

ESTUDIO EN NIÑOS CON DIAGNOSTICO PRESUNTIVO DE TOXOCARIASIS EN SANTA FE, ARGENTINA

UBALDO O. MARTIN¹, PIA B. MACHUCA¹, MIGUEL A. DEMONTE¹, LILIANA CONTINI²

¹Centro de Investigaciones sobre Endemias Nacionales, ²Departamento de Matemáticas, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe

Resumen La toxocariasis humana es una parasitosis de amplia distribución en el mundo, cuyo agente etiológico más importante es el *Toxocara canis*, parásito del perro. El hombre adquiere esta zoonosis mediante la ingesta de huevos infectivos; en el intestino delgado desarticulan sus envolturas y las larvas se liberan atravesando la mucosa, ubicándose en diversos tejidos. Los niños son la población de mayor riesgo. El diagnóstico clínico es difícil. El test de ELISA usando antígenos de excreción-secreción de la larva, es la técnica de elección. Se estudiaron por esta técnica inmunoserológica 100 niños con diagnóstico presuntivo de toxocariasis y se revisaron posteriormente sus historias clínicas de Hospital. La técnica de diagnóstico fue estandarizada y validada en el laboratorio. Su aplicación permitió identificar dos poblaciones de niños: infectados (59) y no infectados (41). La eosinofilia fue más frecuente en la población infectada (100% vs. 85.2%, $p = 0.017$); no así la leucocitosis ($p = 0.950$). La fuerza de asociación de ambos parámetros fue mayor en la población positiva ($R = 0.918$). La dificultad respiratoria se presentó más frecuentemente en pacientes con ELISA positiva, considerados como infectados ($p = 0.05$). La edad promedio de los positivos fue significativamente mayor que la de los negativos ($p = 0.009$). Se halló eosinofilia en el 100% de los infectados y en el 85.2% de los no infectados. La tenencia de canes en los domicilios no fue significativamente mayor entre los casos positivos que entre los negativos ($p = 0.53$). Sería necesario investigar esta enfermedad en niños consultantes con sospecha clínica, y promover las medidas de prevención, diagnóstico temprano y su correcto tratamiento.

Palabras clave: toxocariasis, anticuerpos, eosinofilia, perros

Abstract *Analysis of children with a presumptive diagnosis of toxocariasis in Santa Fe, Argentina.*

Human toxocariasis is a parasitic disease found worldwide. The most important etiological agent is *Toxocara canis*, a dog parasite. Humans are infected by the ingestion of their eggs; the eggs hatch in the small intestine and the larvae migrate through the capillaries, taking up residence in different tissues. Clinical manifestations are associated with mechanical and/or reaction damage caused by these parasites larvae. Clinical diagnosis is difficult. The method applied in this work is the demonstration of antibodies against the helminth in the blood of children, target host population of this parasitic disease. An ELISA test was performed using *T. canis* larval excretory-secretory products as antigen. A total of 100 children presumptively diagnosed of toxocariasis that had been derived from different services of the Regional Children's Hospital for complementary studies, were included in the analysis. The test detected two different populations: infected (59) and non-infected (41). The statistical analysis showed a non significant association between infection and sex ($p = 0.279$). Infected subjects tended to be older than the non infected ($p = 0.009$). Eosinophilia was detected in 100% of seropositive children and in 85.2% of the seronegative. There was no significant association between infection and leucocytosis ($p = 0.950$). The association of these two parameters was significantly higher among infected patients ($R = 0.918$). Respiratory symptoms and signs were more frequently detected in the positive population ($p = 0.05$). Dogs tenancy was as frequent among infected as in the non infected homes ($p = 0.53$). According to these results, prevention, early diagnosis and opportune treatment for toxocariasis should be considered as priority health activities in this region.

Key words: toxocariasis, antibodies, eosinophilia, dogs

La toxocariasis humana es una parasitosis de amplia distribución en el mundo, cuyos agentes etiológicos son

Toxocara canis (*T. canis*) y en una dimensión mucho menor el *Toxocara cati*. El hombre la adquiere, más frecuentemente, mediante la ingesta de huevos infectivos de *T. canis* por geofagia o por descuido en la higiene¹; las formas parasitarias liberan sus envolturas en el intestino delgado proximal y las larvas (estadio II de *T. canis*) atraviesan la mucosa, y alcanzando la circulación portal llegan al hígado; continuando luego por el sistema venoso penetran en pulmón y llegan a la circulación sistémica².

