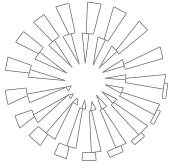


Antígenos de secreción-excreción de *Toxocara canis* reconocidos por cachorros del área metropolitana de la Ciudad de México



Secretory-excretory antigens of *Toxocara canis* recognized by puppies of the Mexico City metropolitan area

Marco Antonio Muñoz-Guzmán* Fernando Alba-Hurtado*

Abstract

The aim of the study was to determine the *Toxocara canis* larvae secretory-excretory antigens (SETc-Ag), which are most often recognized by puppies infected naturally from the metropolitan area of Mexico City. At necropsy, adult phases of *T. canis* were found in the intestine of 20 puppies (64.6%), and 11 had no parasites (35.4%). Sera of all animals with *T. canis* in the intestine and seven animals without worms were positive to ELISA ($X = 0.683 \pm 0.184$ OD) and recognized several SETc-Ag by Western blot (WB). Sera from four puppies with no *T. canis* did not recognize any type of antigen by WB and were negative to ELISA-IgG ($X = 0.078 \pm 0.045$ OD). Sera from the puppies recognized three antigen groups. The first one included seven low molecular weight antigens (16, 20, 23, 24, 28, 32 and 38 kDa); the second one, three high molecular weight antigens (400, 200 and 120 kDa) and the third one, four antigens of intermediate molecular weight (86, 74, 66 and 47 kDa). The most frequently recognized SETc-Ag were of 32, 38, 66, 120 and 200 kDa, which makes them good candidate antigens to develop immunodiagnosis tests in dogs.

Key words: *TOXOCARA CANIS*, SECRETORY-EXCRETORY ANTIGENS, PUPPIES, ELISA, WESTERN BLOT.

Resumen

El propósito del presente trabajo fue determinar los antígenos de secreción-excreción de larvas de *Toxocara canis* (Ag-SETc) que son más frecuentemente reconocidos por cachorros infectados naturalmente del área metropolitana de la Ciudad de México. A la necropsia, 20 cachorros presentaron fases adultas de *T. canis* en el intestino (64.6%) y 11 no presentaron (35.4%). El suero de todos los animales con *T. canis* en el intestino y de siete animales, sin gusanos a la necropsia, fueron positivos a ELISA ($X = 0.683 \pm 0.184$ DO) y reconocieron, por Western blot (WB), varios Ag-SETc. El suero de cuatro cachorros sin *T. canis* en el intestino no reconoció ningún antígeno por WB y fueron negativos a ELISA-IgG ($X = 0.078 \pm 0.045$ DO). Los sueros de los cachorros reconocieron tres grupos de antígenos. El primero incluyó siete de bajo peso molecular (16, 20, 23, 24, 28, 32 y 38 kDa); el segundo, tres de alto peso molecular (400, 200 y 120 kDa) y el tercero antígenos de peso molecular intermedio (86, 74, 66 y 47 kDa). Los Ag-SETc más frecuentemente reconocidos fueron de 32, 38, 66, 120 y 200 kDa, por lo que éstos son candidatos para pruebas de inmunodiagnóstico en perros.

Palabras clave: *TOXOCARA CANIS*, ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN, CACHORROS, ELISA, WESTERN BLOT.

Recibido el 13 de marzo de 2009 y aceptado el 7 de diciembre de 2009.

*Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Km 3.5, Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, Colonia San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 54714, México.

Autor para correspondencia: Fernando Alba-Hurtado, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Km 3.5, Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, Colonia San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 54714, México, Tel: +52 (55) 56 23 19 99, ext. 39411, correo electrónico: fealba@hotmail.com

Toxocara canis is one of the most frequent nematodes in dogs from Mexico and many other places in the world. Adult forms mainly infest puppies, causing digestive problems, affecting development and increasing mortality. In adult dogs and paratenic hosts (rodents, pigs, birds, humans, etc.), larvae can be found in latent stage in different organs: liver, kidney, lungs, muscles, eyes and brain.¹⁻³ The importance of this parasite is not only for its repercussion in dogs, but also as an important zoonosis cause.⁴

Toxocara canis larvae can survive in culture mediums complemented with glucose. These larvae produce *in vitro* great quantities of glycoproteins known as *Toxocara canis* secretion-excretion antigens (SETc-Ag), which have been identified by some authors⁵⁻⁷ in SDS-polyacrylamide electrophoresis gels (SDS-PAGE). These antigens have been used for toxocariosis diagnosis and sera antibodies response to these antigens has been evaluated by ELISA and Western Blot (WB) in different species of paratenic hosts; the proteinic band pattern recognized by the serum of each host species is different.⁸⁻¹¹ At the moment there are no reports of the recognition pattern of these antigens in dogs that guide its utilization for the immunological diagnosis; therefore, in this work the most frequently SETc-Ag recognized by puppies naturally infected were determined.

