

EVALUACIÓN DE UNA PRUEBA DE ELISA CON ANTÍGENO METABÓLICO DE *Fasciola hepatica* PARA EL DIAGNÓSTICO DE FASCIOLISIS HUMANA EN CAJAMARCA, PERÚ*

Hernán Cornejo^{1,a}, Fátima Oblitas^{2,b}, Sandro Cruzado^{2,b}, William Quispe^{3,a}

RESUMEN

Se obtuvo el antígeno metabólico (antígeno excreción - secreción) de *Fasciola hepatica* de ovinos infectados de Cajamarca, con una concentración proteica de 1 005 µg/µL, compuesta principalmente por proteínas de peso molecular entre 1,2 y 170 kDa. Se detectaron bandas de 170; 150; 31; 24; 18-14 y 10 kDa. Con este antígeno se desarrolló una prueba de ELISA y se determinó su punto de corte en 0,140. Se evaluó 33 sueros de pacientes con fasciolosis confirmada por visualización de huevos en heces, 177 sueros de pacientes sin fasciolosis provenientes de áreas endémicas de Cajamarca y 88 sueros de pacientes con otras infecciones parasitarias y bacterianas. Se encontró una sensibilidad de 97,0%, especificidad de 96,6%, valor predictivo positivo de 78,1% y valor predictivo negativo de 99,6%. Se encontró reacción cruzada en 9/88 sueros evaluados. Se recomienda la implementación y uso de esta prueba para el diagnóstico de fasciolosis.

Palabras clave: Fascioliasis/diagnóstico; *Fasciola hepatica*; Pruebas inmunológicas; ELISA, Sensibilidad y especificidad; Perú (fuente: DeCS BIREME).

EVALUATION OF AN ELISA TEST WITH *Fasciola hepatica* METABOLIC ANTIGEN FOR DIAGNOSIS OF HUMAN FASCIOLIASIS IN CAJAMARCA, PERU

ABSTRACT

Metabolic (excretion/secretion) antigen was obtained from sheep infected with *Fasciola hepatica*, with a 1005 µg/µL of protein concentration, composed principally by proteins of molecular weight between 1.2 and 170 kDa. Bands of 170, 150, 31, 24, 18-14 and 10 kDa were detected. With this antigen an ELISA test was developed and the cut off was determined in 0.140. We evaluated 33 serums of patient with fascioliasis confirmed by visualization of eggs in feces, 177 serums of persons without fascioliasis from endemic rural areas of Cajamarca and 88 serums of patients with others parasitic and bacterial infections. We found a 97.0% of sensitivity, 96.6 specificity, 78.1% predictive positive value, 99.6 % predictive negative value. In 9/88 serums was found cross reactions. We recommended the implementation and use of this test for the fascioliasis diagnosis.

Key words: Fascioliasis/diagnosis; *Fasciola hepatica*; Immunologic test; Sensitivity and specificity; Peru (source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una zoonosis parasitaria causada por un tremátodo denominado *Fasciola hepática*, se estima que existen entre 2,6 y 17 millones de personas infectadas en el mundo ⁽¹⁾ y es endémica en comunidades rurales del Perú ^(2,3).

Cajamarca es una de las regiones andinas peruanas endémicas con alta prevalencia de fasciolosis, sobre todo en población rural, las prevalencias humanas se encuentran entre 6,3% y 47,7%, siendo los niños de edad escolar los más afectados. La prevalencia se mantiene alta por la falta de educación sanitaria y escasos recursos económicos de los pobladores que

¹ Laboratorio de Inmunoserología, Laboratorio de Referencia Regional, Dirección Regional de Salud, Cajamarca, Perú.

² Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo, Cajamarca, Perú.

³ Laboratorio de Zoonosis Parasitaria, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú.

^a Biólogo Microbiólogo; ^b Químico Farmacéutico.

* Este trabajo es un resumen de la tesis para optar el título de químico farmacéutico: Cruzado S, Oblitas F. Obtención de antígeno metabólico de *Fasciola hepatica* e implementación de la técnica ELISA para el diagnóstico de fasciolosis humana Cajamarca – 2009. Cajamarca: Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo; 2009.

dejan deambular libremente a los animales herbívoros en zonas cercanas a fuentes de agua corriente, incrementando el riesgo de infectarse por consumir berros u otros vegetales de tallo corto con quistes de metacercarias (forma infectante)⁽⁴⁻⁷⁾.