Recibido: 04-V-2007

Aceptado: 30-VI-2008

Dirección postal: Dr. Ubaldo Omar Martín, Centro de Investigaciones sobre Endemias Nacionales, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo, 3000 Santa Fe, Argentina
Fax: (54-342) 4521637

e-mail: umartin@fbc.unl.edu.ar

Así, se distribuyen por todo el organismo, pudiendo localizarse en hígado, pulmón, corazón, cerebro y tejido muscular³. Las manifestaciones clínicas y de laboratorio se asocian a daños, tanto mecánicos como reaccionales, ocasionados por *larvas migrans*; dependen del órgano afectado, el número de larvas y la intensidad de la respuesta inmunológica provocada por las mismas. Los síndromes clásicos de toxocariasis humana son los de *larva migrans visceral* (LMV) y de *larva migrans ocular* (LMO)³. Existen otras formas clínicas como la toxocariasis subcutánea, asmatiforme, neurológica, neurofisiológica y subclínica⁴.

El diagnóstico de elección es la investigación de anticuerpos circulantes contra antígenos de excreción-secreción del estadio II de la larva de *T. canis*, utilizando un test de ELISA (*enzyme-linked-immunosorbent-assay*)⁵.

Los objetivos de este trabajo fueron: a) evaluar en terreno una prueba de ELISA para investigar la parasitosis, b) investigar qué signos y síntomas determinaban la sospecha clínica de la infección por *T. canis* en la atención médica de un Hospital de Niños Referencial y cuál era su frecuencia, c) proponer un protocolo de trabajo para incluirlo en la atención médica infantil, y transmitir el conocimiento al personal de salud.

Materiales y métodos

Este es un trabajo retrospectivo en niños sospechados de toxocariasis, provenientes de un Hospital Regional de diagnóstico. El control del tratamiento y posterior evolución se realizaron en los servicios de salud descentralizados.

Se estudiaron 100 niños derivados a la consulta en el Hospital de Niños Dr. Orlando Alassia. Este hospital es referencial en la región centro de Argentina y el principal y más complejo de la Provincia de Santa Fe. La procedencia de los niños fue urbana y rural.

Se obtuvieron muestras de sangre por punción venosa y sus sueros conservados a -20°C hasta su estudio. El test de ELISA fue ensayado en los niños que tenían diagnóstico presuntivo de toxocariasis. Luego de haber obtenido resultados sobre el nivel de anticuerpos contra *T. canis* en el laboratorio de toxocariasis, se revisaron las historias clínicas (HC) en el Hospital.

Se analizó la información de las HC, en especial los síntomas y signos que habían motivado el pedido de investigación en el laboratorio de parasitosis.

El test ELISA se realizó en la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL (CIEN-FBCB-UNL) y la muestra poblacional quedó identificada en positivos y negativos.

La obtención de los antígenos de diagnóstico se realizó a partir del cultivo de larvas de estadio II de *T. canis* de acuerdo a De Savigny⁶ con algunas modificaciones, como utilizar el medio de cultivo RPMI 1640 (*ICN Biomedicals Inc. Ohio, EE.UU.*). Los sobrenadantes de cultivos de esta forma parasitaria fueron extraídos cada cuatro días y almacenados en condiciones estériles; se filtraron en membrana de $0.22\ \mu\text{m}$ (*Millipore Stericup Filtration System, EE.UU.*), y luego se concentraron mediante ultrafiltración (*CentriprepYM10 Amicon, EE.UU.*). Los sobrenadantes concentrados se conservaron a -70°C . El contenido de proteínas totales se determinó por el método de Bradford utilizando albúmina bovina sérica como

