

▶ CICLO DE METODOLOGÍA
CIENTÍFICA II



DEPARTAMENTO DE
PARASITOLOGÍA Y MICOLOGÍA
- INSTITUTO DE HIGIENE -

2018



REVISIÓN

DEL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO Y MOLECULAR
EN LA TOXOCARIASIS OCULAR EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA



GRUPO
75

ORIENTADOR
PROF. ADJ. DR. DANIEL DA ROSA ALVAREZ

Javier De Los Santos | Virginia Medina | Fernanda Moll | Michel Rosas | Matías Sánchez | Ximena Sosa



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Revisión del diagnóstico serológico y molecular en la Toxocariasis Ocular en población pediátrica

Nombre de componente de grupo:

Javier De Los Santos
Virginia Medina
Fernanda Moll
Michel Rosas
Matias Sanchez
Ximena Sosa

Nombre del orientador: Prof. Adj. Dr. Walner Daniel Da Rosa Alvarez

Departamento de Parasitología y Micología- Instituto de Higiene

Ciclo de Metodología Científica II 2018

Grupo 75

Índice de contenidos:

| | |
|----------------------------------|----|
| • Resumen..... | 2 |
| • Introducción..... | 3 |
| • Metodología..... | 5 |
| • Resultados..... | 6 |
| • Discusión..... | 6 |
| • Conclusión y perspectivas..... | 9 |
| • Bibliografía..... | 10 |
| • Agradecimientos..... | 12 |
| • Anexos..... | 13 |

Resumen:

Introducción: Se realizó una revisión bibliográfica descriptiva, a fin de conocer la evidencia científica disponible, sobre herramientas para el diagnóstico serológico y/o molecular que permitan detectar la Toxocariasis Ocular (TO) antes de que se produzcan lesiones y secuelas visuales irreversibles, lo que permitiría distinguir un cuadro agudo de crónico.

Metodología: Mediante la búsqueda en bases de bibliografía internacional y nacional, incluyendo diferentes bases de datos Tripdatabase, Medline o Cochrane, de los predictores “MeSH” y booleanos y sus límites, bases de datos de literatura gris, tesinas y tesis. La revisión abarcó los últimos 10 años, retrospectivamente desde junio 2018. Se incluyó a la población pediátrica de 2 a 12 años, dado que la mayor prevalencia de la enfermedad a nivel mundial de la enfermedad se ubica en este grupo etéreo. Se utilizaron gráficos adecuados y tablas con medidas de resumen y diagrama de flujo de la selección de los artículos obtenidos.

Resultados: Se obtuvo un total de 54 artículos, 52 eran full text, 41 de ellos fueron excluidos por no cumplir con los criterios de inclusión, utilizándose los restantes 11 artículos para la realización de la revisión.

Conclusiones y perspectivas: En los últimos años se han identificado nuevas técnicas diagnósticas para la TO como por ejemplo detección de anticuerpos en humor acuoso detección específica de ADN larval de muestras de tejidos o fluidos corporales mediante PCR y detección de antígenos de secreción excreción específicos. El análisis de los estudios no nos permite generar una aproximación a la respuesta de la pregunta planteada por esta revisión, dado que no habría en la bibliografía trabajos que a través de la utilización test serológicos o estudios moleculares que permitan establecer un diagnóstico con la capacidad de diferenciar una Toxocariasis aguda de crónica.

Palabras Claves: Toxocariasis ocular, niños, ADN, molecular, serología, diagnóstico.

