

Inmunodiagnóstico de fasciolosis en Venezuela.

Colmenares C*, Rojas E**, Alarcón de Noya B*.

*Sección de Inmunología, Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela; **Instituto Experimental "José Witremundo Torrealba", Núcleo "Rafael Rangel", Universidad de Los Andes. Trujillo - Venezuela

E-mail: colmenareschechi@yahoo.com

RESUMEN

La fasciolosis, producida por *Fasciola hepatica*, afecta animales y humanos. El hombre la adquiere por agua o vegetales acuáticos contaminados con metacercarias. Las condiciones epidemiológicas varían desde hipo a hiperendémicas en los países afectados. En Venezuela, se ha reportado prevalencias variables en bovinos por coprología y altas por serodiagnóstico. En humanos solo casos aislados y un brote familiar en Timotes, Estado Mérida. La enfermedad debe diagnosticarse atendiendo a los antecedentes epidemiológicos, clínicos, parasitológicos e inmunológicos. En el inmunodiagnóstico se recomienda usar el antígeno de excreción-secreción ultrafiltrado por membrana YM de 50 kDa (AESFh>50kDa o R50) en ELISA y "Western blot" (WB), que mostró buena sensibilidad y especificidad. Los casos positivos se comprueban en WB-R50 cuando ocurre reconocimiento a moléculas de 9,14, 27 y 65 kDa. La aplicación de esta metodología completó el diagnóstico de casos en brote familiar de Timotes. Al comparar resultados 5 años después de tratamiento anti-parasitario se aprecia un descenso en los niveles de anticuerpos como indicador de cura parasitológica. Los estudios realizados muestran el valor del inmunodiagnóstico con antígenos adecuados, frente a la falta de sensibilidad de los exámenes coprológicos y su aplicabilidad en el abordaje de comunidades bajo riesgo de infección.

Palabras claves: fasciolosis, inmunodiagnóstico, antígenos, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

La fasciolosis, enfermedad producida por el trematode *Fasciola hepatica*, afecta a animales herbívoros (bovinos, ovinos, caprinos, etc.) y accidentalmente al hombre. Sin embargo, su hallazgo en animales no necesariamente está relacionado con la distribución de casos en humanos, como ocurre en Venezuela, donde a pesar de que existe una alta prevalencia de Fasciolosis bovina, son pocos los casos en humanos.

Actualmente, esta enfermedad es considerada reemergente en muchos países, presentando incremento de prevalencia, intensidad y expansión geográfica. Se encuentra distribuida ampliamente a nivel mundial con situaciones epidemiológicas variables desde hipo hasta hiperendémica (Mas-Coma y col. 1999a; Mas-Coma, 2005).

El hombre se infecta cuando ingiere agua o vegetales acuáticos (berros) en los cuales puede haber metacercarias del parásito. Una vez ingeridas, las metacercarias desenquistan en el duodeno y los parásitos jóvenes penetran la pared intestinal, llegan al hígado y atraviesan la cápsula de Glisson, migrando por el parénquima hepático hasta ubicarse en los conductos biliares, donde maduran (6 semanas). Los huevos contenidos en la secreción biliar y eliminados por las heces requieren un

periodo de incubación en el ambiente, hasta completar un embrión móvil, ciliado o miracidio el cual al encontrar su hospedador intermediario (caracol del género *Lymnaea*) lo penetra, se transforma en esporocistes, los cuales forman redias madres y a partir de sus membranas internas dan lugar a redias hijas y por el mismo mecanismo a las cercarias. En condiciones adecuadas las cercarias salen del caracol y en un tiempo no mayor de dos horas deben fijarse a alguna superficie lisa (hierbas, piedras, etc), en la cual se enquistan perdiendo la cola y segregando sustancias que las protegen, convirtiéndose en metacercarias, las cuales pueden sobrevivir en el ambiente por 10 meses dependiendo de la humedad.

