Validación de una prueba de ELISA con antígeno recombinante de Fasciola hepática para el diagnóstico de fascioliasis humana en Cajamarca

Validity of an ELISA test with Fasciola hepatica recombinant antigen for the diagnosis of human fascioliasis in Cajamarca

Pedro Ortiz Oblitas, María Cabrera Núñez
1 Docente de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca, Av. Atahualpa 1050, Cajamarca, Perú.
2 Docente de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca, Av. Atahualpa 1050, Cajamarca, Perú.

Recibido: 08-04-19 Aceptado: 20-09-19

Resumen

Un antígeno recombinante de Fasciola hepática (rCL1Fh) fue utilizado para validar una prueba de ELISA para el diagnóstico inmunológico de fascioliasis humana con suero sanguíneo de pacientes provenientes de zonas endémicas de la región Cajamarca. Participaron en el estudio 239 niños entre 6 a 12 años de edad, 145 procedentes del distrito de Los Baños del Inca, provincia de Cajamarca y 94 del distrito de Condebamba. Muestras de sangre fueron colectadas de los 239 niños, de las cuales se separó suero sanguíneo, el cual fue utilizado en la prueba de ELISA. Los resultados muestran que, de 15 pacientes con diagnóstico positivo a F. hepática mediante la técnica de sedimentación rápida (TSR) para la búsqueda de huevos del parásito en heces, 14 dieron resultado positivo y solo uno dio resultado negativo, lo cual nos da una sensibilidad de 93.3%. En cambio de 224 pacientes con diagnóstico negativo en la prueba de sedimentación rápida, 17 resultaron positivos en la prueba de ELISA, lo cual nos da una especificidad de 92.4% y un índice Kappa moderado de 0.570 con la TSR. Los resultados muestran que el antígeno recombinante de F. hepática (rCL1Fh) puede ser usado rutinariamente en el serodiagnóstico de fascioliasis producida por F. hepática en pacientes humanos de la región Cajamarca.

Palabras clave: Fasciola hepática, fascioliasis humana, Cathepsina L1, Cajamarca.

Abstract

A recombinant Fasciola hepatica antigen (rCL1Fh) was used to validate an ELISA test for the immunological diagnosis of human fascioliasis with blood serum from patients from endemic areas of the Cajamarca region. 239 children between 6 and 12 years of age participated in the study. 145 from the district of Los Baños del Inca, province of Cajamarca and 94 from the district of Condebamba. Blood samples were collected from the 239 children, from whom blood serum was separated, which was used in the ELISA test. The results show that, of 15 patients with a positive diagnosis of F. hepatica using the rapid sedimentation technique (RST) to search for fecal parasite eggs, 14 gave a positive result and only one gave a negative result, which gives us a sensitivity of 93.3%. In contrast to 224 patients with negative diagnosis in the rapid sedimentation test, 17 were positive in the ELISA test, which gives us a specificity of 92.4% and a moderate Kappa index of 0.570 with the TSR. The results show that the F. hepatica
recombinant antigen (rCL1Fh) can be used routinely in the serodiagnosis of fascioliasis produced by *F. hepatica* in human patients of the Cajamarca region.

**Key words:** Fasciola hepatica, human fascioliasis, Cathepsina L1, Cajamarca.

**Introducción**

*Fasciola hepatica* es un parásito trematodo que tiene un amplio rango de distribución mundial afectando principalmente a rumiantes domésticos y al hombre (Chen and Mott, 1990). La enfermedad causa pérdidas significativas en la ganadería mundial, siendo éstas del orden de los 2 billones de dólares (Mas-Coma, 2005). En el ser humano, se estima que existen entre 2.4 a 17 millones de personas afectadas (Mas-Coma, 2004). Niños y mujeres parecen ser los más afectados en las áreas endémicas de América Latina y África (Esteban et al., 1997, 2003, 2002; Zumaquero-Ríos et al., 2013). En el Perú, distintos estudios reportan prevalencias medias a altas en los principales valles inter andinos (González et al., 2011; Rodríguez-Ulloa et al., 2018b, 2018a; Rodríguez Ulloa et al., 2015), afectando principalmente a niños de edad escolar.

