



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

PLANTEL "ZARAGOZA"

PREPARACIÓN DE ANTÍGENOS DE *Fasciola hepatica*
Y SU EVALUACIÓN EN ELISA

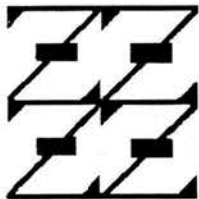
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A N:

CHIRINO CONTRERAS REYNA LETICIA

RANGEL MÉNDEZ JUANA



LO HUMANO
EJE
DE NUESTRA REFLEXION

MÉXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el
Laboratorio de Parásitos Gastrointestinales del
Instituto de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas. SS.

Bajo la dirección de la
M. en C. María Teresa Aguirre Alcántara

Bajo la asesoría del

Q.F.B. Roberto Cruz González Meléndez

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Dedico esta tesis

A mis padres:

Ana Maria Contreras Romero

David Chirino Vargas

Como un reconocimiento por el apoyo incondicional en todos los sentidos y el afecto que siempre me han brindado.

Con amor, admiración y un profundo respeto les agradezco la paciencia y la confianza que en mí depositaron todos estos años, para que sus esfuerzos y sacrificios no fueran en vano.

Es la mayor herencia que me pudieron otorgar.

A mis hermanos:

Claudia, David, Elia, Israel y Karina

Con cariño por su amistad y por todo lo que significan para mí.

A mi tío:

Gerardo Chirino Vargas

Por su generosidad, cariño y apoyo en los momentos cruciales de mi formación profesional.

A mis seres queridos y amigos:

Que compartieron mi sueño.

Sinceramente

Reyna Leticia

Dedico esta tesis

A mis padres:

Guadalupe Méndez Martínez

Carlos Rangel López

Con cariño por su apoyo, esfuerzo y estímulos a lo largo de mi vida.

A mis hermanos:

María Guadalupe

Juan Carlos

Oscar

Con cariño por su amistad y confianza.

A mi esposo:

José Fabián López García

Por su cariño y apoyo.

A mis hijos:

Rebeca Alejandra

Juan José

Por ser el mayor aliciente para continuar, y que a su vez sea esto un estímulo para que ellos puedan llegar más lejos.

A mis suegros:

Enriqueta y Jesús

Quienes me apoyaron en los momentos finales para llegar a mi meta.

Sinceramente

Juanita

A nuestros profesores:

M. en C. Ma. Teresa Aguirre Alcántara

Q.F.B. Roberto Cruz González Meléndez

M. en C. Carmen Guzmán Bracho

Q.F.I. Antonio Meza Lucas

Q.F.B. José Oscar González Moreno

Q.F.B. Ma. de las Mercedes Zamudio Durán

Q.F.B. Francisco Javier Parada García

Nuestro más sincero agradecimiento
por sus enseñanzas, orientación y apoyo.

Agradecemos a la:

M. en C. Ma. Teresa Aguirre Alcántara

Por su entusiasmo, disposición y paciencia en todo momento, hoy sabemos que tenemos un gran tesoro, sus enseñanzas que constituyen una herramienta para nuestra vida y sobre todo por su amistad.

De manera especial agradecemos la colaboración del IndRE, SS.

Atentamente

Reyna y Juanita

Jurado:

Presidente: Q.F.B. Ma. de las Mercedes Zamudio Durán

Vocal: M. en C. Ma. Teresa Aguirre Alcántara

Secretario: Q.F.B. Roberto Cruz González Meléndez

Suplente: Q.F.B. Francisco Javier Parada García

Suplente: Q.F.B. José Oscar González Moreno

Gracias por sus valiosas sugerencias.

ÍNDICE

	Pág.
1. FIGURAS, TABLAS Y CUADROS.....	1
2. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	3
3. RESUMEN.....	4
4. INTRODUCCIÓN.....	5
5. MARCO TEÓRICO.....	7
5.1. Historia.....	7
5.2. Morfología.....	9
5.3. Ciclo biológico.....	18
5.4. Epidemiología.....	22
5.5. Patogenia.....	23
5.6. Cuadro clínico.....	24
5.7. Diagnóstico.....	26
5.7.1. Diagnóstico de laboratorio.....	27
5.7.2. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).....	30
5.7.2.1. Características de los elementos que se usan en el ELISA.....	32
5.8. Antígenos.....	34
5.9. Tratamiento.....	37
5.10. Profilaxis.....	38
6. PLANTEAMIENTOS DEL PROBLEMA.....	39
7. HIPÓTESIS.....	41
8. OBJETIVOS.....	41

9. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	42
10. VARIABLES.....	43
11. MATERIAL Y EQUIPO.....	43
12. MÉTODOS.....	48
12.1. Obtención de parásitos adultos de <i>Fasciola hepatica</i>	48
12.2. Preparación de antígenos de <i>F. hepatica</i>	48
12.2.1. Antígeno somático.....	48
12.2.2. Antígeno de excreciones-secreciones.....	50
12.3. Obtención de muestras de suero.....	51
12.3.1. Muestras de suero del grupo control normal.....	51
12.3.2. Muestras de suero de pacientes parasitados.....	51
12.4. Estandarización del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).....	52
12.4.1. Criterio de positividad en el ELISA.....	55
12.4.2. Análisis estadístico.....	55
12.4.3. Evaluación serológica.....	56
13. DIAGRAMA DE FLUJO.....	60
14. RESULTADOS.....	61
15. DISCUSIÓN.....	74
16. CONCLUSIONES.....	78
17. RECOMENDACIONES.....	79
18. ANEXOS.....	80
19. REFERENCIAS.....	83

1. FIGURAS, TABLAS Y CUADROS

	Pág.
Figura 1. Órganos reproductores masculinos de <i>Fasciola hepatica</i>	10
Figura 2. Órganos reproductores femeninos de <i>F. hepatica</i>	11
Figura 3. Aparato digestivo de <i>F. hepatica</i>	12
Figura 4. Huevo inmaduro y huevo maduro con el miracidio de <i>F. hepatica</i>	13
Figura 5. Miracidio de <i>F. hepatica</i>	14
Figura 6. Esporoquiste de <i>F. hepatica</i>	15
Figura 7. Redia de primera y segunda generación de <i>F. hepatica</i>	16
Figura 8. Cercaria de <i>F. hepatica</i>	17
Figura 9. Metacercaria de <i>F. hepatica</i>	18
Figura 10. Representación del ciclo biológico de <i>F. hepatica</i>	21
Figura 11. Representación del ELISA indirecto.....	31
Figura. 12. Cuadro de doble entrada (matriz de decisión).....	59
Cuadro 1. Desarrollo de la técnica de ELISA para los antígenos de <i>F. hepatica</i>	62
Tabla 1. Valor de corte en CDO para los antígenos de <i>F. hepatica</i>	63
Figura 13. Distribución de los cocientes de densidad óptica (CDO) obtenidos en ELISA con antígeno somático de <i>F. hepatica</i> con sueros de individuos: A) control sano, B) fasciolosis, C) céstodos, D) nemátodos, E) protozoos.....	64
Figura 14. Distribución de los cocientes de densidad óptica (CDO) obtenidos en ELISA con antígeno de excreciones-secreciones de <i>F. hepatica</i>	65

Tabla 2. Positividad serológica en la prueba de ELISA con antígenos de <i>Fasciola hepatica</i>	66
---	----

Tabla 3. Evaluación serológica de la prueba de ELISA con antígeno de <i>F. hepatica</i>	67
---	----

Figura 15. Comparación de los parámetros de sensibilidad, especificidad, valores de predicción positivo, valores de predicción negativo, eficiencia y reacciones cruzadas en ELISA, de los antígenos somático y excreciones-secreciones.....	68
--	----

Figura 16. Visualización con base en el método de Dice y Leraas de los cocientes de densidad óptica (CDO) obtenidos en ELISA con antígeno somático de <i>F. hepatica</i> con sueros de individuos: A) control sano, B) fasciolosis, C) céstodos, D) nemátodos, E) protozoos.....	70
--	----

Figura 17. Visualización con base en el método de Dice y Leraas de los cocientes de densidad óptica (CDO) obtenidos en ELISA con antígeno de excreciones-secreciones de <i>F. hepatica</i> con sueros de individuos: A) control sano, B) fasciolosis, C) céstodos, D) nemátodos, E) protozoos.....	71
--	----

Figura 18. Comparación de la respuesta serológica en ELISA en cocientes de densidad óptica (CDO) contra antígenos somático (Ag Som) y excreciones-secreciones (Ag E-S) de <i>F. hepatica</i> obtenida con 10 sueros de pacientes con fasciolosis clínicamente diagnosticada.....	73
--	----

2. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
Ag E-S	Antígeno de excreciones-secreciones.
Ag Som	Antígeno somático
ASB	Albúmina sérica bovina
CDC	Center Diseases Control
CDO	Cociente de densidad óptica
CPRE	Colangiopancreatografía retrógrada endoscópica
CPS	Coproparasitoscópico seriado
DE	Desviación estándar
δ	Densidad
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EE	Error estándar
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
HEPES	Ácido N { 2-hidroxyetil } piperazina-N'-(2-etanol) sulfónico
IgG	Inmunoglobulina G
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas
n	Tamaño de muestra
nm	Nanómetros
μ g	Microgramos
μ L	Microlitros
μ m	Micrometros
OFD	Ortofenilendiamina
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución salina de fosfatos
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SSI	Solución salina isotónica
UI	Unidades internacionales
\bar{X}	Media de la muestra

3. RESUMEN

Se acudió a rastros municipales para obtener hígados de ganado bovino y ovino naturalmente infectados con *Fasciola hepatica*, los cuales se disecaron cuidadosamente para extraer los parásitos adultos en cantidades adecuadas para preparar antígeno somático y antígeno de excreciones-secreciones.