La fasciolosis humana tiene tres estadios clásicos: agudo, prepatente y crónico, en el estadio agudo no encontramos huevos de *F. hepatica* en las heces, pues el parásito está migrando y las pruebas serológicas son las que ayudan a detectar la infección. En la fase prepatente y crónica, el trematodo ya alcanzó las vías biliares, y la serología y los exámenes de heces son positivos; sin embargo, la excreción de los huevos es intermitente; por ello, el inmunodiagnóstico es el método de elección para el diagnóstico de fasciolosis pues detecta fase aguda, prepatente y crónica^(1,5,8).

Dentro de los métodos más confiables de inmunodiagnóstico, debido a su fácil manejo, alta sensibilidad y especificidad, se encuentran las pruebas inmunoenzimáticas; la más importante es la técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunoabsorbent assay*), la cual es utilizada para la detección de anticuerpos y antígenos (ELISA indirecto)^(1,9,10). La sensibilidad y especificidad son superiores cuando se trabaja con antígeno de *F. hepatica* de excreción - secreción (AFHES) que cuando se trabaja con antígeno somático de *F. hepatica*⁽¹¹⁾.

A pesar de ser Cajamarca una zona endémica de fasciolosis, no se tiene implementado, para el uso en los servicios de salud, una prueba de inmunoenzimática para el diagnóstico de fasciolosis, por ello, el objetivo del estudio es desarrollar una prueba de ELISA a partir del antígeno metabólico de *F. hepatica* (AFHES) y evaluar su eficiencia diagnóstica para su implementación.

EL ESTUDIO

Se desarrolló una prueba de ELISA para el diagnóstico de fasciolosis humana a partir de un antígeno metabólico obtenido de parásitos locales y se evaluó su eficiencia diagnóstica en población rural de zonas endémicas de Cajamarca entre julio de 2008 y febrero de 2009. El estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Investigación de la Dirección Regional de Salud Cajamarca, todos los participantes del estudio firmaron el consentimiento y asentimiento informado, según correspondía. Los resultados de las pruebas fueron remitidos a los establecimientos de salud a los que pertenecían los participantes y quienes, en caso de ser positivos, recibirán tratamiento con triclabendazol.

OBTENCIÓN DEL ANTÍGENO METABÓLICO DE FASCIOLA

Se obtuvo hígados de ovino infectados con *F. hepatica* en el camal municipal de Cajamarca. En el laboratorio se realizó cortes transversales y se presionó ligeramente los canalículos biliares para sacar a los tremátodos, luego con ayuda de una pinza se les extrajo sin dañarlas, se llevaron a un frasco con PBS pH 7,2 en un volumen de 300 mL. Se lavó dos veces con PBS pH 7,2 rápidamente hasta que estén limpias y eliminen todos los restos de sangre y bilis del hospedador.

Se colocó 200 ejemplares de *F. hepatica* en una placa petri estéril con 100 mL de PBS (pH 7,2). Se incubó a 37 °C por cuatro horas luego se refrigeró a 4 °C durante toda la noche. Se retiró las fasciolas y se recogió el PBS (antígeno de excreción - secreción), el cual se centrifugó a 10000 rpm durante una hora a 4 °C. Finalmente, se distribuyó proporcionalmente el sobrenadante en crioviales y se congeló a -20 o -80 °C.

Para determinar la concentración de proteínas, se usó el método de Lowry^(9,10). Se construyó una curva patrón a partir de una solución patrón (BSA) (1 mg/mL) y la concentración de proteínas del antígeno de secreción excreción de *Fasciola hepatica*, se determinó por interpolación de los valores de absorbancia en la curva patrón. Para la caracterización de los pesos moleculares de las proteínas antigénicas se realizó la electroforesis en *chip*^(12,13).

Los antígenos (AFHES) obtenidos tuvieron una concentración proteica de 1 005 µg/µL y están compuestos principalmente por proteínas de peso molecular entre 1,2 a 170 kDa, se detectó bandas de 170; 150; 31; 24; 18-14 y 10 kDa de peso molecular por electroforesis en *chip* (Figura 1).

El antígeno (AFHES) obtenido de ganado ovino de Cajamarca fue comparado con los antígenos (AFHES) de ganado ovino proporcionados por el Instituto Nacional de Salud (INS) y de ganado bovino de la Unidad de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de Lugo (Universidad de Santiago de Compostela, España); donde se observó una composición común de proteínas que van desde 10 – 50 kDa en los tres preparados antigénicos (Figura 2).