Thirty-one puppies from one to three months old were used, obtained from the Centro de Control Canino, of Cuautitlan, Estado de Mexico. All puppies were euthanized with an overdose of pentobarbital* administering at least twice the therapeutic dose of 63 mg/kg of weight. Before euthanasia, blood samples were taken; the sera were separated by centrifuge and were stored at -20°C until its use. Afterwards, necropsy was performed to all puppies in search of intestinal parasites.

SETc-Ag were obtained by *T. canis* larvae culture according to the Savigny method,¹² modified by Bowman *et al.*¹³ The purity and integrity of the SETc-Ag was determined in SDS-PAGE stained with silver nitrate and the protein quantity was determined by the Bradford technique.^{14,15}

The serum antibodies against SETc-Ag were measured by indirect ELISA,¹⁶ this was optimized according to the antigen concentration, serum dilution and conjugate dilution. The antigen concentration was 10 µg/mL, the serum dilution was 1:200 and the conjugate** was diluted 1:1 500. To establish the test cut values an optical density (OD) prevalence bimodal curve was performed and the confidence intervals were defined with the mean of the two resultant populations ± three standard deviations. The OD data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey multiple comparison with the GraphPad Prism v. 4 program.

The separation of SETc-Ag by SDS-PAGE and its

Toxocara canis es uno de los nematodos más frecuentes en perros de México y de muchos otros lugares del mundo. Las formas adultas afectan principalmente a los cachorros, produciéndoles problemas digestivos, afectando su desarrollo e incrementando la mortalidad. En perros adultos y huéspedes paraténicos (roedores, cerdos, aves, humanos, etc.) las larvas se pueden encontrar en estado de latencia en diferentes órganos: hígado, riñones, pulmones, músculos, ojos y cerebro.¹⁻³ La importancia de este parásito no es sólo por sus repercusiones en perros, sino porque también es una causa importante de zoonosis.⁴

Las larvas de *T. canis* pueden sobrevivir en medios de cultivo complementado con glucosa. Estas larvas producen *in vitro* gran cantidad de glicoproteínas conocidas como antígenos secreción-excreción de *T. canis* (Ag-SETc), las cuales han sido identificadas por algunos autores⁵⁻⁷ en geles de electroforesis de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Estos antígenos se han utilizado para el diagnóstico de la toxocariosis y la respuesta de anticuerpos séricos a estos antígenos ha sido evaluada por ELISA y Western Blot (WB) en diferente especies de huéspedes paraténicos; el patrón de bandas proteínicas reconocidas por el suero de cada especie de huésped es diferente.⁸⁻¹¹ Hasta el momento no existen informes del patrón de reconocimiento de estos antígenos en los perros que orienten su utilización para el diagnóstico inmunológico, por lo que en este trabajo se determinaron los Ag-SETc más frecuentemente reconocidos por cachorros infectados naturalmente.

Se utilizaron 31 cachorros de uno a tres meses de edad, obtenidos del Centro de Control Canino, de Cuautitlán, Estado de México. A todos los cachorros se les practicó la eutanasia con sobredosis de pentobarbital* aplicando al menos dos veces la dosis terapéutica de 63 mg/kg de peso. Antes de la eutanasia se tomaron muestras de sangre, se separó el suero por centrifugación y se almacenó a -20°C hasta su utilización. Después de se les realizó la necropsia a todos los cachorros en busca de parásitos intestinales.