Actualmente la fascioliasis es considerada una enfermedad humana importante en muchas regiones geográficas, con intensidades de infección entre bajas y muy altas (Mas-Coma et al., 1999b). Más aun, en las últimas dos décadas, la fascioliasis humana ha ido emergiendo en muchas regiones, debido particularmente al cambio climático (Fox et al., 2011; Gale et al., 2009; Mas-Coma et al., 2009).

La infección humana se produce por el consumo de vegetales contaminados con metacercaria de *F. hepatica*, tales como berros, lechuga o agua (Mas-Coma et al., 2018). Después de la ingestión de vegetales contaminados, los quistes se desenquistan en el lumen intestinal atravesando la pared intestinal hacia la cavidad peritoneal, para luego migrar a través de la cápsula y parénquima hepático hacia los conductos biliares del hígado, dando como resultado los síntomas clínicos característicos tales como anemia, ictericia, fibrosis hepática y molestias intestinales (CDC, 2013; WHO, 2007).

El diagnóstico de fascioliasis humana se lleva a cabo generalmente mediante la detección de huevos del parásito en las heces; sin embargo, este método tiene poca confiabilidad y sensibilidad (Anderson et al., 1999; Correa et al., 2016) por lo que se requieren mejores métodos de diagnóstico. En la fase aguda de la infección, no se encuentran huevos en las heces de los pacientes examinados hasta las 8 – 12 semanas post infección. Además, el ser humano no es el hospedero ideal para *F. hepatica*, por lo que el parásito podría no alcanzar su madurez en el hombre, lo cual resultaría en la presentación de una fascioliasis bilateral sin presencia de huevos en las heces o más aún el período pre-patente se podría alargar hasta por cuatro meses en el hombre o aún por más tiempo (Chen and Mott, 1990; Espino et al., 1998; Sarkari and Khabisi, 2017), dificultando aún más el diagnóstico. Adicionalmente, también se conoce que después de la patencia, los parásitos producen huevos en forma intermitente, lo cual hace al examen coproparasitológico menos sensible o peor aún, en caso de fascioliasis ectópica (Kim et al., 2015; Makay et al., 2007; Öngören et al., 2009; Yi-Zhu and Zhi-Bang, 2010), es imposible detectar huevos en las heces.
El serodiagnóstico de fascioliasis ha sido reconocido como la mejor alternativa para el diagnóstico de la fascioliasis humana. Los métodos de ELISA desarrollados para la determinación de anticuerpos son de gran valor y reemplazan al examen coproparasitológico. (Carnevale et al., 2001b; Gonzales Santana et al., 2013; Valero et al., 2012).

Los antígenos más comúnmente usados en los métodos de ELISA son los productos de excreción/secreción del parásito (E/S), los cuales comprenden un gran número de moléculas secretadas por las fasciolas, sean éstas inmaduras o maduras. Estos productos son los responsables de la estimulación de una potente y prolongada respuesta de anticuerpos y han sido usados en estudios para detectar su sensibilidad y especificidad (Carnevale et al., 2001a; Mattar and El-Toukhy, 2004). Sin embargo, debido a que los productos de E/S están constituidos por una mezcla compleja de antígenos, son frecuentes las reacciones cruzadas (Hanna and Hillyer, 1984; Hassan et al., 1989). En la actualidad, es una práctica común purificar productos de E/S o producir antígenos recombinantes para usarlos en pruebas diagnósticas.

Diferentes autores han estudiado los componentes de los productos de E/S de *F. hepatica* y han reportado que éstos están constituidos principalmente por enzimas de la familia Catepsinas y Glutatión S-Transferasas (Collins et al., 2004; García-Campos et al., 2016; Jeffries et al., 2001; Robinson et al., 2008), siendo las de mayor importancia las Catepsinas, que constituyen aproximadamente el 80% del total de las proteínas presentes en los productos de E/S de *F. hepatica* y podrían ser usados con propósitos diagnósticos (Gottstein et al., 2014; Kuerpick et al., 2013; Mokhtarian et al., 2018, 2016; ONeill et al., 1998; Rokni et al., 2002; Sriveny et al., 2006).