Introducción:

La Toxocariasis es una zoonosis parasitaria causada por un nematelminto, *Toxocara canis* o *Toxocara cati*. Es endémica a nivel mundial y en nuestro país representa un problema de salud pública, siendo considerada como una enfermedad olvidada por la Organización Mundial de la Salud(1). La especie de mayor prevalencia en casos humanos es *Toxocara canis*, presentando su mayor incidencia en población infantil, reportándose en Uruguay aproximadamente 10 a 20 casos anuales (2). El huésped definitivo de *Toxocara canis* es el perro. Éste puede adquirir la infección por 3 vías posibles: la ingestión de huevos larvados, consumo de carne de huéspedes accidentales y por vía congénita (intrauterina y transmamaria). Los huevos son expulsados en la materia fecal de los cánidos, éstos no son infectantes si no que necesitan de tres a cinco semanas en el suelo en condiciones de temperatura y humedad favorables para completar su maduración y llegar a un estadio L2. Los humanos adquieren la infección por la ingestión de los huevos larvados (geofagia) que eclosionan en el intestino delgado y luego de pasar por el hígado, el corazón y los pulmones llegan a la circulación sistémica, donde puede permanecer silente hasta por 7 años (3, 4). Por ello es frecuente, que la población infantil adquiera dicha parasitosis, ya sea por sus hábitos de juego, geofagia o comer alimentos contaminados (5, 6). Es importante destacar que el ser humano es un huésped accidental y que *Toxocara canis* no completa su ciclo en él. La infección puede ser asintomática o manifestarse como Toxocariasis encubierta con síntomas inespecíficos o presentarse como Toxocariasis visceral afectando principalmente hígado, pulmones, SNC o como Toxocariasis ocular (TO) (3). Esta última es la forma de presentación más severa y frecuente, motivo por el cual centraremos esta revisión en los aspectos del diagnóstico serológico y molecular de la TO.

Las larvas de *Toxocara canis* presentan una respuesta tipo Th2 con un aumento de la concentración de inmunoglobulinas y de diferentes interleucinas como IL-4 e IL-5, que estimulan el aumento de eosinófilos periféricos (eosinofilia de leve a moderada y en algunos casos severa) y de mastocitosis. Las larvas que logran evadir esta respuesta, aproximadamente un 20%, son las que llegan a diferentes órganos provocando en un principio focos inflamatorios y posteriormente granulomas (7).

La TO varía en su presentación clínica dependiendo del sitio anatómico donde se asiente la larva, condicionado este factor por la cantidad de larvas infectantes y la respuesta inmunológica propia del huésped. Dentro del amplio espectro de síntomas que se pueden encontrar, existe la disminución de la visión de forma unilateral, ojo rojo, leucocoria, prurito, estrabismo unilateral

y otros de mayor gravedad como uveítis, cataratas, desprendimiento de retina, granuloma multifocal entre otros (8).

El diagnóstico presuntivo de esta parasitosis es clínico, epidemiológico. Debiendo confirmarse con métodos inmunológicos o serológico. En la actualidad los métodos disponibles son ensayo inmunoenzimático (ELISA) o la inmuno electrotransferencia (Western Blot). Estos estudios se realizan en base a antígenos de excreción secreción de las larvas de *Toxocara canis* estadio L2 y la detección de diferentes inmunoglobulinas humanas: IgG, IgE e IgG4 en el suero de los pacientes. Existen dificultades al realizar el diagnóstico inmunológico ya que se observan algunas reacciones cruzadas con otras helmintiasis y no se logra distinguir si estamos frente a una infección pasada o actual (3).

A partir de los avances de los últimos cinco años se han identificado nuevas técnicas diagnósticas para la TO como por ejemplo detección de anticuerpos en humor acuoso utilizando el índice de Goldmann-Witman,(9) detección específica de ADN larval de muestras de tejidos o fluidos corporales mediante PCR y detección de antígenos de secreción excreción específicos(10, 11).

Objetivo general del trabajo

El objetivo de la presente revisión fue despistar mediante la búsqueda en bases de bibliografía internacional, la existencia de métodos inmunológicos que nos permitan diferenciar entre una Toxocariasis ocular aguda y crónica.