Los Ag-SETc se obtuvieron por cultivo de larvas de *T. canis* de acuerdo con el método de Savigny,¹² modificado por Bowman *et al.*¹³ La pureza e integridad de los Ag-SETc fue determinada en SDS-PAGE teñidos con nitrato de plata y la cantidad de proteína se determinó mediante la técnica de Bradford.^{14,15}

Los niveles de anticuerpos séricos contra los Ag-SETc se midieron mediante ELISA indirecta,¹⁶ ésta fue optimizada de acuerdo con la concentración de antígeno, dilución del suero y dilución del conjugado. La concentración de antígeno fue de 10 µg/mL, la

*Anestésal® Pfizer, México.

electro-transference to nitrocellulose paper was done using a vertical chamber and a semi-dry transference apparatus,[†] respectively. For immunodetection 1:20 diluted sera and 1:2000 diluted conjugate were used.^{16,17}

At necropsy, 20 puppies showed adult phases of *T. canis* in intestine (64.6%) and 11 did not show parasites (35.4%), a similar incidence was reported by Eguía-Aguilar *et al.*¹⁸ in puppies from Mexico City. Several studies have shown that the incidence is greater in puppies than in adult dogs.^{19,20}

The OD data obtained by ELISA (Figure 1) showed significant statistical differences ($P < 0.05$) between puppy sera that recognized some antigens by WB (0.683 ± 0.184) and the non-reactive to the same test (0.078 ± 0.045). There were no OD differences between the positive animals at necropsy (0.681 ± 0.193) and the negatives at necropsy but positive to WB (0.686 ± 0.172).

The DO data obtained by ELISA (Figure 1) showed two populations with significant differences ($P < 0.001$), the first one constituted by all sera at necropsy and seven puppy sera negative at necropsy (0.683 ± 0.184) and the second one, by four puppy sera negative at necropsy (0.078 ± 0.045). Sera of all puppies positive to ELISA recognized several SETc-Ag, the distribution and frequency of the antigen recognition is shown in Figure 2. The four puppies negative to ELISA did not recognize any antigen by WB and did not present *T. canis* in the intestine.

The presence of antigens against SETc-Ag in the puppies that did not present adult worms in the intestine can be due to several factors. The first one concerning *T. canis* larvae migrating and secreting antigens in tissues without having matured to the adult stage in the intestine, some authors have observed that the pre-patency period is 42 to 56 days.²¹ The second one, due to possible cross reactions with other helminthes such as: *Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Echinococcus granulosus* and *Anisakis simplex*, among others,^{22,23} although none of these parasites were detected at necropsy. The third one is the bitches' antibody transference towards their puppies through the placenta.

A total of 14 antigens were recognized by the sera of positive puppies (Figure 2). Magnaval *et al.*²⁴ found that human sera with the visceral larva migrans recognized seven Setc-Ag. They recorded two antigen patrons clearly differentiated, one of high and one of low molecular weight. In the present study, puppies recognized three antigen groups. The first group includes seven low molecular weight antigens (16, 20, 23, 24, 28, 32 and 38 kDa), in the second group, three high molecular weight antigens (400, 200 and 120 kDa), besides a pattern of intermediate

dilución del suero fue de 1:200 y el conjugado* fue diluido 1:1 500. Para establecer los valores de corte de la prueba se realizó una curva bimodal de prevalencia de las densidades ópticas (DO) y los intervalos de confianza fueron definidos con la media de las dos poblaciones resultantes $\pm$ tres desviaciones estándar. Los datos de DO fueron analizados mediante ANDEVA de una vía y comparación múltiple de Tukey con el programa GraphPad Prism ver. 4.

La separación de los Ag-SETc por SDS-PAGE y su electrotransferencia a papel de nitrocelulosa se realizó utilizando una cámara vertical** y un equipo de transferencia semihúmeda,*** respectivamente. Para la inmunodetección se usaron los sueros diluidos 1:20 y el conjugado diluido 1:2000.^{16,17}

A la necropsia, 20 cachorros presentaron fases adultas de *T. canis* en el intestino (64.6%) y 11 no presentaron parásitos (35.4%), una incidencia similar fue informada por Eguía-Aguilar *et al.*¹⁸ en cachorros de la Ciudad de México. Diversos estudios han demostrado que la incidencia es mayor en cachorros que en perros adultos.^{19,20}

Los datos de DO obtenidos mediante ELISA (Figura 1) mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre sueros de cachorros que reconocieron algunos antígenos al WB (0.683 ± 0.184) y los no reactivos a la misma prueba (0.078 ± 0.045). No se observaron diferencias en las DO entre los animales positivos a la necropsia (0.681 ± 0.193) y los negativos a la necropsia, pero positivos al WB (0.686 ± 0.172).