patrón. La concentración de proteínas en el sobrenadante recolectado fue de $4\ \text{mg/l}$. Luego fueron fraccionados de acuerdo a las necesidades y sometidos a una corrida en *SDS-PAGE* para observar el peso molecular de las bandas antigénicas. Este fue el complejo de antígenos de excreción-secreción (AgE/S) utilizados en el diagnóstico; las policubetas de poliestireno fueron sensibilizadas con AgE/S de *T. canis* en una concentración de $0.4\ \mu\text{g}$ por pocillo. La solución de lavado utilizada fue *buffer* de fosfatos pH 7.4 con *Tween 20* al 0.5% (PBS T). La técnica fue estandarizada. Los controles utilizados fueron sueros positivos y negativos con resultados coincidentes en tres Centros Referenciales de Argentina (Servicio de Parasitología del Instituto Nacional de Microbiología Dr. C. G. Malbrán, Buenos Aires; Instituto de Medicina Regional de la UNNE, Chaco; y el CIEN-FBCB UNL, Santa Fe).

Las placas fueron incubadas 2 h a 37°C con $100\ \mu$ pocillo de PBS con leche descremada al 5%. Luego se hicieron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS-T. Posteriormente las placas fueron envueltas y almacenadas a -20°C hasta su uso. Se ensayaron 5 sueros positivos y 5 sueros negativos, por duplicado, en cada placa. Para este ensayo todos los sueros fueron diluidos 1/100. Se colocaron $100\ \mu\text{l}$ de estas diluciones por pocillo. Las placas se incubaron 30 min a 37°C . Pasado este período, se procedió a hacer 4 lavados con PBS-T. Se colocó $100\ \mu\text{l}$ de conjugado anti inmunoglobulinas humanas marcadas con peroxidasa (*Chemicon International Inc, EE.UU.*), por pocillo, en dilución previamente titulada. Se incubaron las placas 30 min a 37°C . Luego fueron lavadas 4 veces con PBS-T y posteriormente se revelaron con los reactivos de color, peróxido de hidrógeno y tetrametilbenzidina incubados a temperatura ambiente 30 min; la reacción fue detenida con ácido sulfúrico 1N. Las placas fueron leídas a $450\ \text{nm}$.

De las 100 HC revisadas, en 95 se presentaban los síntomas clínicos y el motivo de consulta del niño en forma precisa; sólo 93 cumplimentaron la información sobre la tenencia de canes en sus hogares; 45 de 100 tenían información sobre el valor de IgE total; 72 HC de los 100 niños contenían información sobre leucocitosis y eosinofilia.

Para la comparación de proporciones y para la verificación de independencia se usó la prueba χ^2 o la exacta de Fisher, según correspondiera. Para la comparación de medias se empleó la prueba t, previa verificación del supuesto de normalidad. Como medida de asociación de variables continuas se empleó el coeficiente de correlación muestral R. La significación estadística adoptada fue alfa = 0.05.

Resultados

De un total de 100 niños con diagnóstico presuntivo de toxocariasis, el 59% resultó positivo al test de ELISA y el 41% negativo. El rango de edad, edad promedio y sexo, entre los positivos y los negativos, se presentan en la Tabla 1. No se encontró asociación entre la presencia de infección y el sexo, $p = 0.279$. Se compararon los promedios de edad entre el grupo de positivos y el de negativos, en general y agrupados según sexo. Se muestra que la edad promedio de los positivos resultó ser significativamente mayor que la de los negativos, $p = 0.009$. Al comparar la edad promedio de positivos respecto de negativos, considerando el sexo, se observó que en el caso de los varones parecería que los positivos son de mayor edad que los negativos, $p = 0.05$; igual ocurre en las niñas, $p = 0.049$.

Los síntomas y signos clínicos estaban relatados con precisión en las HC de 95 niños, 57 positivos y 38 negativos al test de ELISA. La dificultad respiratoria, las reacciones alérgicas y el síndrome diarreico figuraban en la mayoría de los casos sospechados y diagnosticados como una toxocariasis; la dificultad respiratoria apareció como motivo de consulta estadísticamente significativo al comparar las poblaciones positivas y negativas ($p = 0.05$); pero no así en el caso de la consulta por alergias y diarreas ($p = 0.25$ y $p = 0.74$ respectivamente). Tres niños con dificultades otorrinolaringológicas como motivo de consulta, resultaron infectados con *T. canis*. En ninguno de los pacientes con anticuerpos anti-*T. canis* positivos la disminución de la visión fue motivo de consulta ni presentaban los síntomas clásicos del síndrome LMO, y no se diferenciaban –por lo tanto– de los no parasitados ($p = 0.52$).