ELABORACIÓN DE LA PRUEBA ELISA

El antígeno obtenido (AFHES-Cajamarca) se impregnó en placas de microtitulación (100 µL/pocillo) diluido en Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5 a una concentración de 1 µg prot/100 µL, se cubrió las placas con *parafilm* y se

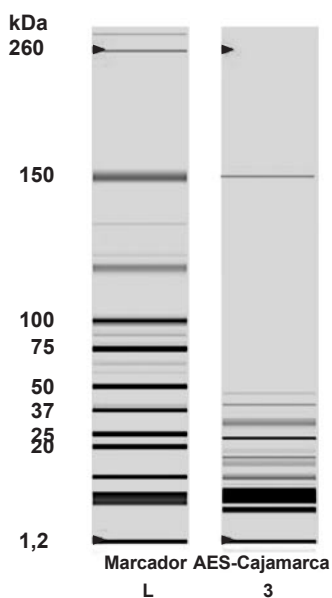


Figura 1. Caracterización por electroforesis en *Chip* del antígeno metabólico de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* (AFHES) de Cajamarca.

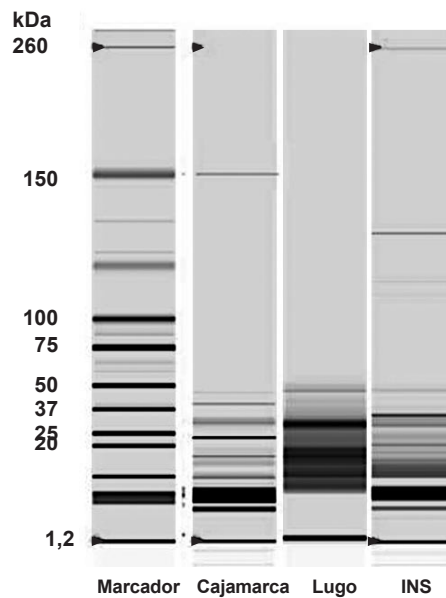


Figura 2. Comparación y caracterización por electroforesis de antígenos (AFHES) Cajamarca, Lima (INS) y Lugo (España).

dejó toda la noche en refrigeración. Al día siguiente se realizó el lavado con PBS-Tween 20 (200 µl por pozo) en cinco oportunidades para quitar el exceso de antígeno, posteriormente, se adicionó a cada pocillo 200 µl de solución de bloqueo (PBS-Tween20-Leche5%) e incubó a 37 °C por 30 minutos. Luego se realizó un nuevo lavado (200 µl/pozo) por cinco veces; de esta manera, la placa impregnada y bloqueada quedó lista para iniciar la corrida ELISA.

EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA

Para obtener sueros positivos y negativos a *Fasciola hepatica* se recolectó muestras de sangre venosa en población general y escolares de los distritos de Chetilla, Jesús, La Encañada, Llacanora, Namora y Matara ubicados en la provincia de Cajamarca y el distrito de Catilluc en la provincia de San Miguel, todos ellos son endémicos para fasciolosis. La selección de los sujetos fue por conveniencia y coordinada con el personal de los establecimientos de salud de cada comunidad, se seleccionó a las escuelas con mayor población estudiantil tanto del nivel primario como secundario y se incluyó a todos los que desearon participar; en forma similar se procedió con población adulta en la comunidad quienes tenían más de tres meses de residencia en la zona de estudio. A cada persona se le extrajo 5 mL de sangre venosa y se le solicitó una muestra de heces que fue procesada por la técnica de sedimentación rápida

(TSR) ⁽¹⁴⁾ en el Laboratorio de Referencia Regional de Cajamarca.

Se extrajo 210 muestras de sangre, de ellas se obtuvo el suero por centrifugación a 2500 rpm durante cinco minutos, luego se separó en alícuotas de 1,5 mL y se conservó a -20 °C hasta su procesamiento en el Laboratorio de Zoonosis Parasitaria del Instituto Nacional de Salud en Lima, Perú.

Se estableció el punto de corte usando el promedio de los títulos obtenidos de los sueros de personas que tuvieron el examen coproparasitológico negativo (177 personas) más tres veces la desviación estándar, que fue de 0,140 D.O. a una longitud de onda de 490 nm; tomando en cuenta este valor, se consideró a los sueros de los pacientes como positivos o negativos.