Los datos de DO obtenidos por medio de ELISA (Figura 1) muestran dos poblaciones con diferencias significativas ($P < 0.001$), la primera formada por sueros de todos los cachorros positivos a la necropsia y siete sueros de cachorros negativos a la necropsia (0.683 ± 0.184) y la segunda, por sueros de cuatro cachorros negativos a la necropsia (0.078 ± 0.045). El suero de todos los cachorros positivos mediante ELISA reconocieron varios Ag-SETc, la distribución y la frecuencia del reconocimiento de estos antígenos se presenta en la Figura 2. Los cuatro cachorros negativos a ELISA no reconocieron ningún antígeno por WB y no presentaron *T. canis* en el intestino.

La presencia de anticuerpos contra Ag-SETc en los cachorros que no presentaron gusanos adultos en el intestino puede deberse a varios factores. El primero en relación a que larvas de *T. canis* estén migrando y secretando antígenos en los tejidos sin que ellas hayan madurado a la fase adulta en intestino, algunos autores han observado que el periodo de prepatencia

*Cabra anti-IgGs de perro marcado con peroxidasa, Serotec Laboratorios, Reino Unido.

**Mini-Protean II Electrophoretic Cell, Bio Rad Inc., Estados Unidos de América.

***Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Bio Rad Inc, Estados Unidos de América.

molecular weight antigens (86, 74, 66 and 47 kDa). Some authors^{10,24} consider that the high molecular weight antigens is not specific of *T. canis*, two of the puppies negative at necropsy, but positive to ELISA, presented this antigen pattern; therefore, they could be considered as negatives to the presence of the parasite. Patterns of intermediate molecular weight antigens have been recorded in other animal species without being found in humans to this moment. It has also been reported of a SETc-Ag three band group that migrate very close and are recognized by only one monoclonal antigen; therefore, variants of the same 120 kDa antigen have been considered.²⁵ In the present work, three bands with similar characteristics to the former were identified and in the WB test all or none are recognized by different sera; hence, they are considered in the same 120 kDa antigen.

Not all host species recognize the same SETc-Ag. Rabbits recognize up to nine antigens;¹⁰ pigs, two;⁹ humans, seven;⁴ mice, four;⁸ and gerbils, eight.¹¹ These works suggest that the SETc-Ag immunodominance is unique for each host species.

It is concluded that sera of sampled dogs recognized up to 14 antigens, the most frequently recognized were: 32, 38, 66, 120 and 200 kDa; therefore, they are candidates to develop immunodiagnostic tests in dogs. Although these tests could have a limited utility

es de 42 a 56 días.²¹ El segundo debido a posibles reacciones cruzadas con otros helmintos como *Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Echinococcus granulosus* y *Anisakis simplex*, entre otros,^{22,23} aunque no se detectó ninguno de estos parásitos a la necropsia. El tercero es la transferencia de anticuerpos de las perras a sus cachorros a través de la placenta.

Un total de 14 antígenos fueron reconocidas por el suero de los cachorros positivos (Figura 2). Magnaval *et al.*²⁴ encontraron que los sueros de humanos con el síndrome de *larva migrans* visceral reconocieron siete Ag-SETc. Ellos registraron dos patrones de antígenos claramente diferenciados, uno de alto y otro de bajo peso molecular. En el presente estudio los cachorros reconocieron tres grupos de antígenos. El primer grupo incluye siete antígenos de bajo peso molecular (16, 20, 23, 24, 28, 32 y 38 kDa); en el segundo grupo, tres antígenos de alto peso molecular (400, 200 y 120 kDa), además de un patrón de antígenos de peso molecular intermedio (86, 74, 66 y 47 kDa). Algunos autores^{10,24} consideran que el grupo de antígenos de alto peso molecular no es específico de *T. canis*, dos de los cachorros negativos a la necropsia, pero positivos mediante ELISA, presentaron este patrón de antígenos, por lo que pudieran ser considerados como negativos a la presencia del parásito. Se han registrado patrones de antígenos de peso molecular intermedio en otras especies animales sin que hasta el momento se hayan encontrado en humanos. También se ha informado de un conjunto de tres bandas de Ag-SETc que migran muy cercanamente y que son reconocidas por un solo anticuerpo monoclonal, por lo que se