Seis de los casos de diarreas en la población positiva fueron de curso crónico y tres agudas, mientras que en la población negativa hubieron cinco agudas y dos crónicas ($p = 0.74$); se presenta esta información en la Tabla 2.

Sólo en las HC de 72 de los 100 niños figuraban ambos valores: de eosinofilia y de leucocitosis. Las demás tenían un solo dato. Por ello se consideraron esas 72 como completas. En la población positiva el rango de variación de eosinófilos fue de 420 a 27 619 y el de leucocitos entre 6 200 a 38 900 por mm^3 . En la población negativa entre 260 a 17 984 y 4 900 a 47 600 respectivamente.

De estos 72 casos, 45 resultaron positivos y 27 negativos al test de ELISA. Estos valores fueron representados en gráficos de dispersión, obteniéndose la Fig 1. En ella se observa que existe asociación lineal entre los valores de eosinófilos y de leucocitos, tanto en los infecta-

TABLA 1.– *Edad y Sexo: Análisis retrospectivo de 100 historias clínicas de niños con diagnóstico presuntivo de toxocariasis y test de ELISA (positivos y negativos)*

Población	ELISA (+)		ELISA (-)		Rango de edad (años)	p (diferencia en edades)
	N	Edad*	N	Edad*		
Masculina N = 62	34	5.8 ± 3.5	28	4.48 ± 2.87	1.1 – 14.0	0.050
Femenina N = 38	25	6.4 ± 3.9	13	4.24 ± 3.08	1.0 – 14.0	0.049
Total N = 100	59	6.0 ± 3.7	41	4.40 ± 2.91	1.0 – 14.0	0.009

*Edad promedio ± Desviación estándar

TABLA 2.– *Síntomas y signos asociados con diagnóstico presuntivo de toxocariasis en 95 historias clínicas de niños estudiados*

Motivo de consulta médica	Test ELISA positivo N = 57	Test ELISA negativo N = 38	p
Dificultad respiratoria	20	16	0.05
Reacciones alérgicas	11	4	0.25
Diarreas	9*	7**	0.74
Disminución de la visión	5	4	0.52#
Poliadenopatías	3	1	0.47#
Dificultades otorrinolaringológicas	3	0	0.21#
Otros síntomas	6***	6****	0.32#

*Tres agudas y seis crónicas

**Cinco agudas y dos crónicas

***Uno con síndrome de Guillan Barré; artritis séptica; celulitis en miembro inferior; epistaxis crónica; absceso en rodilla derecha y otro con poliparasitosis

****Uno con mioartralgia afebril; absceso en muslo izquierdo; celulitis en articulación metatarsofalángica derecha; celulitis periorbitaria; osteomielitis en porción distal de fémur derecho; y otro con poliparasitosis

#Test de Fisher

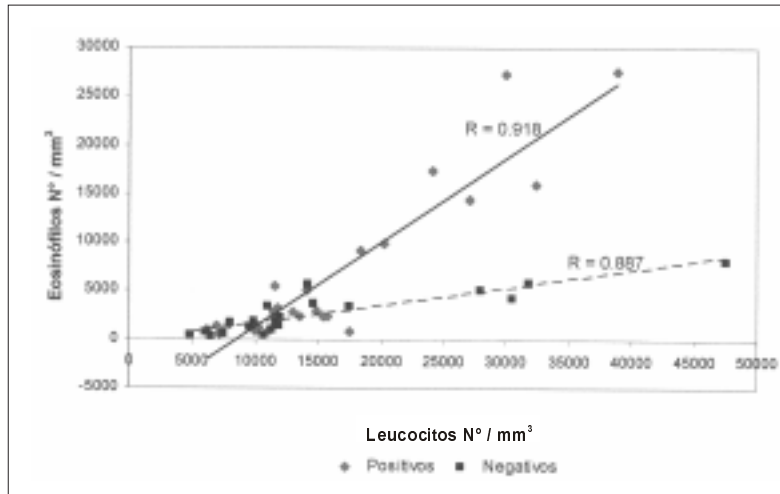


Fig. 1.— toxocariasis presuntiva: relación entre los valores absolutos de eosinófilos y leucocitos de cada niño. Curvas de dispersión para la población infectada y no infectada. 2006-2007.

dos como en los no infectados; pero la fuerza de asociación es mayor en la población positiva, $R = 0.918$. Presentaron eosinofilia los 45 casos con test de ELISA positivo (100%) y 23 de los 27, (85.2%) de aquellos con ELISA negativo ($p = 0.017$).