Se determinó la concentración total de proteínas de ambos antígenos y se titularon con muestras de suero de individuos aparentemente sanos y de pacientes con fasciolosis mediante diluciones de acuerdo al método de Voller y colaboradores en forma de tablero de ajedrez.

Se estandarizó el ELISA y se evaluaron los diferentes grupos de sueros: control sano (n=100), con fasciolosis (n=10), con otras infecciones causadas por céstodos (n=10), nemátodos (n=10) y protozoos (n=10). Para cada antígeno se determinaron valor de corte y los parámetros serológicos de sensibilidad, especificidad, valor de predicción positivo, valor de predicción negativo, eficiencia, reactividad cruzada e índice Kappa.

Los datos estadísticos fundamentales como son la media, la media +/- la desviación estándar, la media +/- dos veces el error estándar y los valores máximos y mínimos de cada grupo de sueros con cada antígeno, se presentan en forma gráfica en el modelo de Dice y Leraas, también se aplicó la prueba t de Student y los resultados obtenidos coincidieron con el modelo gráfico.

En la evaluación serológica de cada antígeno en el ELISA, los mejores valores de los diferentes parámetros se obtuvieron para el antígeno de excreciones-secreciones.

4. INTRODUCCIÓN

Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758), es el agente etiológico de la fasciolosis, es un tremátodo digenético, monoico y en el estado adulto es plano con forma de hoja, mide de 2 a 3.5 cm de largo por 1 a 1.5 cm de ancho, se localiza en los conductos biliares de animales herbívoros y el hombre.

En México, los estudios epidemiológicos de fasciolosis en el humano han sido esporádicos e inadecuados. La infección en el ganado se encuentra reportada en toda la República, lo cual establece amplias zonas endémicas en las que se conjuntan los factores que predisponen para que se lleve a cabo el ciclo biológico como el agua dulce estancada, vegetación acuática, huéspedes intermediarios y la fuente constante de infección que es el ganado enfermo.

F. hepatica puede producir daño mecánico, expoliatriz por la ingesta de células hepáticas, sanguíneas y de las paredes de los conductos biliares, también por eliminación de productos metabólicos tóxicos. El daño consiste en obstrucción, alteraciones inflamatorias, adenomatosas y fibróticas en las vías biliares, apareciendo atrofia del parénquima hepático y cirrosis periportal. Los primeros síntomas pueden ser: cefalea, escalofrío, fiebre, dolor abdominal difuso en hipocondrio derecho, desde muy débil hasta muy agudo. Al progresar la infección aparecen náusea, vómito, flatulencia, ictericia y hepatomegalia dolorosa debido a la congestión e inflamación del parénquima.

En las pruebas de laboratorio pueden haber las siguientes alteraciones: perfil hepático enzimático (niveles elevados de fosfatasa alcalina y aminotransferasas), hematológicas (eosinofilia) y deficiencia de hierro sérico. El cuadro clínico así como las pruebas de laboratorio antes mencionadas son inespecíficas por lo que se llega a confundir fácilmente con otras patologías.

El diagnóstico de la fasciolosis se ha basado en la identificación de los huevos del parásito en las heces o en el líquido duodenal del individuo parasitado. Sin embargo, este diagnóstico se ve dificultado por la fase de la infección y la intermitencia en la excreción de los huevos, por lo que es necesaria la realización de pruebas serológicas para detectar la fasciolosis. Recientemente el diagnóstico se ha mejorado por métodos inmunoenzimáticos como el ELISA y por el uso de productos de excreciones-secreciones.

En México, son necesarios métodos serológicos para apoyar el diagnóstico de fasciolosis ya que es difícil ubicar laboratorios donde se realice dicho diagnóstico, por lo que el propósito del siguiente trabajo será preparar y evaluar los antígenos somático y de excreciones-secreciones en ELISA que es un método serológico confiable, ampliamente utilizado por las ventajas que ofrece como son sencillez, rapidez y estabilidad de los reactivos. Una vez optimizado el ELISA se podrá emplear en estudios seroepidemiológicos para valorar la prevalencia de esta parasitosis en nuestro país.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Historia.