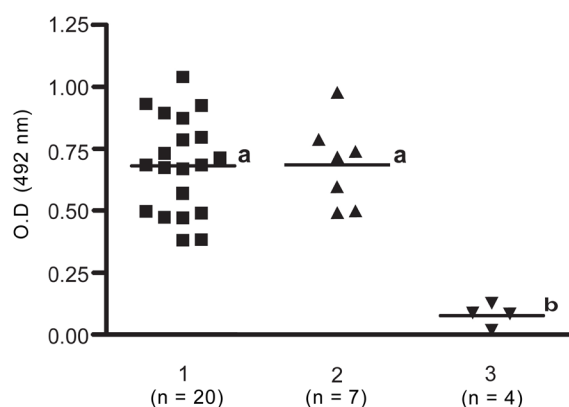


Figura 1. Relación entre los valores de densidad óptica (DO) determinados por ELISA y la reactividad a los antígenos de secreción-excreción de *T. canis* (SETc Ag) al Western blot (WB). 1) cachorros reactivos al WB con *T. canis* adultos en intestino, 2) cachorros reactivos al WB sin *T. canis* adultos en intestino, 3) cachorros no reactivos al WB sin *T. canis* adultos en intestino. La línea continua representa la media geométrica de cada grupo, la línea discontinua representa el valor de corte del ELISA, letras diferentes indican diferencia estadística ($P < 0.001$).

Figure 1. Relation between optic density (OD) values determined by ELISA and reactivity to secretion-excretion antigens of adult *T. canis* (SETc-Ag) to Western blot (WB). 1) puppies reactive to WB with adult *T. canis* in the intestine, 2) puppies reactive to WB without adult *T. canis* in the intestine, 3) non reactive puppies to WB without adult *T. canis* in intestine. The continuous line represents the geometric mean of each group, the dotted line represents the cut value of ELISA, different letters indicate statistic difference ($P < 0.001$).

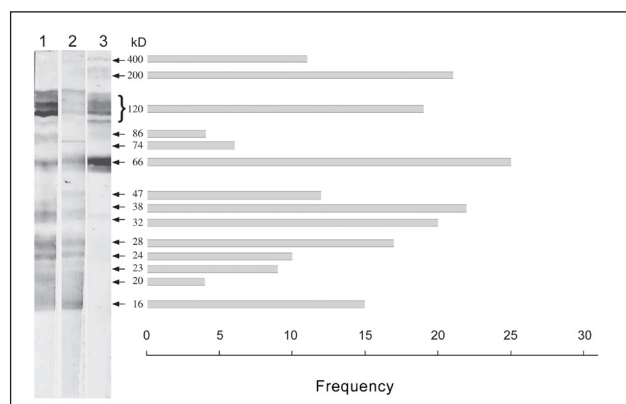


Figura 2. Frecuencia de antígenos de secreción-excreción de *T. canis* (Ag-SETc) reconocidos por sueros de 31 cachorros del área metropolitana de la Ciudad de México. Carriles 1 y 2 WB de cachorros que reconocieron antígenos de alto y bajo peso molecular, carril 3 WB de cachorro que reconoció solamente antígenos de alto peso molecular.

Figure 1. *T. canis* (SETc-Ag) secretion-excretion antigens frequency recognized by sera of 31 puppies from the metropolitan area of Mexico City. WB lanes 1 and 2 are from puppies that recognized low and high molecular weight antigens, WB lane 3 from a puppy who only recognized high molecular weight antigens.

in the case of puppies with intestine worms that are eliminating eggs in fecal material, its utilization in puppies older than three months and in adult dogs that do not eliminate eggs, could be of great utility in the diagnosis.