Como ejemplo de la variada condición epidemiológica entre los países con *Fasciola sp*, se encuentra el Altiplano Norte Boliviano, área hiperendémica, con prevalencia alta en humanos (por coprología 72% y por inmunodiagnóstico 100%), con intensidades de infección hasta de 5.000 h/g de heces y una relación mujeres/hombres de 2:1. Esta región tiene la más alta prevalencia conocida de Fasciolosis humana, además en ella se encontró otros hospedadores definitivos como son los cerdos y asnos. Como hospedador intermediario encontraron *Lymanaea truncatula* y se logró

demostrar la transmisión por ingestión de agua contaminada con metacercarias (Mas-Coma y col. 2001, 2005; Parkinson y col. 2007).

En Venezuela, se ha encontrado una prevalencia por coprología variable en bovinos, 0,33 % en mataderos del Edo. Zulia en el período 84-98; 6,13 % en Mara y Páez período 92-98 (Chirinos y col. 2000; Chavez y col. 1979). Se encuentran prevalencias de 18 a 59 % en bovinos de Zulia, Portuguesa, Trujillo y Falcón (Chavez y col. 1979). Por serodiagnóstico en bovinos se encontró hasta 76 % infectados en fincas del municipio Silva del Estado Falcón (Castellano, 2001). En relación a Fasciolosis humana, se han diagnosticado casos aislados (Risquez, 1929; Barroeta, 1911; Rodríguez y Gonzalez, 1975; Abdul-Hadi y col. 1996; Scorza y col. 1999; Incani y col. 2002; Alarcón de Noya y col. 2006) y en el 2005 se detectó un brote familiar en Timotes (Rojas y col. 2005; Alarcón de Noya y col. 2007), cuyo estudio pudo completarse gracias a la introducción del inmunodiagnóstico para fasciolosis en el abordaje de comunidades bajo riesgo de infección.

DIAGNÓSTICO DE FASCIOLOSIS

Las personas sospechosas de infección por *F. hepatica* deben ser investigadas de forma integral, indagando información epidemiológica, como la ingestión de agua de lagunas o ríos, de berros u hortalizas, la procedencia del paciente, cuya infección será más probable si viene de los estados endémicos de Fasciolosis bovina, como son: Lara, Portuguesa, Barinas, Trujillo, Mérida y Zulia. Estableciendo el diagnóstico clínico cuando se encuentra dolor abdominal, hepatomegalia, eosinofilia alta, signos de obstrucción biliar y los hallazgos eco y tomográficos indicativos de presencia del parásito. En cuanto al diagnóstico parasitológico, se realiza en heces o en contenido duodenal usando técnicas de concentración como sedimentación en copa, formol-tritón-éter o de semi-concentración como Kato (Fredes, 2004). En biopsia de lesiones hepáticas, puede encontrarse huevos o adultos del parásito, estos últimos pueden ser extraídos de vesícula o canaliculos biliares en intervenciones quirúrgicas (Alarcón de Noya y col. 2006)

El diagnóstico parasitológico tiene baja sensibilidad y se dificulta por varias razones: la existencia de parásitos en estados inmaduros, siendo útil solo 3 a 4 meses post-infección; la liberación de huevos puede ser baja o intermitente; el hallazgo de huevos en las heces por tránsito intestinal en personas que ingieren hígados crudos o mal cocidos de animales infectados, generará falsos positivos, además los adultos pueden tener ubicaciones ectópicas en cuyo caso no hay huevos en

el tracto intestinal (Mas-Coma y col. 1999). Para mejorar la sensibilidad de estos exámenes se recomienda un estudio copro-parasitológico de al menos 10 muestras de heces seriadas de las personas sospechosas de tener *F. hepatica*, esto consume mucho tiempo y dedicación del operador (Atias, 1991)

El inmunodiagnóstico es necesario sobre todo cuando el infectado está en etapa prepatente (10 a 12 semanas), tiempo que transcurre desde que la persona ingiere las metacercarias hasta que el parásito alcanza la madurez (Duménigo y col. 1999). Por otra parte, los niveles de inmunoglobulinas están generalmente aumentados (IgG, IgM e IgE), siendo la IgG4 el isotipo predominante, dependiendo de la edad y las características clínicas (Mas-Coma y col. 1999). Esto hace que la detección de anticuerpos sea el método preferido por su relativa simplicidad y seroconversión en una o dos semanas de ocurrida la infección, comparado con la patencia tardía de los estudios coprológicos (Hyller, 1999). Con la desventaja de reactividad de las inmunoglobulinas hasta por dos años post-tratamiento y cura de la infección. Los antígenos de excreción-secreción han sido considerados importantes inductores de la respuesta inmune humoral en esta enfermedad, mediante procedimientos de purificación se pueden mejorar aumentando su sensibilidad y especificidad.