Es posible que *Fasciola hepatica* haya sido conocida desde la antigüedad, pero no se tienen referencias escritas a este respecto; casi todos los autores coinciden en que la primera referencia escrita sobre este parásito la hizo Jean de Brie en 1379, quien después de recibir la comisión de Carlos V de Francia, investigó y escribió un tratado sobre la producción de lana y en él se refirió a la fasciolosis como una “putrefacción del hígado por las sustancias nocivas producidas por ciertas plantas, que dan lugar al desarrollo de los gusanos”. El primer dibujo de la duela del hígado, aparece en una publicación de 1668 de Francisco Redi, lo que estimuló a otros a investigar la biología de este parásito. Leeuwenhoek también estuvo interesado en este organismo pero aparentemente su tiempo lo ocupó más en los “animalículos” que fue encontrando en su microscopio. Las cercarias y redias de *F. hepatica* fueron descritas por primera vez por Swammerdam en 1737; en 1758 Linneo le dio su nombre actual, aunque lo consideró una sanguijuela; a Pallas le cabe el honor de haberlo encontrado por primera vez parasitando al hombre y en 1816 Nitzsch pone de manifiesto las similitudes entre las cercarias y las fasciolas adultas; es así como la historia de este parásito ha ido corriendo justamente con el desarrollo de la helmintología. En 1844 Johannes Steenstrup hizo notar la alternancia de generaciones en los tremátodos, postulando a la vez que tienen dos generaciones de las cuales una es la adulta. En relación con los huéspedes intermediarios, se empezó a

sospechar el papel de los moluscos (*Lymnaea peregra*) como participantes en la transmisión; Thomas, tuvo la suerte de encontrar e identificar a *Lymnaea trunculata*, así como su hábitat favorable en 1880.^{1,2}

La fasciolosis es la parasitosis más común de la vía biliar en el ganado de nuestro país. En el humano, desde 1935 se han reportado en México al menos 52 enfermos de fasciolosis, los más numerosos se han encontrado en los estados de México, Puebla e Hidalgo y en general la zona de la cuenca del río Lerma.

Caballero en 1936, señala el primer caso de fasciolosis, posteriormente Campuzano en 1955 y Lara Alarcón en 1962 describieron los primeros casos con afección coledociana.³ Nava (1974) en una revisión de la literatura nacional, reunió veintiséis casos, siete de los cuales se localizaron en el colédoco.⁴ En otra revisión nacional posterior, Palacio (1982) encontró diecisiete casos más y desde entonces sólo se han agregado seis casos, con lo que suman cuarenta y nueve.^{3,5} La infección masiva de las vías biliares es un evento raro en el hombre, en nuestro país Iturralde (1977)⁶, describió cuarenta parásitos en el colédoco, sin embargo, no enfatizó este hallazgo, que es común en el ganado bovino, recientemente Sánchez en el 2000 contribuyó con dos casos más.³

El antecedente de la ingesta de berros (*Nasturium officinalis*) ha estado presente en la mayoría de los casos y los pacientes han provenido de áreas consideradas como endémicas en México.

Clasificación taxonómica:

Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758)

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Trematoda

Subclase: Digenea

Superorden: Anepitheliocystidia

Orden: Echinostomata

Familia: Fasciolidae

Género y especie: *Fasciola hepatica*.²

5.2. Morfología.

Fasciola hepatica en su estado adulto es un tremátodo grande, de 2 a 3.5 cm de longitud por 1 a 1.5 cm de anchura. Es aplanado, de color café claro y de aspecto foliáceo, se adelgaza hacia la parte distal y en la proximal es más ancho; en esta parte se localiza el cono cefálico en el extremo del cual se encuentra la ventosa oral y hacia la base del mismo la ventral, un poco más grande que se conoce como acetábulo; el tegumento se encuentra cubierto por espinas escamosas. Es monoico o hermafrodita; el aparato sexual masculino está conformado por dos testículos grandes y muy ramificados (figura 1);

