza. En especial a Juan, por todo su apoyo, enseñándome procedimientos que desconocía totalmente, por ser paciente y darme la oportunidad de trabajar con él.

A Pedro, por haber sido un pilar en este proceso, por animarme a continuar cuando yo sentía que ya no tenía fuerzas, y por recordarme que era capaz de llegar hasta el final.

A mis asesores la Dra. Zinnia J. Molina Garza y el Dr. Lucio Galaviz Silva, quienes con paciencia, comprensión y confianza en mi trabajo me guiaron en este proceso. Gracias por creer en mí incluso cuando yo dudaba de mí mismo/a.

A CONAHCYT, por el apoyo financiero brindado durante mi formación doctoral, el cual fue fundamental para la realización de este proyecto. Su respaldo hizo posible que pudiera enfocarme plenamente en mi investigación y culminar este proceso académico.

Este doctorado no es solo un título, es un testimonio de resistencia, amor y apoyo. A todos los que formaron parte de este camino, gracias de corazón.

DEDICATORIA

A mis padres.

A mi hermana y sobrinas.

A toda mi familia, por su amor incondicional y su apoyo constante.

A quienes me han acompañado en este camino, en los momentos de alegría y en los de dificultad.

A la memoria de quienes han partido, pero dejaron en mí su amor, enseñanzas y fortaleza.

A la resiliencia, a la esperanza y a la certeza de que cada esfuerzo, por más difícil que parezca,
siempre encuentra su recompensa.

Este logro es reflejo de todo ello.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	II
ÍNDICE	III
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
<u>I.</u> INTRODUCCIÓN	1
<u>II.</u> ANTECEDENTES	3
2.1. <i>Toxocara canis</i>	4
2.2. Taxonomía	4
2.3. Morfología	5
2.4. Ciclo biológico	7
2.5. Sintomatología	8
2.5.2.1. Larva migrans visceral (LMV)	9
2.5.2.2. Larva migrans ocular (LMO)	9
2.5.2.3. Larva migrans encubierta (LME)	10
2.6. Epidemiología	10
2.7. Tratamiento	12
2.8. Diagnóstico	13
2.8.1. Diagnóstico por microscopía	13
2.8.2. Diagnóstico por flotación-centrifugación	14
2.8.3. Diagnóstico molecular	14
2.8.4. Diagnóstico inmunológico	15

2.8.4.1. Inmunodiagnóstico a base de antígenos excretor-secretor (TES)	16
2.8.4.2. Inmunoensayo ligado a coproenzimas (copro-ELISA) tipo sándwich	18
2.8.5. Proteínas excreción-secreción de <i>T. canis</i> (TES)	19
2.8.6. Anticuerpos empleados en ELISA	22
III. JUSTIFICACIÓN	24
IV. HIPÓTESIS	25
V. OBJETIVO DEL TRABAJO	26
Objetivo general	26
Objetivos específicos	26
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1. Área de estudio	27
6.2. Obtención de péptido recombinante (rTES)	28
6.2.1. Transformación de células calcio competentes <i>E. coli</i> TOP10	29
6.2.2. Purificación del ADN plasmídico	30
6.2.4. Transformación y análisis de células calcio competentes <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	31
6.2.5. Inducción de la expresión de péptido recombinante	31
6.2.6. Lisis bacteriana	32
6.2.7. Solubilidad del péptido recombinante	32
6.2.8. Solubilidad de cuerpos de inclusión	33
6.2.9. SDS-PAGE de los lisados bacterianos	33
6.2.10. Purificación del péptido recombinante	34
6.2.12. Western Blot	35
6.3. Obtención de antígenos TES nativos (excreción-secreción de <i>Toxocara canis</i>)	36
6.3.1. Cultivo, eclosión y mantenimiento de larvas L2	36
6.3.1.1. Desove <i>in vitro</i> de ejemplares adultos	36
6.3.1.2. Eclosión <i>in vitro</i> de la fase larvaria	37
6.3.1.3. Extracto antigénico	37

6.3.1.4. Análisis del perfil proteico del extracto	38
6.4. Esquema de inmunización en conejos y obtención de anticuerpos	38
6.5. Prueba de ELISA tipo sándwich	39
6.6. Estudio parasitológico	39
6.7. Diseño experimental	40

VII. RESULTADOS

7.2. Recuperación de secuencias de proteínas y predicción de epítomos de células B	42
7.3. Epítomos inductores de IL-4 e IL-10 y detección	48
7.4. Ensamblaje de la construcción de proteína quimérica.	52
7.5. Propiedades de antigenicidad, solubilidad y fisicoquímicas	52
7.6. Predicción de estructuras secundarias y terciarias.	53
7.7. Refinamiento del modelo terciario	55
7.8. Predicción de epítomos conformacionales de células B.	57
7.9. Ingeniería de disulfuro de proteínas	58
7.10. Traducción inversa, optimización de codones y clonación <i>in silico</i> .	59
7.11. Clonación de la subunidad rTES	60
7.13. Purificación de la subunidad rTES	61
7.15. Identificación de los ejemplares adultos	62
7.16. Cultivo y eclosión de larvas	63
7.17. Producción del antígeno de excreción/secreción (E/S)	64
7.18. Evaluación de anticuerpos policlonales contra el producto de ES recombinante y nativo de <i>T. canis</i>	65
7.19. Análisis de reactividad de anticuerpos policlonales anti-TES en muestras fecales de cánidos procedentes del estado de Nuevo León	66

XI. BIBLIOGRAFÍA

XII. RESUMEN BIOGRÁFICO

XIII. ANEXO

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas empleadas en el diagnóstico de Toxocariosis	16
Tabla 2. Preparación de geles de poliacrilamida	34
Tabla 3. Concentraciones de reactivos para la preparación de muestra	34
Tabla 4. Candidatos a péptidos multiepítomos de productos TES 26, 30 y 120	47
Tabla 5. Selección final de candidatos para el péptido multiepitopo	51
Tabla 6. Discriminación entre controles de <i>T. canis</i>	65
Tabla 7. Cuadro de contingencia entre resultados de MO y ELISA de TES	68
Tabla 8. Resultados de la comparación entre las técnicas MO, ELISAr y ELISAn para la detección de <i>T. canis</i> en heces de cánidos	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Extremo anterior de <i>Toxocara canis</i> , se observan las alas cervicales	5
Figura 2. Huevo de <i>Toxocara canis</i>	6
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Toxocara canis</i>	8
Figura 4. Prevalencias y número de individuos examinados (cada punto amarillo con un halo azul representa una encuesta nacional definida) Fuente: Ma et al., 2018.	12
Figura 5. Obtención de TES nativos y recombinantes	17
Figura 6. Productos ES de helmintos y sus posibles mecanismos sobre la modulación inmune del hospedador	22
Figura 7. Mapa del estado de Nuevo León con sitios de recolección	27
Figura 8. Orden de los componentes de un bastidor para inmunotransferencia	35
Figura 9. Distribución de individuos muestreados	41
Figura 10. Secuencia de aminoácidos de productos ES de <i>T. canis</i> .	42
Figura 11. Candidatos a epítomos de TES analizados mediante el servidor Bepitope	43
Figura 12. Candidatos a epítomos de TES analizados mediante el servidor ABCpred	44
Figura 13. Candidatos a epítomos de TES analizados mediante el servidor Bepipred Linear	45
Figura 14. Candidatos a epítomos de TES analizados mediante el servidor Bepipred 3.0	46
Figura 15. Candidatos a epítomos de TES analizados mediante el servidor SVMTriP	46
Figura 16. Candidatos a epítomos de TES inductores de IL-4 analizados mediante el servidor IL-4 pred	48
Figura 17. Candidatos a epítomos de TES inductores de IL-10 analizados mediante el servidor IL-4 pred	49
Figura 18. Predicción de epítomos inductores de IL-10 analizados mediante el servidor IL-10 pred	49
Figura 19. Predicción de epítomos inductores de IL-10 analizados mediante el servidor IL-10 pred.	50
Figura 20. Secuencia de epítomos inductores seleccionados en la construcción de epítomos múltiples	52

Figura 21. Predicción por el servidor SOPMA	54
Figura 22. Representación de la estructura secundaria mediante el servidor PSIPRED	54
Figura 23. Modelo 3D de cinta y superficie de la construcción del péptido multiepítopo mediante el servidor I-TASSER.	55
Figura 24. Procesamiento de refinado por el servidor Prosa-Web	56
Figura 25. Predicción de epítomos conformacionales de células B por ElliPro, herramienta del servidor IEDB.	57
Figura 26. Análisis de enlaces disulfuro del péptido multiepítopo diseña	58
Figura 27. Constructo <i>in silico</i> del clon pET-22b (+) con el gen de interés, por el software Snape Gene.	59
Figura 28. Colonias de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con vector pET-22b (+) /TESr	60
Figura 29. Purificación del plásmido pET-22b (+)	60
Figura 30. Producto de digestión doble del plásmido pET-22b (+) purificado	60
Figura 31. Expresión de TESr de <i>T. canis</i> en <i>E. coli</i> BL 21 (DE3) en medio LB	61
Figura 32. Análisis del péptido multiepítopo purificado mediante cromatografía de afinidad a metales (Ni++)	61
Figura 33. Análisis antigénico de proteína purificada rTES mediante Western blot	62
Figura 34. Ejemplares machos y hembras de <i>T. canis</i> colectados de muestras de heces de cánidos	63
Figura 35. Huevos obtenidos <i>in vitro</i>	63
Figura 36. Electroforesis de diferentes fracciones obtenidas del cultivo larvario L2 de <i>T. canis</i>	64
Figura 37. Western Blot de 3 diferentes lotes del extracto antigénico obtenido del cultivo del segundo estadio larvario de <i>T. canis</i>	64
Figura 38. Curva estándar de la cuantificación proteica por el método de Bradford	65
Figura 39. Detección de <i>T. canis</i> en canidos por la técnica de ELISA anti-TES recombinante	66
Figura 40. Detección de <i>T. canis</i> en canidos por la técnica de ELISA anti-TES nativo	67

NOMENCLATURA

aa	Aminoácidos
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenztiazolio-6-ácido sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNp	Ácido desoxirribonucleico plasmídico
BL21(DE3)	Cepa de <i>E. coli</i> utilizada para producir péptidos recombinantes
DH5 α	Cepa de <i>E. coli</i> utilizada en protocolos de clonación
°C	Grados centígrados
HRP	Peroxidasa de rábano
h	Hora
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranósido
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria-Bertoni
M	Mol
MO	Microscopía óptica
mA	Miliamperios
mg	Miligramos
mM	Milimoles
μ M	Micromoles
min	Minutos
mL	Mililitros
μ L	Microlitros
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases de nucleótidos
PBS	Buffer salino de fosfatos
pH	Potencial de hidrogeniones (-log [H ⁺])
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
SFB	Suero fetal bovino

SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametil-etilendiamina
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
U	Concentración de unidades enzimáticas
1X	Concentración de trabajo de una solución preparada a partir de un stock 10 o 50 veces concentrado (10X, 50X)
ABZ	Albendazol

RESUMEN

El nemátodo *Toxocara canis* es un patógeno del cánido y otros cánidos, que puede ser transmitido accidentalmente al humano. El asado para detectar esta zoonosis se centra en técnicas microscópicas y en la serología, sin embargo, los kits diagnósticos solo se emplean en humanos y se usan antígenos nativos de excreción-secreción (*TES*), los cuales no son tan específicos de especie, ya que se pueden presentar reacciones cruzadas con anticuerpos que se encuentren presentes en otro tipo de helmintiasis. Existen métodos moleculares que tienen una alta sensibilidad y especificidad, aunque, estos tienen limitaciones en el uso en veterinaria ya que se requiere de personal capacitado y equipo especial. El objetivo de la presente investigación fue producir un antígeno recombinante a partir de las proteínas *TES* de *T. canis* y evaluarlo para el inmunodiagnóstico de la toxocariasis. Se diseñó el antígeno recombinante por medio de programas computacionales, se sintetizó mediante el vector de expresión pET22b+ y se purificó mediante cromatografía de afinidad (Ni²⁺). La reacción serológica del péptido se evaluó mediante el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) y Western blot, además se evaluó la capacidad de detección mediante muestras fecales de animales positivos, sospechosos y negativos por ELISA; es importante mencionar que no existe una prueba de referencia. Esto se comparó con las pruebas coprológicas para el diagnóstico de la toxocariasis en perros. Se analizaron 100 muestras fecales de cánidos mediante el estándar de oro microscopía óptica (MO) y una prueba ELISA a base de anticuerpos policlonales anti-*TES* nativo y recombinante. Un total de 40 muestras positivas a *T. canis* reaccionaron a ambos ELISA, por lo que no se presentaron casos falsos negativos. En el ELISA anti-*TES* nativo se obtuvieron tres reacciones cruzadas (3/100) a *Ancylostoma caninum* y *Strongyloides stercoralis*. Por el contrario, el ELISA anti-*TES* recombinante mostró una reacción cruzada (1/100) en *A. caninum*. Los resultados mostraron una mayor especificidad al implementar ELISA a base de anticuerpos policlonales contra el péptido quimérico diseñado en el presente estudio.

ABSTRACT

The nematode *Toxocara canis* is a pathogen of canines and other canids, which may be accidentally transmitted to humans. The detection of this zoonosis is based on microscopic techniques and serology. However, diagnostic kits are only for humans, using native excretion-secretion antigens (TES) that are not species-specific, since cross-reactions with antibodies in other types of helminthiasis may occur. There are molecular methods that have a high sensitivity and specificity, although these have limitations in their use in veterinary medicine since they require trained personnel and special equipment. The present study aimed to produce a recombinant antigen from the TES proteins of *T. canis* and evaluate it for the immunodiagnosis of toxocariasis. The recombinant antigen was designed using computer programs, synthesized using the pET22b+ expression vector, and purified using affinity chromatography (Ni²⁺). The serological reaction of the peptide was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot, and the detection potential was evaluated by fecal samples of positive, suspect, and negative animals by ELISA; it should be noted that there is no reference test. This was compared with coprological tests for the diagnosis of toxocariasis in dogs. One hundred fecal samples from canines were analyzed by the gold standard optical microscopy (OM) and an ELISA based on native and recombinant anti-TES polyclonal antibodies. Forty samples positive for *T. canis* reacted to both ELISAs, thus there were no false negative cases. In the native anti-TES ELISA, three cross-reactions (3/100) were obtained to *Ancylostoma caninum* and *Strongyloides stercoralis*. In contrast, the recombinant anti-TES ELISA showed one cross-reaction (1/100) to *A. caninum*. Results showed significant specificity when implementing ELISA based on polyclonal antibodies against the chimeric peptide designed in the present study.

I. INTRODUCCIÓN

La toxocariasis es una helmintiasis zoonótica importante causada por el nemátodo ascárido *Toxocara*, es asociada mayormente a la especie que infecta al cánido *Toxocara canis*, sin embargo, la que parasita a félidos *Toxocara cati* también se encuentra involucrada, aunque en menor frecuencia (Mohamad et al., 2009). La distribución de este parásito es mundial, no obstante, es considerado como uno de los principales nematodos más prevalentes en estudios realizados en zonas urbanas de distintos países en vías de desarrollo de Latinoamérica, África y Asia (Apt, 2014; Hernández, 2018).

La enfermedad de toxocariasis presenta diferentes manifestaciones clínicas que se muestran a causa de la capacidad migratoria de la larva de *Toxocara* spp. a través del sistema circulatorio hacia otros órganos, que varían de acuerdo con la intensidad y la capacidad del sistema inmune para combatir la infección. Suelen presentarse tres tipos de síndromes, *larva migrans* visceral (LMV), *larva migrans* ocular (LMO) y *larva migrans* neural (LMN), aunque por lo general la enfermedad puede cursar de manera subclínica (Yamasaki et al., 2000).

La principal fuente de infección es por el contacto de huevos larvados con el estadio infectivo L2 de *Toxocara* spp., encontrados en las heces de diversos cánidos y algunos félidos. El diagnóstico definitivo de la toxocariasis es mediante la detección de estas larvas a partir de muestras fecales y biopsias de tejido; el principal problema de esta última es el tiempo y la dificultad de la metodología que se requiere para efectuar su análisis. Por lo cual, el diagnóstico se centra solo en las partes clínica y serológica. En animales, son empleados solamente las técnicas rutinarias parasitológicas y se basa en la presentación de signos clínicos. En humanos, actualmente se cuentan con kits comerciales del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de inmunoglobulina G (IgG), en los que se obtienen los antígenos excretorios-secretorios (TES) de *Toxocara*, sin embargo, esto ha resultado en ensayos no tan específicos que presentan reacciones cruzadas frente a otras helmintiasis. Se han reportado resultados significativos al usar antígenos recombinantes para la detección de toxocariasis, ya que poseen una mayor sensibilidad y

especificidad a comparación con los ensayos que utilizan antígenos nativos de TES. Diversos autores han reportado antígenos recombinantes potenciales para el serodiagnóstico de la toxocariasis, como TES-30 (Olave et al., 2016) y TES-120 (Mohamad et al., 2009), pero aún son necesarios más estudios para su validación como reactivos de diagnóstico.

El diagnóstico preciso es realmente importante tanto para el manejo del paciente, como para comprender la epidemiología de la toxocariasis y así establecer medidas profilácticas (Durant et al., 2012). Por lo que, el presente estudio fue realizar un inmunoensayo para el diagnóstico rápido y certero de la infección por *Toxocara canis*, en comparación con las técnicas implementadas por médicos humanos y veterinarios en la actualidad.

II. ANTECEDENTES

Las enfermedades parasitarias con potencial zoonótico pueden ocasionar una gran variedad de síntomas, tanto en humanos como en animales. Estas pueden generar desde una simple irritación en la dermis causada por picaduras o “mordeduras” e inclusive en casos muy extremos la muerte como resultado de una falla multiorgánica, como en el caso de la enfermedad de Lyme. Estas enfermedades, en especial las helmintiasis, pueden ser transmitidas directa o indirectamente, ya sea por contacto directo con heces contaminadas o indirectamente por la ingesta de alimentos, agua o suelo contaminados con heces infectadas (Raza et al., 2018).

La toxocariasis considerada dentro de las cinco primeras enfermedades parasitarias desatendidas más importantes, en conjunto con la enfermedad de Chagas, cisticercosis cerebral y toxoplasmosis, de acuerdo con la publicación generada por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, 2019). Esta enfermedad se encuentra presente en muchos países, al tener una alta prevalencia, independientemente de factores como la condición económica de los lugares registrados con una elevada tasa de infectados, es muy probable que el porcentaje de prevalencia sea subestimado, al carecer del número real de casos de toxocariasis por la falta de programas adecuados de vigilancia y por los ineficientes métodos de diagnóstico (Elsheikha, 2014).

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017) dio a conocer diversas recomendaciones para reducir la transmisión de *Toxocara* spp. a humanos. Primeramente, se aconseja limitar la exposición a suelos contaminados, buenas prácticas de higiene, reducir la presencia de heces de perros y gatos infectados mediante la recolección y eliminación de sus excretas, es importante recalcar que son los hospederos definitivos y son los principales eslabones en la cadena de la transmisión de toxocariasis humana (Hernández, 2018).

Hasta la fecha se tiene conocimiento de que un considerable número de hogares en nuestro país posee una mascota, ya sea perro o gato. Peña et al. (2017) mencionan que la relación entre humanos y animales tiene la misma antigüedad que el origen de la humanidad, por lo que es importante poner atención en los cuidados preventivos de las mascotas (Overgaauw et al., 2020).

2.1. *Toxocara canis*

Toxocara spp. (Beaver) es un nematodo ascárido, las especies *T. canis* (Werner) y *T. cati* (Zeder) afectan principalmente a caninos y felinos domésticos, respectivamente. Los huevos unicelulares son evacuados y se desarrollan hasta su etapa infectiva en el medio ambiente. La transmisión puede darse por vía transplacentaria, transmamaria o por la ingesta de huevos larvados o hospederos paraténicos (humanos, roedores, lagomorfos y algunas aves). Esta parasitosis puede causar muertes fetales o neonatales. Los animales adultos son menos propensos a cursar infecciones sintomáticas. Ambas especies son de importancia zoonótica, ya que en humanos puede causar síndrome de larva *migrans* ocular y *migrans* visceral, según sean los órganos afectados (Zajac & Conboy, 2012; Morales et al., 2016).

2.2. Taxonomía

Pertenece al *phylum* Nematoda, es clasificado dentro de la clase: Secernentea, subclase: Rhabditia, orden: Ascaridida, suborden: Ascaridina, superfamilia: Ascaridoidea, familia: Ascarididae, género: *Toxocara* e incluye más de 30 especies diferentes de las cuales se han descrito *T. canis* y *T. cati*, como patógenos potenciales para el humano. Estas especies se diferencian principalmente por su hospedador definitivo, aunque en la mayoría de los casos es difícil diferenciarlos morfológicamente, por lo que se precisa implementar técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por su mayor sensibilidad y especificidad (De la Fé et al., 2006).

2.3. Morfología

El aspecto del cuerpo del nematodo adulto de *T. canis* es tubular y no segmentado, son de color blanco a amarillento pálido. Los machos pueden llegar a medir entre 4 a 10 cm de longitud y 2 a 3 cm de diámetro; como en la mayoría de los helmintos la hembra presenta un mayor tamaño que alcanza medidas de entre 5 a 18 cm; esta tiene la capacidad biótica de oviponer en el intestino de su hospedero definitivo, aproximadamente 200,000 huevos/día (Archelli & Kozubsky, 2008). La forma de distinguir el sexo del parásito es por el tamaño de la espícula del macho y los rasgos distintivos del aparato reproductor femenino (De la Fé et al., 2006). Una de las características distintivas para identificar el género del parásito es mediante la observación de su boca, ya que se encuentra conformada por tres labios. Además, posee dos proyecciones cuticulares en sus extremos laterales en la parte anterior, conocidas como alas cervicales, estas miden aproximadamente 2.5 por 0.2 mm, estas estructuras le conceden al parásito la forma característica distintiva de punta de flecha (Bowman, 2011). La fase adulta frecuentemente se encuentra y permanece en el intestino delgado de los cánidos, luego de una migración hepato-cardiopulmonar, misma que realizan los distintos estadios larvarios.



Figura 1. Extremo anterior de *Toxocara canis*. Se observan las alas cervicales. Fuente: Universidad de Pensilvania, 2008.

La estructura de los huevos de *T. canis* son casi esféricos y miden aproximadamente entre 75 a 90 μm . Se observan de color marrón oscuro y no están segmentados. Están protegidos por una gruesa y rugosa cubierta compuesta tres capas concéntricas: lipídica (interna), quitinosa (media) y vitelina (externa). La capa lipídica está formada por ascarósidos (glucolípidos de nematodos compuestos por un azúcar y un alcohol unidos por un enlace glucosídico) y 25 % de proteínas. Los ascarósidos son los compuestos que le otorgan impermeabilidad al huevo de *T. canis* frente a cualquier sustancia a excepción de algunos gases o disolventes lipídico. La capa media o quitinosa como su nombre lo refiere, está compuesta por quitina, el cual es un polisacárido formado por unidades de N- acetilglucosamina, que le ofrece un soporte análogo al exoesqueleto de artrópodos. La capa externa o vitelina del huevo se asemeja más a la composición de la capa externa del parásito en fase adulta; esta es abundante en carbohidratos y se encarga de establecer los mecanismos para evadir la respuesta inmune del hospedador (Cordero & Rojo, 1999).

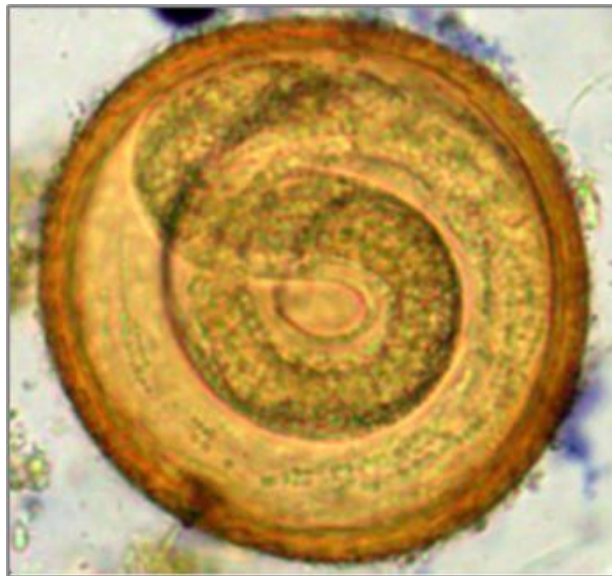


Figura 2. Huevo de *Toxocara canis*. Fuente: Departamento de Parasitología; UNAM, 2016.

2.4. Ciclo biológico

El ciclo de vida de *Toxocara canis* es complejo ya que puede desarrollarse mediante cuatro posibles modos de infección: por vía directa, ingesta de huevos larvados, vía transplacentaria y/o lactogénica (Bowman, 2011).

El desarrollo de *T. canis* en el hospedero definitivo comienza al ingerir larvas infectivas en el estadio dos (L2), después de ser deglutidas comienzan un recorrido por el tracto gastrointestinal hasta localizarse en el intestino delgado, donde pueden desarrollarse hasta la fase adulta o una vez que eclosionan los huevos, la larva penetra la pared duodenal, aquí comienza la migración somática. Una vez que alcanza el hígado (alrededor de 24 h post-infección) por medio de los capilares venosos, pasa a la vena porta donde transitará en circulación portal. Al pasar 12 h aproximadamente, las larvas se desplazan al corazón donde por medio de la arteria pulmonar pasan a los pulmones. La ruta que tomen dependerá de diversos factores como la edad y estado inmunológico del hospedador, así como la carga parasitaria. Las larvas pueden tomar la ruta del aparato respiratorio, donde en esta etapa ya son denominadas larvas en etapa tres (L3), estas pueden atravesar los alvéolos y pasar a los bronquiolos, la tráquea hasta llegar a la faringe. Finalmente, las larvas pasan a la cuarta fase de maduración (L4) donde se localizan en el intestino delgado (su órgano blanco), luego de alrededor de 7 a 15 días de la migración traqueal. Los gusanos adultos pueden vivir hasta 4 meses en el intestino delgado del canino, y se enfatiza que la hembra tiene la capacidad de producir aproximadamente 200 000 huevos/día (Schnieder et al., 2011).

Los huevos que son arrojados mediante las heces se dispersan en el medio ambiente, estos cuando son evacuados no son infectivos, necesitan condiciones óptimas para desarrollarse como una humedad relativa de 80%, oxigenación y una temperatura que oscile entre los 24 °C a 37 °C, ya que el huevo embriona a partir de la segunda a la sexta semana post-evacuación y pueden infectar otro cánidos u otros hospedadores. Los huevos finalmente eclosionan donde liberan las L2 (Quiroz, 2005).