Metodología

Se consideraron en primer término la población a incluir, considerando el rango etéreo en el cual la enfermedad es prevalente a nivel mundial. El límite de tiempo de esta revisión fue de los últimos 10 años, retrospectivamente desde junio 2018.

Se realizó una búsqueda primaria para identificar aquellos descriptores de interés representativos de los objetivos planteado: *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, inmunodiagnóstico, ocular, agudo, crónico, niños, Técnicas serológicas: ELISA, PCR, WB o sinónimos y términos relacionados.

Se estableció como criterios de inclusión todos estudios que sean o no de revistas arbitradas, opinión de expertos, publicación de casos, descriptivos, casos y controles, cohortes, ensayos clínicos aleatorizados, revisiones sistemáticas y entrevistas a expertos nacionales, bibliografía no publicada nacional. Se consideraron solamente los artículos full text, excluyendo aquellos abstract en los cuales no se pudo conseguir el artículo completo.

Se realizó la búsqueda de los descriptores de interés antes mencionadas mediante la consulta a bases de datos como Tripdatabase, Medline o Cochrane, de los predictores “MeSH” y booleanos y sus límites, bases de datos de literatura gris, tesinas y tesis.

Se coordinaron los descriptores que responden la pregunta clínico/diagnóstica planteada, dentro de aquellos elegidos por cada integrante del grupo de manera de homogeneizar una nueva búsqueda.

Se reiteró nueva búsqueda bibliográfica ampliando de 5 años a 10 años el periodo a considerar.

Confección de base datos y análisis:

Se confeccionó una base datos en Epiinfo 2000 con las siguientes variables: ID (número de identificación correlativo de aparición de cada trabajo, basado en fecha de publicación), Título del trabajo, autores (según normas de Vancouver, se detallaran hasta tres autores y cuando sean más, solo se enumeran los 3 primeros con su prefijo et al.), fecha de publicado, nombre de la publicación científica donde fue publicado, lugar de estudio, palabras claves, características demográficas de la población estudiada, técnicas o herramientas utilizadas.

Se utilizó programa Review Manager 5.3 para análisis cuantitativo y cualitativo de los trabajos que cumplieron todos los criterios de inclusión, teniendo en cuenta la posible combinación de resultados de los trabajos científicos obtenidos, evaluar su heterogeneidad y evaluación de potenciales sesgos. Se utilizó gráficos adecuados y medidas de resumen.

Resultados

De la búsqueda realizada en las distintas bases de datos se obtuvo un total de 54 artículos y un estudio correspondiente a bibliografía gris. De la totalidad de los artículos, 52 eran full text. 41 de ellos fueron excluidos debido a que no cumplían con los criterios de inclusión siendo 22 correspondientes a población adulta y 19 no utilizaron métodos serológicos ni moleculares para el diagnóstico de Toxocariosis Ocular. Los restantes 11 artículos fueron utilizados para la realización de la revisión. (Ver anexos)

Discusión

En las últimas décadas, el número de diferentes métodos de diagnóstico para Toxocariosis ocular ha aumentado considerablemente. Actualmente, el diagnóstico estándar de TO se basa en la identificación de signos clínicos compatibles con la enfermedad en la examinación oftalmológica, apoyada por las pruebas de anticuerpos contra *Toxocara spp.* Dentro de los métodos serológicos, el ELISA es el más fiable y más utilizado para el diagnóstico de dicha patología (12).

El serodiagnóstico se basa en la utilización de kit de ELISA comercial, que tiene como antígeno todas las proteínas de excreción-secreción (TES) del estadio L2/L3 de la larva crecido en cultivo. Estos presentan diferentes especificidades (90- 92%) y sensibilidades (75-86%) según la calidad del antígeno y si detectan inmunoglobulinas totales (o algún subtipo específico). Normalmente el diagnóstico se confirma mediante western blot, el que resulta ser muy específico cuando se toman en cuenta las proteínas de bajo peso molecular (24, 30, 35, 55 y 70 kDa), que evitan la reacción cruzada con otros helmintos. A su vez se ha identificado que las bandas de 55 a 66 kDa son las responsables de la reacción cruzada con *Ascaris lumbricoides*. Se ha estandarizado un inmunoblot que se utiliza para el seguimiento de la enfermedad, en este se monitorean IgG contra las fracción mayor a 205 kDa, IgA para 29-38, 48-54, 81- 93 kDa e IgE para la fracción de 95-121 kDa(12).