1. Ventosa oral
2. Ventosa ventral
4. Testículos
5. Conducto eferente
6. Poro genital

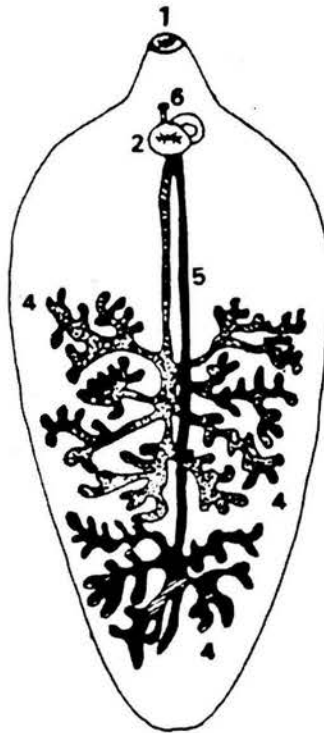


Figura 1. Órganos reproductores masculinos.⁷

el aparato sexual femenino está formado por el ovario dendrítico pequeño, que se extiende un poco hacia la derecha y por detrás del acetábulo, el útero es corto y sinuoso, se encuentra enrollado entre el ovario y la bolsa del cirro que es preacetabular; las glándulas o folículos vitelinos son extensos y llenan la mayor parte de las porciones laterales del cuerpo, las cuales se enlazan un poco por debajo de los testículos (figura 2).

1. Ventosa oral
2. Ventosa ventral
6. Poro genital
7. Ovario
8. Conducto vitelino
9. Glándula de Mehlis
10. Ootipo
11. Útero
12. Glándulas vitelinas

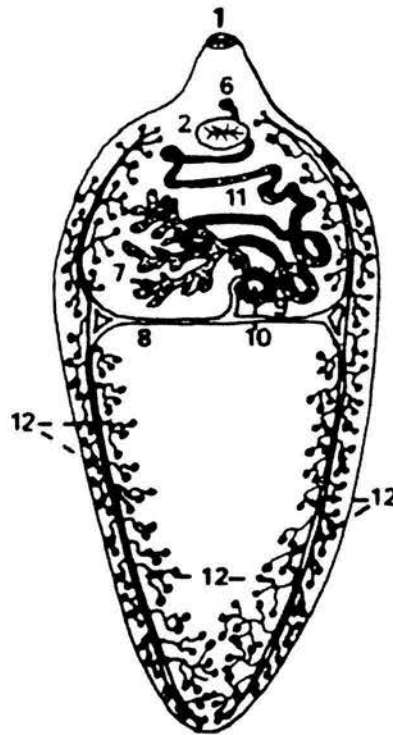


Figura 2. Órganos reproductores femeninos.⁷

El aparato digestivo es incompleto, se inicia en la ventosa oral, sigue una faringe musculosa bien desarrollada, luego el esófago y enseguida la división en dos troncos laterales que se ramifican profusamente y terminan en ciegos intestinales (figura 3).

1. Ventosa oral
2. Ventosa ventral
3. Ciegos intestinales

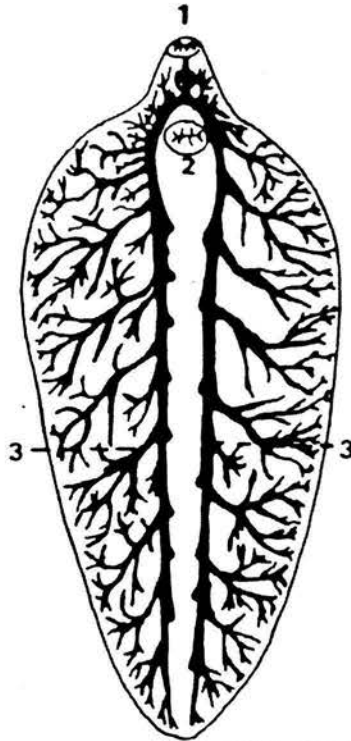


Figura 3. Aparato digestivo.⁷

El sistema excretor está formado por una unidad funcional conocida como protonefridio o célula en flama. Esta célula en flama de aspecto de botella tiene un conjunto de cilios que con sus movimientos, proporcionan la fuerza que mueve los líquidos en el sistema y en general se conectan a los tubos colectores y éstos a su vez desembocan hacia la parte distal del parásito en la vejiga excretora.

Los huevos son operculados, elípticos, pardo-amarillentos, miden en promedio 140 μm de largo por 75 μm de ancho, están parcialmente embrionados, pues se expulsan con una mórula perfectamente identificable (figura 4).