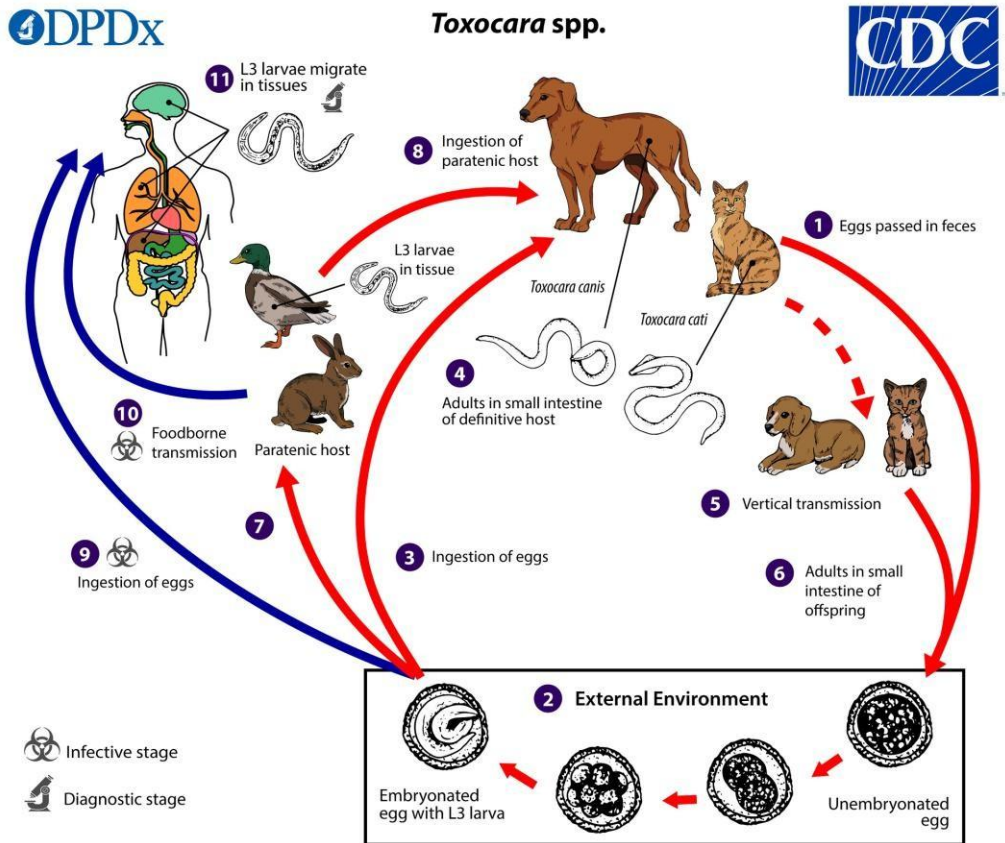


Figura 3. Ciclo de vida de *Toxocara canis*. Fuente: Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern, Center of Disease Control and Prevention (CDC), 2025.

2.5. Sintomatología

2.5.1. En animales

En cánidos en etapa de lactación y jóvenes entre 6-10 meses, se puede presentar un retraso en el crecimiento, emaciación, debilitamiento y artralgia. En general puede generar trastornos intestinales, como diarrea o estreñimiento, vómitos, abultamiento abdominal. La presentación de síntomas está relacionada con la ubicación del parásito en el hospedero y el grado de parasitosis, es posible visualizar ejemplares adultos del ascárido mediante evacuaciones de los animales (Chidumayo, 2020).

2.5.2. En humanos

Los signos clínicos dependerán del órgano afectado por *T. canis*, ya sea hígado, sistema nervioso central (SNC), pulmones y ojos, al parecer en humanos son los más comúnmente afectados. Las consecuencias patológicas dependerán del estado de las larvas, si estas mueren inducirán una respuesta de hipersensibilidad retardada o inmediata, lo que produce síntomas característicos LMV (Pinelli et al., 2007; Hamilton et al., 2008).

2.5.2.1. Larva migrans visceral (LMV)

El síndrome de LMV generalmente se presenta en niños menores de 5 a 6 años con antecedentes de geofagia o que se encuentra en estrecho contacto con su perro, por lo que es menos frecuente en adultos, sin embargo, los adultos también son vulnerables a esta infección. Se presenta con signos de afección de las vías respiratorias bajas, hepato y esplenomegalia. En un 50 % de los pacientes al realizarles estudios radiológicos se pueden observar infiltrados pulmonares transitorios. En sangre periférica se hace presente la eosinofilia la cual puede presentar con valores de 70 %. A si mismo se presentan hipergammaglobulinemia de IgM, IgG e IgE. En algunos casos se ha reportado miocarditis, nefritis y afección del sistema nervioso central como meningitis aséptica con eosinofilia en líquido cefalorraquídeo (LCR). En piel se han descrito lesiones locales como urticaria y nódulos asociados a la eosinofilia (Ciarmela, 2008; Chen et al., 2018).

2.5.2.2. Larva migrans ocular (LMO)

De igual manera, el síndrome de LMO es más frecuente en niños pequeños que en adultos, debido a las actividades que realizan y los lugares que frecuentan, como áreas recreativas. Los síntomas que se pueden presentar son: pérdida parcial de la visión (unilateral) este síntoma es considerado como el más frecuente, seguido por pérdida de la visión bilateral. La consecuencia más severa es la formación de un granuloma ya sea periférico o en el polo posterior. La endoftalmitis y la uveítis son las principales causas de la pérdida visual en la fase aguda de la infección (Despommier, 2003).

2.5.2.3. Larva migrans encubierta (LME)

El síndrome de larva migrans encubierta el parásito se encuentra en el músculo estriado sin causar síntomas que pudieran dar indicios de una infección por *T. canis*. Puede generarse en personas que hayan tenido una primoinfección y se presenten signos clínicos nuevamente, ya que las larvas tienen la capacidad de sobrevivir por meses e inclusive años hasta que el hospedero muera (Rojas et al., 2016).

2.6. Epidemiología

La toxocariasis tiene una distribución global, se han reportado diversos estudios como la revisión de literatura realizada por Okulewicz et al. (2012), la cual muestra la relevancia que tiene *T. canis* y *T. cati* en animales carnívoros silvestres y domesticados en diversas partes del mundo. Szabová et al. (2007) detectaron en la República Eslovaca que el 53.2 % de los cachorros de perros de hasta 6 meses, el 37.5 % de los cachorros de 6 a 12 meses y el 18.8 % de los perros de más de 1 año, estaban infectados con *T. canis*. Así mismo, en Rumanía Mircean et al. (2010) observaron que *T. cati* también muestra tendencia de prevalencia dependiente de la edad. Por ejemplo, encontraron una prevalencia de infección del 30.8 % en gatos jóvenes y del 13.1 % en animales adultos.

Vélez et al. (2014) estimaron la prevalencia de parásitos con potencial zoonótico en heces caninas procedentes de Puerto Escondido, Oaxaca, México. En el primer semestre del año 2012 se recolectaron 180 muestras de heces, de las cuales en el 47.78 % se detectó *T. canis*. Para la obtención de las muestras, la ciudad fue dividida en diez zonas, ocho habitacionales limitadas por avenidas, de las cuales dos de ellas eran principales. Las zonas se categorizaron por tres hábitats (natural no creado por el hombre, urbano y suburbano). Con base en la metodología, se emplearon técnicas coproparasitológicas convencionales (frotis directo y flotación simple), implementadas por el documento de Métodos Básicos de Laboratorio en Parasitología Médica de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1992).

Rangel & Sahagún (2016) elaboraron un estudio retrospectivo sobre las fluctuaciones poblacionales de parásitos gastrointestinales en cánidos en situación de calle, en la ciudad de Irapuato, Guanajuato, México. En un periodo que abarcó desde el año 2010 al 2015, se identificaron cinco especies de nematodos de 1,830 muestras examinadas, en las cuales se destacaron *A. caninum* y *T. canis* con una mayor prevalencia (56.8 % y 47.2 % respectivamente).

Villeneuve et al. (2015) determinaron la prevalencia de parásitos en perros y gatos de refugios provenientes de provincias canadienses. Analizaron un total de 1086 muestras de heces caninas y 636 felinas de 26 refugios, empleando una técnica de flotación con doble centrifugación y solución glucosada. Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para distinguir las especies de *Taenia* spp. y *Echinococcus* spp. La prevalencia global fue de 33.9 % (IC 31.1-36.8) para caninos y de 31.8 % (IC 28.2-35.5) para felinos. Identificaron 11 especies diferentes de parásitos en perros y ocho en gatos. *T. canis* fue el parásito con mayor prevalencia en perros (12.7 %, IC 10.8-14.8) y *T. cati* (16.5 %, IC 13.7-19.6) en el caso de gatos.

Ezema et al. (2019) evaluaron los factores de riesgo, implicaciones para la Salud Pública y la prevalencia de parásitos gastrointestinales en perros originarios de Maiduguri, Borno, Nigeria. Examinaron 200 muestras fecales frescas por medio de la técnica de flotación de cloruro de sodio saturado; para la detección de huevos y oocistos se basaron en la identificación morfológica y tamaño de estos. La prevalencia fue de 31.5 %, más alta para los pacientes machos jóvenes que vivían al aire libre, en términos de edad, sexo y manejo; la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$). *Toxocara* spp. fue el segundo grupo de helmintos detectados, con una prevalencia del 7.0 %.

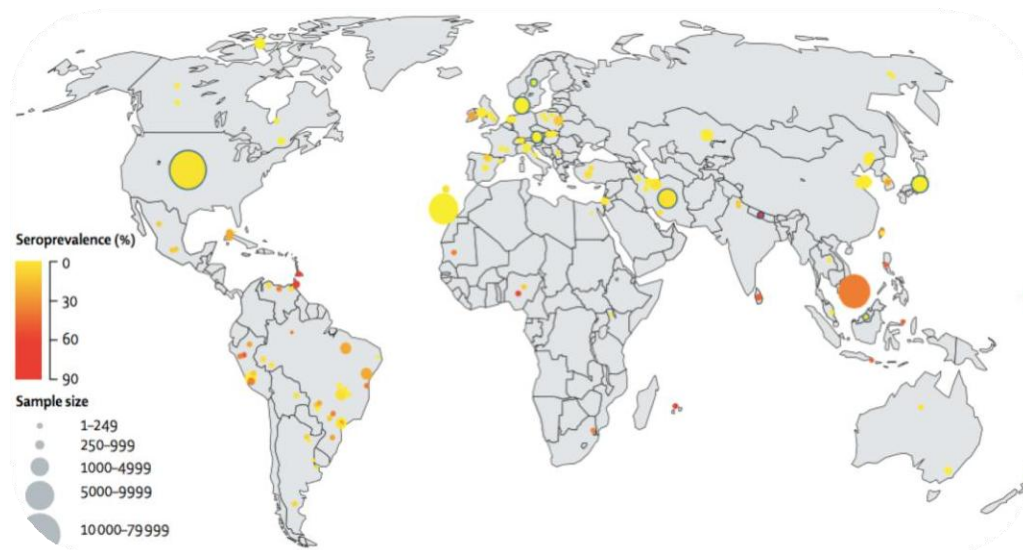


Figura 4. Prevalencias y número de individuos examinados (cada punto amarillo con un halo azul representa una encuesta nacional definida) Fuente: Ma et al., 2018.

2.7. Tratamiento

Los fármacos más empleados en la práctica médica para tratar la toxocariosis tanto en humanos como en animales, son el albendazol (ABZ) y el mebendazol. Sin embargo, ambos fármacos poseen limitantes. Por ejemplo, el ABZ presenta limitada eficacia contra las larvas en tejidos, aunque este es preferible ya que cuando se metaboliza, este se distribuye ampliamente a través de los tejidos a diferencia del mebendazol que solo se absorbe en el tracto gastrointestinal (Pawlowski, 2001).

Aunque el albendazol es un antihelmíntico muy empleado y seguro, es necesario un control exhaustivo de su administración ya que además de tener efectos secundarios es importante cuidar su eficiencia, ya que en los últimos años se han reportado resistencias a diversos antihelmínticos debido a su uso indiscriminado en la ganadería (Hombu et al., 2017). Existe una variedad de fármacos antihelmínticos, otros de los productos generalmente utilizados para el tratamiento de la toxocariasis pertenecen al grupo de los carbamatos de benzimidazol, pero el principal obstáculo de estos fármacos es la insuficiente biodisponibilidad en tejidos a causa de su baja solubilidad y su requerimiento de altas dosis durante largos períodos (Woodhall et al., 2014).

2.8. Diagnóstico

En medicina veterinaria, los métodos convencionales para identificar y diferenciar *T. canis* de las diferentes especies pertenecientes al género de *Toxocara*, se basan principalmente en análisis microscópicos de muestras fecales. Las especies como *T. leonina*, *T. cati* y *T. canis* pueden ser diferenciadas por la morfología de sus alas cefálicas, sin embargo, identificar estas estructuras es complicado y se necesita de personal especializado y capacitado para este tipo de análisis. Dado que la identificación morfológica mediante técnicas microscópicas carece de sensibilidad y especificidad, aunque se emplee un método preanalítico de enriquecimiento mediante el uso de técnicas de centrifugación-flotación, esta técnica puede fallar en la discriminación de huevos pertenecientes a otras especies de *Toxocara* (Durant et al., 2012).

Diversas investigaciones se han centrado en el desarrollo y mejoramiento de diferentes métodos moleculares basados en el PCR, por su alta sensibilidad y especificidad, para la detección confiable de diferentes especies de parásitos, en especial *Toxocara* spp. Se han informado numerosos métodos de PCR para la detección e identificación de *T. canis* y *T. cati* en heces de perros, zorros y gatos (Oguz et al., 2018). No obstante, a pesar de los logros obtenidos por las investigaciones, existen inconvenientes que impiden su implementación en la detección rutinaria de *Toxocara* spp. tanto en medicina veterinaria como en sector salud. Esto a consecuencia de la falta de personal capacitado, instalaciones y equipo necesario para evitar riesgos de contaminación, falta de automatización y estandarización (Norhaida et al., 2008; Chen et al., 2018).

2.8.1. Diagnóstico por microscopía

En animales parasitados lo más habitual para el diagnóstico de diferentes helmintiasis, incluyendo la causada por *T. canis*, se basa en el empleo del método coproparasitoscópico. Los huevos embrionados pueden ser observados en el examen microscópico, a diferencia del ser humano, ya que en él no se pueden apreciar mediante esta técnica, a consecuencia del ciclo biológico que lleva el parásito en este hospedero

paraténico, por lo que es indispensable utilizar otra metodología alternativa (Rojas et al., 2016; Antonopoulos et al., 2024).

2.8.2. Diagnóstico por flotación-centrifugación

La detección de huevos por técnicas de flotación-centrifugación es la prueba comúnmente utilizada en medicina veterinaria. En conjunto con la técnica coproparasitoscópica son las técnicas de gabinete. A diferencia del examen coproparasitoscópico la técnica de flotación es un poco más confiable, ya que separa los parásitos en sus diferentes estadios (huevos, ooquistes, quistes y larvas) de otros residuos, basándose en la diferencia de densidades. Se establece que la densidad es el peso del parásito o su diferente estadio por unidad de volumen y se expresa en gravedad específica. Esta metodología requiere de implementar una solución correcta con la densidad indicada que varía entre 1.18 a 1.20, algunas implementan una cantidad de sal y otras de azúcar (Köchle, 2019).

2.8.3. Diagnóstico molecular

Las técnicas moleculares tienen una elevada especificidad y sensibilidad, los tiempos de respuesta son más cortos que los diagnósticos generalmente empleados (microscopia directa, serodiagnóstico e imagenología). Diferentes ensayos se desarrollaron basados en PCR, los cuales utilizan una gran variedad de marcadores genéticos como, por ejemplo, las regiones ITS-1 e ITS-2 del ADNr, las cuales permitieron la identificación y el análisis filogenético de *T. canis*, *T. cati*, *T. leonina* y de otros ascáridos. La técnica de PCR fue utilizada para la identificar larvas de *T. canis* obtenidas de biopsias de tejido en humanos con síndrome de LMO y muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) en pacientes con larva migrans neuronal (LMN). Se implementaron diferentes tipos de ensayos moleculares como PCR en tiempo real (qPCR), PCR con polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) y PCR basada en ADN polimórfico amplificado al azar, para el diagnóstico preciso e identificación de huevos aislados de heces y suelo. Los métodos moleculares con

rendimiento mejorado tienen considerable potencial, pero su empleo sigue teniendo ciertas desventajas (Overgaauw & Knapen, 2013).

2.8.4. Diagnóstico inmunológico

En el diagnóstico de la toxocariasis humana es común recurrir a las pruebas serológicas, con la finalidad de respaldar el diagnóstico clínico. La inmunolectroforesis (IEP por sus siglas en inglés) mostraron una buena especificidad, pero su desventaja es la baja sensibilidad, lo que limita su empleo en el entorno clínico (Fillaux & Magnaval, 2013).

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), que emplea antígenos excretores y secretores del estadio larvario L3 de *T. canis* se utiliza en la actualidad para el diagnóstico de esta infección parasitaria zoonótica. La principal limitante de esta prueba es la significativa reactividad cruzada frente a otras helmintiasis, como la ocasionada por *Ascaris lumbricoides* (Zahabiun et al., 2015). El nivel de IgG en suero puede encontrarse alto durante un largo tiempo, quizás hasta años, lo que limita la discriminación entre infecciones activas, latentes y persistentes. A pesar de los posibles resultados falsos positivos, estos ensayos tienen valor clínico que no debe ignorarse, ya que es una herramienta que puede ayudar a descartar la enfermedad en casos donde el resultado sea negativo. Las pruebas serológicas para detectar *T. canis* pueden tener un valor no significativo en la evaluación del progreso de la enfermedad neuronal, ya que los resultados para detección de anticuerpos de *T. canis* en suero pueden ser positivos, pero negativos en muestra de LCR. Se ha comprobado que la utilización de antígenos *Toxocara* recombinantes aumentan considerablemente la sensibilidad y especificidad. En estudios seroepidemiológicos se utiliza generalmente una combinación de pruebas de diagnóstico para mejorar la sensibilidad y especificidad, por ejemplo, se emplea inicialmente un ELISA como prueba rápida y de bajo costo, después como prueba confirmatoria se utiliza *Western blotting* (Zibaei et al., 2013). Es posible detectar específicamente anticuerpos totales de IgG anti-*Toxocara* y algunas subclases como: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Varios antígenos (crudos y semipurificados) de larvas *T. canis* (TCLA), se utilizan para detectar IgM, IgG o IgG4 mediante el ELISA y obtuvieron sensibilidad y especificidad

satisfactorias. Además, la utilización del ELISA basado en IgE e IgM se puede utilizar para evaluar el efecto terapéutico de distintos fármacos, al dar seguimiento por el título de anticuerpos post-tratamiento (Jin et al., 2013).

2.8.4.1. Inmunodiagnóstico a base de antígenos excretor-secretor (TES)

La presencia de eosinofilia crónica en suero es un indicador confiable en el diagnóstico de helmintiasis, pero las técnicas de laboratorio usadas más efectivas y económicas son las pruebas inmunológicas (Fillaux & Magnaval et al., 2013).

El inmunodiagnóstico que utiliza antígenos TES de la larva L2/L3 de *T. canis* es muy empleado, pero su producción es compleja y su falta de especificidad como se menciona anteriormente, hace que no se recomiende su uso. Se han descrito varios componentes de TES, como TES-32 (proteína de 32 kDa), TES-55 (55 kDa), TES-70 (70 kDa), TES-120 (120 kDa) y TES-400 (400 kDa). Todas estas proteínas se encuentran glicosiladas, son antigénicas y están presentes en diferentes especies de *Toxocara* y otros ascáridos (Tabla 1). La proteína TES-32 es una de las más secretadas, pero presenta limitaciones al tener similitud significativa con lectinas C presentes en células inmunes de distintos mamíferos en respuesta a la exposición de patógenos (Sperotto et al., 2017; Antonopoulos et al., 2024).

Tabla 1. Proteínas empleadas en el diagnóstico de Toxocariosis (modificada de Maizels et al., 1984).

Antígenos Nativos		Antígenos recombinantes	
Excreción/Secreción	Superficie larvaria	Pm (kDa)	Función
Pm (kDa)	Pm (kDa)		
		26	Proteína de unión a fosfatidiletanolamina
32	32	32	Lectina tipo C (dependiente de calcio)
	Componentes intermedios	45	Lectina (no confirmado)
55		55	Lectina
70		70	Lectina tipo C
120	120	120	Mucina
400		400	Análogo de proteoglicanos

A causa de las adversidades que presenta la producción de antígenos TES nativos mediante el cultivo *in vitro* de larvas L2/L3, así como la presentación de reacciones cruzadas hacia otras helmintiasis, se limita la utilización de TES nativos. Una solución a este problema sería la identificación de proteínas TES recombinantes específicas y su producción mediante el empleo de algún vector (Fig. 5). Algunas proteínas recombinantes ya se reportaron, como la TES-30, la cual presento una alta especificidad en comparación al kit comercial generalmente usado para el diagnóstico de la toxocariasis humana (Olave et al., 2016). Otras proteínas con potencial que se han considerado son rTES-26 rTES-30 y rTES-120, al mostrar un alto nivel de sensibilidad cuando son utilizadas en combinación (Romano et al., 2010).

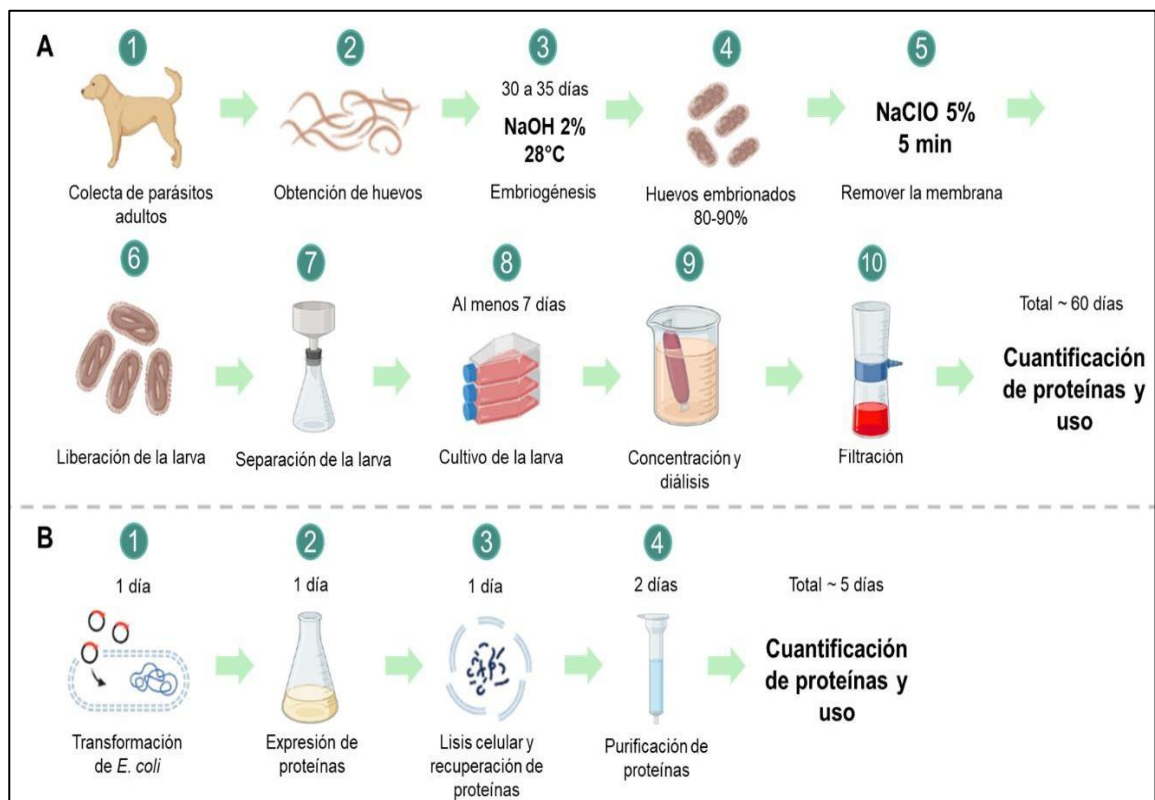


Figura 5. Obtención de TES nativos (A) por método de De Savigny (1975) y recombinantes (B) por Moreira et al., 2014 para su implementación como antígeno. Modificado de Echeverría, 2016.

Santos et al., 2019 diseñaron un ELISA indirecto en base a las proteínas recombinantes TES (TES-30 y TES-120) en donde obtuvieron resultados positivos, sin embargo, destacan que la proteína que se emplee dependerá de la especie animal que se busque diagnosticar.

Los componentes antigénicos del complejo TES aún no se identifican, los cuales pueden ser objetos de estudios para fortalecer el diagnóstico o inclusive para desarrollar de una vacuna para enfermedades parasitarias. Para identificar las proteínas involucradas en la infección hay diversas herramientas como la espectrometría de masas, esta presenta buena efectividad para la identificación de proteínas, gracias a su gran precisión, sensibilidad y capacidad para analizar componentes individuales dentro de mezclas complejas. En la actualidad, se cuenta con la secuencia completa del genoma de *T. canis*, lo que ayuda a la identificación de componentes de TES más específicos (Santos et al., 2020; Mesa et al., 2022).

2.8.4.2. Inmunoensayo ligado a coproenzimas (copro-ELISA) tipo sándwich

Jara et al. (2019) reportaron una posible estrategia para el diagnóstico de diversas helmintiasis, el ELISA tipo sándwich de coproantígeno (copro-ELISA). El estudio consistió en diseñar un inmunoensayo ligado a “coproenzimas” para facilitar el diagnóstico de equinococosis en muestras fecales de caninos. Este ensayo consiste en una prueba de laboratorio específica y sensible. Los parásitos liberan productos metabólicos en el intestino del hospedero, estos productos pueden ser aprovechados para su utilización como antígenos para la detección inmunológica. Al no haber kits comerciales disponibles para el diagnóstico de coproantígenos de *E. granulosus*, el ensayo tipo sándwich ofrece un desarrollo de una metodología simplificada para su uso en la detección activa de caninos procedentes de regiones endémicas de esta parasitosis. El camino para la elaboración del ensayo que facilite su empleo, diagnóstico e interpretación de diversas enfermedades parasitarias, cada vez es más explorado.