En el caso particular del diagnóstico de TO basado en el antígeno específico de *T. Canis*, es todavía desafiante, ya que los títulos de anticuerpos en suero puede ser bajos o ausentes, no

excluyéndose así el diagnóstico. En estos casos es necesaria la confirmación mediante distintas técnicas que aumenten la sensibilidad y especificidad, siendo alguna de estas la detección de anticuerpos específicos producidos localmente, es decir en el humor vítreo, la realización del índice Goldmann-Witmer y la utilización de antígenos recombinantes para emplear un ELISA mas específico(9, 13).

Cuando la inflamación vítrea no permite identificar las lesiones típicas, y la serología es negativa, el diagnóstico de esta enfermedad no se puede realizar clínicamente y es necesario recurrir a métodos invasivos. Una alternativa ante la sospecha de la enfermedad es obtener anticuerpos anti *Toxocara* de muestras de fluidos oculares, con una sensibilidad y especificidad cercana al 90%(13).

El humor vítreo ha sido fuente de material para llegar al diagnóstico de TO ya que se han observado títulos de anticuerpos en el humor vítreo iguales o mayores a los encontrados en suero, sugiriendo la producción de anticuerpos in situ (13).

Una manera eficaz de evaluar la producción intraocular de anticuerpos anti-*Toxocara*, es utilizando el coeficiente de Goldmann-Witmer. Este permite además descartar que su presencia no sea por el mero paso desde el suero a través de la barrera hemato ocular.

Se calcula como:

$$= \frac{\text{anti-}T.\text{canis igG titer in AH}}{\text{anti-}T.\text{canis IgG titer in serum}} \times \frac{\text{serum total IgG}}{\text{AH total IgG}}$$

Un valor de corte mayor o igual a 3,0 se considera sugestivo de Toxocariasis ocular. Teniendo todo esto en cuenta, se recomienda el uso de esta prueba en pacientes con títulos bajos o ausentes de IgG detectados con ELISA, en sueros de pacientes con corioretinitis inexplicable focal, lesiones focales posteriores, endoftalmitis o vitritis, particularmente en aquellos con factores de riesgo epidemiológicos (9, 14).

La detección temprana de la Toxocariasis humana y la evaluación de la importancia de la enfermedad en una población dependen en gran medida de pruebas serológicas, ya que es extremadamente difícil de detectar las larvas en muestras de biopsia. Aunque se ha utilizado ampliamente IgG-ELISA para el serodiagnóstico de Toxocariasis humana, dichos ensayos

generalmente tienen especificidad insuficiente para su uso en países tropicales, donde otras infecciones helmínticas son comunes. La especificidad se puede mejorar mediante el uso de antígenos TES más pequeños (es decir, los de 24-35 kDa; y una proteína recombinante correspondiente al antígeno TES de 30 kDa (TES-30) **(10, 11, 12)**.

Para evitar la mayoría de las limitaciones de los extractos crudos de antígenos TES producidos por cultivos L2, se pueden producir proteínas recombinantes basadas en los antígenos de TES, sin variabilidad y en cantidades ilimitadas. Los ensayos basados en uno de estos antígenos recombinantes han mejorado en general la especificidad debido a que el antígeno recombinante es una sola molécula y a diferencia de un antígeno natural, no está glicosilada. La ausencia de glicosilación evita, o al menos disminuye, la reactividad cruzada con anticuerpos que reconocen los restos de azúcar de los antígenos producidos por TES de larvas de *Toxocara canis* **(11)**.