1. Opérculo
2. Manchas oculares
3. Cilios
4. Células germinales

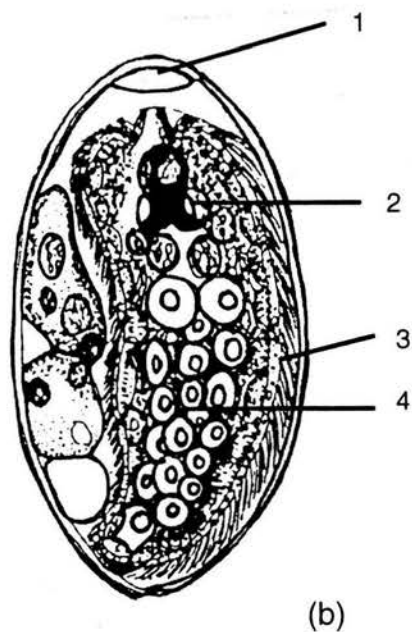
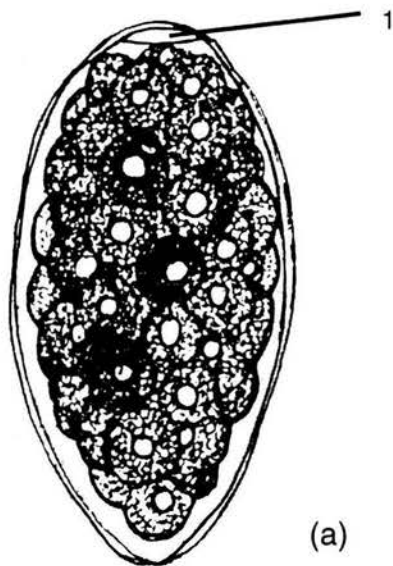


Figura 4. Huevo inmaduro (a), huevo maduro con el miracidio (b).⁷

El miracidio es una larva ciliada que recuerda al parásito adulto en su forma externa, mide en promedio 130 μm de largo por 30 μm de ancho y como característica importante, detrás de la papila cefálica, se encuentran las manchas oculares (figura 5).

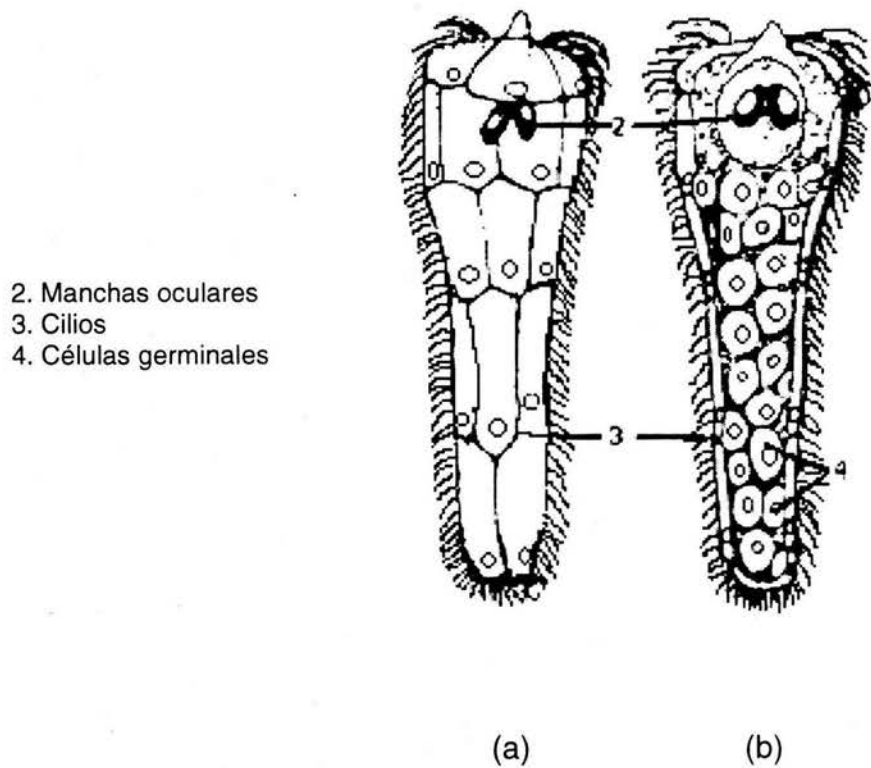


Figura 5. Miracidio en vista exterior (a), miracidio en vista interna (b).⁷

El esporoquiste es ovalado, mide entre 500 y 600 μm , ésta forma larvaria va a dar origen a la primera generación de redias (figura 6).