2.8.5. Proteínas excreción- secreción de *T. canis* (TES)

Estudios han reportado diversas proteínas de excreción-secreción de helmintos que se involucran en la evasión de la respuesta inmune del hospedador (Fig. 6). Algunos productos de excreción-secreción tienen la capacidad de bloquear la respuesta de IL-12p70, como una estrategia para protegerse de la respuesta inmune de tipo Th1. La fase larvaria de *T. canis* tiene el potencial de afectar a una amplia gama de hospederos, provoca diferentes síndromes según el órgano que afecte. Los productos que produce la larva estimulan la respuesta inmune tipo Th2, se identifican principalmente glicoproteínas simples derivadas de tres genes diferentes. Estas moléculas se conforman por dos lectinas de tipo C y tres tipos de mucinas, las cuales presentan glucanos ligados a O, semejantes al grupo sanguíneo tipo H de mamíferos. Las mucinas similares al grupo H son uno de los objetivos primordiales de IgM, presentes en el curso de la infección. Estos glicanos de *T. canis* favorecen la regulación inmunitaria, al unirse a la lectina DC-SIGN (Hewitson, Grainger & Maizels, 2009).

Las lectinas de tipo C son los componentes más abundantes en los productos de secreción de *T. canis*, su desempeño aun no es del todo claro; sin embargo, las proteínas TES-32 y TES-70 se ha observado cierta homología en cuanto a proteínas presentes en mamíferos, así como la CD23 y receptor de manosa en macrófagos. Los glicanos juegan un papel importante en la modulación de la respuesta inmune, además, de tener la capacidad de producir una respuesta del TLR (Toll like-receptor) y de los receptores de lectinas tipo C en células dendríticas, donde interfieren sobre su activación para evadir la respuesta inmune. En los últimos años, los productos TES han ganado atención gracias a su funcionamiento en el hospedero, han sido catalogados como buenos candidatos para su implemento en vacunas, pruebas diagnósticas y fármacos. Al involucrarse en la respuesta inmune, se generan anticuerpos que intervienen en el bloqueo de la acción y la sobrevivencia del parásito, mientras que, al emplearlos en pruebas diagnósticas, estos ayudan a incrementar su detección (Gazzinelli & Nutman, 2018).

Se han descrito una serie de proteínas TES mediante el empleo de un SDS-PAGE, donde se visualizan diferentes bandas que van desde los 26 hasta 400 kDa. El 40 % de las proteínas TES, se encuentran con un alto grado de glicosilación (Maizels, 2013).

Diferentes estudios observaron que el empleo de estas proteínas en ensayos ELISA, entre mayor fuera su peso molecular, mayor reactividad cruzada presentaban frente a otras parasitosis (Smith *et al.*, 2009). Las proteínas TES se encuentran conformadas por una gran variedad de familias, de las cuales se destacan seis diferentes mucinas relacionadas a la cutícula del nematodo, cuatro lectinas de tipo C, cinco variedades de superóxido dismutasa, homólogos de ASP, proteínas de unión a fosfatidiletanolamina, entre otras (González *et al.* 2014). La producción de estos componentes se estudia hasta la fecha, algunas investigaciones estiman que la larva produce hasta 2 ng de glicoproteínas por día, en las que se incluyen las lectinas, mucinas y diversas enzimas. La larva tiene la capacidad de mudar constantemente la capa proteica de la cutícula, se estima que cambia hasta un 50 % en una hora y el 80 % en 48 h. Esta capacidad le da la propiedad de evadir el sistema inmune, al impedir que los anticuerpos reconozcan o reaccionen con la nueva muda (Despommier, 2003). Gracias a esta peculiaridad, las proteínas secretadas producen una mayor reactividad en la respuesta inmune, en comparación con los antígenos somáticos que quedan expuestos en la destrucción de la larva, los cuales la mayoría muestran potencial alergénico (Badri *et al.*, 2020; Ayelign *et al.*, 2020).

Las proteínas TES-120 están conformadas por una familia de mucinas que secreta *T. canis*, estas no presentan dominio de unión a la membrana y son el componente principal de la superficie larvaria. En su estructura presentan un dominio en tándem de seis cisteínas en el C-terminal, el cual se asocia a otras proteínas de distintos parásitos, como muestra de conservación evolutiva de los mismos. Las TES-120 se componen de cinco mucinas conocidas como Tc-MUC-1, Tc-MUC-2, Tc-MUC-3, Tc-MUC-4 y Tc-MUC-5, estas presentan repeticiones de aminoácidos de treonina y serinas, donde se genera la O-glicosilación. La proteína Tc-MUC-1 se encuentra en la superficie larvaria en mayor proporción y muestra un alto potencial inmunogénico, ya que brinda protección al parásito frente a anticuerpos y eosinófilos. Estas pueden ser reconocidas por los anticuerpos, sin embargo, contrarrestan la acción de estos al no permitirles el acceso directo a la larva. El potencial inmunogénico de las mucinas puede estar influenciado por factores como su ubicación, estas al encontrarse en la superficie más externa del parásito, son fácilmente detectadas por el sistema inmune. La estructura también es un factor que influye en su poder antigénico, al poseer glicanos de largas cadenas conjugados a

proteínas, aumenta su antigenicidad. Por último, la densidad es mayor en antígenos formados por glicanos en comparación con un epítipo específico para proteínas, ya que una sola glicoproteína tiene estructuras grandes formadas por un glicano (Maizels, 2013). El tamaño de Tc-MUC-5 es mucha más grande y divergente en comparación con el resto de las mucinas, lo cual sugiere no encontrarse dentro del grupo de proteínas de superficie TES-120. En el SDS-PAGE las mucinas tienden a formar en conjunto una banda de 120 kDa, sin embargo, un análisis por espectrometría de masas demostró que estas son de menor tamaño. Esto se atribuye a su gran contenido de carbohidratos, Tc-MUC-1 presenta un peso molecular de 39.7 kDa, Tc-MUC-2 de 47.8 kDa, Tc-MUC-3 de 45 kDa (Dlugosz et al. 2015).

La familia TES-26 o también conocida como Tc-PEB-1 es un homólogo de la proteína de unión a fosfatidiletanolamina presente en mamíferos. No obstante, esta familia presenta diferencias estructurales entre esta última, ya que mantiene seis cisteínas similares a TES-120. Se han detectado otros homólogos de TES-26 presentes en la microfilaria y en el adulto de *Brugia malayi* (Hewitson, Grainger & Maizels, 2009).

Las proteínas de excreción-secreción recombinantes y sin glicosilación han mostrado aumentar la especificidad y sensibilidad en la técnica empleada. El implemento de antígenos nativos mediante la técnica Western Blot, mostró un aumento en la especificidad con antígenos de bajo peso molecular y los de mayor peso elevada reactividad cruzada frente a otras parasitosis. Tal resultado demuestra que TES-26 es un buen candidato para su implementación en pruebas diagnósticas como marcador de toxocariasis (Mohamad et al., 2009; Thomas et al., 2016).

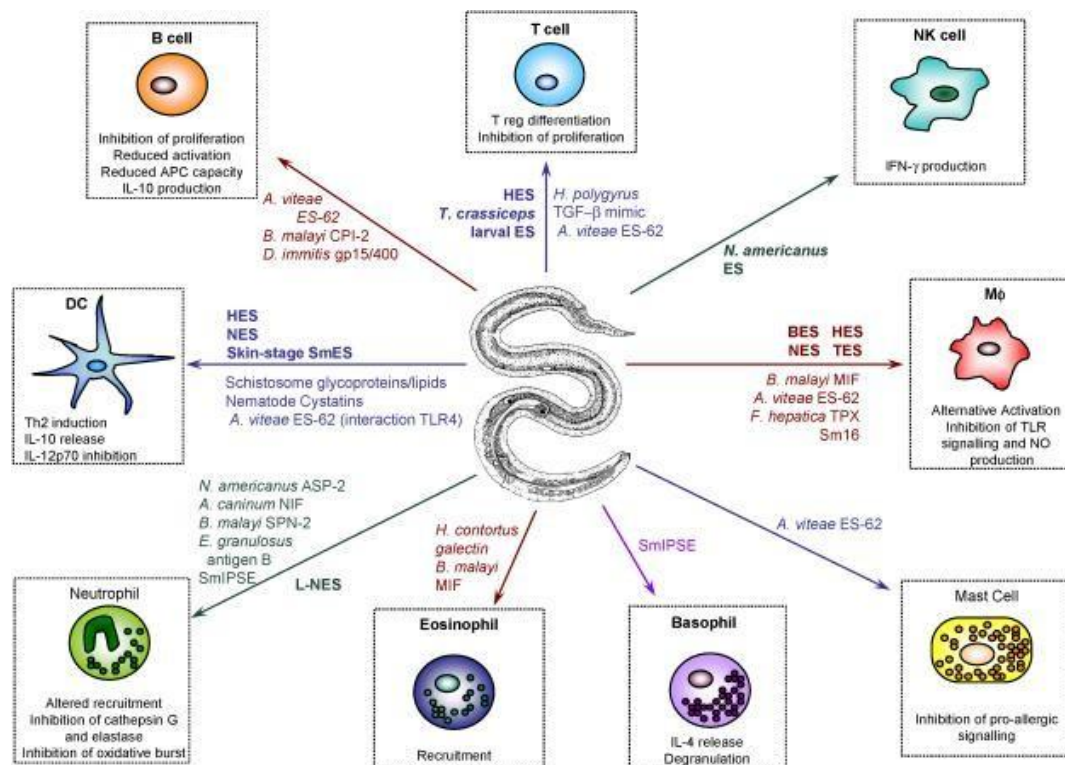


Figura 6. Productos ES de helmintos y sus posibles mecanismos sobre la modulación inmune del hospedador. Fuente: Hewitson, Grainger & Maizels, 2009.

2.8.6. Anticuerpos empleados en ELISA

La búsqueda del isotipo de anticuerpo ideal para aumentar la especificidad y sensibilidad en las pruebas ELISA continúa en estudio. Actualmente, se cuenta con ELISA comerciales que detectan IgG total, sin embargo, para establecer la fase en la cual cursa el paciente, se indica la detección de IgM, la cual es un marcador clásico en la detección de la fase aguda. La detección de esta inmunoglobulina es controversial, ya que es difícil detectar la fase aguda de la enfermedad, al presentar signos tan variables, esta se detecta generalmente en su fase crónica (Hewitson, Grainger & Maizels, 2009). Alguno de los síntomas de la toxocariasis puede llegar a inducir reacciones alérgicas, mostrando un aumento de eosinófilos y nivel de IgE en sangre. Los anticuerpos que se han detectado son IgE, IgM e IgG en pacientes positivos (Nandini et al., 2022). Los anticuerpos que presentan mayor especificidad son IgG, mientras que IgE e IgM se encuentran presentes cuando se cursa la etapa aguda. Los anticuerpos IgG suelen ser el blanco en el empleo de

técnicas inmunológicas, estudios han detectado una mayor especificidad y sensibilidad en el subtipo IgG4 (Mohamad et al. 2009). En un estudio realizado por Noordin et al. (2005) evaluaron dos tipos de ELISA: IgG-ELISA e IgG4-ELISA, esta última mostró mayor especificidad, mientras que la IgG-ELISA presentó mayor sensibilidad. Un inconveniente que presentan los ELISA a base de IgG es que no distingue entre una enfermedad activa a una pasada, ya que IgG se puede encontrar en circulación durante largos periodos de tiempo, después de la exposición a *T. canis*. Una alternativa a la solución de este inconveniente sería el uso de IgE, ya que está sus niveles disminuyen en el primer año al recibir tratamiento con tiabendazol, esto permite diferenciar entre una infección activa a una pasada y además dar seguimiento al paciente confirmado (Roldán et al., 2010; Maizels, 2013). Otra estrategia implementada fue el diseño del ELISA-Avidez-IgG, esta se basa en el uso de proteínas nativas y urea para disociar la unión entre el antígeno y anticuerpo. Las infecciones pasadas se relacionan más anticuerpos con una mayor avidéz, mientras que infecciones muy recientes presentan anticuerpos con menor avidéz (Adán et al., 2007; Archelli & Kozubsky, 2008).

Uno de los retos más difíciles que se enfrentan los diferentes tipos de ELISA desarrollados, es su implementación en lugares donde existen poliparasitosis. La razón principal son las reacciones cruzadas que estos puedan presentar al carecer de una elevada especificidad. Estas reacciones cruzadas frente a parásitos como *Ascaris* spp., *Trichuris* spp., *Schistosoma* spp., *Strongyloides* spp., entre otros, no se ha podido contrarrestar del todo. A pesar de esto, se siguen estudiando posibles estrategias, como combinaciones de algunos antígenos y la detección de algunos isotipos de anticuerpos para su implementación y eliminar el problema de reactividad cruzada frente a otras parasitosis (Hewitson, Grainger & Maizels, 2009).

III. JUSTIFICACIÓN

Las técnicas convencionales para el diagnóstico de toxocariasis tanto en humanos como en animales suelen llevar tiempo para su realización y carecen de sensibilidad y especificidad, por el contrario la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiene alta sensibilidad y especificidad para detectar especies de *Toxocara* difíciles de diagnosticar por microscopía, sin embargo, se presentan inconvenientes para su uso rutinario, ya que se necesita personal capacitado para su elaboración, además de instalaciones y equipo específico. Debido a estas limitantes se necesita desarrollar una alternativa, más segura, rápida, eficaz y de bajo costo (en comparación con PCR), para su uso en la clínica, como el uso de técnicas inmunológicas. Así se plantea el uso de un ensayo ligado a enzimas (ELISA) tipo sándwich a base de un antígeno recombinante específico de TES. Ya que su importancia radica en una detección temprana en el hospedero definitivo (canino) para evitar que *T. canis* sea transmitido a los humanos, especialmente a la población más susceptible, los niños.

IV. HIPÓTESIS

La detección de antígenos de *Toxocara canis* mediante el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) es más sensible y específico en comparación con los métodos microscópicos para su diagnóstico.

V. OBJETIVO DEL TRABAJO

Objetivo general

Evaluar y diseñar un ELISA a base de anticuerpos anti-TES de *T. canis* para el inmunodiagnóstico de la toxocariasis en cánidos.

Objetivos específicos

1. Colectar muestras fecales de cánidos provenientes de centros antirrábicos y clínicas veterinarias.
2. Determinar la eficiencia *in sillico* de un péptido multiepítopo derivado de las proteínas TES-26, TES-30 y TES-120 mediante diversos servidores.
3. Clonar, expresar y purificar el péptido multiepítopo recombinante TES.
4. Obtener un extracto antigénico TES nativo mediante el cultivo *in vitro* de larvas L2 de *T. canis*.
5. Producir anticuerpos policlonales contra el péptido multiepítopo recombinante y al extracto antigénico TES nativo.
6. Evaluar la efectividad de anticuerpos policlonales mediante ELISA tipo sándwich en muestras fecales de cánidos.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Área de estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Patología Molecular y Experimental así mismo se contó con el apoyo del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia perteneciente a la misma institución.

En la presente investigación se utilizaron muestras de heces provenientes de canidos que mostraban sintomatología típica de cursar con una parasitosis gastrointestinal y de pacientes sanos, analizadas por microscopia óptica, el cual se utilizó como estándar de oro, para el reconocimiento de *T. canis* y otras parasitosis. Tales muestras fueron colectadas de caninos de edad entre los 6 meses a 13 años, provenientes de clínicas veterinarias y centro antirrábicos del Estado de Nuevo León durante el periodo del 2021-2022 (Figura 7). Como controles positivos se emplearon muestras positivas a *Toxocara canis* y para evaluar la reactividad a otras helmintiasis, se utilizaron muestras positivas a *Trichuris vulpis*, *Dipylidium caninum*, *Ancylostoma caninum* y *Strongyloides stercoralis*, además se utilizó en muestras positivas al protozoario *Giardia duodenalis*. Todas donadas de la coproteca del Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

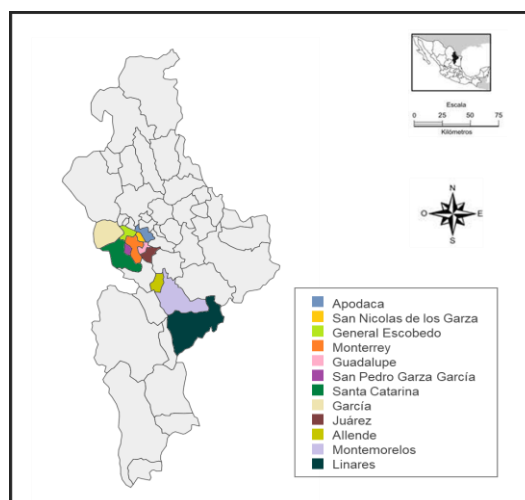


Figura 7. Mapa del estado de Nuevo León muestra los sitios de recolección; zonas suburbanas (Allende, Montemorelos y Linares) y área urbana (Apodaca, San Nicolás de los Garza, General Escobedo, Monterrey, Guadalupe, San Pedro Garza García, Santa Catarina, García).

6.2. Obtención de péptido recombinante (rTES)

El diseño del péptido recombinante se realizó a partir de la secuencia de las proteínas TES-26, TES-30 y TES-120 de *T. canis*, reportadas en el *GenBank* (números de acceso U29761, AB009305 y U39815 respectivamente). La recuperación de aminoácidos (aa) de las secuencias de las proteínas TES fueron obtenidos a través de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), se utilizó el formato FASTA para el análisis bioinformático. Se sometieron a diferentes programas predictivos para determinar tres secuencias de 20 aa candidatos, con un grado de antigenicidad aceptable (cercano al valor 1). Se emplearon servidores como Bepitope, [ABCpred](#), [BCEpred](#), [BepiPred-3.0](#) y [SVMTriP](#).

Se seleccionó una secuencia de cada proteína TES, cuyo valor de antigenicidad fuera aceptable. Después se emplearon conectores (linkers) para el diseño del péptido quimérico, el cual se eligió para continuar con el ensamblaje del constructo, donde se determinaron las propiedades de antigenicidad, solubilidad, fisicoquímicas, alergénicas y de toxicidad, con ayuda de los servidores [VaxiJen](#), [Protein Sol](#), [CrystalP2](#), [AllerTOP](#) y [ToxinPred](#). Además, se utilizaron los servidores [IL-4 pred](#) y [IL-10 pred](#) para identificar las regiones que inducen las citocinas IL-4 y IL-10, con base al método SVM con un umbral de -0.3.

Posteriormente se realizó un análisis para la predicción de estructuras secundarias mediante el servidor SOPMA y para estructuras terciarias con [I-TASSER](#), y se subprocesaron por el metaservidor [LOMETS](#).

Se realizó un refinamiento del mejor modelo propuesto, mediante el servidor [GalaxyRefine](#), el cual sustituye aminoácidos por rotámeros con alta probabilidad y simula una relajación estructural mediante dinámica molecular.

La herramienta [ElliPro](#) del servidor IEDB se utilizó para mostrar la predicción de epítomos conformacionales de células B en el péptido quimérico. El servidor predice mediante tres pasos: agrupación de residuos vecinos, índice de protrusión residual (PI) y estimación estructural de la proteína. Es uno de los mejores predictores conformacionales de epítomos de células B con una AUC de 0.732.

El empleo del servidor [Disulfide by Design 2.0](#) (DbD2), ayudó a la predicción de la formación de posibles enlaces disulfuro, los cuales mejoran la conformación estructural de la proteína, al brindarle estabilidad.

Se realizó la traducción inversa de la secuencia de proteínas y la adaptación de codones se realizó según la cepa K12 de *Escherichia coli* (*E. coli*) mediante el servidor Sequence Manipulation Suite y JCat. Dado que los sitios de restricción para las enzimas Eco53 KI y Eco RV dentro de la secuencia diseñada no estaban presentes, excepto para los extremos 3' (Eco53 KI) y 5' (Eco RV), se emplearon para la clonación *in silico*. Para este propósito, la secuencia de corte de cada enzima se agregó a la secuencia final además de las secuencias de Shine-Dalgarno (AGGAGG), etiqueta H6 y codones de inicio/parada.

El péptido recombinante se envió a servicios externos de la compañía Distribuidora BakterLab, S.A. de C.V. Monterrey, México, para su síntesis (Olave et al., 2016).

6.2.1. Transformación de células calcio-competentes *E. coli* TOP10

Se utilizó la cepa *E. coli* TOP10 de la empresa Novagen (Darmstadt, Alemania), transformada con protocolos estándar de choque térmico y cloruro de calcio (Olave et al., 2016). Para reactivar la cepa se tomó una colonia y se incubó en 4 mL de medio Luria Bertani (LB) a 37 °C toda la noche agitación (260 rpm, OD₅₅₀= 1.0-2.0). Se tomaron 200 µL de cultivo y se inocularon en 50 mL de caldo LB sin ampicilina a 37 °C en agitación (260 rpm) durante aproximadamente 4 h, hasta alcanzar una OD₅₅₀ = 0.6, la cual se midió en un espectrofotómetro modelo Spectronic (Milton Roy Company, New York, NY, EE. UU.). Después de obtener la densidad requerida, se procedió a colocar 1.5 mL de cultivo en tubos Eppendorf® estériles. Enseguida se centrifugaron los tubos con el inóculo a 10,000 rpm durante 1 minuto. Se retiró el sobrenadante de cada tubo con cuidado, para dejar el pellet de bacterias. Se agregaron 1.2 mL de solución CaCl₂ (50 mM) estéril y se incubó durante 20 min en hielo. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 10,000 rpm durante 2 min. Se retiró el sobrenadante y se suspendió en 50 µL de solución CaCl₂ (50 mM) estéril, colocándoles 3 µL (300 ng) del plásmido pET-22b (+), se mezcló por inversión sin pipeteo

ni vórtex. Se procedió a realizar un shock térmico a las células competentes más el plásmido, las cuales se colocaron en hielo durante una hora con agitación cada 10 min. Posteriormente se incubaron en baño maría a 40 °C durante un minuto. Después se colocaron nuevamente en hielo, se les añadió 250 µL de medio LB a temperatura ambiente y se agitaron 200 rpm a 37 °C. De las células transformadas, se tomaron 100 µL para sembrar placas selectivas de agar LB con 100 µg/mL de ampicilina (Pierce) y se incubaron a 37 °C toda la noche (Olave et al., 2016).

6.2.2. Purificación del ADN plasmídico

Las colonias que crecieron en el medio selectivo LB adicionado con ampicilina (100 µg/ml) fueron crioconservadas. Se tomó una asada de una colonia aislada y se cultivó en 5 mL de caldo LB con 100 µg/mL de ampicilina, se incubó a 37 °C con agitación constante 260 rpm toda la noche. Se prepararon alícuotas de 1000 µL en tubos criogénicos con 300 µL de glicerol al 40% estéril, se etiquetaron y se almacenaron a -70 °C. Se reservaron 3 mL de cultivo con el fin de realizar la purificación del ADNplasmídico mediante el kit comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA System (Promega, Madison, WI, EE. UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante. La verificación del producto obtenido de la purificación se realizó mediante gel de agarosa al 0.8% en buffer SB 1X, utilizando la cámara Easy cast 7212 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) a 100 V durante 40 min. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó mediante un transiluminador ultravioleta (BIO RAD) (Engebrecht et al., 2001).

6.2.3. Digestión enzimática

Se utilizaron las enzimas BamHI (GGATCC) y HindIII (AAGCTT) para realizar los cortes y observar los patrones de digestión esperados en el programa virtual.

Se tomó el ADNplasmídico purificado de las colonias positivas y se realizó la digestión enzimática con las enzimas BamHI (GGATCC) y HindIII (AAGCTT) (Thermo Scientific). La reacción se realizó en tubos de microcentrífuga de 0.6 mL utilizando 0.5 µL de buffer K 10X, 1 mg de ADNp purificado, 0.5 µL de enzima BamHI 10 U/µL

(Thermo Fisher Scientific), 0.5 μ L de enzima HindIII 10 U/ μ L (Thermo Fisher Scientific) y agua nanopura estéril para completar un volumen final de 10 μ L. La mezcla de reactivos se incubó a 37 °C por una hora. Posteriormente se analizó mediante un gel de agarosa al 1.5% en buffer SB 1X y teñido con bromuro de etidio, con una corriente constante de 100 Volts durante 50 min. Se compararon los patrones obtenidos al revelar el gel con luz ultravioleta (UVP, Transilluminator). De las colonias que mostraron similitud entre los patrones esperados se seleccionaron para proseguir a la subclonación en células BL21 (Shams et al., 2021).

6.2.4. Transformación y análisis de células calcio competentes *E. coli* BL21 (DE3)

La transformación de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) se llevó a cabo siguiendo la misma metodología mencionada en el apartado 6.2.2. Después se cultivaron en agar LB/ampicilina (100 μ g/mL) a 37 °C por 16 h. El DNAp se purificó siguiendo las indicaciones del Kit anteriormente mencionado y mediante una reacción de restricción enzimática (Olave et al., 2016).

6.2.5. Inducción de la expresión de péptido recombinante

Se inocularon bacterias transformadas BL21 (DE3) en tubos de ensayo con 3 mL de LB/ampicilina (100 μ g/mL) y se incubaron a 37 °C con agitación de 260 rpm durante 16 h. Después se inocularon en 120 mL de caldo LB (sin antibiótico) con 1.2 mL de cultivo de bacterias durante 16 h, obteniendo una dilución de 1:100. Las bacterias se mantuvieron en agitación a 260 rpm a 37 °C durante dos horas. Se monitoreó la DO en un mililitro de cultivo, en un espectrofotómetro (Spectronic 20D) a una longitud de onda de 590 nm. El matraz se mantuvo en agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.4-0.6. Para el control, se tomaron 10 mL de cultivo bacteriano no inducido y se almacenó a 4 °C. Al resto del cultivo se adicionó con IPTG a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión del péptido recombinante. Se continuó con la incubación a 37 °C con agitación de 260 rpm durante 5 h. Las bacterias inducidas y el control se transfirieron a

tubos cónicos de 50 mL y se centrifugaron a 5000 rpm a 4 °C por 10 min. El caldo LB fue decantado y el pellet de bacterias se pesó y se suspendió con Buffer Binding. Por cada gramo de pellet se adicionaron 10 mL del buffer. La suspensión bacteriana se almacenó a -20 °C hasta su uso (Olave et al., 2016; Sperotto et al., 2017; Kielkopf et al., 2021).

6.2.6. Lisis bacteriana

Se tomaron alícuotas de 500 µL a diferentes tiempos para la evaluación de la inducción, a las 0 h (bacterias de control sin inducir), 2 y 5 h de inducción (lisado de bacterias). Una vez obtenidas, se centrifugaron a 4000 RCF por 5 min y el sedimento bacteriano se suspendió en 100 µL de solución tampón desnaturizante de proteínas (2.5 mL de tris 0.5 M, pH 6.8, 5 mL de glicerol a 36%, 0.4 g de SDS, 0.4 mL de azul de bromofenol al 0.4%, 0.1 mL de β-mercaptoetanol y 0.2 mL de agua ultrapura). La muestra se sometió a ebullición (100 °C) por 5 min y se separó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12% (Santos et al., 2020).