Otra posibilidad para el diagnóstico son las pruebas de detección de antígenos en las heces o en suero, que indicarían actividad de infección y tienen alta sensibilidad y especificidad, pero requieren un anticuerpo monoclonal lo que dificulta su aplicación.

El inmunodiagnóstico es fundamental sobre todo cuando no observamos el agente causal. Se ha logrado estandarizar con éxito ELISA y "Western blot" (WB) con antígeno de excreción-secreción de adultos de *Fasciola hepatica*, usando ultrafiltración por membranas YM de celulosa regenerada de 10, 30 y 50 kDa, utilizando los retenidos (R10, 30 y 50) como antígenos (AESFh>10, 30 y 50 kDa), demostrándose mejores resultados en WB con AESFh>50 kDa o R50 (Colmenares y col. 2007). Esta preparación (R50) usada en ELISA Y WB, mostró una buena sensibilidad y especificidad (90-100 % y 97-100%, respectivamente). La comprobación de los casos positivos se logra en WB con R50, cuando ocurre el reconocimiento a las moléculas de 9, 14, 65 y la región alrededor de 27 kDa. Al ensayar 29 sueros con otras parasitosis sólo una persona con *Paragonimus sp.*, reaccionó a la molécula de 65 kDa. ELISA con cualquiera de las fracciones obtenidas es un buen método de despistaje en poblaciones bajo riesgo de infección y posteriormente debe realizarse WB con R50,

como prueba confirmatoria (Colmenares y col. 2007).

Alarcón de Noya y col. 2007, demuestran en un estudio realizado en Timotes, Estado Mérida, la aplicación de esta metodología, cuando detectan en 65 personas evaluadas, 9 positivos al AESFh, de los cuales solo 5 reconocen el patrón molecular específico en WB-R50, 3 con hallazgo de huevos en las heces. Los cuatro sueros restantes con débil reactividad al ELISA, no reconocieron las moléculas específicas por WB.

En un estudio reciente en el cual se evaluaron 73 personas de la misma población de las cuales solo 18 estuvieron incluidas en el primer muestreo, se encontró que los 5 casos positivos demostrados en el 2005 bajaron notablemente sus valores de densidad óptica, manteniéndose reactivos bajos solamente 3 de ellos. Los títulos de anticuerpos contra este parásito disminuyen en el tiempo cuando el tratamiento ha sido exitoso, a partir de 4 meses después de la terapia (Hillyer y col. 2001). Una persona con respuesta positiva baja al ELISA y negativa por WB permaneció invariable en el tiempo, lo cual puede deberse a infecciones pasadas o reactividad cruzada con otros parásitos.

OTRAS ALTERNATIVAS DE DIAGNÓSTICO

Existen otras moléculas alternativas de diagnóstico utilizadas por otros autores como la cistein proteinasa de 27 kDa purificada a partir de adultos del parásito. Este antígeno ha sido usado en ELISA, con una sensibilidad del 100% (Yamasaki y col. 1989). Se trata de una proteasa implicada en la alimentación, migración y evasión de la respuesta inmune del parásito (Smooker, 2000). Se ha utilizado en ELISA cistein proteinasas de 26 kDa (Fas 1) y de 25 kDa (Fas 2), provenientes de productos de excreción-secreción con sensibilidad y especificidad de 89 y 98%, respectivamente para Fas 1; y de 95 y 100% respectivamente para Fas 2 (Córdova y col. 1999).

La Catepsina L1 (CL1) nativa y recombinante se ha usado y mostró potencial en el diagnóstico (O'Neil y col. 1998,1999). Polipéptidos de 14 y 29 kDa son una buena alternativa para el desarrollo de una prueba inmunodiagnóstica de campo (Fredes y col. 2001).