Para la evaluación de la prueba de ELISA se usó tres tipos de sueros: 33 sueros positivos a fasciolosis diagnóstico por la TSR en heces, 177 sueros negativos por la prueba de TSR y 88 sueros positivos a otras enfermedades bacterianas y parasitarias pero negativos a fasciolosis por *western blot* provenientes de la seroteca del Instituto Nacional de Salud para evaluar reacciones cruzadas, estos sueros fueron positivos a hidatidosis (9), cisticercosis (10), toxoplasmosis (5), leptospirosis (2), hymenolepiosis (3), giardiosis (21), ascariosis (6), estrogiloidiosis (5), blastocistosis (15),

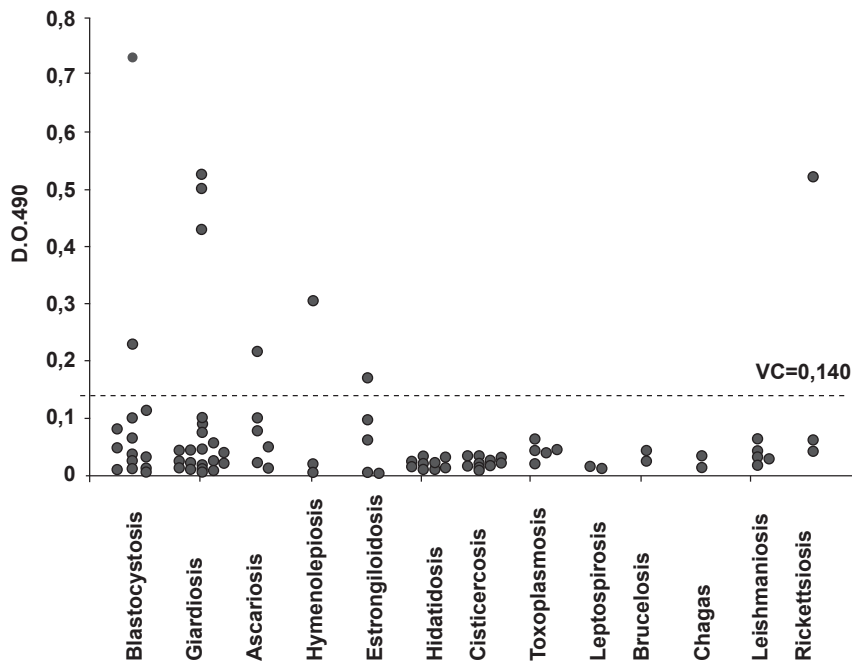


Figura 3. Distribución de los sueros positivos a otras etiologías según los valores obtenidos con la prueba ELISA con el antígeno metabólico de *F. hepatica*.

Brucelosis (2), enfermedad de Chagas (2), Leishmaniosis (5) y Rickettsiosis (3).

Los resultados fueron procesados con el programa Epidat v3.1, se calculó los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictos positivos (VPP) y negativos (VPN), así como las razones razones de verosimilitud positiva (RVP) y negativa (RVN).

De las personas con diagnóstico confirmado de fasciolosis, una tuvo resultado negativo por ELISA (1/33), de las personas con sueros positivos a otras enfermedades 9/88 fueron positivos (Tabla 1), la evaluación según tipo de suero positivo a otras infecciones y el resultado del ELISA se observa en la Figura 3.

Tabla 1. Evaluación del ELISA con el antígeno metabólico de *F. hepatica* en el diagnóstico de fasciolosis humana.

ELISA antígeno metabólico de <i>F. hepatica</i>	Fasciolosis		Total
	Positivos*	Negativos†	
Positivo	32	9	41
Negativo	1	256	257
Total	33	265	298

* Los casos positivos fueron diagnosticados por la visualización de huevos de *F. hepatica* por la técnica de sedimentación rápida (TSR) en heces.

† 177 casos negativos tuvieron una prueba negativa en el coproparasitológico y 88 provinieron de sueros positivos a otras infecciones pero negativos a *F. hepatica* por *western blot*.

La sensibilidad de la prueba fue de 97,0% (IC95%: 89,6-100%), especificidad de 96,6% (IC95%: 94,2-98,9%), VPP de 78,1% (IC95%: 64,2-91,9%), VPN de 99,6% (IC95%: 98,7-100%), con RVP de 28,6 (IC95%: 15,0-54,4) y RVN de 0,03 (IC95%: 0,00-0,22).