Los valores de IgE total dosados por ELISA en 45 niños de ambas poblaciones (30 positivos y 15 negativos) tuvieron todos valores elevados.

El dato sobre tenencia de canes en los domicilios fue obtenido en 93 de las 100 HC. En la población positiva, al examen de laboratorio, 44 tenían canes y 12 no, mientras que en los negativos 31 de 37 también tenían perros en sus domicilios ($p = 0.533$).

En la población con reacción de ELISA negativa para anticuerpos contra el *T. canis*, un niño presentó un absceso en muslo izquierdo y fiebre de 39 °C, con eosinofilia de 8092 mm^3 (17%), altamente parasitado, con abundantes formas de *Strongiloides stercoralis* y quistes de *Giardia lamblia* en su materia fecal.

Discusión

Es habitual definir a la toxocariasis como una infección accidental. Sin embargo, en nuestro país, en la mayor parte de América Latina y en otras regiones del mundo, los determinantes socioeconómicos y las condiciones ambientales de contaminación con huevos de *T. canis*, permiten considerar a esta infección como posiblemente endémica^{8, 9, 10}. En esta muestra, la prevalencia de la infección (59%) es mayor que la encontrada en el mismo hospital, en el mismo año, con una población elegida al azar (40.8%, Martín U, 2006, datos no publicados). La

consulta médica previa podría ser el factor causal. Se observó en las HC que la toxocariasis no se tuvo en cuenta en un primer momento, sino que se sospechó luego de sucesivos estudios y descartando otras causas.

En los niños con inmunoserología (ELISA) positiva, el 60% cursaban con leucocitosis y con eosinofilia alta. La eosinofilia fue uno de los motivos principales de la presunción diagnóstica. Valores absolutos de eosinófilos superiores a 500 mm^3 promueven la sospecha de toxocariasis en los niños y deben investigarse anticuerpos contra *T. canis*. Esto debe ser tenido en cuenta en los primeros niveles de atención para pesquisar precozmente la causa. La presencia de eosinófilos provoca destrucción celular-tisular y debe ser suficientemente preocupante en la consulta médica¹¹. En el caso de los infectados por *T. canis* la eosinofilia parecería producirse por la presencia del parásito que posee una familia de genes denominados alérgicos¹². Esta quizás sea la causa de las eosinofilias persistentes, que mejoran después del tratamiento, como observaron otros autores en estudios prospectivos¹³. La Fig. 1 parece indicar que justamente la persistencia de eosinofilia y leucocitosis alta son parámetros que hacen suponer una toxocariasis en actividad. Es de destacar el caso de un niño con una alta eosinofilia y presencia de otras parasitosis, cuyo resultado en el test de ELISA fue negativo; esta situación contrasta con estudios que plantean una inespecificidad de la técnica, en presencia de otras parasitosis^{13, 14}. Ciertos equipos de diagnóstico comerciales, no evaluados en terreno, en nuestras poblaciones mostrarían hasta un 10% de valores falsos positivos (Martín U, datos no publicados, 2006).

Los valores de IgE son difíciles de evaluar en esta edad, en razón de que es una variable biológica discontinua. En las dos poblaciones estuvieron aumentadas.

No existieron diferencias en cuanto a la tenencia de canes en el domicilio, cuando se comparó la población infectada y la no infectada. La existencia de perros en el domicilio no sería una condición necesaria ni imprescindible para la transmisión de la infección¹⁵. Este aspecto parece ser bastante discutido y tal vez varíe en zonas urbanas y rurales¹⁴.