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por "PCR restriction fragment length polymorphism" (RFLP) ha dado buenos resultados sobre todo para distinguir entre *F. hepatica* y *F. gigantica* en animales y humanos, sobre todo en áreas en las cuales coexisten ambas especies, (Marcilla y col., 2002; Huang y col. 2004).

La obtención de antígenos recombinantes o altamente purificados mejoraría notablemente las posibilidades de diagnóstico pero son difíciles de

implementar, de allí nuestra propuesta de ELISA y WB con el antígeno de excreción-secreción ultrafiltrado, con un procesamiento accesible a cualquier laboratorio.

CONCLUSIONES

Los estudios realizados hasta el momento demuestran la utilidad del inmunodiagnóstico, con mayor sensibilidad y aplicabilidad en estudios epidemiológicos, frente a la falta de sensibilidad de los exámenes coprológicos.

En general, el diagnóstico en humanos ha sido por hallazgos fortuitos. Sin embargo, hoy contamos con técnicas de inmunodiagnóstico para despistaje y certeza de la fasciolosis humana en Venezuela.

Se debe investigar la presencia de esta parasitosis como causante de problemas biliares e intestinales e iniciar estudios en áreas endémicas de Fasciolosis bovina, para determinar la prevalencia real de Fasciolosis humana en el país.

REFERENCIAS

- Abdul-Hadi S, Contreras R, Tombazzi C, Alvarez M, Meléndez M. Hepatic fascioliasis: case report and review. 1996. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 38: 69-73.
- Alarcón de Noya B, Rojas E, Colmenares C, Morales C, Contreras R, Kay Valero S, Hernandez D, Briceño S, Scorza JV, Noya O. Brote familiar de fascioliasis en Venezuela. 2007. Boletín de Malariología y Salud Ambiental. XLVII: 47-54.
- Alarcón de Noya B, Sosa L, Colmenares C, Beker B, Contreras R, Matteo M. Localización Pancreática de *Fasciola hepatica* en un caso humano autóctono proveniente del Edo. Bolívar, Venezuela. 2006. GEN Revista de la Sociedad Venezolana de Gastroenterología. 60: 134-137.
- Atias A. Fasciolosis. 1991. In: Parasitología Médica. Mediterráneo. Santiago. Chile. pp. 334-340.
- Barroeta JF. 1911. Gaceta Médica de Caracas. XVIII: 35-37
- Castellano A, Colmenares C, Bruces AC, Alarcón de Noya B. Inmunodiagnóstico de fasciolosis bovina en Venezuela. Journal Brasileiro de Patología, 2001. Suplemento XV Congresso Latinoamericano de Parasitología. 37: 40. São Paulo, Brasil.
- Chavez K, Surumay Q, Olivares R, Montiel N. Prevalencia de la distomatosis hepática en fincas del Distrito Mara, del Estado Zulia. 1979. Veterinaria Tropical. 4: 52-63.
- Chirinos AR, De Chirinos N, Román R, Homez G, Pirela H, Rodríguez N. Distomatosis hepática bovina a nivel de dos mataderos industriales del estado Zulia, Venezuela. 2000. Revista Científica FCV-LUZ. 10: 297-302.