6.2.7. Solubilidad del péptido recombinante

La evaluación de la solubilidad del péptido recombinante se efectuó al centrifugar las bacterias inducidas a 4000 RCF por 25 min. Posteriormente, se descartó el sobrenadante, se pesó el pellet y se agregó solución tampón de sonicación (50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM de NaCl, 10 mM de imidazol, pH de 8,0 ajustado con NaOH), por gramo de bacterias. La sonicación se hizo en el sonicador VibraCell Sonics (Danbury, CT, EE. UU.) a 130 Watts, con una amplitud de 70% con pulsos de 59 segundos e intervalos de descanso de 10 seg, para un tiempo total de 35 min. Nota: el lisado de bacterias se colocó en hielo durante el procedimiento. El lisado se centrifugó a 4 °C, y 10.000 RCF por 20 min. Se separó el sobrenadante del pellet y se analizaron por SDS-PAGE con gel separador al 12 % (Olave et al., 2016; Santos et al., 2019).

6.2.8. Solubilidad de cuerpos de inclusión

Los cuerpos de inclusión con el péptido recombinante fueron sometidos a tres lavados, el primero se hizo con una solución de NaH_2PO_4 a 100 mM, 10 mM de tris HCl, 10 mM de imidazol, pH de 8.0 y se centrifugó a 4500 rpm, a 4 °C, por 20 min. El segundo lavado se realizó con los mismos productos mencionados anteriormente, además de 4 M de urea, 10 mM de 2-mercaptoetanol, tritón X100 al 1 %, pH de 8.0 y se centrifugó con las mismas condiciones para el primer lavado. El tercero se realizó bajo las mismas condiciones que el primer lavado. Como seguimiento se tomó una alícuota entre cada lavado, que se analizó mediante SDS-PAGE con gel separador al 12%. La solubilidad de los cuerpos de inclusión se hizo con una solución tampón desnaturizante (10 mM de tris HCl, 10 mM de imidazol y 8 M de urea con un pH de 8.0). La muestra permaneció a 25 °C con agitación a 90 rpm por toda la noche. Al pasar este tiempo, la muestra se centrifugó a 8000 RCF y se incubó por 20 min a 4 °C. El sobrenadante y el pellet se evaluaron mediante SDS-PAGE con gel separador al 12%. La proteína ubicada en el sobrenadante con la urea se cuantificó por medio del espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) con una absorción a 280 nm (Sperotto et al., 2017).

6.2.9. SDS-PAGE de los lisados bacterianos

Se realizó una electroforesis de proteínas según el protocolo de Laemmli (1970) en geles discontinuos de poliacrilamida (gel concentrador 4% y gel separador 12%) en condiciones desnaturizantes de los lisados para analizar la presencia del péptido recombinante. La preparación de la muestra consistió en mezclarla con Loading Buffer a una concentración de 4 mg de proteína del extracto por mL de tampón. Se hirvió durante 5 min para provocar la reducción de puentes disulfuro y al enfriarse, los restos insolubles, se eliminaron centrifugando la muestra durante 5 min a 10,000 rpm. La preparación de los geles consistió en una proporción de acrilamida del 12.5% a partir de una solución de acrilamida/bis-acrilamida 40%, 29:1 (Adán, 2007; Echeverría, 2016).

Las soluciones y reactivos se mezclaron en las cantidades indicadas en las Tablas 2 y 3. Una vez polimerizado, se procedió a cargar la muestra y posterior a la electroforesis. Esta se llevó a cabo a intensidades en función de la concentración de acrilamida de los geles (Del Águila et al., 1988) apilador 250 mA y separador 30 mA. La duración de la electroforesis fue de 10 min hasta que el frente penetró el gel separador y 50 min hasta que la proteína de 25 kDa del marcador de peso molecular alcanzó el frente del gel. Finalmente, el gel fue teñido con azul de Coomassie durante toda la noche (Adán, 2007; Echeverría, 2016; Olave et al., 2016).

Tabla 2. Preparación de geles de poliacrilamida al 12.5 % y 4 %.

	Gel separador al 12.5%	Gel apilador al 4%
Acrilamida/Bis-acrilamida	3.1 mL	1 mL
dH ₂ O	4.3 mL	6.4 mL
Tris-HCL 1.5 M, pH 8.8	2.5 mL	-
Tris-HCL 0.5 M, pH 8.8	-	2.5 mL
SDS 10%	100 µL	100 µL
Persulfato de amonio	75 µL	75 µL
TEMED	20 µL	20 µL

Tabla 3. Concentraciones de reactivos para la preparación de muestra.

Tampón de desnaturalización	Volumen final
Tris 0.5 M pH 6.8	2.5 mL
Glicerol 36%	5 mL
SDS	0.4 g
Azul de bromofenol 0.4%	0.4 mL
β-mercaptoetanol	0.1 mL
dH ₂ O	0.2 mL

6.2.10. Purificación del péptido recombinante

La purificación del péptido recombinante se realizó mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados con Ni²⁺ (Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography, IMAC), en un cromatógrafo Biologic Duoflow System (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.), utilizando columnas de 1 mL (Bio-Scale Mini Profinity; BioRad). El experimento se elaboró bajo condiciones desnaturalizantes con 8 M de urea y se eluyó con cambios de pH. Las fracciones que se obtuvieron en el proceso de purificación se evaluaron

mediante SDS-PAGE con gel separador al 12% y Western blot. Finalmente, las fracciones se congelaron hasta su uso (Elsemore et al., 2017; Yunus et al., 2018).

6.2.12. Western blot

Se empleó un gel obtenido en el paso anterior, para proceder con la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm (BioRad). Se colocó el gel de poliacrilamida en un “sándwich” (Fig. 8). Se corrió en una cámara húmeda con Buffer de transferencia, el cual se preparó el mismo día de su empleo (100 mL solución stock Tris Base-Glicina, 200 mL de metanol y 700 mL de H_2O), a 26 V durante 2 h. Enseguida se preparó una solución stock de TBS 10X (31.5 g Tris-HCl, 80 g NaCl en 1L, pH 7.6). Al terminar la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se transfirió en una solución de bloqueo (TBS-Tween 1% y leche descremada al 5%) durante una hora. Posteriormente, se retiró la solución de bloque y se colocó el anticuerpo primario de TES policlonal diluido 1:200 en TBS-Tween y leche descremada 5%. Luego, se realizaron tres lavados con TBS-Tween 1%, durante 10 min y se incubó el anticuerpo secundario (conjugado HRP) anti-conejo diluido a 1:5000, en TBS-Tween y leche descremada 5%, durante 2 h. Se retiró el anticuerpo conjugado y se realizaron nuevamente tres lavados con las indicaciones mencionadas anteriormente. Se agregó el sustrato Lumi-Light plus (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, EE. UU.) por 5 min, se retiró el excedente y se colocó la membrana en un cassette para ser expuesto con una película y revelarla en la oscuridad (Yunus et al., 2018).

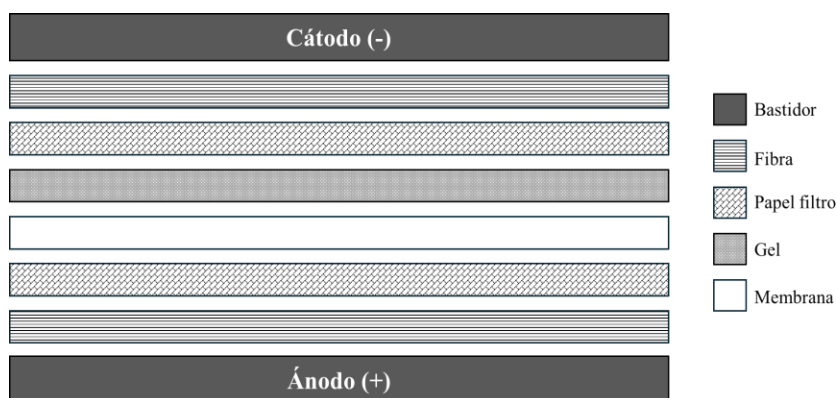


Figura 8. Orden de los componentes de un bastidor (marca) para inmunotransferencia.

6.3. Obtención de antígenos TES nativos (excreción-secreción de *Toxocara canis*)

6.3.1. Cultivo, eclosión y mantenimiento de larvas L2

Se obtuvo el estadio L2 de *Toxocara canis* según el método descrito por De Savigny (1975) modificado, a partir de parásitos adultos de cánidos infectados naturalmente, los cuales fueron tratados con Pamoato de pirantel (15 mg/kg) para lograr la expulsión completa de los vermes adultos. La identificación de los parásitos se realizó mediante la observación de las estructuras externas características de los ejemplares adultos, por medio de un microscopio estereoscópico (Nikon, Tokio, Japón). Estos se colocaron en un vidrio de reloj y se observaron directamente en objetivo de 40x (Adán, 2007; Nieves et al., 2012; Echeverría, 2016).

6.3.1.1. Desove *in vitro* de ejemplares adultos

Una vez aislados los ejemplares adultos, se realizó el sexado de los mismos, separando a las hembras, las cuales se depositaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con solución salina al 0.85%, adicionado con antibióticos al 1% de penicilina (10,000 U), 10 mg de estreptomicina y 25 µg de anfotericina B por mililitro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Para inducir el desove se realizó de manera mecánica, al diseccionar la cavidad uterina. Los huevos liberados en el medio fueron recolectados en cajas de cultivo celular estériles, estos se incubaron a 28 °C durante 45 d, se agitaron por lo menos una vez al día, con el fin de obtener huevos embrionados. El desarrollo de los embriones fue monitorizado cada día mediante observación microscópica (Adán, 2007; Nieves et al., 2012; Echeverría, 2016).

6.3.1.2. Eclosión *in vitro* de la fase larvaria

Los huevos embrionados fueron lavados con tampón de fosfato salino (PBS) estéril y se centrifugaron a 3000 rpm, 20 °C, durante 5 min, con el fin de eliminar restos orgánicos del medio. El sobrenadante fue descartado y para lograr la liberación larvaria, los huevos se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 2 h, con ligera agitación a 50 rpm, con el fin de reblandecer la cubierta del huevo. Posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm, 20 °C, por 5 min, para eliminar los restos de hipoclorito de sodio, se repitió el lavado tres veces. Después del último lavado, los huevos con la cubierta reblandecida fueron colocados en recipientes con perlas de vidrio, donde se mantuvieron con agitación constante a 50 rpm, durante 2 h, para facilitar la ruptura de la cubierta y por ende la liberación de la larva. Enseguida, se centrifugó el contenido a 3000 rpm, 4 °C, por 5 min, se descartó el sobrenadante y finalmente se realizó un último lavado, esta vez, se empleó 10 mL de medio de cultivo celular RPMI (Sigma); se descartó el sobrenadante y enseguida se colocó 10 mL de medio adicionado con antibióticos (1% de penicilina (10000 U), 10 mg de estreptomicina y 25 µg de anfotericina B por mililitro) y glucosa al 1% (Adán, 2007; Nieves et al., 2012; Echeverría, 2016).

6.3.1.3. Extracto antigénico

Las larvas L2 se mantuvieron en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma) suplementado con glucosa y antibióticos por un periodo de dos meses. Para obtener los productos ES, los cultivos larvarios se dejaron reposar verticalmente durante una hora con el fin de sedimentar las larvas en el fondo. Con una pipeta estéril, se recogieron 7 mL del medio de cada frasco de cultivo. El volumen recolectado se repuso con el mismo volumen (10 mL) de medio RPMI-1640 (Sigma- Aldrich) adicionado con glucosa y antibióticos a las mismas concentraciones anteriormente mencionadas. Esta operación se realizó cada siete días (Adán, 2007; Nieves et al., 2012; Echeverría, 2016).

El extracto de los productos TES se obtuvo a partir del medio recolectado semanalmente. Se obtuvo un volumen de 80 ml, los cuales serán filtrado a través de membrana de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 22 µm (Millipore Corp., Bedford, MA, EE. UU.). El filtrado fue dializado frente a 50 volúmenes de dH₂O durante 24 h, en membrana

de diálisis con un punto de corte de 7000 Daltones. El volumen total se congeló a -40 °C para ser dializado (Nieves et al., 2012).

6.3.1.4. Análisis de perfil proteico del extracto

La determinación de la concentración proteica del antígeno de ES nativo y recombinante se realizó por el método de Bradford (1976). Se prepararon soluciones con diferentes concentraciones a partir de una solución de albúmina proporcionada para la realización de la curva de calibración (diluciones de 0.2 a 0.14 mg/mL). Se colocó las diferentes diluciones en una placa de 96 pocillos, enseguida se colocaron 100 µL del colorante Bradford y se incubó a 37 °C durante 15 min en condiciones de oscuridad. Se realizó la lectura mediante un lector de placas ELISA Asys UVM 340 a 595 nm. Finalmente se graficó la curva patrón y se determinó la concentración de cada muestra. La determinación del perfil proteico del extracto se realizó mediante electroforesis SDS-PAGE y Western blot, siguiendo los protocolos descritos en el apartado 6.2.10 y 6.2.11 respectivamente (Nieves et al., 2012).

6.4. Esquema de inmunización de conejo y obtención de anticuerpos

Se inmunizaron conejos de raza Nueva Zelanda, hembras de aproximadamente dos meses de edad, de acuerdo con el protocolo realizado por Elhakam. Se inyectaron por vía intramuscular con 1 mg de TES nativo y TESr mezclado 1:1 en adyuvante completo de Freund. Se aplicaron dos refuerzos con intervalos de 7 días; después de la 1 aplicación se aplicaron 0.5 mg del péptido recombinante emulsionado en un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund. Una semana después de la última dosis de refuerzo, se obtuvieron los sueros de conejo y la fracción de pAbs fue sometida a un ensayo de Bradford para cuantificar los anticuerpos IgG recuperados. Para la conjugación de anticuerpos IgG anti-TES con peroxidasa de rábano picante (HRP) se utilizó el método de peryodato de sodio (Elsemore et al., 2017; Santos et al., 2020).

6.5. Prueba de ELISA tipo sándwich

La ELISA tipo sándwich se basó en la captura y detección de antígenos de *T. canis* en muestras de heces. Se recubrió una microplaca de 96 pocillos (Immulon 4HBX; Thermo Fisher Scientific) con 0.8 µg/mL de anticuerpos IgG policlonales anti-TES nativo en tampón de carbonato/bicarbonato (0.05 M a pH 9.6) y se incubó a 4 °C por 24 h. Se realizaron cinco lavados con 200 µL de PBS 0.15 M, con polisorbato 20 al 0.1% (Tween 20; Sigma-Aldrich) posterior a cada incubación. El bloqueo de los pocillos se hizo mediante 200 µL de PBS mezclado con Tween 20 al 0.3% por una hora a temperatura ambiente. El sobrenadante de la muestra de heces (50 µL) se dispersó con 50 µL de suero fetal bovino inactivado por calor (Corning, Corning, NY) y luego se incubó durante una hora a temperatura ambiente, mientras se agitaba suavemente. La detección se realizó con 0.9 µg/mL de los anticuerpos IgG policlonales anti-TES, previamente conjugados con peroxidasa e incubados durante una hora a temperatura ambiente, con agitación suave. Se mezclaron 100 µL del sustrato cromogénico comercial 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazolin-6-ácido sulfónico (ABTS) (Sigma) con peróxido de hidrógeno al 0.02% (v/v) para revelar la reacción en la oscuridad, se siguieron las instrucciones del fabricante (kit de sustrato de peroxidasa de pocillos de dos componentes TMB; SeraCare, Milford, MA, EE. UU.). La reacción se detuvo con 50 µL de ácido sulfúrico a 2 M y los resultados se leyeron mediante un espectrofotómetro a 450 nm (Adán, 2007; Nieves et al., 2012; Echeverría, 2016).

6.6. Estudio parasitológico

La identificación de todas las muestras se realizó mediante observación microscópica por medio de la técnica simple de flotación por centrifugación (Ayinmode et al., 2016; Hernández et al., 2018). El procedimiento se basa en eliminar residuos y detritos indeseables en la muestra y concentrar los huevos del parásito. El material examinado y los sobrenadantes desechados fueron tratados en un recipiente con formalina al 10% para su desinfección y posterior eliminación (Vázquez et al., 2005; Alarcón et al., 2015; Ezema et al., 2019).

6.7. Diseño experimental

Una prueba de chi cuadrada fue utilizada para determinar si hay diferencia significativa ($p < 0.05$) en la sensibilidad y especificidad entre el ELISA TES-nativo, TES-recombinante y la técnica coprológica convencional como estándar de oro. El análisis estadístico fue realizado en el programa SPSS ver.20.

VII. RESULTADOS

7.1. Muestras fecales de cánidos

Se colectaron 100 muestras de heces fecales analizadas por mo, de los cuales 40% eran positivas a *T. canis* y 60% negativas.

A continuación, se muestran las distribuciones de los individuos participes del estudio en donde se muestrearon 50 hembras y 50 machos. El 90% de los animales muestreados procedían de albergues, antirrábicos o no tenían hogar. El valor de las variables no mostró asociación significativa: $\chi^2 = 0.3841$, $gl = 1$, $p = 0.05$ (Fig. 9).

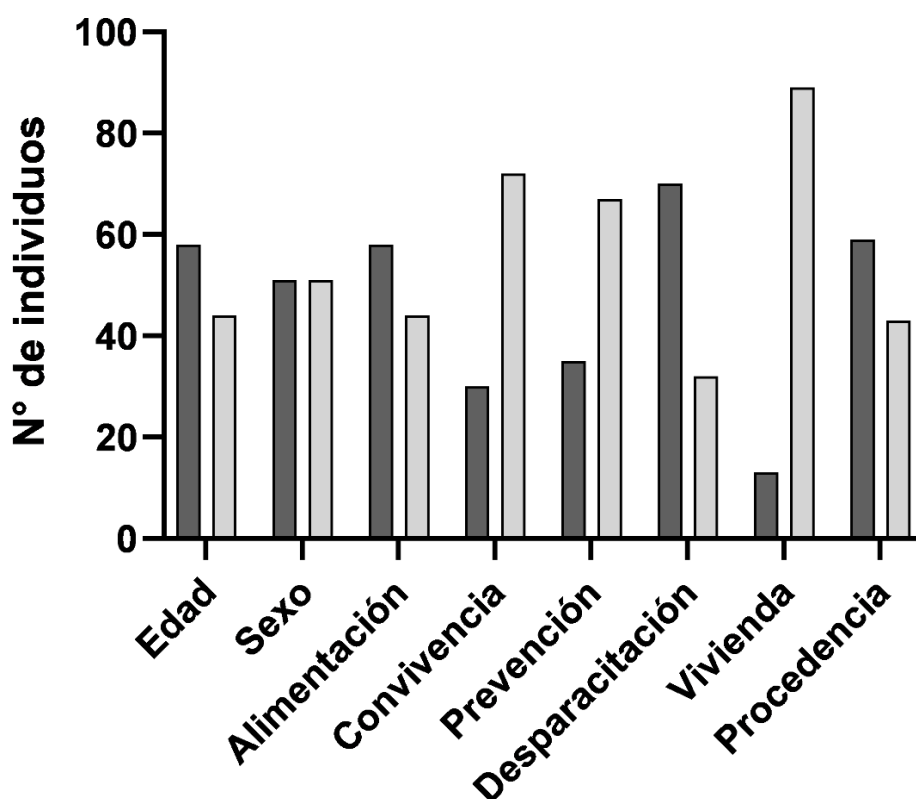


Figura 9. Distribución de individuos muestreados (Barra oscura y tenue muestran las siguientes variables, respectivamente: Edad = > 1 año y < 1 año; Sexo = hembra y macho; Alimentación = pellet y comida variada; Convivencia = animal único y con otros animales; Prevención = Consulta veterinaria en < 1 año y > 1 año o nula asistencia; Desparasitación = Si y no; Vivienda = Casa y albergues o calle; Procedencia = urbana y suburbana).

7.2. Recuperación de secuencias de proteínas y predicción de epítomos de células B

Secuencias de aminoácidos de TES-26 (AAC46843.1), TES-30 (BAA31253.2) y TES-120 (AAB05820.1) (Fig. 10)

```
TES-26
>AAC46843.1 TES-26 [Toxocara canis]
MSVVHKACLIALLFVSSGVAQQCMDSASDCAANAGSCFTRPVSQVLQNRQRTCNTCDCRDEANNCAASI
NLCQNPTFEPLVRDRCQKTCGLCAGCGFISSGIVPLVVTSA PSRRVSVTFANNVQVNCGNTLTTAQVANQ
PTVTWEAQPNDRYTLIMVDPDFPSAANGQQGQRLHWWVINIPGNNIAGGTTLAAFQPSTPAANTGVHRYV
FLVYRQPAAINSPLLNNLVVQDSERPGFGTTAFATQFNLGSPYAGNFYRSQA

TES-30
>BAA31253.2 proteoglycan core protein, partial [Toxocara canis]
TPTTTRRMIAAIVLLCLHLSATNACATNNDGIFQVCVNNVCVANNQGCNPPCVPPQVCVAPMCVAPPP
AATTTAAPGVTTTRPRACPPNWT P FNNNCYIASLPGRFLFNQASDWCTQTGSRVVWFDQSTVGNFGSELN
FVNSFALGRGVTRYWIGVNRQFGQWFTNGSPVIFSNWRPSQPDGCCGSNVTCAFVNYANFLGQWDDAPC
GSLFTTPQGFVCKRPL

TES-120
>AAB05820.1 surface coat glycoprotein TES-120 precursor [Toxocara canis]
MHVLTVALVAVLICVATPQMMSSSSSSSPSTSSSSASTSSSSASTSSSSASTSSSSASTSSSPASTSSSS
ASTSSMAGSTSTAAGPTSSSSVSTSTPAVMTTTPACIDTANDCQLFTPLCFVQPYSRAIQGRCRRTCNIC
SCQDSANDCANFVSVCLNPTYQPVLRSRCPLTCGFC
```

Figura 10. Secuencia de aminoácidos de productos ES de *T. canis*.

A continuación, se identifican los epítomos inductores de células B, con el método de verificación cruzada (Fig. 11-15).

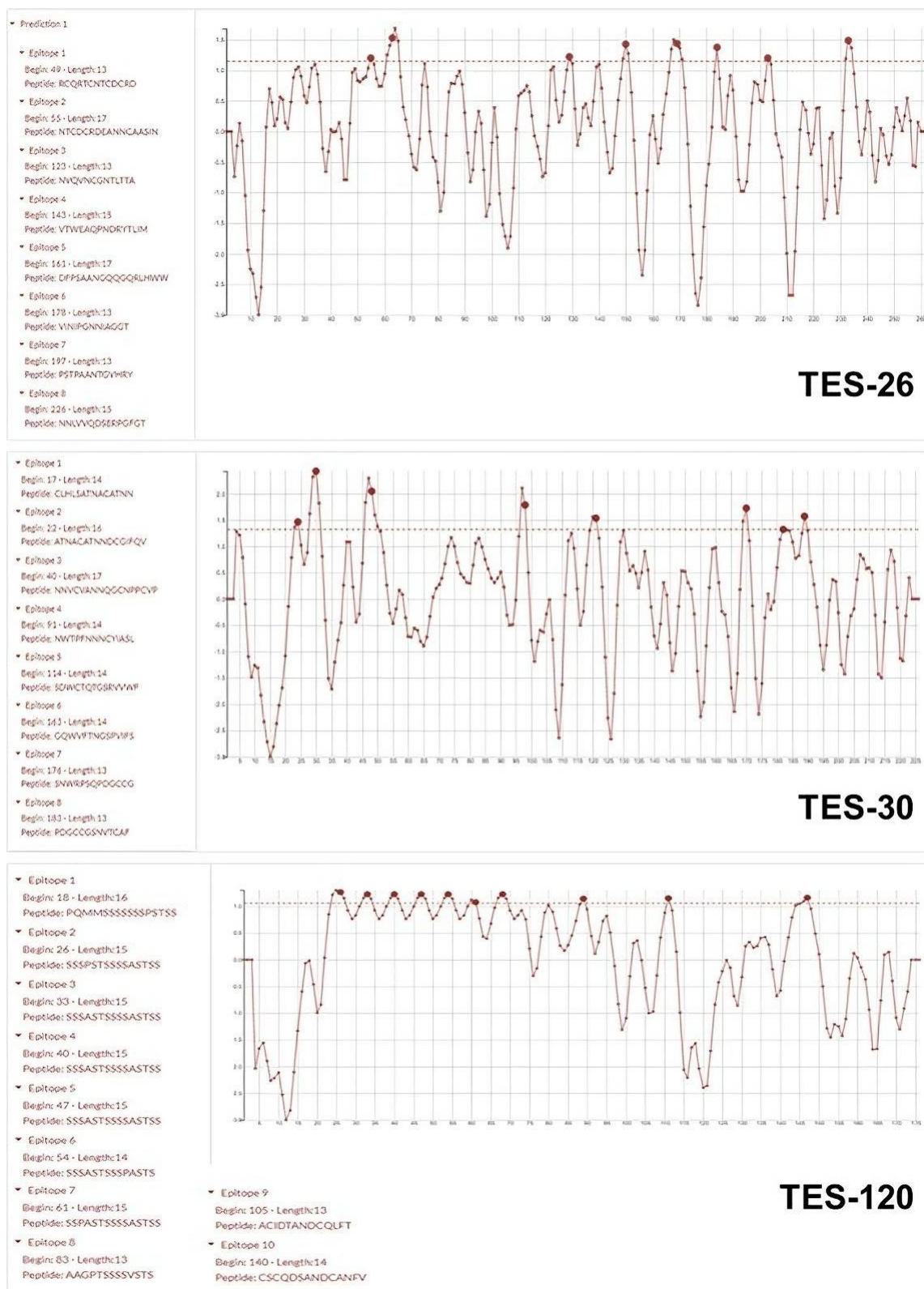


Figura 11. Candidatos a épitops de TES analizados mediante el servidor Bepitope (<http://bepitope.ibs.fr/>).