DISCUSIÓN

Diversos estudios indican que la mayor respuesta inmune frente al antígeno de *Fasciola hepatica*, se da con proteínas entre 12,4 a 60 kDa (12,13), el antígeno de *Fasciola hepatica* de Cajamarca cuenta con pesos moleculares de 170; 150; 31; 24; 18-14 y 10 kDa de los cuales, 24, 18-14 kDa están dentro del rango con mayor respuesta antigénica.

La proteína con peso molecular de 24 kDa es producto de excreción - secreción, propia del tegumento del parásito que parece formar parte de las células tegumentales y gránulos tipo 1 y tipo 2 (T1 y T2) presentes en los estadios inmaduros y de adultos del trematodo (15,16), lo que indica que esta proteína es una de las más importantes en la respuesta inmune.

La prueba de ELISA desarrollada a partir del antígeno metabólico de *F. hepatica* ha demostrado mejor sensibilidad que otras pruebas inmunológicas ensayadas en el Perú, como el FAS2 y FAS1-ELISA, *western blot* y arco2 (5,10,14); si bien tuvo una buena especificidad esta fue menor que la obtenida por Cordova *et al.* (10) con el

Tabla 2. Evaluación de pruebas inmunológicas para el diagnóstico de fasciolosis humana en el Perú.

Autor	Prueba	Sueros evaluados	Lugar - año	S	E	VPP	VPN
Cornejo	ELISA-AFHES	298 (N,P,O)*	Cajamarca -2009	97,0%	96,6%	78,1%	99,6%
Maco ⁽¹⁴⁾	ELISA-FAS2	145 (N,P)	Junín - 2000	96,7%	91,2%	75,0%	99,1%
Espinoza ⁽⁵⁾	ELISA-FAS2	237 (N,P)	Cajamarca - 2001	96,5%	92,2%	79,7%	98,8%
Cordova ⁽¹⁰⁾	ELISA-FAS2	138 (N,P,O)†	Lima - 1997	94,7%	100%	100%	98,6%
Espinoza ⁽⁵⁾	ELISA-FAS2	158 (N,P)	Junín - 2000	92,6%	89,6%	69,4%	97,9%
Cordova ⁽¹⁰⁾	ELISA-FAS1	138 (N,P,O)†	Lima - 1997	89,4%	98,0%	94,5%	96,2%
Espinoza ⁽⁵⁾	ELISA-FAS2	231 (N,P)	Puno - 2001	88,3%	70,8%	51,5%	94,5%
Maco ⁽¹⁴⁾	<i>Western blot</i>	144 (N,P)	Junín - 2000	71,9%	93,8%	76,7%	92,1%
Maco ⁽¹⁴⁾	Arco2	143 (N,P)	Junín - 2000	34,5%	98,3%	83,3%	85,5%

* Incluyó 88 sueros de pacientes con otras infecciones parasitarias y bacterianas.

† Incluyó 54 sueros de pacientes con otras parasitosis.

FAS2-ELISA. Lo que indica que esta prueba es útil para el diagnóstico de fasciolosis.

Una limitación del estudio, es que la visualización de huevos de *Fasciola hepatica* en heces, como prueba utilizada como *gold standar*, solo puede detectar los casos de fasciolosis en estadio crónico o prepatente, por lo que no se puede conocer el rendimiento de la prueba en estadios agudo; sin embargo, esta limitación es compartida con todos los estudios previos realizados y con los que comparamos nuestros resultados.

Encontramos reacciones cruzadas con sueros de pacientes con blastocitosis (2/15), giardiosis (1/20), ascariosis (1/3), estrogiloidosis (1/6) y Rickettsiosis (1/3), a diferencia del estudio de Cordova *et al.*⁽¹⁰⁾ que encontró que el FAS2-ELISA no tuvo reacciones cruzadas con sueros de pacientes con enfermedades parasitarias a diferencia de lo que encontramos, que podría deberse al nivel de purificación que tiene el antígeno que ellos usaron. Futuros estudios podrían trabajar en purificar mejor los antígenos de excreción – secreción que usamos y evaluar las reacciones cruzadas que encontramos, así mismo tener la certeza de que los sueros trabajados provengan de pacientes con la parasitosis a estudiar y que no hayan tenido fasciolosis, ya que un problema de estas pruebas inmunológicas es que no distinguen entre infección actual y pasada. Además, estos sueros fueron *western blot* negativos, que tiene una menor sensibilidad que el ELISA y en los casos de enfermedades bacterianas no se tiene la seguridad de un examen coproparasitológico negativo, como es el caso de reacción cruzada por Rickettsiosis.