- Colmenares C, Méndez L, Díaz-Bello Z, Alarcón de Noya B. Antígeno excreción-secreción de *Fasciola hepatica*: ultrafiltración y aplicación en inmunodiagnóstico. 2007. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 41: 259-266.
- Cordova M, Reategui L, Espinoza J. Immunodiagnosis of human fasciolosis with *Fasciola hepatica* cystein proteinasas. 1999. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93: 54-57.
- Duménigo B, Espino A, Finlay C, Meza M. Kinetics of antibody based antigen detection in serum and faeces of sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. 1999. *Veterinary Parasitology*. 86: 23-31.
- Fredes F. La fasciolosis animal y humana. 2004. Monografías electrónicas de Patología Veterinaria. <http://www.patologiaveterinaria.cl/Monografias/Numero1/05.htm>
- Fredes F, Sánchez C, Gorman T, Alcaíno H. Purificación de antígenos de *Fasciola hepatica* mediante electroelución y su aplicación inmunodiagnóstica mediante Western Blot en la infección animal. 2001. *Parasitología al día*. 25: 19-23.
- Hillyer G. Immunodiagnosis of human and animal fasciolosis. 1999. In: Dalton JP. *Fasciolosis*. Ed. CABI. N.Y., USA. pp. 435-447.
- Hillyer GV, Soler de Galanes M, Delgado-Azañero E. Immune diagnosis of human fasciolosis in children from Cajamarca, Perú. 2001. *Parasitología al día*. 25: 82-84.
- Huang W Y, He B, Wang CR, Zhu XQ. Characterisation of *Fasciola* species from Mainland China by ITS-2 ribosomal DNA sequence. 2004. *Veterinary Parasitology*. 120: 75-83.
- Incani RN, Vieira JM, Pacheco M, Planchart S, Amarista M, Lazdins J. Human infection by *Fasciola hepatica* in Venezuela: report of geriatric case. 2002. *Investigación Clínica*. 44: 255-260.
- Marcilla A, Bargues MD, Mas-Coma S. A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. 2002. *Molecular and cellular probes*. 16: 327-333.
- Mas-Coma S, Bargues MD, Esteban JG. Human Fasciolosis. In: Dalton JP. (Ed.), *Fasciolosis*. 1999. CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK, pp. 411-434.
- Mas-Coma S. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. 2005. *Journal of Helminthology*. 79: 207-216.
- Mas-Coma S, Esteban JG, Bargues MD. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. 1999a. *Bull WHO*. 77: 340-346.
- Mas-Coma S, Funatsu IR y Bargues MD. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. 2001. *Parasitology* 123: S115-S127.
- Parkinson M, O'Neill SM, Dalton JP. Controlling fasciolosis in the Bolivian Altiplano. 2007. *Trends in Parasitology*. 23: 238-239.
- Risquez JR. 1904-1911, 1929. *Gaceta Médica de Caracas*. (Nº extraordinario); 38-41.
- Rodríguez A, González H. Sobre un nuevo caso humano de fasciolosis hepática en Venezuela. 1975. *Revista del Instituto Nacional de Higiene*. 8: 111-114.
- Rojas E, Alarcón de Noya B, Colmenares C, Morales C, Contreras R, Kay S y col. Fasciolosis humana en los Andes de Venezuela. 2005. *Parasitología Latinoamericana*. 60: 294.
- Scorza JV, Villegas E, Morales C. Fasciolosis hepática en el Estado Trujillo: segundo caso clínico. 1999. *Archivos Venezolanos de Medicina Tropical*. 3: 9-13.
- Smooker P, Whisstock J, Irving J, Siyaguna S, Spithill T, Pike R. A single amino acid substitution affects substrate specificity in cysteine proteinases from *Fasciola hepatica*. 2000. *Protein Science*. 9: 2567-2572.
- Yamasaki H, Aoki T, Oya H. A cystein proteinase from the liver fluke *Fasciola spp.* Purification, characterization, localization and application to immunodiagnosis. 1989. *Japanese Journal of Parasitology*. 38: 373-384.

Immunodiagnostic of fasciolosis in Venezuela

The fasciolosis caused by *Fasciola hepatica*, affects animals and humans. Man gets infection through ingestion of water or aquatic plants contaminated with metacercarias. The epidemiological situations vary from hypo to hyperendemic in the affected countries. In Venezuela, it has been reported different prevalences in cattle by coprology and high for serodiagnosis. Only isolated cases in humans and a family outbreak in Timotes, Estado Mérida, have been reported. The disease should be diagnosed according to epidemiological, clinical, parasitological and immunological findings. The use of excretion-secretion ultrafiltered antigen by membrane YM 50 kDa (AESFh> 50kDa or R50) in ELISA and Western blot (WB), is recommended since showed high sensitivity and specificity. Specific recognition of molecules of 9.14, 27 and 65 kDa of the WB-R50 antigen is the pattern of positive cases. The application of this methodology was achieved in the diagnosis of the familial outbreak in Timotes. When comparing these results with those obtained 5 years after anti-parasitic treatment, a decline on antibody levels was observed. These studies show the value of immunodiagnostic in front of the low sensitivity of the coprology, and its applicability in surveillance of the distribution of the disease in communities a risk of infection.

Keywords: fasciolosis, immunodiagnosis, antigen, Venezuela.