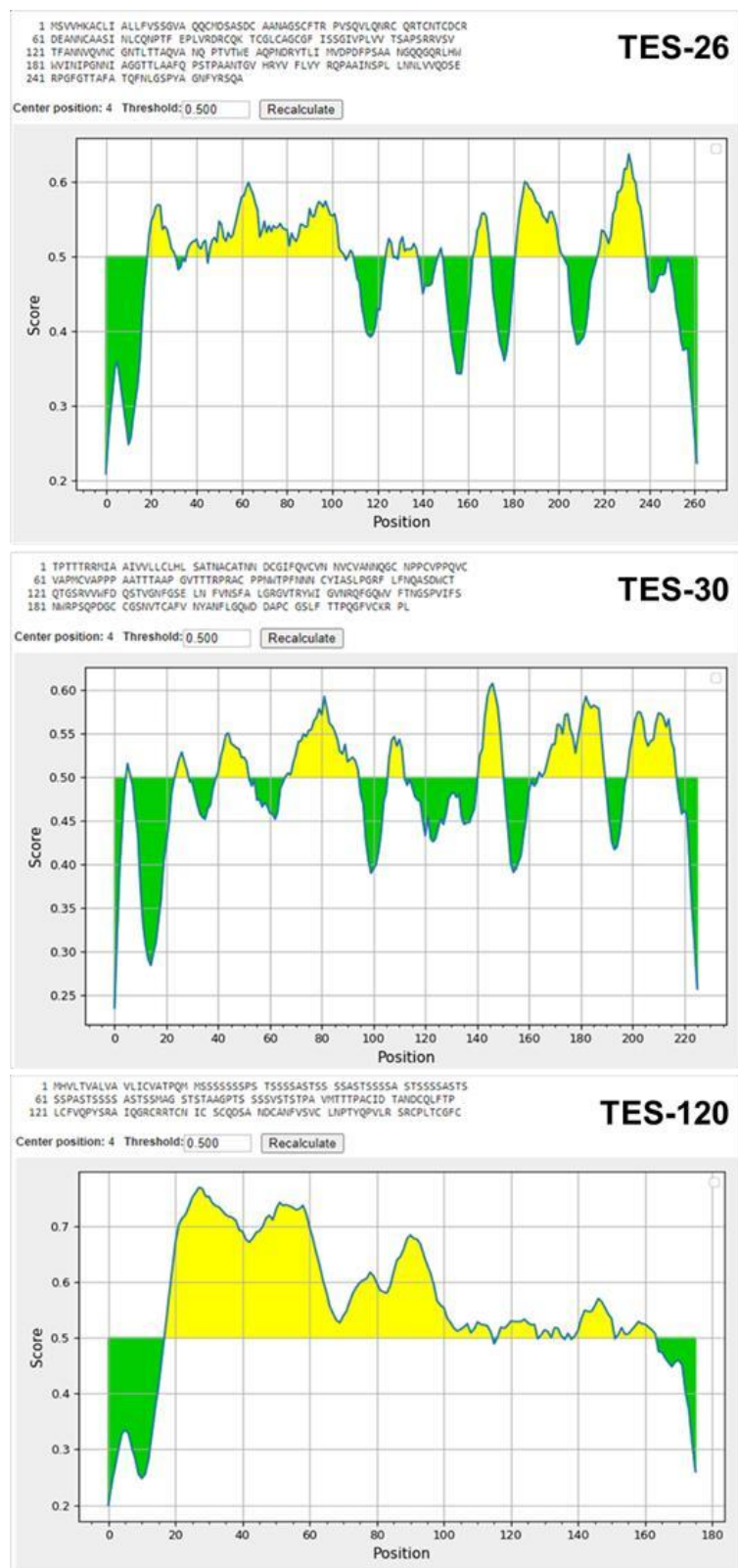


Figura 13. Candidatos a epítomos de TES analizados mediante el servidor Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 (<http://tools.iedb.org/bcell>)

[illegible]

TES-26	Rank	Location	Epitope	Score	Recommend*
	1	55 - 74	NTCDCRDEANNCAASINLCQ	1.000	
	2	150 - 169	NDRYTLIMVDPDFPSAANGQ	0.789	
	3	104 - 123	VPLVVTSAPSRRVSVTFANN	0.720	
	4	206 - 225	VHRYVFLVYRQPAAINSPLL	0.560	
TES-30	Rank	Location	Epitope	Score	Recommend*
	1	7 - 24	RMIAAIVLLCLHLSATN	1.000	
	2	123 - 140	RVVWFDQSTVGNGFSELN	0.299	
	3	29 - 46	NNDCGIFQVCVNNVCVAN	0.279	
	4	96 - 113	NNNCYIASLPGRFLFNQA	0.238	
TES-120	Rank	Location	Epitope	Score	Recommend*
	1	1 - 18	MHVLTVALVAVLICVATP	1.000	
	2	141 - 158	SCQDSANDCANFVSVCLN	0.661	
	3	105 - 122	ACIDTANDCQLFTPLCFV	0.567	
	4	85 - 102	GPTSSSSVSTSTPAVMTT	0.449	
	5	62 - 79	SPASTSSSSASTSSMAGS	0.448	
	6	27 - 44	SSPSTSSSSASTSSSSAS	0.448	

Los resultados del servidor VaxiJen mostró los grados de antigenicidad de cada constructo formado con las diferentes opciones de conectores y orden de las secuencias que fueron más frecuentes en los diferentes servidores mencionados, el umbral establecido fue de 1.5 (Tabla 4).

Tabla 4. Candidatos a péptidos multiepitopes de productos TES 26, 30 y 120.

No.	Péptido	Umbral
1	SASTSSSSASTSSSSASTSSSPA GPGPG TNACATNNDGIFQVCVNN GPGPG TCNTCDRDEANNCAASINL	0.9862
2	TNACATNNDGIFQVCVNN AAY TCNTCDRDEANNCAASINL AAY SASTSSSSASTSSSSASTSSSPA	0.9286
3	SASTSSSSASTSSSSASTSSSPA GPGPG TCNTCDRDEANNCAASINL AAY TNACATNNDGIFQVCVNN	0.9902
4	SASTSSSSASTSSSSASTSSSPA GPGPG TNACATNNDGIFQVCVNN AAY TCNTCDRDEANNCAASINL	1.0821
5	TCNTCDRDEANNCAASINL AAY SASTSSSSASTSSSSASTSSSPA GPGPG TNACATNNDGIFQVCVNN	1.0476
6	TNACATNNDGIFQVCVNN AAY SASTSSSSASTSSSSASTSSSPA GPGPG TCNTCDRDEANNCAASINL	0.9659
7	SASTSSSSASTSSSSASTSSSPA GPGPG TNACATNNDGIFQVCVNN KK TCNTCDRDEANNCAASINL	0.9897
8	TCNTCDRDEANNCAASINL KK SASTSSSSASTSSSSASTSSSPA GPGPG TNACATNNDGIFQVCVNN	1.0464
9	TNACATNNDGIFQVCVNN KK SASTSSSSASTSSSSASTSSSPA GPGPG TCNTCDRDEANNCAASINL	0.9960
10	TNACATNNDGIFQVCVNN KK SASTSSSSASTSSSSASTSSSPA AAY TCNTCDRDEANNCAASINL	0.9136
11	TCNTCDRDEANNCAASINL AAY TNACATNNDGIFQVCVNN KK SASTSSSSASTSSSSASTSSSPA	0.9360
12	TNACATNNDGIFQVCVNN AAY TCNTCDRDEANNCAASINL KK SASTSSSSASTSSSSASTSSSPA	0.9255

7.3. Epítopos inductores de IL-4 e IL-10 y detección

Los epítopos de elección fueron aquellos que presentaban un índice de antigenicidad más elevado y no tenían propiedades alérgicas y tóxicas. Un solo epítipo de cada antígeno: TES-26, TES-30 y TES-120, se seleccionó para su predicción como inductores de interleucinas, mediante los servidores IL4-pred e IL10-pred (Tablas 16, 17, 18 y 19).

Query Peptides							
TES-26	Peptide Sequence	SVM Score	Prediction	Hydrophobicity	Hydropathicity	Hydrophilicity	Mol wt
seq1	RCQRTCNTCDGRD	0.28	IL4 inducer	-0.63	-1.45	0.82	1573.91
seq2	NTCDRCDEANNCAASIN	0.30	IL4 inducer	-0.31	-0.77	0.38	1814.12
seq3	NVQVNCGNTLTITA	0.15	Non IL4 inducer	-0.08	0.00	-0.52	1334.66
seq4	VTWEAQPNDRYTLIM	0.41	IL4 inducer	-0.14	-0.50	-0.27	1837.30
seq5	DFPSAANGQQGQRLHWW	0.34	IL4 inducer	-0.19	-1.18	-0.32	1998.40

Query Peptides							
TES-30	Peptide Sequence	SVM Score	Prediction	Hydrophobicity	Hydropathicity	Hydrophilicity	Mol wt
seq1	CLHLSATNACATNN	0.18	Non IL4 inducer	-0.07	0.15	-0.54	1432.78
seq2	ATNACATNNDGIFQV	0.21	IL4 inducer	-0.05	0.16	-0.39	1642.01
seq3	NNVCVANNQGCNPPCVP	0.27	IL4 inducer	-0.11	-0.25	-0.40	1743.20
seq4	NWTFNNNCYIASL	0.26	IL4 inducer	-0.04	-0.28	-0.90	1657.03
seq5	SDWCTQTGSRVVWF	0.27	IL4 inducer	-0.10	-0.21	-0.52	1672.04

Query Peptides							
TES-120	Peptide Sequence	SVM Score	Prediction	Hydrophobicity	Hydropathicity	Hydrophilicity	Mol wt
seq1	PQMMSSSSSSPSTSS	0.28	IL4 inducer	-0.19	-0.72	0.01	1574.85
seq2	SSSPSTSSSSASTSS	0.26	IL4 inducer	-0.20	-0.67	0.13	1346.45
seq3	SSSASTSSSSASTSS	0.26	IL4 inducer	-0.18	-0.44	0.10	1320.41
seq4	SSSASTSSSSASTSS	0.26	IL4 inducer	-0.18	-0.44	0.10	1320.41
seq5	SSSASTSSSPASTS	0.11	Non IL4 inducer	-0.16	-0.47	0.06	1243.36

Figura 16. Candidatos a epítopos de TES inductores de IL-4 analizados mediante el servidor IL-4 pred (<http://crdd.osdd.net/raghava/il4pred>).

TES-26	Seq	Score	Prediction	Hydrophobicity	Hydropathicity	Hydrophilicity	Charge	Mol wt
seq1	QVLNRCQRTCNTC	0.5	IL10 inducer	-0.43	-0.89	-0.01	2.00	1667.11
seq2	VLNRCQRTCNTCDC	0.512	IL10 inducer	-0.40	-0.66	0.11	1.00	1757.21
seq3	LCQNPTFEPLVRDRC	0.573	IL10 non-inducer	-0.28	-0.49	0.16	0.00	1791.28
seq4	TWEAQPNDRYTLIMV	0.575	IL10 inducer	-0.14	-0.50	-0.27	-1.00	1837.30
seq5	TPAANTGVHRYVFLV	0.57	IL10 inducer	0.01	0.46	-0.68	1.50	1645.11
TES-30	Seq	Score	Prediction	Hydrophobicity	Hydropathicity	Hydrophilicity	Charge	Mol wt
seq1	AAIVLLCLHLSATN	0.553	IL10 inducer	0.22	1.85	-0.99	0.50	1538.11
seq2	GVTTTRPRACPPNWT	0.565	IL10 inducer	-0.25	-0.86	-0.12	2.00	1657.08
seq3	TTAAPGVTTTRPRAC	0.647	IL10 inducer	-0.20	-0.27	0.00	2.00	1502.90
seq4	RFLNQASDWCTQTG	0.647	IL10 inducer	-0.17	-0.55	-0.37	0.00	1774.15
seq5	TVGNFGSELNFVNSF	0.457	IL10 inducer	0.03	0.23	-0.57	-1.00	1631.98
TES-120	Seq	Score	Prediction	Hydrophobicity	Hydropathicity	Hydrophilicity	Charge	Mol wt
seq1	PQMMSSSSSSPSTSS	0.407	IL10 inducer	-0.19	-0.72	0.01	0.00	1574.85
seq2	SSSPSTSSSASTSS	0.375	IL10 inducer	-0.20	-0.67	0.13	0.00	1346.45
seq3	YSRAIQGRRTCNI	0.563	IL10 inducer	-0.46	-0.83	0.26	4.00	1797.29
seq4	CRRTCNICSCQDSAN	0.532	IL10 inducer	-0.38	-0.60	0.23	1.00	1674.06
seq5	TYQPVLSRCPLTCG	0.637	IL10 inducer	-0.21	-0.19	-0.25	2.00	1694.21

Figura 17. Candidatos a epítomos de TES inductores de IL-10 analizados mediante el servidor IL-4 pred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/il10pred/predict3.php>).

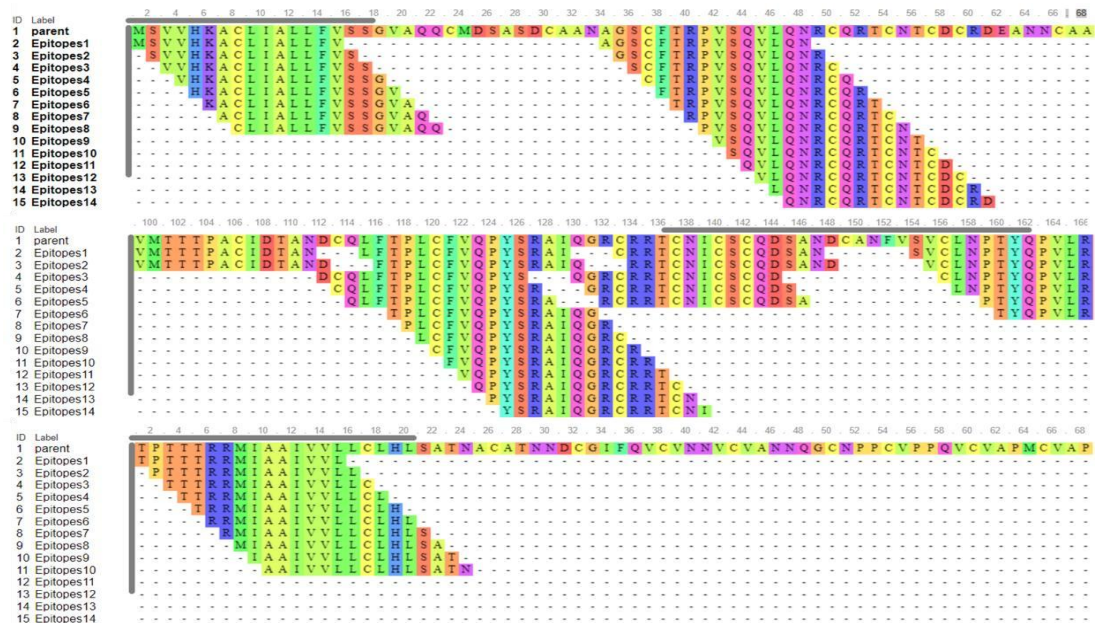


Figura 18. Predicción de epítomos inductores de IL-10 analizados mediante el servidor IL-10 pred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/il10pred/predict3.php>).

Los resultados de las secuencias selectas de cada antígeno (TES-16, TES-30 y TES-120) en los diferentes servidores, presentaron un umbral considerable para su grado de antigenicidad y baja toxicidad.

Tabla 5. Selección final de candidatos para el péptido multiepítipo en base a los servidores utilizados.

Péptido	Servidor	Umbral
TCNTCDCRDEANNCAASINL	Bepitope	0.90
	ABCpred	0.86
	BCEpred	2.008
	Bepriped linear	0.599
	SVMTriP	1.0
	IL4-pred	0.30
	IL10-pred	0.21
	ToxinPred	-0.23 (NT)
TNACATNNDGIFQVCVNN	Bepitope	0.89
	ABCpred	0.83
	BCEpred	2.966
	Bepriped linear	0.551
	SVMTriP	0.27
	IL4-pred	0.21
	IL10-pred	0.22
	ToxinPred	-0.25 (NT)
SASTSSSSASTSSSSASTSSSPA	Bepitope	0.90
	ABCpred	0.83
	BCEpred	2.002
	Bepriped linear	0.742
	SVMTriP	0.48
	IL4-pred	0.26
	IL10-pred	0.37
	ToxinPred	-0.40
TCNTCDCRDEANNCAASINL KK SASTSSSSASTSSSSASTSSSPA GPGPG TNACATNNDGIFQVCVNN HHHHHH	VaxiJen	1.0849
	Protein-Sol	0.710
	CrystalP2	0.127
	AllerTOP v. 2.0	NA

7.4. Ensamblaje de la construcción de proteína quimérica.

Se incluyeron tres epítopos que se llegaron a repetir en los servidores que fueron sometidos al presentar un umbral óptimo. Un total de tres péptidos se seleccionaron para el diseño de la secuencia del epítipo múltiple. Estos se unieron al emplear conectores KK, GPGPG y se añadió una cola de seis histidinas, como estrategia para su posterior purificación por cromatografía de afinidad por metales (Ni²⁺). Finalmente, el péptido multiepítipo diseñado constó de 75 aminoácidos (Fig. 20), con la siguiente secuencia:

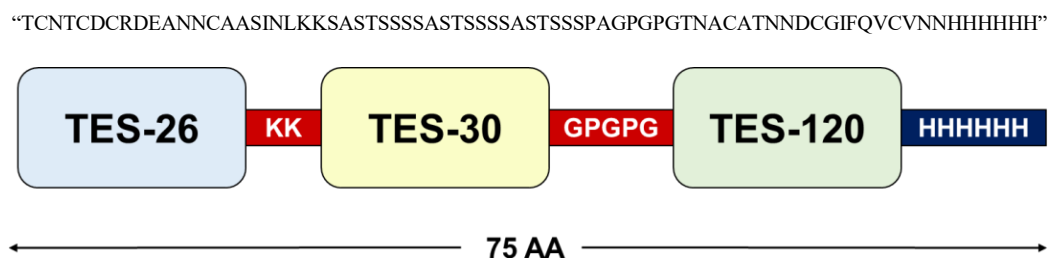


Figura 20. Secuencia de epítopos inductores seleccionados en la construcción de epítopos múltiples. La proteína quimérica final constituía 75 aminoácidos (AA).

7.5. Propiedades de antigenicidad, solubilidad y fisicoquímicas

El índice de antigenicidad que se obtuvo mediante el servidor VaxiJen v2.0, fue de 1.0849 (considerablemente alto) con un umbral de 0.75. De acuerdo con el servidor Protein-Sol se predijo que el péptido multiepítipo muestra una solubilidad tras la sobreexpresión en *E. coli* con un puntaje de 0.710. La predicción del servidor web ExPASy ProtParam muestra que el péptido de 75 aminoácidos tiene un peso molecular (PM) de 7549.99 Da y un pI teórico de 6.52. En la secuencia se muestran cuatro residuos cargados negativamente (Asp + Glu) y 3 residuos cargados positivamente (Arg + Lys). El ensamble del péptido mostró un índice de inestabilidad de 36.33, lo que clasifica al péptido como estable. Por otro lado, el índice alifático fue de 35.33, lo cual indica que el modelo quimérico tiene una termotolerancia moderada-baja. Por otro lado, el promedio de hidropaticidad (GRAVY) fue de -0.625, lo que muestra una propiedad hidrofílica. Finalmente, se estimó la vida media del péptido multiepítipo en diferentes modelos, 7.2 h en reticulocitos de mamíferos (*in vitro*), >20 h en levaduras (*in vivo*) y >10 h en *E. coli* (*in vivo*).

7.6. Predicción de estructuras secundarias y terciarias.

El péptido quimérico se analizó mediante el servidor SOPMA, los resultados fueron los siguientes: 49 (65.33 %) hélice superenrollada aleatoria o espirales aleatorias, 12 (16 %) hebras extendidas, 3 (4 %) giros beta y 11 (14.67 %) hélices alfa. El servidor PSIPRED mostró las áreas más frecuentes en la estructura secundaria, las cuales fueron en su mayoría hélices superenrolladas, seguidas por hebras y hélices. Los gráficos de los servidores SOPMA y PSIPRED se muestran en las figuras 21 y 22 respectivamente. Posteriormente, se identificaron 10 plantillas principales mediante el servidor I-TASSER, las cuales se utilizaron para el subprocesamiento por el metaservidor LOMETS, con el objeto de predecir cinco modelos de estructura terciaria del péptido diseñado. La plantilla 6h0iA obtuvo una puntuación Z de 1.41, al ser mayor del valor establecido (>1), presenta una buena alineación. En cuanto a los modelos propuestos por el servidor, se obtuvo la puntuación C de cada uno. Este parámetro indica el nivel de confianza de calidad del modelo predicho, su valor oscila entre -5 y 2. El valor más alto, indica una alta confianza de predicción. Los cinco modelos obtuvieron valores entre -3.23 y -4.7. Se seleccionó el modelo con mayor puntuación C que fue de -3.23, puntuación TM estimada de 0.35 ± 0.12 y RMSD estimada de 10.4 ± 4.6 Å (Fig. 23). La puntuación TM es un estándar que mide la similitud entre dos estructuras proteicas, permite disolver los principales obstáculos en las métricas tradicionales como la desviación cuadrática media (RMSD). Los valores óptimos de la puntuación TM estimada son entre 0.17 a 0.5, valores por debajo del rango mínimo representan similitud no específica, por el contrario, un valor >0.5 indica una topología adecuada. El modelo con valores óptimos en los parámetros anteriormente descritos se procesó mediante servidores para su refinamiento.

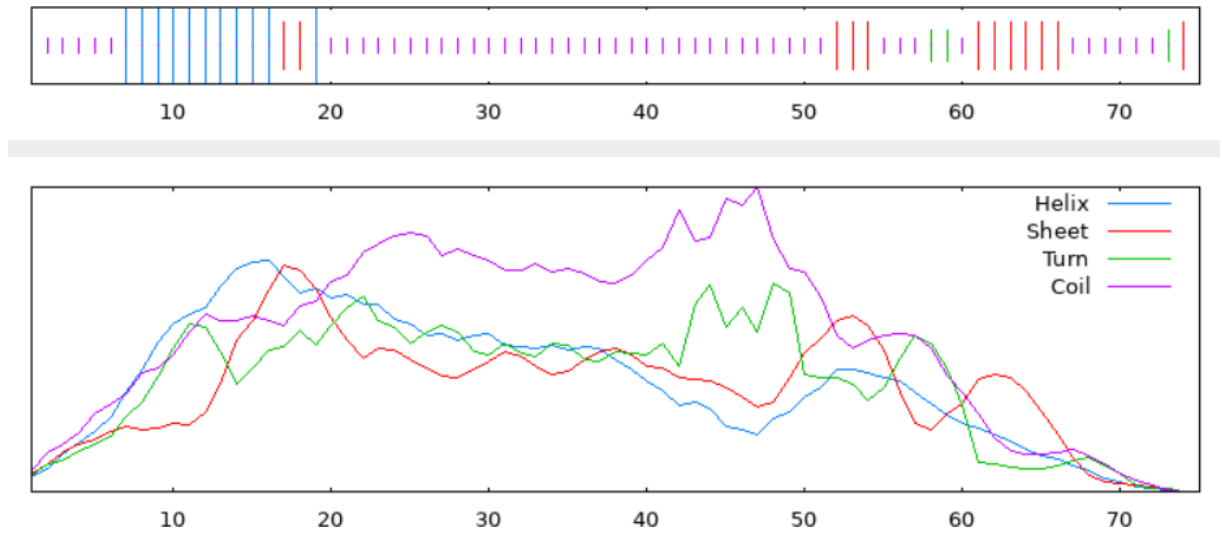


Figura 21. Predicción por el servidor SOPMA, de la estructura secundaria del péptido multiepitopo. En la secuencia se muestra un 65,33 % de espirales aleatorias, un 16 % de hebra extendida, un 4 % de giro beta y un 14.67 % de hélice alfa.

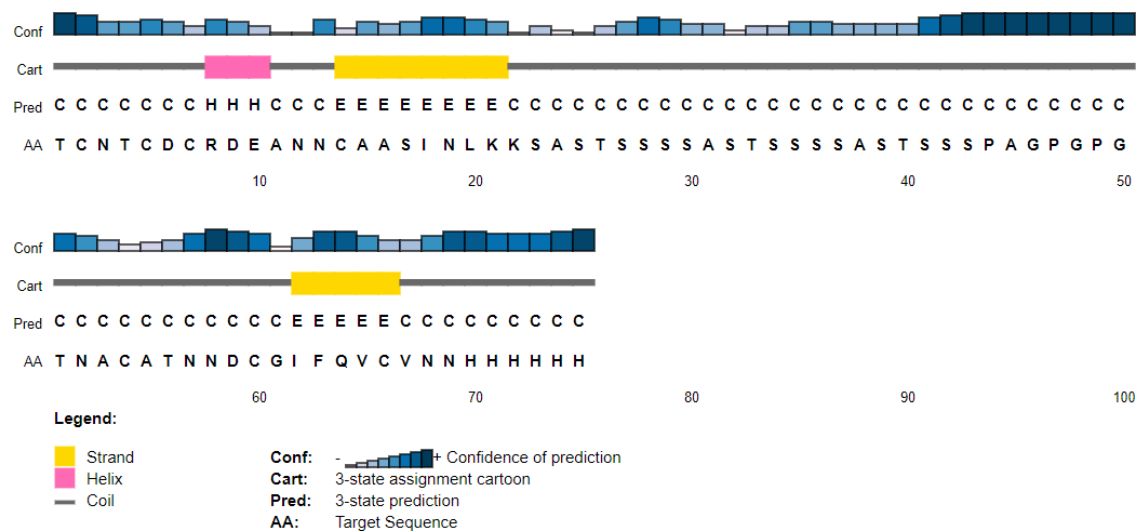


Figura 22. Representación de la estructura secundaria mediante el servidor PSIPRED. Las secciones en amarillo muestran las hebras, rosa área de hélices y línea gris hélices superenrolladas.

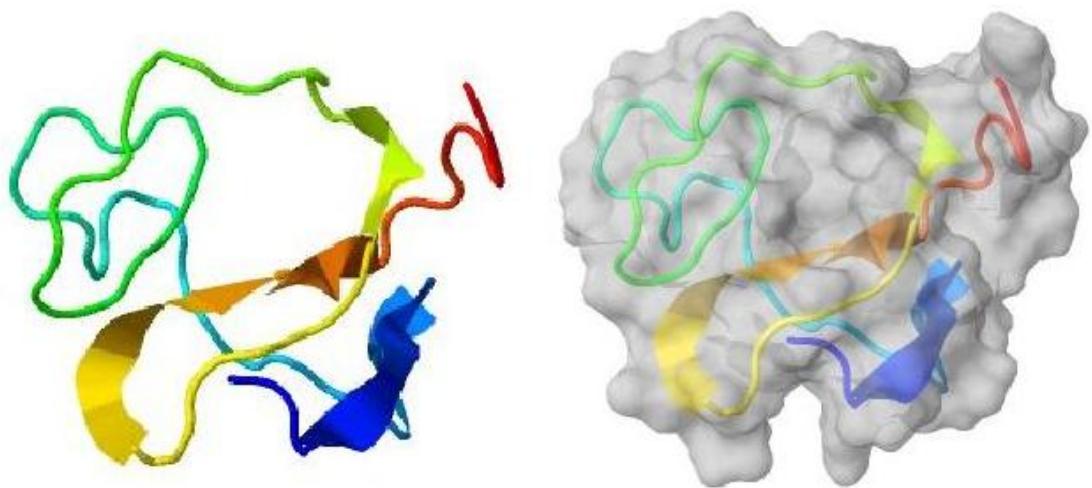


Figura 23. Modelo 3D de cinta y superficie de la construcción del péptido multiepítipo mediante el servidor I-TASSER.