El objetivo del presente estudio fue validar la utilidad de un antígeno recombinante de *F. hepatica* (rCL1Fh) para el diagnóstico inmunológico de fascioliasis humana en Cajamarca.

**Material y método**

**Obtención de muestras de heces y suero**

En el estudio participaron 239 niños entre 6 a 12 años de edad, 145 procedentes del distrito de Los Baños del Inca, provincia de Cajamarca y 94 del distrito de Condebamba, provincia de Cajabamba; ambas provincias han reportado importantes prevalencias de fascioliasis humana. Del total, 56% fueron niñas y la media de edad fue de 8,7 años.

Las muestras fecales fueron colectadas y transportadas bajo cadena de frío al Laboratorio de Parasitología de la Universidad Nacional de Cajamarca para el diagnóstico. Estas se conservaron en formol al 10% a razón de una parte de heces por tres partes de formol hasta su procesamiento.

Para la recolección de muestras sanguíneas, se obtuvo 5 ml de sangre venosa en tubos con anticoagulante (EDTA al 10%), que fueron rotulados adecuadamente y enviados en cadena de frío al laboratorio de Parasitología. El suero se obtuvo por centrifugación a 3000 r.p.m. por 5 minutos. Cada una fue rotulada con su respectivo número de identificación y conservadas a -20°C. Posteriormente fueron enviadas al laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca para determinar los niveles de anticuerpos contra *F. hepatica* mediante la técnica de ELISA.
Pedro Ortiz Oblitas, María Cabrera Núñez

Ensayo indirecto de detección de anticuerpos (ELISA)

Se utilizaron placas de micro-titulación de 96-porcillos con fondo plano (Costar, USA), las cuales fueron recubiertas con 100μl del antígeno recombinante de *F. hepatica* Cathepsina L1 (rCL1Fh) a concentración de 25μg/ml e incubadas a 4°C durante 16 horas. Luego de la incubación las placas fueron lavadas 3 veces con solución 0.01M de salina tamponada con fosfato (pH 7.0) (PBS) conteniendo un 0.05% de Tween-20 (PBST). Los espacios libres de antígeno en los porcillos fueron bloqueados durante 1h a 37°C con 300μl/porciolo de una solución al 3% de leche descremada y deslipidizada. Luego de eliminar la solución de bloqueo se añadieron las muestras de suero diluidas 1:100 en PBST. Como control positivo se utilizó un suero de paciente con fascioliasis crónica confirmada mediante el hallazgo de huevos en materia fecal y como control negativo un suero humano de una persona que no se había sido expuesto nunca a la infección por *F. hepatica* y que no había vivido en áreas endémicas de fascioliasis. Las muestras de suero fueron incubadas durante 1h a 37°C posterior a lo cual las placas fueron lavadas 3 veces con PBST e incubadas 1 h a 37°C con 100μl/porciolo de un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (Bio-Rad, USA) diluido 1:2,500 en PBST. Luego de la incubación las placas fueron de nuevo lavadas 3 veces con PBST y se añadió la solución de sustrato (20 mg ortofenilendiamina + 20μl 30% H₂O₂ + 20-ml de solución 0.1M fosfato-citrico pH 5.0) (100μl/porciolo). Las placas fueron incubadas por 30 min con la solución de sustrato a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, la reacción fue detenida mediante la adición de 50 μl/porciolo de ácido clorhídrico 1N. Los valores de absorbancia fueron leídos a 490nm en un lector de microplacas (Bio-Rad, USA). Todas las muestras fueron analizadas en duplicado y los resultados expresados como la absorbancia promedio para cada determinación. Se consideró positiva toda muestra de suero por encima de 0.42, el cual fue el valor de corte correspondiente a la absorbancia media ± 3 desviaciones estándares de una población de más de 30 sueros controles negativos establecido cuando se estandarizo el ensayo (Espino et al., 1987; Espino Hernandez et al., 1991).