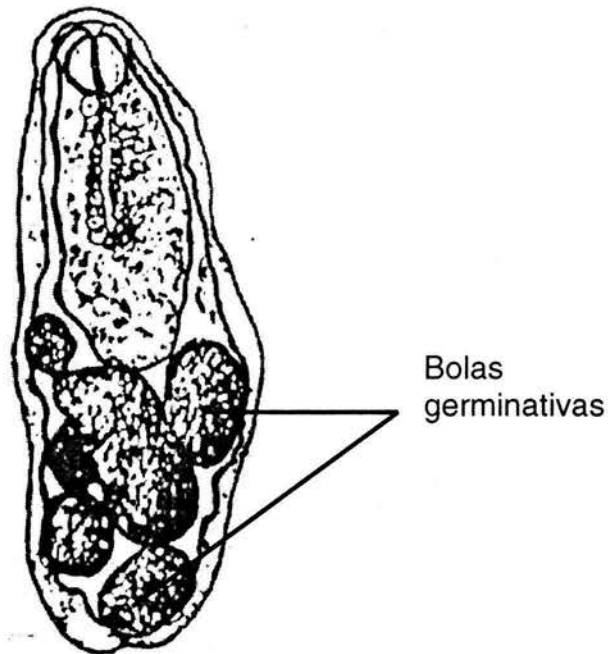


Figura 6. Esporoquiste.⁷

Las redias semejan un saco alargado lleno de unas estructuras que según sean madres o hijas, las primeras van a dar origen a las redias de segunda generación y las segundas originarán cercarias. Las redias dependiendo de la fase en que se encuentren miden de 1 a 3 mm de largo (figura 7).

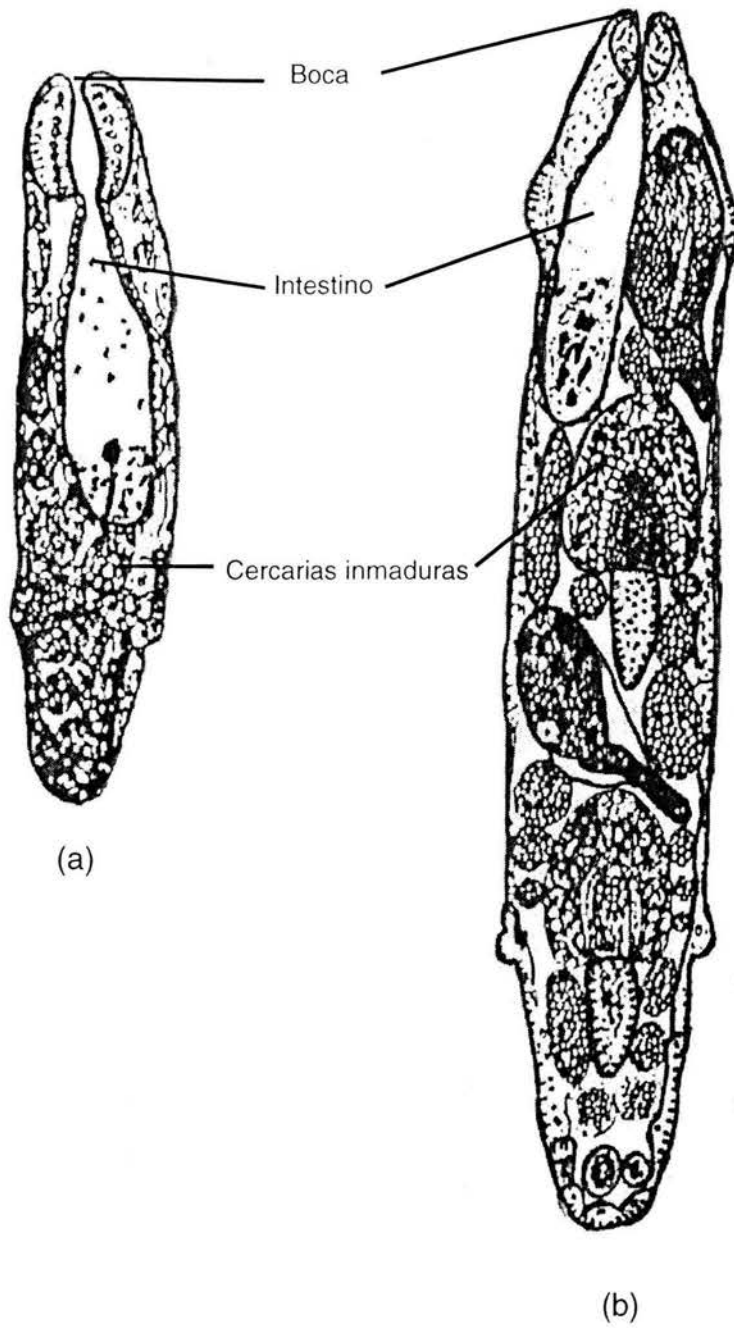


Figura 7. Redia de primera (a) y segunda generación (b).⁷

La cercaria de *F. hepatica* es gimnocerca, semeja un renacuajo, la parte anterior, que corresponde a la porción cefálica, es casi esférica aunque en movimiento puede alargarse considerablemente; mide aproximadamente 250 μm de diámetro y la cola 700 μm (figura 8).