7.7. Refinamiento del modelo terciario

Se mostraron cinco modelos refinados mediante el servidor GalaxyRefine, de los cuales el modelo con mejor puntuación mostró los siguientes parámetros: GDT-HA con 0.9500, RMSD con 0.419, MolProbity con 2.684, puntuación de choque con 29.9, rotámeros pobres de 0.0 y rama favorecida de 80.8. Posteriormente, se evaluó la calidad del refinamiento estructural del modelo uno con la ayuda de distintos servidores web. Se observó un aumento considerable del modelo refinado mediante el servidor Prosa-web, con una puntuación Z de -4.77 en el modelo crudo y -4.51 en el modelo refinado. Los resultados del análisis gráfico de Ramachandran por el servidor MolProbity, para ambos modelos, mostró que el 52.1 % y el 72.6 % de los residuos se encontraron en regiones favorecidas y permitidas, en el modelo crudo. Por otro lado, en el modelo refinado, el 80.8 % y el 95.9 % de residuos se muestran en áreas favorecidas y permitidas (Fig. 24). Este último se seleccionó para los demás análisis complementarios.

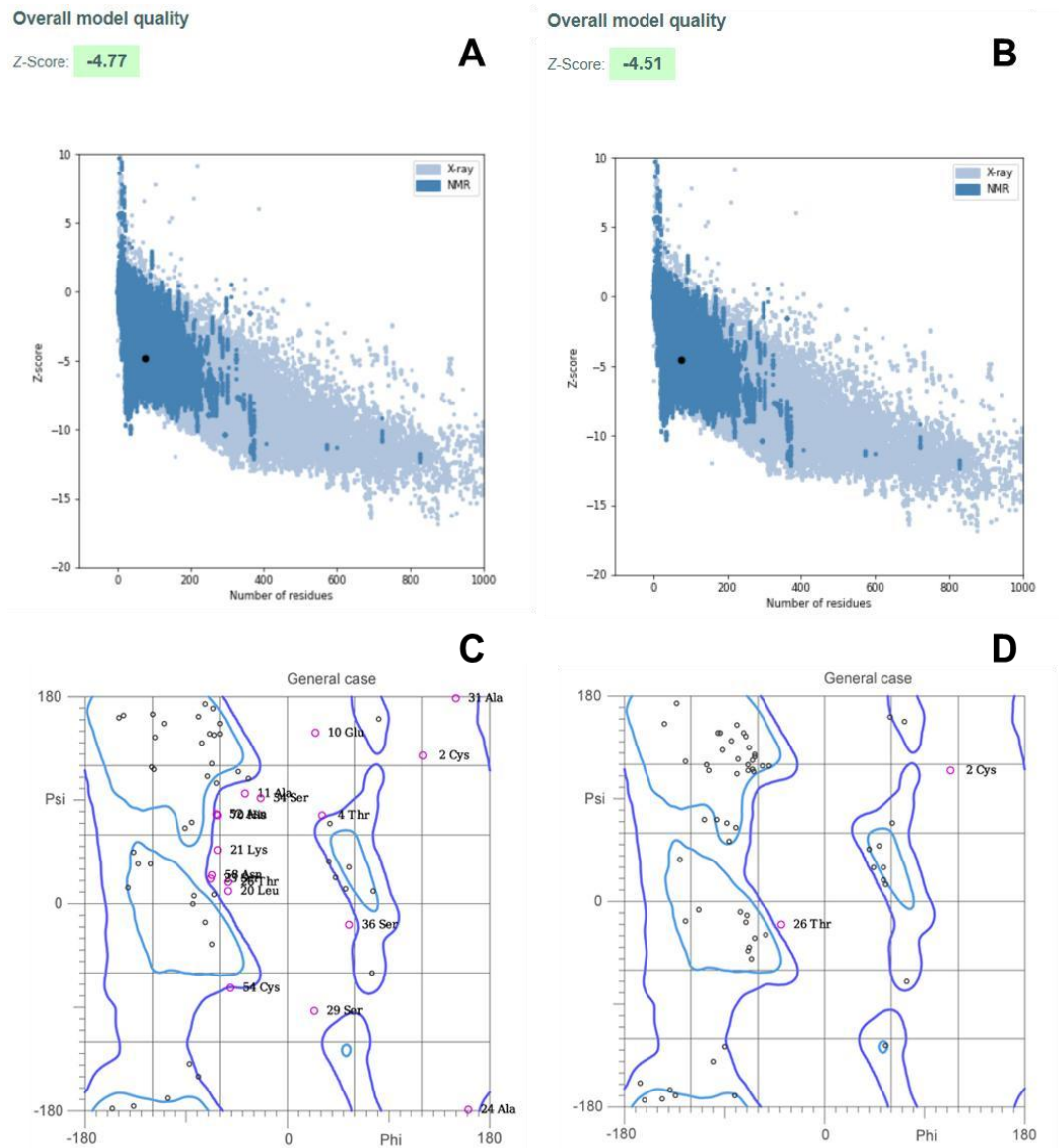


Figura 24. A-B. Se muestran los resultados del procesamiento de refinado por el servidor Prosa-Web, las puntuaciones Z fueron de -4.77 y -4.51, para el modelo crudo y refinado respectivamente. C-B. Análisis gráfico de Ramachandran del modelo crudo muestra 52.1% y el 726 % de residuos en regiones favorecidas, mientras que en el modelo refinado hay una notoria mejora en el porcentaje de residuos en regiones favorecidas, de 80.8% y el 95.9%.

7.8. Predicción de epítomos conformacionales de células B.

Los resultados de la herramienta ElliPro del servidor IEDB mostraron en el primer epítopo tres residuos con una puntuación de 0.822, mientras que el segundo epítopo obtuvo 28 residuos con una puntuación de 0.515. Se utilizó una configuración de 6 Å de distancia máxima y una puntuación de 0.5. Los detalles de los epítomos conformacionales de células B se muestran en la Fig. 25.

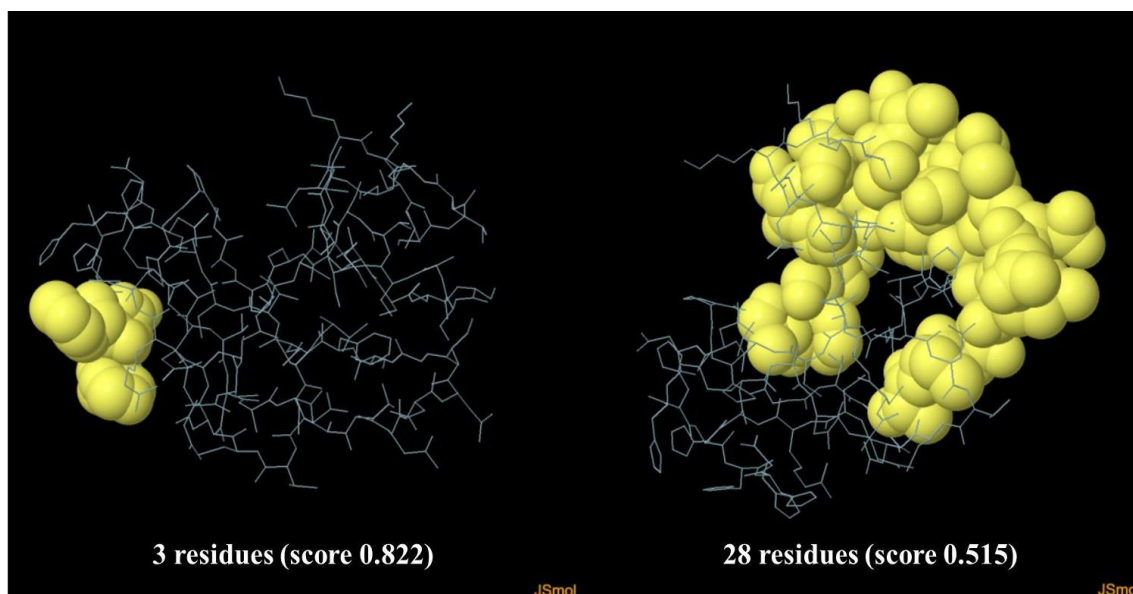


Figura 25. Predicción de epítomos conformacionales de células B por ElliPro, herramienta del servidor IEDB.

7.9. Ingeniería de disulfuro de proteínas

El servidor DbD2 mostró 17 pares de residuos con capacidad de formar enlaces disulfuro. Tales residuos se seleccionaron para su análisis sobre los parámetros de χ^3 : -87 a +97 y un valor de energía de factor B < 2,5, se encontró un par de aminoácidos dentro de los rangos establecidos, que satisfacían la formación de un enlace disulfuro, correspondiente a ALA 16 -VAL 65, que fueron reemplazados por un residuo de cisteína (Fig. 26).

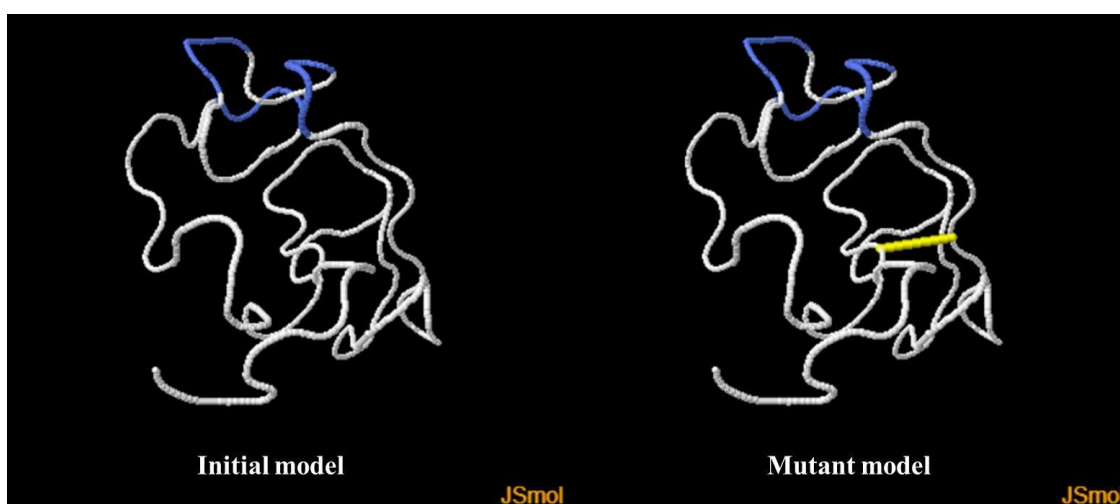


Figura 26. Análisis de enlaces disulfuro del péptido multiepítipo diseñado. Se muestra el enlace disulfuro (línea amarilla) formado en la estructura mutante.

7.10. Traducción inversa, optimización de codones y clonación *in silico*.

La secuencia inicial de la cepa K12 de *E. coli* obtuvo una estimación del valor de CAI y porcentaje de GC de 0.55 y 67.28%, mientras que la secuencia adaptada a codones fue de 1,0 y 51,85%, respectivamente. Se obtuvo un clon exitoso de 5700 pb después de la inserción del fragmento en el vector pET-22b (+) (Fig. 27).

Construct Map:

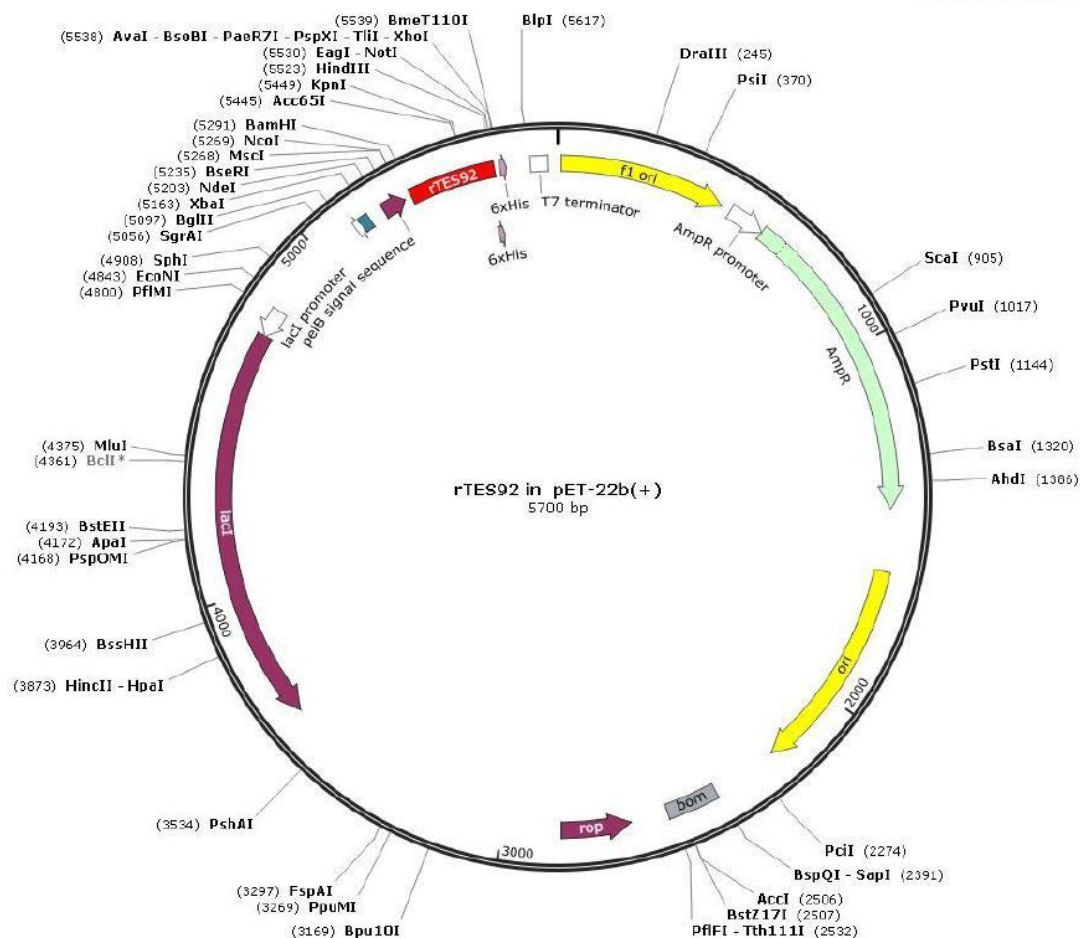


Figura 27. Constructo in silico del clon pET-22b (+) con el gen de interés, por el software Snap Gene.

7.11. Clonación de la subunidad rTES

Observación de la clonación del constructo plasmídico pET-22b (+) con el péptido multiepítotope rTES92 en bacterias *E. coli* TOP10 (Fig. 28), además de su purificación (Fig. 29) y producto de digestión (Fig. 30).

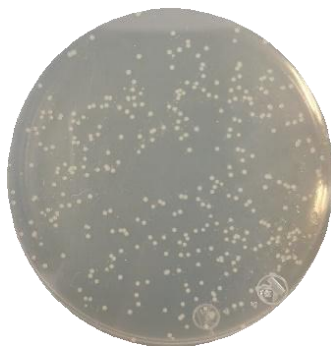


Figura 28. Colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con vector pET-22b (+) /TESr. Agar LB con 100 µg/mL de ampicilina.

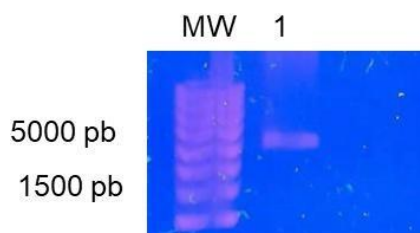


Figura 29. Purificación del plásmido pET-22b (+). Gel de agarosa al 0.75% donde se muestran las bandas correspondientes a las colonias TOP 10 transformadas.

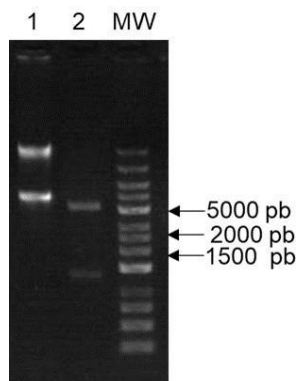


Figura 30. Producto de digestión doble del plásmido pET-22b (+) purificado. Carril 1: Marcador de pares de base (MPB) HyperLadder I; Carril 2: pET22b (+) digerido.

7.12. Expresión de rTES en *E. coli* BL21

A continuación, se muestra la expresión de proteínas luego de la inducción con 1 mM de IPTG en la cepa *E. coli* BL21, se muestran proteínas de diferentes pesos moleculares, en donde se marca con una flecha, una proteína de aproximadamente 10 kDa, que corresponde al peso molecular del péptido multiepítoto reportado por el servidor ExPASy ProtParam (Fig. 31).

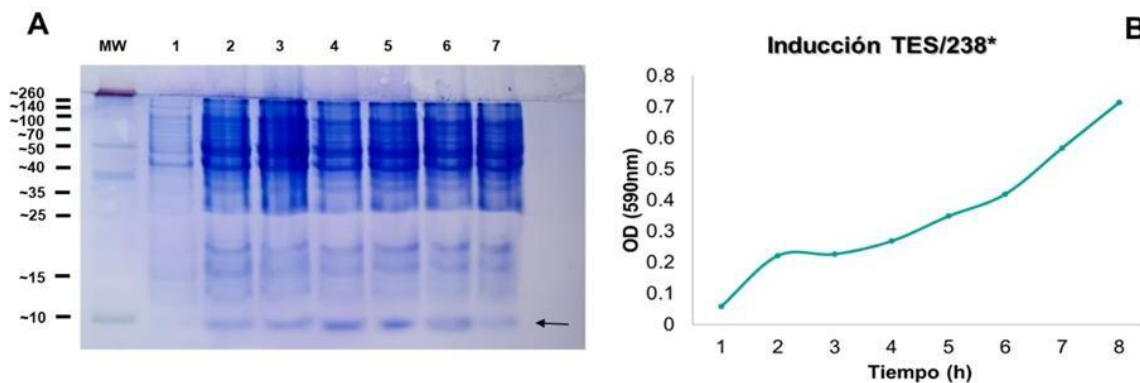


Figura 31. Expresión de TESr de *T. canis* en *E. coli* BL 21 (DE3) en medio LB. A) Curva de inducción de la TESr. B) Análisis densitométrico de la curva de inducción del péptido recombinante TES.

7.13. Purificación de la subunidad rTES

Para la purificación del péptido se realizó al utilizar lisados de bacterias/TESr. Los geles de poliacrilamida de los lisados se tiñeron con azul de Coomassie. Se identificó la banda correspondiente al tamaño de 75 kDa y de mayor intensidad, esta fue cortada del gel para su posterior análisis (Fig. 32).



Figura 32. Análisis del péptido multiepítoto purificado mediante cromatografía de afinidad a metales (Ni^{++}).

7.14. Análisis de reactividad de anticuerpos policlonales anti-rTES

Confirmación del purificado de la proteína rTES, mediante análisis de Western blot, se muestra la banda de aproximadamente 10 kDa (Fig. 33).



Figura 33. Análisis antigénico de proteína purificada rTES mediante Western blot.

7.15. Identificación de los ejemplares adultos

Ejemplares donados por el Laboratorio de parasitología FMVZ-UANL, se observaron vermes con un tamaño que variaba entre los 4 a 12 cm de longitud, de color blanquecino, con cutícula anillada, la región cefálica presentaba dos extensiones cuticulares en los laterales cuyo aspecto se asemejaba al de unas aletas. Se sexaron los ejemplares mediante las diferencias morfológicas que presentaba los machos de las hembras. La primera diferencia fue el tamaño, las hembras de este género fueron de mayor tamaño alcanzando hasta los 12 cm de longitud mientras que el macho presentó un tamaño menor al no superar los 5 cm de longitud. Además, las hembras presentaron en su extremo caudal una terminación tipo punta roma y ligeramente más fina. En el extremo caudal de los machos se observó una espícula. Las características morfológicas distintivas de este género y la diferenciación estructural entre ejemplares machos y hembras, permitió la identificación de los ejemplares recuperados como *T. canis* (Fig. 34).



Figura 34. A) Ejemplares machos y hembras de *T. canis* colectados de muestras de heces de cánidos, B) Parte cefálica de un ejemplar adulto, la flecha muestra las alas cervicales características de la especie.

7.16. Cultivo y eclosión de larvas

Los huevos extraídos a los 30 días mostraron embrionación hasta de un 80% en cada lote, de los cuales el 70% desarrolló la fase larvaria L1 y L2 (Fig. 35).

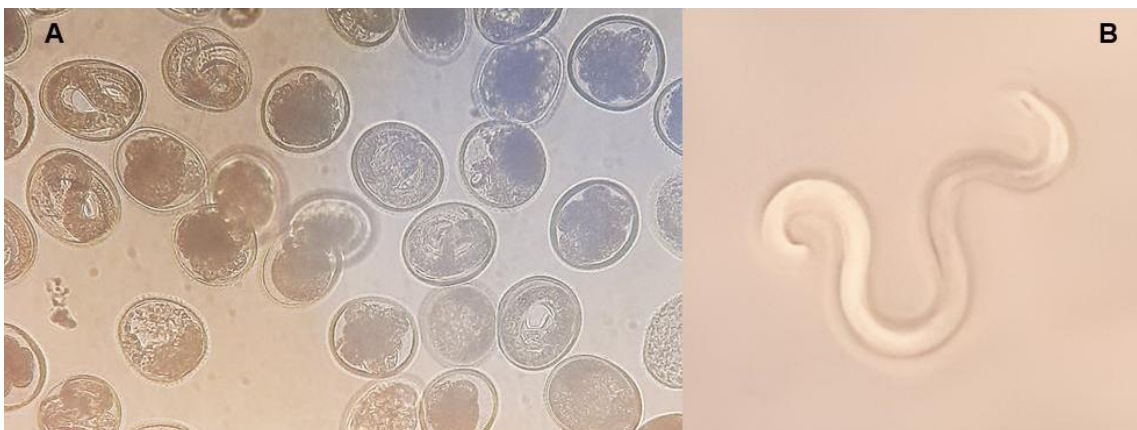


Figura 35. A) Huevos obtenidos *in vitro* en el LPME en diferentes etapas de desarrollo, B) segundo estadio juvenil (L2) de *T. canis*.

7.17. Producción del antígeno de excreción/secreción (E/S)

Se obtuvieron 3 lotes con un volumen final de 80 mL cada uno, de los cual se obtuvo una concentración proteica de 1.4, 1.7 y 2 mg/mL respectivamente.

La electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12.5% del dializado antigénico TES de larvas L2 de *T. canis* mostró una banda de peso molecular de 70 kDa confirmadas con el WB (Figs. 36 y 37).

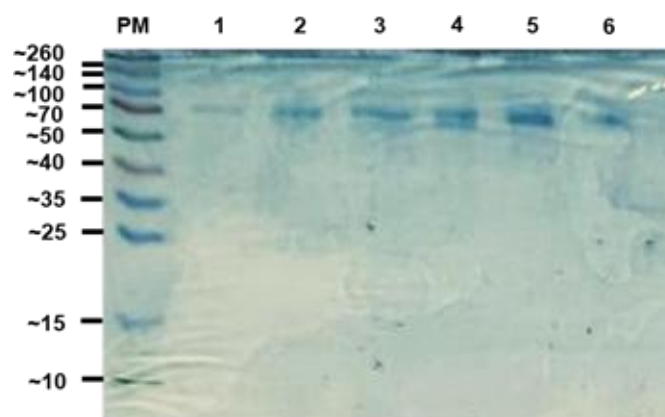


Figura 36. Electroforesis de diferentes fracciones obtenidas del cultivo larvario L2 de *T. canis*. PM, marcador de peso molecular, 1-6, Fracciones de cultivo tomado semanalmente.

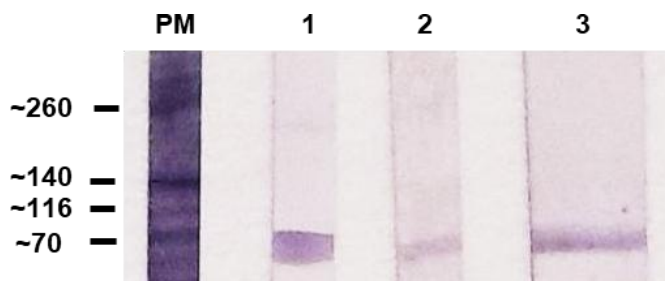


Figura 37. Western blot de 3 diferentes lotes del extracto antigénico obtenido del cultivo del segundo estadio larvario de *T. canis* utilizando anticuerpo inmunoglobulina G de conejo anti-TES. PM. Marcador de peso molecular (marca), carril 1-3: preparación del antígeno de excreción/secreción de *T. canis*.

En la cuantificación proteica mediante Bradford, se obtuvo una concentración de 1.3 mg/mL (Fig. 38).

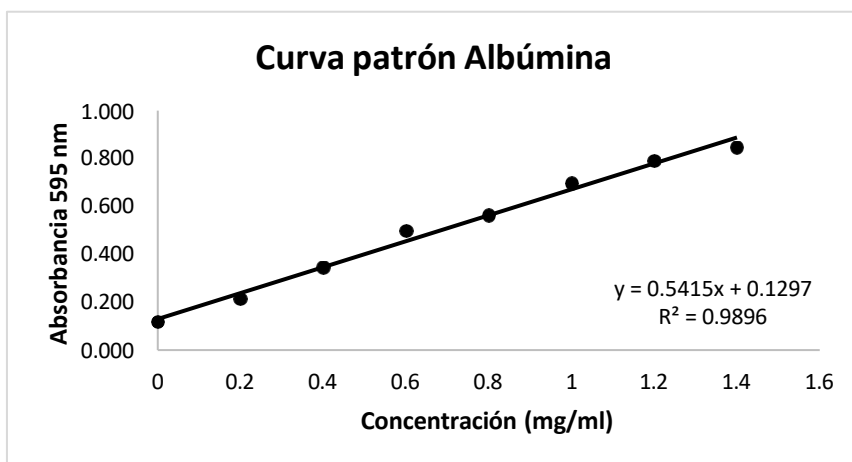


Figura 38. Curva estándar de la cuantificación proteica por el método de Bradford.