Técnica de Sedimentación Rápida Modificada por Lumbreras (TSR)

En un tubo de ensayo se colocó aproximadamente entre 4 a 8 g de materia fecal que fue homogenizada en agua corriente filtrada. La mezcla fue filtrada a un vaso a través de una gasa, completando el volumen del vaso con agua filtrada y se dejó reposar por treinta minutos. Se decantó los dos tercios del sobrenadante y se volvió a completar el mismo volumen inicial con agua filtrada. Se repitió los mismos pasos con un intervalo de treinta minutos, hasta que el sobrenadante quedó claro. El último sedimento fue vertido en una placa petri y se observó al estereomicroscopio.

Análisis estadístico

Los datos fueron ingresados y procesados con el programa estadístico SPSS versión 23 para el análisis de frecuencias. Con el programa Epidaat 3.1, se calculó la sensibilidad, especificidad y concordancia de la técnica de ELISA con respecto a la TSR, considerada como prueba estándar.

Aspectos éticos de la investigación

Se tomó de manera voluntaria e informada, el
consentimiento a cada padre y/o apoderado, y el asentimiento a cada escolar participante. La toma de muestras fue aprobada por el Comité Institucional de Ética en Investigación del Instituto de Investigación Nutricional (IIN) (La Molina, Lima).

Resultados y discusión

De las 239 muestras examinadas mediante la TSR, 15 presentaron huevos de *F. hepatica* (6,3%). Se consideró como ELISA positivo aquellos valores de absorbancia ≥ 0,20 nm. De acuerdo con este criterio, 31 del total de muestras de suero (13%) resultaron positivas, con valor de absorbancia media de 0,69 nm y un rango entre 0,20 a 1,55.

De los 15 escolares con examen coprológico positivo para huevos de *F. hepatica*, 14 (93,3%) fueron ELISA positivo con un valor de absorbancia media de 0,81 y un rango entre 0,51 a 1,55. En este grupo, la única muestra de suero negativa con examen coprológico positivo tuvo una absorbancia de 0,039. Diecisiete muestras de suero con examen coprológico negativo fueron ELISA positivos, con una absorbancia media de 0,60 y un rango entre 0,20 y 1,16. De las 224 muestras fecales negativas, 207 (92,41%) fueron también negativas para ELISA, con una absorbancia media de 0,07 y un rango entre 0,003 y 0,19.

Considerando la TSR como gold estándar para el diagnóstico de la fascioliasis en todos los niños estudiados, la técnica de ELISA mostró una sensibilidad de 93,3% y una especificidad de 92,41%. Al examinar la concordancia observada entre los resultados de la TSR y ELISA el índice de kappa fue considerado moderado (0,57).  


**Tabla 1.** Comparación de los resultados obtenidos para el diagnóstico de *Fasciola hepatica* por la técnica de sedimentación rápida modificada por Lumbres (TSR) y ELISA en 239 muestras de niños de Cajamarca, Perú.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Método evaluado</th>
<th>Método referencial</th>
<th>S</th>
<th>E</th>
<th>VPP</th>
<th>VPN</th>
<th>K</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>ELISA</td>
<td>TSR</td>
<td>93,3%</td>
<td>92,4%</td>
<td>45,2%</td>
<td>99,5%</td>
<td>0,57</td>
</tr>
</tbody>
</table>

**Tabla 2.** Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y coeficiente de kappa de ELISA y TSR para el diagnóstico de *Fasciola hepatica* en 239 muestras de niños de Cajamarca, Perú.