También parece ser posible aumentar la especificidad de una prueba para el serodiagnóstico de toxocariasis mediante la detección de anticuerpos anti-Toxocara IgG4. En la detección de filariasis linfática y no linfática, limitar el ensayo a anticuerpos IgG4, también aumenta en gran medida la especificidad, ya que el anti-IgG 4 podría ser un marcador de la infección activa.

La especificidad del kit comercial ELISA IgG es de un 55,7% mientras que la especificidad del ELISA IgG4 es de 89,6%demostrándose así un aumento del 34% **(11)**.

Existen estudios recientes que muestran que los parásitos secretan exosomas con micro ARN que son capaces de regular la respuesta inmunológica del hospedero siendo probable que estos también contengan ADN del parásito haciendo posible la identificación del mismo mediante PCR. **(8)** Se ha utilizado PCR en fluidos intraoculares de pacientes con clínica presuntiva de Toxocariasis Ocular pero sin embargo se requieren más estudios a futuro para valorar su especificidad y sensibilidad. **(15)**

Conclusión y Perspectivas

Del universo de artículos encontrados, aquellos que cumplen con los criterios de inclusión y por lo tanto seleccionados, son estudios altamente heterogéneos entre sí. Esta heterogeneidad se encuentra constituida por la epidemiología, rango etario utilizado, tipo de estudio empleado a nivel metodológico, entre otras. Esto nos plantea la imposibilidad de delinear una estrategia que nos permita generar una comparación válida entre estos estudios.

El análisis de los estudios no nos permite generar una aproximación a la respuesta de la pregunta planteada por esta revisión, dado que no habría en la bibliografía trabajos que a través de la utilización test serológicos y/o de genética molecular, permitan establecer un diagnóstico con la capacidad de diferenciar una Toxocariasis aguda de crónica.

Por lo expuesto anteriormente y la importancia de la temática en cuestión, es que entendemos que sería pertinente la realización en un futuro de estudios, que utilizando herramienta de biología molecular puedan discriminar casos agudos de crónicos.

Es importante destacar que si bien hay trabajos que muestran la importancia de IgG4 como marcador de infección activa, esta premisa no ha sido posible de demostrar en la práctica clínica.

Bibliografía:

- 1- Torres G, Costa P, Lima P. *Human Toxocariasis: Prevalence and Factors Associated with Biosafety in Research Laboratories*. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Brasil; pp.1428–1431; 2016.
- 2- Guía Práctica de Hidatidosis y Zoonosis Desatendidas. Organización Panamericana de la Salud – Comisión nacional de zoonosis. Disponible en <http://www.zoonosis.gub.uy/images/Documentos/GuiaPracticaZoonosis.pdf> (Revisado en noviembre 2013).
- 3- Becerril Flores, M.. *Parasitología médica Cuarta edición*. México; pp.279-287; 2016.
- 4- Sowemimoa O, Leec Y, Asaolua S, et al. *Seroepidemiological study and associated risk factors of Toxocara canis infection among preschool children in Osun State, Nigeria*. Acta tropica. Nigeria; 2017.
- 5- Iddawela D, Ehambaram K, Bandara P, et al. *Prevalence of Toxocara antibodies among patients clinically suspected to have ocular toxocariasis: A retrospective descriptive study in Sri Lanka*. BMC ophthalmology. Sri Lanka; 2017.
- 6- Archellia S, Santillan G, Fonrougea R, et al. *Toxocariasis: seroprevalence in abandoned-institutionalized children and infants*. Revista Argentina de Microbiología. Argentina; 2014.
- 7- Rubinsky G, Yamamoto J, Hirata C, et al. *Toxocariasis: critical analysis of serology in patients attending a public referral center for ophthalmology in Brazil*. Japanese Ophthalmological Society. Brasil; 2018.
- 8- Joon S, Ryoo N, Joon W. *Ocular toxocariasis: clinical features, diagnosis, treatment, and prevention*. Asia Pacific allergy. Korea; 2014.