7.18. Evaluación de anticuerpos policlonales contra el producto de ES recombinante y nativo de *T. canis*

La concentración óptima del antígeno TES fue de 1 µg/mL, para los anticuerpos de captura la dilución óptima probada fue de 1:8000, mientras que para los anticuerpos conjugados fue de 1:4000. Estas concentraciones fueron las que presentaron mayor diferencia entre el control positivo y negativo (Tabla 6).

Tabla 6. Discriminación entre controles positivos a *T. canis*, negativos y positivos a otras parasitosis.

antiTES-Ig	-	Muestras	
		Positivas	Negativas
1:1000	-	-	+
1:2000	+	+	-
1:4000	++ ^a	+	-
1:8000	++ ^b	-	-
1:16000	+++	-	-

^a Anticuerpos policlonales conjugados ^b Anticuerpos policlonales de captura.

- No hay discriminación entre las muestras.

+ Poca discriminación entre las muestras.

++ Moderada discriminación entre las muestras.

+++ Elevada discriminación entre las muestras.

7.19. Análisis de reactividad de anticuerpos policlonales anti-TES en muestras fecales de cánidos procedentes del estado de Nuevo León

Se establecieron las condiciones óptimas para determinar el punto de corte del ELISA anti-TES recombinante, el cual fue 0.187, el control positivo obtuvo 0.823 y el negativo fue 0.142 DO (Figura 39). De las 100 muestras obtenidas de cánidos, 41 resultaron positivas a *T. canis*, 59 negativas. Se presentó un caso de reactividad cruzada en una muestra positiva a *Ancylostoma caninum* (falso positivo), dando un VPP de 97% y un VPF de 100% (Tabla 7 y 8).

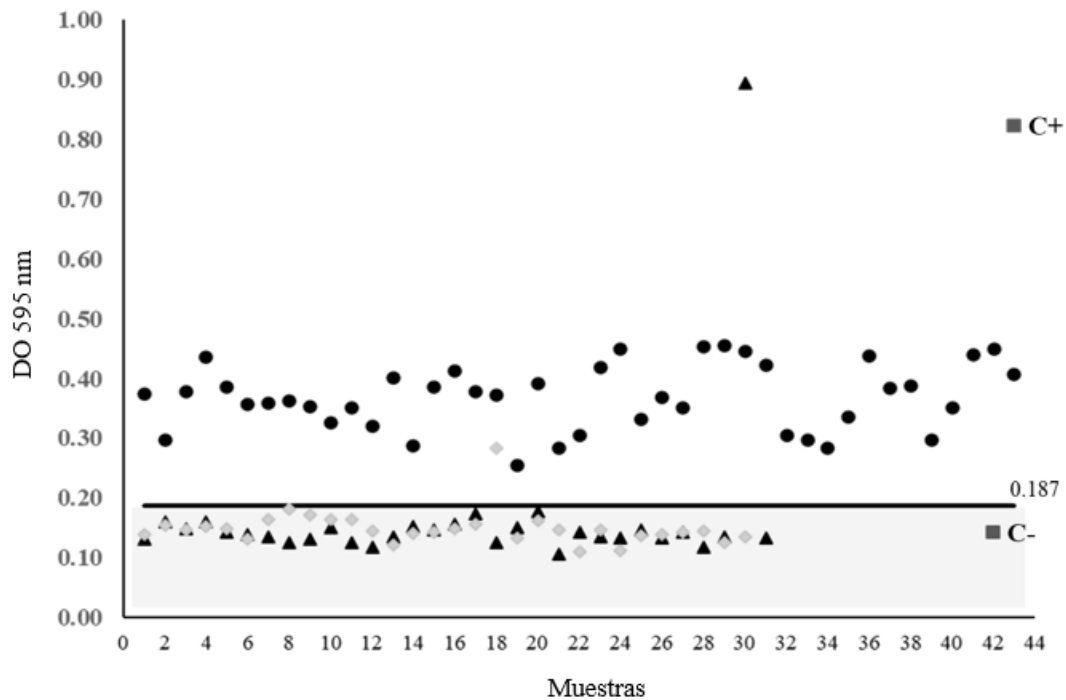


Figura 39. Detección de *T. canis* en cánidos por la técnica de ELISA anti-TES recombinante, en el estado de Nuevo León. El valor de corte se estableció en lecturas de absorbancia de 0.187. Las lecturas se realizaron a una DO de 595 nm (n= 100). En el área sombreada se muestran los valores negativos por debajo de la línea de corte. Se muestran los controles (cuadros) y únicamente un caso señalado (rombos) mostró reactividad cruzada a una de las muestras positivas a *A. caninum*.

De la misma manera se determinó el punto de corte el cual fue 0.206, el control positivo obtuvo 1.191 y el negativo fue 0.069 DO. De las 100 muestras obtenidas de cánidos, 43 resultaron positivas a *T. canis* y 57 negativas (Figura 40). Las muestras que presentaron reactividad cruzada fueron positivas para *Ancylostoma caninum* (2) y *Strongyloides stercoralis* (1) previamente identificadas por MO, obteniendo una especificidad de 95% (falsos positivos), la sensibilidad fue del 100% en las muestras negativas (57). El valor predictivo positivo fue de 93 % mientras que el valor predictivo negativo fue de 100% (Tabla 8).

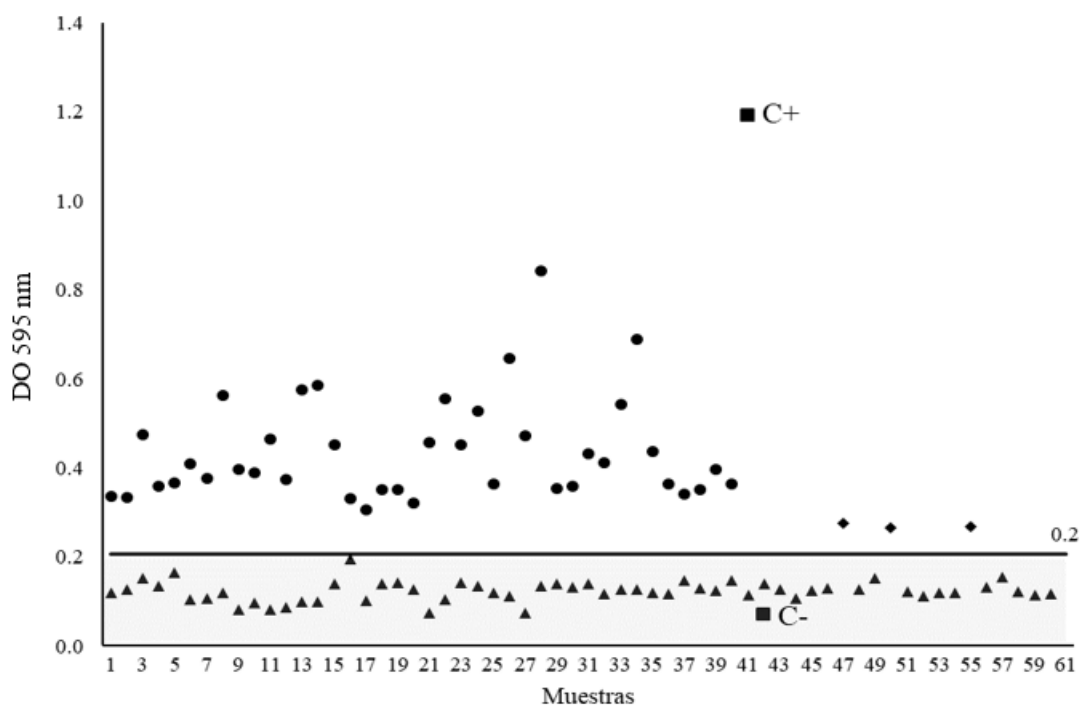


Figura 40. Detección de *T. canis* en cánidos por la técnica de ELISA anti-TES nativo, en el estado de Nuevo León. El valor de corte se estableció en lecturas de absorbancia de 0.206 la cual corresponde a 1 µg/mL del extracto del parásito. Las lecturas se realizaron a una DO de 595 nm (n = 100). En el área sombreada se muestran los valores negativos por debajo de la línea de corte. Se muestran los controles (cuadros) y únicamente tres casos señalados (rombos) mostraron reactividad cruzada a los Ac policlonales anti-TES nativo, correspondiendo dos de ellos a *A. caninum* y una a *S. stercoralis*.

La tabla de contingencia muestra $\chi^2 = 12.562$ y 19.058 , $gl = 1$, $p < 0.05$, por lo que la proporción de muestras positivas a microscopía óptica (MO) es diferente entre las muestras que resultaron positivas al copro-ELISA recombinante (rTES) y nativo (nTES) respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Cuadro de contingencia entre resultados de MO y ELISA de TES de la detección de *T. canis* en muestras de canidos provenientes del estado de Nuevo León. Se muestra la prevalencia de *T. canis* entre paréntesis. $\chi^2 = 12.562$ y 19.058 , $g=1$ $p=0.05$.

Resultado	Técnica		
	MO	ELISA-TESr	ELISA-TESn
Positivo	40	41	43
	(40%)	(41%)	(43%)
Negativo	60	59	57
	(60%)	(59%)	(57%)
Total	100	100	100

Tabla 8. Resultados de la comparación entre las técnicas MO, ELISAr y ELISAn para la detección de *T. canis* en heces de cánidos, procedentes del estado de Nuevo León, México.

Resultados (%)				
Técnica	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
MO	100	100	100	100
ELISA-TESr	100	98	97	100
ELISA-TESn	100	95	93	100

MO: Microscopía óptica

ELISA-TESr: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de TES recombinante

ELISA-TESn: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de TES nativo

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

VIII. DISCUSIÓN

La toxocariasis es una parasitosis considerada zoonótica, su amplia distribución y su sintomatología tan inespecífica hace que sea poco reconocida. Se le considera dentro de las cinco enfermedades parasitarias desatendidas (Voller et al., 1976). Tal motivo impulsó el desarrollo del presente trabajo, con la finalidad de estandarizar una técnica inmunológica que fuera rápida y sensible para el diagnóstico de esta parasitosis.

La prevalencia de perros infectados en Nuevo León fue superior (70%) a la reportada en otros estados de la República Mexicana, como es Tulacingo, México donde se reportó 53% de perros positivos a este helminto (Olave et al., 2019), mientras que, en Puerto Escondido, Oaxaca fue de 47.78% (Vélez et al., 2014). Uno de los principales obstáculos en el estado de Nuevo León y en el País, es que se desconoce la prevalencia, esto se atribuye posiblemente a que los signos son muy variables e inespecíficos que la enfermedad puede pasar silenciosa. Esto representa un reto para la determinación de la prevalencia de enfermedades parasíticas (Vélez et al., 2014; Olave et al., 2019).

El diagnóstico de toxocariasis en caninos se puede diagnosticar mediante análisis coproparasitoscópico, aunque los resultados en ocasiones son insatisfactorios y pueden diagnosticar erróneamente a los pacientes si no se cuenta con personal capacitado. Estos inconvenientes han abierto un umbral hacia la investigación en la búsqueda de una alternativa diagnóstica centrada en el uso de anticuerpos anti-*T. canis* específicos en animales, mediante técnicas inmunológicas como ELISA (De Moura et al., 2018).

Se han desarrollado pocas pruebas de copro-ELISA basadas en la detección de antígenos de excreción-secreción para *T. canis* con diversas sensibilidades y especificidades. Los resultados obtenidos hasta el momento presentan mayor sensibilidad que la purgación con arecolina para su detección (De Moura et al., 2018).

Estudios han comprobado una mejoría en la sensibilidad y especificidad en ensayos de ELISA al emplear proteínas recombinantes como antígenos, tales como rTES-26 (Nguyen et al., 2017), rTES-30 y TES-120 (Mohamad et al., 2009, Peixoto et al., 2011, Santos et al., 2018).

Actualmente existe un kit ELISA para el diagnóstico de la enfermedad en perros; sin embargo, el acceso al mismo es difícil ya que pocos laboratorios cuentan con este kit. De ahí la importancia de nuestro trabajo, buscar una alternativa de diagnóstico enfocada

en el uso de anticuerpos anti-*TES* específicos para la detección de *T. canis* con el objetivo de ayudar al veterinario y médico en general, a establecer un diagnóstico oportuno y contribuir a datos epidemiológicos.

La técnica de copro-ELISA anti-*TES* recombinante se obtuvo mediante el péptido quimérico diseñado con 75 aa, su peso molecular fue de ~7549.99 Da, de estructura y peso menor al reportado por Shams et al. (2021) de 162 aa y 15863,84 Da respectivamente, lo cual determinó el rango de purificación de la proteína. El péptido mostró un pI teórico de 6.51 de naturaleza ligeramente ácido aceptable para la realización de cromatografía de intercambio iónico. Además, la estructura mostró un índice de inestabilidad de 36.33, menor al límite de inestabilidad de 40, por lo que la molécula se considera estable (Shams et al., 2021).

En nuestro modelo de expresión, las cepas utilizadas en esta investigación (TOP 10 y BL21) tuvieron una vida media >10 h, lo que muestra una “buena” estabilidad antigénica (Santos et al., 2018). Se visualizó una proteína de ~10 kDa mediante electroforesis, la cual coincide con el peso molecular estimado del péptido multiepítipo diseñado, se comprobó su reactividad mediante Western blotting, mostró una banda de mismo peso molecular frente a un suero problema de conejo inmunizado con la rTES. Se han reportado diseños, clonación y secuenciación de proteínas recombinante derivadas de antígenos de excreción-secreción de *T. canis*, con la finalidad de emplearlos en nuevas pruebas diagnóstico con un mayor porcentaje de sensibilidad y especificidad (Dlugosz et al., 2015, Olave, 2016; Varghese et al., 2017, Morales et al., 2019; Shams et al., 2021).

El antígeno nativo se obtuvo con algunas modificaciones, al emplear 2 dosis de pamoato de pirantel, para obtener nematodos adultos completos, en comparación a lo reportado por Nieves et al. (2012) donde se administró dosis única, obteniendo menos adultos; esto podría deberse a la cantidad de desparasitante administrado o al grado de parasitosis del animal infectado. Al implementar un esquema de desparasitación se logró evitar la eutanasia de los animales para obtener los parásitos completos, a diferencia de otros estudios en los que se implementaron infecciones experimentales y posteriormente se sacrificó el modelo animal (Del Águila et al., 1988, Jin et al., 2013).

El porcentaje de huevos que se encontraban en fase embrionaria fue del 80% al día 30 de incubación, a diferencia de Nieves et al. (2012), que obtuvieron un 70% de

huevos embrionados en un periodo mayor de 45 días. Esto se puede atribuir a diferentes factores como medio ambientales, o que se tenían un número mayor de huevos fertilizados. Jin et al. (2013) reporta que el número de huevos fertilizados no afecta la obtención de antígenos E/S de *T. canis*, lo cual se difiere ya que se obtuvo una concentración mayor a la reportada. El volumen obtenido del cultivo larvario fue de 80 mL de sobrenadante, misma cantidad reportada por Nieves et al. (2012) pero el volumen total se obtuvo en un periodo de tiempo menor. Por otro lado, Morales (1999) obtuvo un volumen mayor de 200 mL, ya que mantuvieron las larvas durante 6 meses, por ende, utilizaron mayor volumen de medio RPMI-1940. En cuanto al extracto antigénico, el volumen que se obtuvo fue liofilizado y dializado para su purificación por el contrario de Morales (1999) el cual no lo purificó. Además, las concentraciones que obtuvimos fueron 1.4, 1.7 y 2 mg/mL en tres diferentes lotes, mayor a las reportadas por Morales (1999) y Nieves et al. (2012), aunque menor a la reportada por Echeverría (2016) considerando que trabajaron con cantidades mayores de medio.

La proteína nativa de origen de excreción y secreción de 70 kDa, se identificó como una lectina de tipo C, son los componentes más abundantes en los productos de secreción de *T. canis*, su desempeño aun no es del todo claro, sin embargo, las proteínas TES-32 y TES-70 se ha observado cierta homología en cuanto a proteínas presentes en mamíferos, así como la CD23 y receptor de manosa en macrófagos. Los glicanos juegan un papel importante en la modulación de la respuesta inmune, además, de tener la capacidad de producir una respuesta del TLR (Toll like-receptor) y de los receptores de lectinas tipo C en células dendríticas, donde interfieren sobre su activación para evadir la respuesta inmune (Gazzinelli & Nutman, 2018).

Se han identificado una serie de proteínas consideradas de bajo peso molecular (24 a 70 kDa), las cuales han sido descritas por Olave (2016), Echeverría (2016) y Elsemore (2017) y otros autores, estas son sido utilizadas para el diagnóstico de toxocariasis ya que presenta una elevada sensibilidad y especificidad al presentar baja o nula reactividad frente otras helmintiasis. Sin embargo, proteínas entre los 55 a 66 kDa presentan reacción cruzada frente *Ascaris lumbricoides*. Algunos de los estudios recomiendan seguir estudiando la capacidad de detección de estos antígenos, con el fin de aumentar la especificidad y

sensibilidad de la técnica ELISA para evitar reacciones cruzadas frente a otras helmintiasis (Roldán & Rubinsky, 2012; Morales et al., 2019).

Con base a nuestros resultados en la estandarización del copro-ELISA se recomienda emplear como mínimo 5 µg/mL de antígeno rTES y 1 µg/mL de TES nativo para que los anticuerpos policlonales lo detecten a diferencia de Espinoza et al. (2003) y Nieves et al. (2012) que reportan concentraciones de 50 µg/mL y 2 µg/mL respectivamente. La dilución recomendada de anticuerpos policlonales fue más concentrada para el anticuerpo conjugado (1:8000 como Ac de captura y 1:4000 Ac conjugados), a diferencia de lo reportado por Nieves et al. (2012) que utilizaron anticuerpos diluidos 1:400 a 1:20,000 respectivamente. Por lo contrario, Jin et al. (2013) empleó una concentración más concentrada para Ac de captura (1:100) que Ac conjugado (1:24,000). Aunque la concentración de las diluciones sea mayor, sigue siendo poca la cantidad requerida de anticuerpos diluidos para realizar la técnica.

La sensibilidad de los Copro-ELISA que se desarrollaron en el presente trabajo, mostraron una sensibilidad del 100% equiparable a la reportada por Nieves et al. (2012) y mayor en comparación al ELISA empleado por Jin et al. (2013) de 92.2%. La especificidad de copro-ELISA recombinante fue de 98 % mientras que TES-nativo fue 95% inferior a la de otros Copro-ELISA como el reportado por Ávila et al. (2021) que presentó una especificidad optima (100%) frente a *T. canis* y *T. cati*, existen otros copro-ELISA empleados para el diagnóstico de otras helmintiasis, como el reportado por Jara et al. (2019) que detecta *Echinococcus granulosus*. Sin embargo, se puede establecer que es uno de los primeros trabajos realizados de Copro-ELISA a base de anticuerpos anti-TES nativo y anti-TES recombinante implementado para el diagnóstico del nematodo *T. canis* en canidos.

En el presente estudio el copro-ELISA nativo presentó reactividad cruzada a tres muestras positivas *A. caninum* y *S. stercoralis* (falsas positivas), mientras que el copro-ELISA recombinante únicamente mostro reactividad a una muestra positiva a *A. caninum*. Existen estudios en los cuales se han reportado reacciones cruzadas frente a otras helmintiasis como *Ascaris lumbricoides*. Se cree que la carga de parásitos y el tiempo post-infección con *T. canis* puede influenciar los resultados del ensayo debido al número de parásitos que puedan estar presentes y la baja concentración proteica que pudieran

producir estos, por lo que se sugiere realizar un estudio de tiempo post-infección (Stangogiannis et al., 2007; Nandini et al., 2022).

Otra explicación posible para la reacción cruzada (IgE) con otros parásitos es entre las proteínas presentes en los productos de excreción-secreción y somáticos (tropomiosina) de *T. canis* y alergenitos presentes en *Dermatophagoides farinae* (ácaro del polvo). Los resultados muestran posible reacción cruzada entre los glicanos presentes en el extracto excretor-secretor de *T. canis* y el alergenito Der f 15 y Zen-1 purificado de *D. farinae*. Además, reportan reactividad cruzada heterogénea entre la tropomiosina somática, recombinante de *T. canis* y la paramiosina de *D. farinae*, lo cual podrían estar involucrados epítomos de tipo peptídicos, ya que los alergenitos recombinantes no se encuentran glicosilados (Olivry et al., 2024).

En el presente estudio se utilizaron las proteínas TES que han sido uno de los modelos base en la evaluación de técnicas inmunodiagnósticas, ya que muestran buenos resultados como se observa en esta investigación (sensibilidad 100% y especificidad 98%). Nandini et al. (2022) desarrollaron una prueba ELISA a base del antígeno CL-1 recombinante y TES-26, expresadas en un modelo bacteriano, determinaron la presencia de anticuerpos circundantes (IgG), lo cual mostró una seroreactividad entre 37.7-87.9 %. Además, la proteína TES-26 recombinante ha demostrado ser un candidato potencial para el diagnóstico de toxocariasis tanto en animales como en humanos. La prueba ELISA reportada por Mohamad et al. (2009) utilizó TES-26 recombinante para la detección de IgG, mostró una sensibilidad de 80% y una especificidad de 96.2%. Otros estudios han reportado sensibilidad de hasta el 100% (Varghese et al., 2017).

En esta investigación se mostró reactividad cruzada a anquilostomas, sin embargo, fue menos la cantidad de muestras reactivas entre el ELISA a base de anticuerpos anti-TES nativo y recombinante. El estudio de Yamasaki et al. (2000) muestra una evaluación sobre la reactividad cruzada entre su ELISA a base de TES y TES recombinante frente a muestras positivas a otras helmintiasis, el resultado mostró una disminución del 42.2% sobre la reactividad del TES recombinante (19/142), obtuvieron muestras positivas a gnathostomosis, paragonimosis y espirometosis, lo cual muestra una mejora en la especificidad del ensayo al utilizar proteínas recombinantes.

IX. CONCLUSIONES

Los Copro-ELISA diseñados en el presente estudio basados en anticuerpos policlonales anti-TES recombinante y nativo para la detección de antígenos circundantes de *T. canis*, en muestras fecales de caninos domiciliados y comunitarios, presentaron una sensibilidad del 100%, especificidad de 98% y 95%, respectivamente. La especificidad es considerable en ambas técnicas, a comparación con algunos ELISA diseñados para la detección la toxocariasis humana.

Las reacciones cruzadas que se observaron fueron principalmente hacia el anquilostoma *A. caninum*, logrando obtener dos técnicas altamente específicas, aunque las muestras heterólogas se evaluaron y mostraron ligera reactividad cruzada, no se descarta la posibilidad de considerar un estudio más amplio en cantidad y diversidad de muestras de individuos con parásitos provocadas por otros helmintos. Además, se considera que ambas técnicas podrían detectar *T. cati* dada su similitud antigénica entre estas dos especies, resaltando que podría aplicarse en el diagnóstico de toxocariasis en felinos.

X. PERSPECTIVAS

1. Evaluar anticuerpos policlonales anti-TES frente a un mayor número de muestras positivas a otras helmintiasis, para demostrar el grado de especificidad.
2. Evaluar anticuerpos policlonales anti-TES para el diagnóstico de *T. canis*, *T. cati* y *Toxoscaris leonina*; especies muy similares morfológicamente.
3. Determinar el grado de diagnóstico de los anticuerpos policlonales obtenidos frente a infecciones de *Toxocara canis* en especies paraténicas (modelo murino).
4. Comparar resultados de las técnicas copro-ELISA entre técnicas más sensibles y específicas como el PCR.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Adán, A. V. (2007). Estudio de la respuesta dual de anticuerpos IgE e IgG en la toxocariosis humana y su relación con el fenómeno de la atopia. Descripción de alergenitos relevantes de *Toxocara canis* (Tesis doctoral, Universidad Miguel Hernández).
- Alarcón, Z. K., Juyo, V., & Larrota, J. A. (2015). Caracterización epidemiológica de parásitos gastrointestinales zoonóticos en caninos con dueño del área urbana del municipio de La Mesa, Cundinamarca. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 62(1), 20-36.
- Antonopoulos, A., Giannelli, A., Morgan, E. R., & Charlier, J. (2024). Quantifying the neglected: Initial estimation of the global burden and economic impact of human toxocariasis. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*, 100180.
- Apt, B. W. (2014). Infecciones por parásitos más frecuentes y su manejo. *Rev. Med. Clínica Las Condes*, 25(3), 485-528. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70065-3](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70065-3)
- Archelli, S. & Kozubsky L. (2008). *Toxocara* y Toxocariosis* *Toxocara* and toxocariosis. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 3: 379-84.
- Ávila, H. G., Risso, M. G., Ruybal, P., Repetto, S. A., Butti, M. J., Trangoni, M. D., ... & Periago, M. V. (2021). Development of a low-cost copro-LAMP assay for simultaneous copro-detection of *Toxocara canis* and *Toxocara cati*. *Parasitology*, 148(7), 819-826.
- Ayelign, B., Akalu, Y., Teferi, B., Molla, M. D., & Shibabaw, T. (2020). Helminth Induced Immunoregulation and Novel Therapeutic Avenue of Allergy. *Journal of asthma and allergy*, 13, 439–451. <https://doi.org/10.2147/JAA.S273556>

- Ayinmode, A. B., Obebe, O. O., & Olayemi, E. (2016). Prevalence of potentially zoonotic gastrointestinal parasites in canine faeces in Ibadan, Nigeria. *Ghana medical journal*, 50(4), 201-206.
- Badri, M., Ghaffarifar, F., Hassan, Z. M., Dalimi, A., & Cortes, H. (2020). Immunoregulatory Effects of Somatic Extract of *Toxocara canis* on Airway Inflammations in Murine Model. *Iranian journal of parasitology*, 15(4), 500–510. <https://doi.org/10.18502/ijpa.v15i4.4855>
- Bowman D.D. (2011). *Parasitología para Veterinarios*. Elsevier: Barcelona, pp. 152-153.
- Chen, J., Liu, Q., Liu, GH, Zheng, WB, Hong, SJ, Sugiyama, H., Zhu, XQ y Elsheitka, HM (2018). Toxocariasis: una amenaza silenciosa con un impacto progresivo en la salud pública. *Enfermedades infecciosas de la pobreza*, 7 (1), 59. <https://doi.org/10.1186/s40249-018-0437-0>
- Chidumayo N. N. (2020). Prevalence of *Toxocara* in dogs and cats in Africa. *Advances in parasitology*, 109, 861–871. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.01.032>
- Ciarmela, M. L. (2008). Efecto ovicida de hongos del suelo sobre huevos de *Toxocara canis* (Werner) Johnston (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata). <https://doi.org/10.35537/10915/4409>
- Cordero del Campillo, M., & Rojo Vázquez, F. A. (1999). *Parasitología veterinaria*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. p. 77-78; 221-222; 620-623.
- De la Fé Rodríguez, D., Duménigo Ripoll, B., Brito Alberto, E & Aguiar Sotelo, J. (2006). *Toxocara canis* y Síndrome Larva Migrans Visceralis (*Toxocara canis* and Syndrome Larva Migrans Visceralis). *Revista Electrónica de Veterinaria* 4:1-42.
- De Moura, M. Q., de Macedo, M. R. P., da Silva Terto, W. D., da Costa Avila, L. F., Leite, F. P. L., Scaini, C. J., ... & Berne, M. E. A. (2018). Detection of *Toxocara canis* DNA in tissues of experimentally infected mice. *Acta tropica*, 187, 51-56.