El rendimiento de la prueba desarrollada en el Laboratorio de Referencia Regional de Cajamarca señala su idoneidad

para el diagnóstico de fasciolosis humana, por lo que se recomienda su implementación y uso.

Financiamiento

Esta investigación fue autofinanciada, contando con el apoyo técnico del Laboratorio de Referencia Regional Cajamarca e Instituto Nacional de Salud.

Conflictos de Interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés en la publicación de este artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mas-Coma MS, Esteban JG, Bargues MD. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. Bull World Health Organ. 1999;77(4):340-46.
2. Esteban J, Gonzales C, Bargues M, Angles R, Sánchez C, Naquira C, et al. High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Peru. Trop Med Int Health. 2002;7(4):339-48.
3. Marcos LA, Terashima A, Leguia G, Canales M, Espinoza JR, Gotuzzo E. La infección por *Fasciola hepatica* en el Perú: una enfermedad emergente. Rev Gastroenterol Peru. 2007;27(4):389-96.
4. Albán M, Jave J, Quispe T. Fasciolosis en Cajamarca. Rev Gastroenterol Peru. 2002;22(1):28-32.
5. Espinoza JR, Maco V, Marcos L, Saez S, Neyra V, Terashima A, et al. Evaluation of Fas2-ELISA for the serological detection of *Fasciola hepatica* infection in humans. Am J Trop Med Hyg. 2007;76(5):977-82.
6. Ortiz P, Cabrera M, Jave J, Claxton JR, Williams D. Human fascioliasis: prevalence and treatment in a rural area of Peru. Infect Dis Rev. 2000;2(1):42-46.
7. Raunelli F, Gonzalez S. Strategic control and prevalence of *Fasciola hepatica* en Cajamarca, Peru. A pilot study. Intern J Appl Res Vet Med. 2009;7(4):145-52.

8. Rivera Marrero CA, Santiago N, Hillyer GV. Evaluation of immunodiagnostic antigens in the excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. J Parasitol. 1988;74(4):646-52.
9. Cordova M, Herrera P, Nopo L, Bellatin J, Naquira C, Guerra H, et al. *Fasciola hepatica* cysteine proteinases: immunodominant antigens in human fasciolosis. Am J Trop Med Hyg. 1997;57(6):660-66.
10. Cordova M, Reategui L, Espinoza JR. Immunodiagnosis of human fascioliasis with *Fasciola hepatica* cysteine proteinases. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999;93(1):54-57.
11. Incil E. Reconocimiento antigénico de productos de *Fasciola hepatica* en infecciones humanas. [Tesis de Bachiller] Cajamarca: Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca; 2000.
12. Espino AM, Dumenigo BE, Fernández R, Finlay CM. Immunodiagnosis of human fascioliasis by enzyme-linked immunosorbent assay using excretorysecretory products. Am J Trop Med Hyg. 1997;37(3):605-8.
13. Fredes F, Alarcón J, Ilabaca P, Alcaíno H. Evaluación diagnóstica de dos proteínas purificadas de *Fasciola hepatica* mediante ELISA en la fasciolosis ovina. Parasitol Latinoam. 2003;58(3-4):148-51.
14. Maco V, Marcos L, Terashima A, Samalvides F, Miranda E, Espinoza J, et al. Fas2-ELISA y la técnica de sedimentación rápida modificada por Lumbreras en el diagnóstico de la infección por *Fasciola hepatica*. Rev Gastroenterol Peru. 2002;13(2):49-57.
15. Miranda M, García Z. Aislamiento e identificación in situ de antígenos de *Fasciola hepatica*. Vet Mex. 1994;25(3):267- 71.
16. Knobloch J. Human fascioliasis in Cajamarca/Peru. II. Humoral antibody response and antigenaemia. Trop Med Parasitol. 1985;36(2):91-93.

Correspondencia: Blgo. Hernán Daniel Cornejo Pacherras.
Dirección: Av Mario Urteaga 500, Cajamarca, Perú.
Telefono: (51-076) 363-864 anexo: 134
Correo electrónico: dcornejop68@yahoo.es

Consulte la versión electrónica de la
Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública en
www.pubmed.gov