Relatamos los contenidos de las HC de 100 niños que fueron sospechados clínicamente de toxocariasis en los servicios de un Hospital de Niños referencial y regional. En el hospital se atienden más de 150 000 consultas anuales. La prevalencia encontrada en el análisis de 100 niños con sospecha clínica de toxocariasis en dos años, 2006-2007, en ese hospital, muestra que el sistema de salud no le confiere una real importancia a esta parasitosis a pesar de los indicadores epidemiológicos, y pone de manifiesto la necesidad de que el sector salud conozca más sobre la infección. Un estudio prospectivo realizado por Altcheh en Buenos Aires¹³ y otro en la Región Subtropical por López¹⁶, ambos en la Argentina, destacan la necesidad de implementar actividades de salud pública en esta parasitosis. Al igual que Paludo en Brasil, nosotros consideramos que la falta de métodos de laboratorio disponibles sumados a la inespecificidad de la clínica colaboran para que esta enfermedad sea ignorada por los sistemas de Salud Pública¹⁷.

Existen otras opiniones y reflexiones importantes sobre toxocariasis, publicadas en nuestro país¹⁸.

Teniendo en cuenta la inmunodepresión que producen algunas enfermedades, los tratamientos inmunosupresores en niños, los avances científicos y tecnológicos en trasplantes de órganos, y las complicaciones posibles por esta y otras parasitosis endémicas, consideramos la necesidad de tenerlas en cuenta para su prevención, diagnóstico temprano e instauración del tratamiento adecuado en los casos comprobados.

Agradecimientos: A la Dirección y al personal de los Servicios del Hospital de Niños Dr. Orlando Alassia. Este trabajo fue financiado con fondos de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Bibliografía

- Glickman LT, Chaudry IU, Constantino J, et al.: Pica patterns, toxocariasis and elevated blood lead in children. *Am J Trop Med Hyg* 1981; 28: 77-80.
- Glickman L, Schantz P. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiol Rev* 1981; 3: 230-50.
- Schantz P. Toxocara larva migrans now. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41: 21-34.
- Petithory J, Beddok A, Quedoc M. Ascariasis zoonoses: visceral larva migrans syndrome. *Bull Acad Nat Med* 1994; 178: 635-45.
- De Savigny DH, Voller A, Woodruff AW. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J Clin Pathol* 1979; 32: 284-8.
- De Savigny DH. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae, a simple method for the production of E/S antigens for use in LMV serodiagnostic. *J Parasitol* 1975; 61: 781-2.
- Armitage P, Berry G. Estadística para la investigación biomédica. Harcourt Brace (eds). 3^{era} ed. Madrid 1997; p 87-396.
- Alonso JM, Stein M, Chamorro MC, Bojanich MV. Contamination of soils with eggs of *Toxocara* in a subtropical city in Argentina. *J Helminthol* 2001; 75: 1-4.
- Campos Junior D, Elephant GR, Silva de Melo EO, et al. Frequency of seropositivity to *Toxocara canis* in children of different socioeconomic strata. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36: 509-13.
- Alderete JMS, Jacob CM, Pastorino AC, et al. Prevalence of *Toxocara* infection in schoolchildren from the Butantã region, São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 593-7.
- Meeusen ENT, Balic A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol Today* 2000; 16, 3, 95-101.
- Maizels RM, Tetteh KKA, Loukas A. *Toxocara canis*: genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode. *Int J Parasitol* 2000, 30: 495-508.
- Altcheh J, Nallar M, Conca M, Biancardi M, Freilij H. Toxocariasis: aspectos clínicos y de laboratorio en 54 pacientes. *An Pediatr* 2003; 58: 425-31.
- Chiodo P, Basualdo J, Ciarmela L, Pezzani B, Apezteguía M, Minvielle M. Related factors to human toxocariasis in a rural community of Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006, 101: 397-400.
- Alonso JM, López MA, Bojanich MV, Marull J. *Toxocara canis* infection in adult healthy population from a Subtropical area in Argentina. *Parasitol Latinoam* 2004; 5: 61-4.
- López MA, Martín G, Chamorro MC, Alonso JM. Toxocariosis en niños de una región Subtropical. *Medicina (Buenos Aires)* 2005; 65: 226-30.
- Paludo ML, Falavigna DL, Elephant GR, et al. Frequency of toxocara infection in children attended by the health public service of Maringã, South, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 2007; 49: 343-8.
- Barcat JA. *Larva migrans*: perros, parásitos y hombres. *Medicina (Buenos Aires)* 2000; 60: 270-2.