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>ELISA</th>
<th>TSR</th>
<th></th>
<th></th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td>Positivo</td>
<td>Negativo</td>
<td>Total</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Positivo</td>
<td>14</td>
<td>17</td>
<td>31</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Negativo</td>
<td>1</td>
<td>207</td>
<td>208</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Total</td>
<td>15</td>
<td>224</td>
<td>239</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>
El diagnóstico coprológico basado en la identificación de huevos de *F. hepatica* en las heces, contenido duodenal o análisis de bilis son aún los procedimientos empleados como “pruebas de oro” (gold standard) para la detección de fascioliasis humana. A pesar de esto, los hechos demuestran que estos métodos no son enteramente confiables (Hillyer, 1999) debido a que: (i) huevos no son detectados hasta el periodo pre patente de la infección, cuando el daño hepático ya ocurrido debido a la migración de parásitos juveniles por el parénquima hepático, (ii) la eliminación esporádica de los huevos, por lo tanto, las heces de pacientes infectados necesariamente no podrían contener huevos de *F. hepatica* (Mas-Coma et al., 1999a).

Es debido a esto que las técnicas serológicas juegan un importante papel en el diagnóstico de casos clínicos de fascioliasis, los cuales deben tener una buena sensibilidad y especificidad. La razón es que reactores pacientes falsos negativos o falsos positivos pueden ser frecuentes de encontrar en diagnóstico rutinario de fascioliasis humana, lo cual tiene que ser considerado dentro del contexto de un diagnóstico diferencial, predominantemente relacionado a diferentes desórdenes hepáticos que, sintomáticamente, podrían confundirse con aquellos de fascioliasis.

Suero sanguíneo de 239 pacientes procedentes de distintas localidades endémicas a *F. hepatica* de la provincia de Cajamarca (Rodríguez-Ulloa et al., 2018a, 2018b), fueron analizados utilizando un antígeno recombinante Cathepsina L1 de *F. hepatica* (rCL1Fh), la cual constituye una de las enzimas proteolíticas más importantes producidas por *F. hepatica* (Stack et al., 2007). Dicha enzima fue recombinada inicialmente y utilizada con buenos resultados en el inmunodiagnóstico de fascioliasis hepática (Cornelissen et al., 2001), mediante ELISA.

En el presente trabajo de investigación, la presencia de infección en esta población de individuos está representada por dos grupos: un grupo de pacientes parasitológicamente positivos a huevos de *F. hepatica* mediante TSR y a la vez serológicamente positivos a la prueba de ELISA indirecta y el grupo de pacientes negativos a huevos de *F. hepatica* y a la vez parasitológicamente negativos. Los resultados de la serología dependen de las densidades ópticas obtenidas en la prueba de ELISA.
Los resultados claramente muestran que, de los 15 pacientes con diagnóstico positivo a *F. hepatica* mediante huevos del parásito en sus heces, 14 dieron resultado positivo y solo uno dio resultado negativo (Tabla 1, Fig. 1) en la prueba de ELISA. Solo un paciente con diagnóstico positivo mediante la TSR dio negativo en la prueba de ELISA, lo cual nos da una sensibilidad de la prueba de ELISA del 93.3%. En cambio de los 224 pacientes con diagnóstico negativo en la prueba de ELISA, siendo dos pacientes los que reaccionaron como falsos positivos, dando una especificidad de 92.4%. Esta reportado que las pruebas de ELISA pueden dar resultados falsos positivos cuando los pacientes podrían estar infectados con distinto tipo de parásitos (Valero et al., 2012). El punto de corte (PC) establecido para la prueba de ELISA fue de 0.2, obtenido mediante la suma de ±3 desviaciones estándar del promedio de densidad óptica de los sueros negativos (Fig. 1). Los resultados del presente trabajo son coincidentes con los encontrados por grupos de investigación que utilizaron el mismo antígeno para diagnóstico de fasciolarisíasis humana (O'Neill et al., 1998; Strauss et al., 1999).

**Conclusión**

Se concluye que el antígeno recombinante de Cathepsina L1 de *F. hepatica* (rCL1Fh) es adecuado para ser utilizado en una prueba de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra *F. hepatica*.

**Agradecimiento**

Los autores agradecen al Dr. John Dalton de la Queens Belfast University de Irlanda por proporcionar el antígeno recombinante de *F. hepatica* (rCL1Fh)

**Referencias bibliográficas**


Pedro Ortiz Oblitas, María Cabrera Núñez