- 9- Wang Z, Zhou M, Caoa J, W. *Evaluation of the Goldmann-Witmer coefficient in the immunological diagnosis of ocular toxocariasis*. Acta Tropica. China; 2018.
- 10- Olave A, Mesa J, Botero J, et al. *Producción y evaluación del antígeno recombinante TES-30 de Toxocara canis para el inmunodiagnóstico de toxocariasis*. Biomédica vol. 36. Colombia; 2016.
- 11- Norhaida A, Suharni M, Sharmini A, et al. *rTES-30USM: cloning via assembly PCR, expression, and evaluation of usefulness in the detection of toxocariasis*. Annals of Tropical Medicine & Parasitology. Malasia; 2008.
- 12- Echeverría S. *Hacia la elaboración de un test diagnóstico para la detección de Toxocariasis en Humanos*. Maestría en biotecnología. Facultad de ciencias. Uruguay; 2016.
- 13- Inchauspe S, Echandia L, Doddsb E. *Diagnóstico de toxocariasis ocular mediante la demostración de anticuerpos en el humor vítreo*. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología. Argentina; 2017.
- 14- Martínez D, Muñoz M, Gómez L, Delgado O, Rodríguez A. *Ocular Toxocariasis: New Diagnostic and Therapeutic Perspectives*. Bentham Science Publishers. Colombia; 2015.
- 15- Tian JX, O'Hagan S. *Toxocara polymerase chain reaction on ocular fluids in bilateral granulomatous chorioretinitis*. International medical case reports Journal. Australia; 2015.

Agradecimientos

Se agradece al equipo de trabajo del Departamento de Parasitología y Micología del Instituto de Higiene por brindarnos el espacio para poder realizar las múltiples reuniones a lo largo de la elaboración de este proyecto.

Queremos hacer especial mención a nuestro tutor de monografía, Profesor Adjunto Dr. Daniel Da Rosa quien con gran dedicación y atención nos brindó todo su conocimiento sobre el tema, guiándonos a lo largo de este trabajo.

Agradecer también a la Profesora Agregada Dra. Alicia Alemán quien pertenece a equipo del Departamento de Medicina Preventiva y Social, otorgando herramientas para la aplicación de la metodología de trabajo.