Referencias

1. ABO-SHEHADA MN, AL-ZUBAIDY BA, HERBERT IV. The migration of larval *Toxocara canis* in mice. I. Migration through the intestine in primary infections. *Vet Parasitol* 1984;17:65-73.
2. ALBA-HURTADO F, TORTORA PJ, TSUTSUMI V, ORTEGA-PIERRES M.G. Histopathological investigation of experimental ocular toxocariasis in gerbils. *Int J Parasitol* 2000;30:143-147.
3. FINSTERER J, AUER H. Neurotoxocarosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2007; 49:279-287.
4. MAGNAVAL JF, GLICKMAN LT, DORCHIES P, MORASIN B. Highlights of human toxocariasis. *Kor J Parasitol* 2001;39:1-11.
5. MAIZELS RM, DE SAVIGNY D, OGILVIE BM. Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite Immunol* 1984;6 :23-37.
6. BADLEY JE, GRIEVE RB, BOWMAN DD, GLICKMAN LT, ROCKEY JH. Analysis of *Toxocara canis* larval excretory-secretory antigens: physicochemical characterization and antibody recognition. *J Parasitol* 1987;73:593-600.
7. MEGHJI M, MAIZELS RM. Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Mol Biochem Parasitol* 1986;18:155-170.
8. SARIMEHMETOGLU HO, BURGU A, AYCICEK H, GÖNENÇ B, TANYUKSEL M, KARA M. Application of western blotting procedure for the immunodiagnosis of visceral larva migrans in mice by using excretory/secretory antigens. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2001;108:390-392.
9. SOMMERFELT IE, SANTILLAN G, LOPEZ C, RIBICICH M, FRANCO AJ. Immunological and hematological response in experimental *Toxocara canis*-infected pigs. *Vet Parasitol* 2001;96:127-134.
10. MORALES OL, LOPEZ MC, NICHOLLS RS, AGUDELO C. Identification of *Toxocara canis* antigens by Western blot in experimentally infected rabbits. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002;44:213-216.
11. ALBA-HURTADO F, MUÑOZ-GUZMAN MA, VALDIVIA-ANDA G, TORTORA JL, ORTEGA-PIERRES M.G. *Toxocara canis*: larval migration dynamics, detection of antibody reactivity to larval excretory-secretory antigens and clinical findings during experimental infection of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp Parasitol* 2009 IN PRESS.
12. SAVIGNY DH. *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. *J Parasitol* 1975;61:781-782.
13. BOWMAN DD, MIKA-GRIEVE M, GRIEVE RB. Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*. *Am J Trop Med Hyg* 1987;36:75-82.
14. JOHANSSON KE. Separation of antigens by analytical gel electrophoresis. In: BJERRUM OJ, HEEGAARD NH, editors. *Handbook of immunoblotting of proteins*. Vol. I Florida: CRC-Press, 1988:31-50.
15. BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
16. COLIGAN JE, KRUISBEEK AM, MARGULIES DH, SHEVACH EM, STROBER W. editors. *Immunoblotting and immunodetection*, Current protocols in immunology Vol 2. New York: Wiley & Sons, 1994.
17. PARK HY, LEE SU, HUH S, KONG Y, MAGNAVAL JF. A seroepidemiological survey for toxocariasis in apparently healthy residents in Gangwon-do, Korea. *Kor J Parasitol* 2002;40:113-117.
18. EGUIA-AGUILAR P, CRUZ-REYES A, MARTINEZ-MAYA JJ. Ecological analysis and description of the intestinal helminths present in dogs in Mexico City. *Vet Parasitol* 2005;127:139-146.
19. HABLUTZEL A, TRALDI G, RUGGIERI S, ATTILI AR, SCUPPA P, MARCHETTI R *et al*. An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. *Vet Parasitol* 2003;113:243-252.
20. MARTINEZ-MORENO FJ, HERNANDEZ S, LOPEZ-COBOS E, BECERRA C, ACOSTA I, MARTINEZ-MORENO A. Estimation of canine intestinal parasites in Cordoba (Spain) and their risk to public health. *Vet Parasitol* 2007;143:7-13.
21. FAHRION AS, STAEBLER S, DEPLAZES P. Patent

- Toxocara canis* infections in previously exposed and in helminth-free dogs after infection with low numbers of embryonated eggs. Vet Parasitol 2008;152:108-115.
22. ISHIDA MM, RUBINSKY-ELEFANT G, FERREIRA AW, HOSHINO-SHIMIZU S, VAZ AJ. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. Acta Trop 2003;89:73-84.
 23. PERTEGUER MJ, CUELLAR C, GUILLÉN JL, AGUILA C, FENOY S, CHIVATO T *et al*. Cross-reactivity between *Anisakis simplex* sensitization and visceral *larva migrans* by *Toxocara canis*. Acta Trop 2003;89:85-89.
 24. MAGNAVAL JF, FABRE R, MAURIERES P, CHARLET JP, DE LARRARD B. Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. Parasitol Res 1991 ;77 :697-702.
 25. MAIZELS RM, PAGE AP. Surface associated glycoproteins from *Toxocara canis* larval parasites. Acta Trop 1990 ;47 :355-364