- De Savigny, D. H. (1975). In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans.
- Del Águila, C., Cuellar, C., & Guillen, J. L. (1988). Excretory/secretory antigen of *Toxocara canis*: recognition profiles of polyclonal and larvicidal monoclonal antibodies. *Parasite immunology*, 10(2), 237-241.
- Despommier, D. (2003). Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clinical microbiology reviews*, 16(2), 265–272. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.265-272.2003>
- Długosz, E., Wasyl, K., Klockiewicz, M., & Wiśniewski, M. (2015). *Toxocara canis* mucins among other excretory-secretory antigens induce in vitro secretion of cytokines by mouse splenocytes. *Parasitology research*, 114, 3365-3371. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4561-5>
- Durant, J.F., Ireng, L.M., Fogt-Wyrwas, R., Dumont, C., Doucet, JP, Mignon, B., Losson, B. y Gala, J.L. (2012). Ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real dúplex para la detección y discriminación de los huevos de *Toxocara canis* y *Toxocara cati* (Nematoda, Ascaridoidea) en muestras de suelo y heces. *Parásitos y vectores*, 5, 288. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-288>
- Echeverría Cordo, S. E. (2016). Elaboración de un test de diagnóstico para detección del parásito *Toxocara Canis*. (Maestría en Biotecnología, Universidad de la República Uruguay).
- Elsemore, D. A., Geng, J., Cote, J., Hanna, R., Lucio-Forster, A., & Bowman, D. D. (2017). Enzyme-linked immunosorbent assays for coproantigen detection of *Ancylostoma caninum* and *Toxocara canis* in dogs and *Toxocara cati* in cats. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 29(5), 645–653. <https://doi.org/10.1177/1040638717706098>

- Elsheikha, H.M. (2014). The future of parasitology: challenges and opportunities. *Frontiers in Veterinary Science* 1: 1-2.
- Engelbrecht, J., Heilig, J. S., & Brent, R. (2001). Preparation of bacterial plasmid DNA. *Current protocols in immunology, Chapter* 10,. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1003s27>
- Espinoza, Y., Huapaya, P., Sevilla, C., Huiza, A., Jiménez, S., & Náquira, C. (2003, December). Toxocariosis humana: seroprevalencia en población de Lima mediante la técnica de ELISA. In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 64, No. 4, pp. 228-232).
- Ezema K. U., Malgwi S. A., Zango M. K., Kyari F., Tukur S. M., Mohammed A., & Kayeri B. K. (2019). Gastrointestinal parasites of dogs (*Canis familiaris*) in Maiduguri, Borno State, Northeastern Nigeria: Risk factors and zoonotic implications for human health. *Veterinary world*, 12(7), 1150–1153. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1150-1153>
- Fillaux, J., & Magnaval, J. F. (2013). Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Veterinary parasitology*, 193(4), 327–336. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.028>
- Gazzinelli-Guimaraes, P. H., & Nutman, T. B. (2018). Helminth parasites and immune regulation. *F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-1685. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15596.1>
- González - Páez, G. E., Alba-Hurtado, F., García-Tovar, C. G., & Argüello-García, R. (2014). Proteinases in excretory-secretory products of *Toxocara canis* second-stage larvae: zymography and modeling insights. *BioMed research international*, 2014, 418708. <https://doi.org/10.1155/2014/418708>
- Hamilton, C. M., Brandes, S., Holland, C. V., & Pinelli, E. (2008). Cytokine expression in the brains of *Toxocara canis*-infected mice. *Parasite Immunology*, 30(3), 181-185. [doi: 10.1111/j.1365-3024.2007.01002x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.01002x)

- Hernandez, L., Quevedo-Acosta, Y., Vazquez, K., Gomez-Trevino, A., Zarate-Ramos, J. J., Macias, M. A., & Hurtado, J. J. (2018). Study of the effect of metal complexes on morphology and viability of embryonated *Toxocara canis* eggs. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 18(10), 548-553.
- Hewitson, J. P., Grainger, J. R., & Maizels, R. M. (2009). Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and biochemical parasitology*, 167(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.04.008>
- Hombu A, Yoshida A. Kikuchi T. & Nagayasu E. (2017). Treatment of larva migrans syndrome with long-term administration of albendazole. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 10:1-6
- Jara, L.M., Rodríguez, M., Altamirano, F., Herrera, A., Verastegui, M., Gímenez-Lirola, LG, Gilman, R.H. y Gavidia, C.M. (2019). Desarrollo y validación de un sándwich de ensayo inmunoabsorbente ligado a coproenzimas para la detección de antígenos de membrana solubles de *Echinococcus granulosus* en perros. *La revista americana de medicina e higiene tropical*, 100 (2), 330–335.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0645>
- Jin, Y., Shen, C., Huh, S., Sohn, W. M., Choi, M. H., & Hong, S. T. (2013). Serodiagnosis of toxocariasis by ELISA using crude antigen of *Toxocara canis* larvae. *The Korean journal of parasitology*, 51(4), 433–439.
<https://doi.org/10.3347/kjp.2013.51.4.433>
- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2021). Expression of Cloned Genes in *E. coli* Using IPTG-Inducible Promoters. *Cold Spring Harbor protocols*, 2021(2), 10.1101/pdb.prot102137. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102137>
- Köchle, B. R. (2019). Estudio de las zoonosis parasitarias en parques públicos de Valencia con enfoque a *Toxocara* spp., ¿un problema para la salud pública? (Bachelor's thesis).

- Ma, G., Holland, C. V., Wang, T., Hofmann, A., Fan, C. K., Maizels, R. M., Hotez, P. J., & Gasser, R. B. (2018). Human toxocariasis. *The Lancet. Infectious diseases*, 18(1), e14–e24. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30331-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30331-6)
- Maizels, R. M. (2013). *Toxocara canis*: molecular basis of immune recognition and evasion. *Veterinary parasitology*, 193(4), 365–374. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.032>
- Maizels, R.M. (1984). Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite Immunology* 6:23-37.
- Mesa-Arango, J. A., Olave-Velandia, A. M., García-Montoya, G. M., Isaza-Agudelo, J. P., Jiménez-Ruiz, A., & Alzate, J. F. (2022). Evaluation of new *Toxocara canis* chimeric antigens as an alternative to conventional TES-Ag for anti-Toxocara antibodies detection. *Heliyon*, 8(10), e11144. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11144>
- Mircean, V., Titilincu A., & Vasile C. (2010). Prevalence of endoparasites in household cat (*Felis catus*) populations from Transylvania (Romania) and association with risk factors. *Veterinary parasitology*, 171(1-2), 163-166. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.03.005>
- Mohamad, S., Azmi, N.C.& Noordin, R. (2009). Desarrollo y evaluación de un ensayo sensible y específico para el diagnóstico de toxocariasis humana mediante el uso de tres antígenos recombinantes (TES-26, TES-30USM y TES-120). *Revista de microbiología clínica*, 47 (6), 1712-1717. <https://doi.org/10.1128/JCM.00001-09>
- Morales Reyes, O. L. (1999). Identificación de antígenos de *Toxocara canis* mediante la técnica de Western Blot en conejos infectados experimentalmente (Doctoral dissertation).
- Morales Sánchez, M., Soto Olarte, S., Villada Durango, Z., Buitrago Mejía, J., & Uribe Corrales, N. (2016). Helmintos gastrointestinales zoonóticos de perros en parques

públicos y su peligro para la salud pública. CES Salud Pública, 7(2). Recuperado de http://revistas.ces.edu.co/index.php/ces_salud_publica/article/view/3593

Morales-Yanez, F. J., Sariego, I., Vincke, C., Hassanzadeh-Ghassabeh, G., Polman, K., & Muyldermans, S. (2019). An innovative approach in the detection of *Toxocara canis* excretory/secretory antigens using specific nanobodies. *International journal for parasitology*, 49(8), 635-645.

Moreira, G. M. S. G., de Lima Telmo, P., Mendonça, M., Moreira, Â. N., McBride, A. J. A., Scaini, C. J., & Conceição, F. R. (2014). Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends in parasitology*, 30(9), 456-464.

Nandini, A., Varghese, A., Bora, C. A. F., Deepa, C. K., Malangmei, L., Raina, O. K., Verma, M. R., Kumar, K. G. A., John, L., Asaf, M., Kumar, G. S., Hembram, P. K., & Ravindran, R. (2022). Prevalence of Anti-*Toxocara canis* Antibodies in Dogs Detected with Recombinant Cathepsin L-1 and TES-26 Antigens in Three States of India. *Acta parasitologica*, 67(1), 523–529. <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00464-7>

Nguyen H.H., Vo D.T., Thai T.T.T., Le T.T.T., Le T.D., Hoang N.S. (2017). The 33.1 kDa Excretory/secretory Protein Produced by *Toxocara canis* Larvae Serves as a Potential Common Biomarker for Serodiagnosis of Toxocariasis in Paratenic Animals and Human. *Iran Journal of Parasitology*, 12(1):69-82.

Nieves, A., Ortega, B., Martinez, M., Castejon, O., Lares, M., & Ferrer, E. (2012). Standardization of ELISA technique for the immunological diagnosis of human toxocariasis. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 52(1), 21-32.

Noordin, R., Smith, H.V., Mohamad, S., Maizels, R.M. y Fong, M.Y. (2005). Comparación de IgG-ELISA e IgG4-ELISA para el serodiagnóstico de *Toxocara*. *Acta trópica*, 93 (1), 57-62.

- Norhaida, A., Suharni, M., Liza Sharmini, AT, Tuda, J. y Rahmah, N. (2008). rTES-30USM: clonación mediante PCR de ensamblaje, expresión y evaluación de su utilidad en la detección de toxocariasis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 102 (2), 151-160.
- Oguz, B., Ozdal, N. & Serdar Deger, M. (2018). Análisis genético de *Toxocara* spp. en perros y gatos callejeros en la provincia de Van, Este de Turquía. *Revista de Investigación Veterinaria*, 62(3), 291-295. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0042>
- Okulewicz, A., Perec Matysiak, A., Buńkowska, K., & Hildebrand, J. (2012). *Toxocara canis*, *Toxocara cati* and *Toxascaris leonina* in wild and domestic carnivores. *Helminthologia*, 49(1), 3-10. <https://doi.org/10.2478/s11687-012-0001-6>
- Olave, A. M., Mesa, J. A., Botero, J. H., Patiño, E. B., García, G. M., & Alzate, J. F. (2016). Producción y evaluación del antígeno recombinante TES-30 de *Toxocara canis* para el inmunodiagnóstico de toxocariasis. *Biomédica*, 36(1), 39-51. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i1.2617>
- Olave-Leyva, J., García-Reyna, P., Martínez-Juárez, V., Figueroa-Castillo, J., Luqueño-Mejía, C., & Avila-Castillo, R. (2019). Prevalencia de helmintos gastrointestinales en perros procedentes del servicio de Salud de Tulancingo, Hidalgo. *Abanico veterinario*, 9.
- Olivry, T., Mas-Fontao, A., Jacquenet, S., Aumayr, M., Tsukui, T., Gomord, V., Faye, L., & Favrot, C. (2024). Identification of cross-reactive allergens between the *Dermatophagoides farinae* house dust mite and the *Toxocara canis* nematode in dogs with suspected allergies. *Veterinary dermatology*, 35(6), 662–671. <https://doi.org/10.1111/vde.13295>
- Overgaauw, P. A., & van Knapen, F. (2013). Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Veterinary parasitology*, 193(4), 398–403. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.035>

- Overgaauw, P., Vinke, C. M., Hagen, M., & Lipman, L. (2020). A One Health Perspective on the Human-Companion Animal Relationship with Emphasis on Zoonotic Aspects. *International journal of environmental research and public health*, 17(11), 3789. <https://doi.org/10.3390/ijerph17113789>
- Pawlowski, Z. (2001). Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *Journal of Helminthology* 75: 299–305.
- Peixoto, P. L., Nascimento, E., Cançado, G. G., Miranda, R. R., Rocha, R. L., Araújo, R. N., & Fujiwara, R. T. (2011). Identification of candidate antigens from adult stages of *Toxocara canis* for the serodiagnosis of human toxocariasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(2), 200–206. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762011000200014>.
- Peña, I., Vidal, F., Arnaldo del Toro, R., Hernández, A., & Zapata, M. M. (2017). Zoonosis parasitarias causadas por perros y gatos, aspecto a considerar en Salud Pública de Cuba. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 18(10), 1-11. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63653470002> Fecha de acceso: 20 agt. 2020.
- Pinelli, E., Brandes, S., Dormans, J., Fonville, M., Hamilton, C. M., & Der Giessen, J. V. (2007). *Toxocara canis*: Effect of inoculum size on pulmonary pathology and cytokine expression in BALB/c mice. *Experimental Parasitology*, 115(1), 76-82. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2006.06.002>
- Quiroz, R. (2005). Cestodos de perros y gatos. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. Ed. Limusa, 303-320.
- Rangel, A. A. H., & Sahagún, C. A. A. (2016). Fluctuaciones poblacionales de parásitos gastrointestinales en caninos en condición de calle. *Jóvenes en la Ciencia*, 2(1), 21-25. Disponible en: <http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/720>. Fecha de acceso: 05 agt. 2020.

- Raza, A., Rand, J., Qamar, AG, Jabbar, A. y Kopp, S. (2018). Parásitos gastrointestinales en perros de refugio: ocurrencia, patología, tratamiento y riesgo para los trabajadores de refugios. *Animales: una revista de acceso abierto de MDPI*, 8 (7), 108. <https://doi.org/10.3390/ani8070108>
- Rojas-Salamanca, A. C., León-Bustamante, M. C., & Bustamante-Saavedra, O. R. (2016). *Toxocara canis*: una zoonosis frecuente a nivel mundial. *Ciencia y Agricultura*, 13(1), 19-27.
- Roldán, W. H., & Rubinsky-Elefant, G. (2012). Immunodiagnosis of human toxocariasis. Serological diagnosis of certain human, animal and plant diseases, 97-112.
- Roldán, W. H., Espinoza, Y. A., Huapaya, P. E., & Jiménez, S. (2010). Diagnóstico de la toxocarosis humana. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 27(4), 613-620.
- Romano, N., Azah, MN, Rahmah, N., Lim, YAL y Rohela, M. (2010). Seroprevalencia de toxocariasis entre Orang Asli (pueblos indígenas) en Malasia utilizando dos inmunoensayos. *Biomedicina tropical*, 27 (3), 585-594.
- Santos, L. M. D., de Moura, M. Q., Azevedo, M. L., Marques, G. A., Avila, L. F. D. C., Scaini, C. J., Berne, M. E., Moreira, Â. N., & Conceição, F. R. (2018). Reactivity of recombinant *Toxocara canis* TES-30/120 in experimentally infected mice. *Parasite immunology*, 40(8), e12568. <https://doi.org/10.1111/pim.12568>.
- Santos, L., Donassolo, R.A., Berna, M.E., Leite, F., Avila, L., Scaini, C.J., Moreira, Â. N., & Conceição, F.R. (2019). El potencial serodiagnóstico de las proteínas recombinantes TES-30 y TES-120 en un ELISA indirecto en el diagnóstico de toxocariasis en bovinos, equinos y ovinos. *PloS uno*, 14 (3), e0213830. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213830>
- Santos, L.M.D., Cerqueira, M.P., Gaboardi, G.C., Magalhães, C.G., Donassolo, R.A., Rodrigues, R.R., & Scaini, C.J. (2020). Evaluación de TES glicosilada de *Toxocara canis* producida en *Pichia pastoris* para el inmunodiagnóstico de la

toxocariasis humana. Archivos Brasileños de Biología y Tecnología, 63.
<https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020190148>

Schnieder, T., Laabs, E., & Welz, C. (2011). Larval development of *Toxocara canis* in dogs. Veterinary Parasitology, 175(3-4), 193-206. doi:
[10.1016/j.vetpar.2010.10.027](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.027)

Shams, M., Nourmohammadi, H., Asghari, A., Basati, G., Majidiani, H., Naserifar, R., & Irannejad, H. (2021). Construction of a multi-epitope protein for human *Toxocara canis* detection: Immunoinformatics approach multi-epitope construct for *T. canis* serodiagnosis. Informatics in Medicine Unlocked, 26, 100732.

Smith, H., Holland, C., Taylor, M., Magnaval, J.F., Schantz, P., & Maizels, R. (2009). How common is human toxocariasis? Towards

Sperotto, R. L., Kremer, F. S., Berne, M. E. A., De Ávila, L. F. C., Da Silva Pinto, L., Monteiro K. M., Silva, C. K., Bunselmeyer, F. H., Berne, N. & Borsuk, S. (2017). Proteomic analysis of *Toxocara canis* excretory and secretory (TES) proteins. Molecular and biochemical parasitology, 211, 39-47.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.09.002>

Stangogiannis, D. E., Marval, H., de Moreno, M. M., Martínez, M., & Stangogiannis, D. C. (2007). Infección experimental en ratones con larva migrans ocular [Experimental ocular larva migrans infection in mice]. Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia, 82(2), 89–93. <https://doi.org/10.4321/s0365-66912007000200006>.

Szabová E., Juriš P., Miterpáková M., Antolová D., Papajová I., & Šefčíková H. (2007). Prevalence of important zoonotic parasites in dog populations from the Slovak Republic. Helminthologia, 44(4), 170-176. <https://doi.org/10.2478/s11687-007-0027-3>

Thomas, D., Jeyathilakan, N., Abdul Basith, S., & Senthilkumar, T. M. (2016). *In vitro* production of *Toxocara canis* excretory-secretory (TES) antigen. Journal of

parasitic diseases: official organ of the Indian Society for Parasitology, 40(3), 1038–1043. <https://doi.org/10.1007/s12639-014-0630-4>

Varghese, A., Raina, O. K., Chandra, D., Mirdha, B. R., Kelawala, N. H., Solanki, J. B., Kumar, N., Ravindran, R., Arun, A., Rialch, A., Lalrinkima, H., Kelawala, R. N., & Samanta, S. (2017). Sero-detection of *Toxocara canis* infection in human with *T.canis* recombinant arginine kinase, cathepsin L-1 and TES-26 antigens. *Acta parasitologica*, 62(4), 775–778. <https://doi.org/10.1515/ap-2017-0093>

Vásquez, L. R., Daza, V. C., Vergara, D., Rivera, O., Cordero, H., & Dueñas, J. (2005). Prevalencia de *Toxocara Canis* y Otros Parásitos Intestinales en Caninos en la Ciudad de Popayán, 2004. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad del Cauca*, 7(4), 13-21.

Vélez Hernández L., Reyes Barrera K. L., Rojas Almaraz D., Calderón Oropeza M. A., Cruz Vázquez J. K., & Arcos García J. L. (2014). Riesgo potencial de parásitos zoonóticos presentes en heces caninas en Puerto Escondido, Oaxaca. *salud pública de México*. 56(6), 625-630. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342014000600012 Fecha de acceso: 10 de abril 2020.

Villeneuve, A., Polley, L., Jenkins, E., Schurer, J., Gilleard, J., Kutz, S., ... & Gagné, F. (2015). Parasite prevalence in fecal samples from shelter dogs and cats across the Canadian provinces. *Parasites & vectors*, 8(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0870-x>

Voller, A., Bidwell, D. E., & Bartlett, A. N. N. (1976). Enzyme immunoassays in diagnostic medicine: theory and practice. *Bulletin of the World Health Organization*, 53(1), 55.

Woodhall D., Eberhard M., Parise M. (2014). Neglected Parasitic Infections in the United States: Toxocariasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 5: 810- 813.

- Yamasaki H., Araki K., Lim P. K., Zasmy N., Mak, J. W., Taib, R., & Aoki, T. (2000). Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. *Journal of clinical microbiology*, 38(4), 1409–1413. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.4.1409-1413.2000>
- Yunus, M. H., Tan Farrizam, S. N., Abdul Karim, I. Z., & Noordin, R. (2018). A Lateral Flow Rapid Test for Human Toxocariasis Developed Using Three *Toxocara canis* Recombinant Antigens. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 98(1), 32–38. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0632>
- Zahabiun, F., Sadjjadi, SM, Yunus, MH, Rahumatullah, A., Moghaddam, MH, Saidin, S. & Noordin, R. (2015). Producción de antígeno recombinante de *Toxocara cati* TES-120 y comparación con su homólogo de *T. canis* para el serodiagnóstico de toxocariasis. *La revista estadounidense de medicina e higiene tropical*, 93 (2), 319–325. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0190>
- Zajac A.M., Conboy G. (2012). *Veterinary Clinical Parasitology*, 8th ed. Wiley-Blackwell, Oxford, UK. pp. 54, 60, 72 y 76.
- Zibaei, M., Firoozeh, F., Bahrami, P. y Sadjjadi, SM (2013). Investigación de anticuerpos anti-*Toxocara* en pacientes epilépticos y comparación de dos métodos: ELISA y Western blot. *Investigación y tratamiento de la epilepsia*, 2013, 156815. <https://doi.org/10.1155/2013/156815>

Páginas electrónicas

- Engormix (2014). Prevalencia de *Toxocara canis* y otros parásitos intestinales en Caninos en la ciudad de Popayán, 2004. <http://www.engormix.com/MA-mascotas/sanidad/articulos/prevalencia-toxocara-canis-otros-t5466/165-p0.htm> (verificado el 03/10/20)
- CDC (2019). Toxocariasis FAQs. Centers for Disease Control and Prevention https://www.cdc.gov/toxocariasis/symptoms/?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/parasites/toxocariasis/gen_info/faqs.html (verificado el 15/11/19)

CDC (2025). Toxocariasis FAQs. Centers for Disease Control and Prevention
https://www.cdc.gov/dpdx/toxocariasis/modules/Toxocara_LifeCycle_lg.jpg
(verificado el 06/02/2025)

OMS (2017). Helminthiasis transmitidas por el suelo. Organización Mundial de la Salud <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/es/8/02/2019> (verificado el 08/02/2019).

World Health Organization. (1992). Métodos básicos de laboratorio en parasitología médica. Organización Mundial de la Salud. <https://iris.who.int/handle/10665/38858>

Servidores:

Bepitope <http://bepitope.ibs.fr/>

ABCpred http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/ABC_submission.html

Bepired Linear Epitope Prediction 2.0 <http://tools.iedb.org/bcell>

Bepired 3.0 <https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-3.0/>

SVMTriP <http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/index.php>

IL-4 pred <http://crdd.osdd.net/raghava/il4pred>

IL-4 pred <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/il10pred/predict3.php>

IL-10 pred <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/il10pred/predict3.php>

SOPMA https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html

PSIPRED <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

I-TASSER <https://zhanggroup.org/I-TASSER/>

IEDB <https://www.iedb.org/>

XII. RESUMEN BIOGRÁFICO

Ana Cristina González Morales

Candidato para el Grado de:

Doctor en Ciencias con Orientación en Microbiología

**Tesis: EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS TES PARA EL DIAGNÓSTICO DE
Toxocara canis (Werner 1782) MEDIANTE UN ENSAYO
INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA)**

Campo de estudio: Diagnóstico de enfermedades parasitarias

Biografía:

**Datos Personales: Nacido el 24 de noviembre de 1992, hija de Jorge Jaime
González Puente† y María Margarita Morales Silva, en Durango, Durango.**

Educación:

**Egresado de la Universidad Juárez del Estado de Durango. con el título de Médico
Veterinario Zootecnista, en el 2016 recibiendo medalla al mérito académico “Lic.
Benito Juárez”.**

Obtención del grado de Maestro en

**Ciencia Animal con especialidad en Epidemiología y enfermedades infecciosas en el
2019.**

Experiencia Profesional:

**Profesor nivel licenciatura en la Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad
de Ciencias Biológicas, de 2022 a la fecha.**

XIII. ANEXO

8.1. Artículo publicado

Iran J Parasitol: Vol. 19, No. 4, Oct-Dec 2024, pp. 418-427

 Tehran University of Medical Sciences Publication http://tums.ac.ir	Iran J Parasitol Open access Journal at http://ijpa.tums.ac.ir	 Iranian Society of Parasitology http://isp.tums.ac.ir
--	---	---

Original Article

Evaluation of a 70 kDa Excreted/Secreted Coproantigen Immunoassay for the Detection of *Toxocara canis* in Dogs

Ana Cristina González-Morales ¹, Zinnia Judith Molina-Garza ¹, Ricardo Gomez-Flores ²,
Juan José Zárate-Ramos ³, *Lucio Galaviz-Silva ¹

1. Department of Invertebrates Zoology, Biological Sciences School, Autonomous University of Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México
2. Department of Immunology and Virology, Biological Sciences School, Autonomous University of Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México
3. Department of Parasitology, Agricultural Sciences Campus, Veterinary Medicine and Zootechnics School, Autonomous University of Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México

Received 15 Jun 2024
Accepted 09 Aug 2024

Keywords:
Helminthology;
Toxocara canis;
Excreted-secreted antigens;
Immunodiagnosics;
Toxocarasis

*Correspondence Email:
lucio.galavizsl@uanl.edu.mx

Abstract

Background: We aimed to develop a sandwich ELISA, using polyclonal antibodies against excretory/secretory (E/S) antigens specific to copro-antigens present in *Toxocara canis*-positive dogs.

Methods: Antibodies were produced at Biological Sciences School, Autonomous University of Nuevo León, México in 2023 by immunization of rabbits with antigenic extracts from in vitro cultures of *T. canis* larvae. Assays were performed on 100 stool samples from pet dogs, measuring sensitivity, specificity, and cross-reactivity against other parasitic infections.

Results: High values of sensitivity (100%), specificity (90.9%), and positive (93.47%) and negative (95.45%) predictive values were obtained, respectively. We obtained an E/S protein with a molecular weight of 70 kDa, which showed high sensitivity and specificity by ELISA, but it presented cross-reactivity against *Ancylostoma caninum* and *Strongyloides stercoralis*.

Conclusion: Additional studies are necessary to increase the specificity percentage since this assay demonstrated significant potential as a useful and inexpensive diagnostic tool for immunodiagnostic in dog feces.



Copyright © 2024 González-Morales et al. Published by Tehran University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.
(<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Available at: <http://ijpa.tums.ac.ir>