ANEXOS

| Título | Autores | Población | Herramientas utilizadas | Fecha y Lugar | Revista |
|--|---|---|--|------------------------------|---|
| Toxocariasis: critical analysis of serology in patients attending a public referral center for ophthalmology in Brazil. | Rubinsky G, Yamamoto J, Hirata C, et al. | Pacientes con clínica de TO entre 8-14 años | Anticuerpos IgG anti-Toxocara | 06/2018 San Pablo, Brasil | Japanese Ophthalmological Society |
| Seroepidemiological study and associated risk factors of Toxocara canis infection among preschool children in Osun State, Nigeria. | Sowemimoa O, Leec Y, Asaolu S, et al. | Niños entre 9 meses y 5 años en contacto estrecho con perros | ELISA | 06/2017 Osun, Nigeria | Acta Tropica |
| Prevalence of Toxocara antibodies among patients clinically suspected to have ocular toxocariasis: A retrospective descriptive study in Sri Lanka. | Iddawela D, Ehambaram K, Bandara P, et al. | Niños entre 10 y 14 años con clínica sugestiva de TO | ELISA | 04/2017 Sri Lanka | BMC ophthalmology |
| Evaluation of the Goldmann-Witmer coefficient in the immunological diagnosis of ocular toxocariasis | Wanga Z, Zhou M, Cao W, et al. | 72 pacientes diagnosticados con OT | ELISA de suero y fluidos oculares | 06/2016 Shangai, China | Acta Tropica |
| Toxocara polymerase chain reaction on ocular fluids in bilateral granulomatous chorioretinitis. | Tian JX, O'Hagan S. | Reporte de caso: Adolescente 14 años | PCR | 05/2015 Australia | International medical case reports Journal. |
| Ocular toxocariasis: new diagnostic and therapeutic perspectives. | Martínez D, Muñoz M, Gómez L, et al. | | Revision | 10/2015 Colombia | Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery |
| rTES-30USM: cloning via assembly PCR | Norhaida A, Suharni M, Sharming L, et al. | 338 muestras de suero | TES ELISA y IgG4ELISA | 03/2018 Malasia | Annals of Tropical Medicine and Parasitology |
| Diagnosis of ocular toxocariasis by detecting antibodies in the vitreous humor | Inchauspe S, Echandia L, Dodds E, et al. | 6 pacientes de entre 6 y 25 años con TO con serologías negativas. | Estudio retrospectivo con historias clínicas | 11/2017 Argentina | Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología |
| Producción y evaluación del antígeno recombinante TES-30 de Toxocara canis para el inmunodiagnóstico de toxocariasis | Olave A, Mesa J, Botero J, et al. | | TES ELISA y IgG4ELISA | 03/2016 Colombia | Biomedica vol. 36 |
| Toxocariasis: seroprevalence in abandoned-institutionalized children and infants | Archellia S, Santillan G, Fonrougea R, et al. | Niños expósitos de 10 meses hasta 3 años | ELISA y Western Blot | 01/2014 Argentina | Revista Argentina de Microbiología |
| *Hacia la elaboración de un test diagnóstico para la detección de Toxocariasis en Humanos | Echeverría S | | Proteínas, ELISA y PCR | 2016 Uruguay | Tesis de Maestría en Biotecnología. Facultad de Ciencias. |

Tabla I. Artículos seleccionados que cumplen con los criterios de inclusión y exclusión de la revisión. Montevideo, 2018.

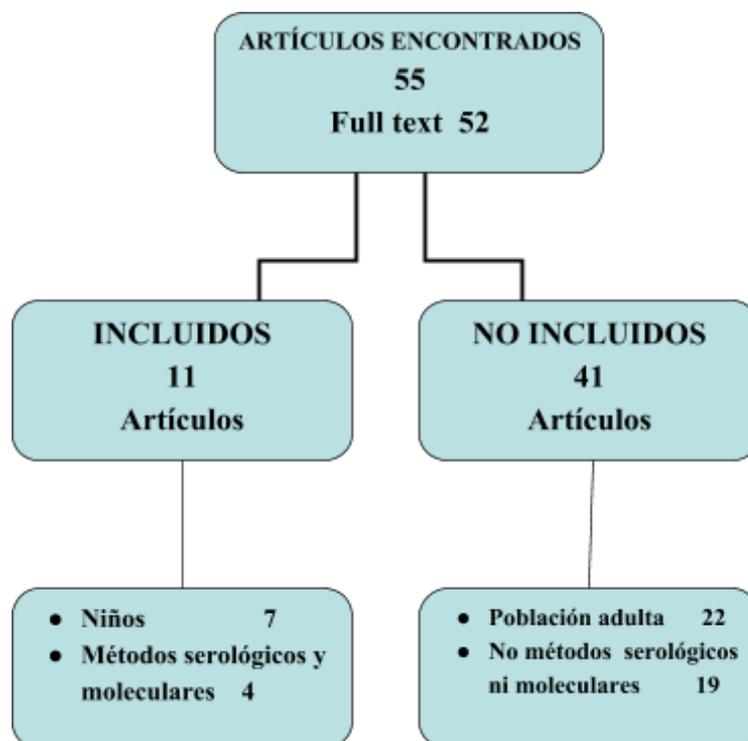


Gráfico 1. Consort resultados según criterios de inclusión y exclusión planteados en el protocolo de la revisión. Montevideo, 2018.