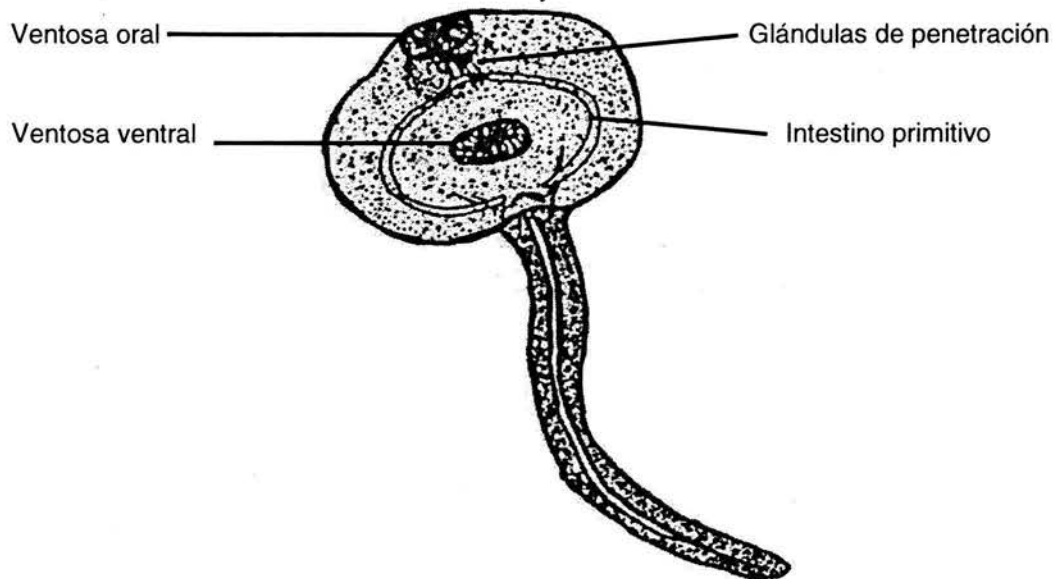


Figura 8. Cercaria.⁷

La metacercaria no es más que la porción cefálica de la cercaria, pues al enquistarse pierde la cola y se redondea engrosándose considerablemente su cubierta a base de un polímero de quinonas, mide en promedio 200 μm de diámetro (figura 9).^{1,7,8}

-
1. Ventosa ventral
 2. Ventosa oral
 3. Pared quística

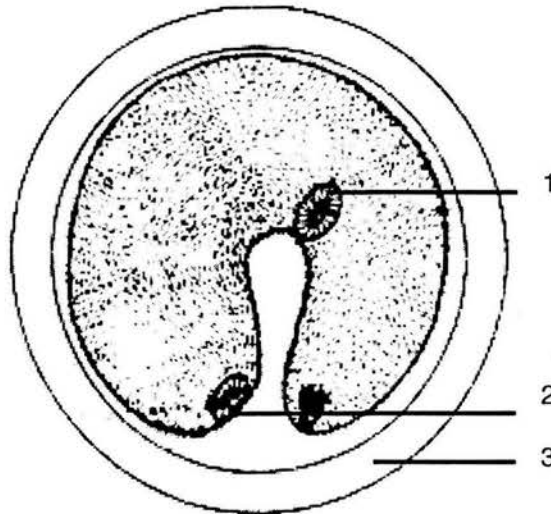


Figura 9. Metacercaria.³

5.3. Ciclo biológico.

Fasciola hepatica posee un ciclo realmente complejo que incluye la presencia de dos huéspedes obligatorios: el huésped definitivo (rumiantes, otros animales y el ser humano), que alberga la forma adulta del parásito, y el huésped intermediario (moluscos de los géneros *Fossaria*, *Pseudosuccinea* y otros de la familia Lymnaeidae) en el cual se desarrollan etapas asexuadas. En este ciclo alternan dos etapas de vida libre en el exterior: la etapa ovular eliminada con las heces del huésped definitivo al medio ambiente y las cercarias expulsadas por el caracol que se enquistan sobre vegetales acuáticos transformándose en metacercarias.⁹

Los parásitos adultos se localizan en el hígado y vías biliares del huésped. En su hábitat se alimentan de las paredes de los conductos biliares donde depositan huevos en cantidades limitadas, aproximadamente 300 huevos por día, éstos son arrastrados con la bilis y llegan al intestino, al ser eliminados con las heces del huésped todavía no están maduros, maduran en el agua, lo cual ocurre entre 9 y 15 días a temperatura óptima de 22 a 25°C. Una vez maduros presentan una larva ciliada, bien desarrollada que se denomina miracidio.

La larva ciliada, por movimientos activos que se favorecen por la acción de la luz, así como por acción enzimática, desprenden el opérculo del huevo y salen a nadar libremente en busca del huésped intermediario (caracoles pulmonados de agua dulce) a los cuales deberán encontrar en el término de unas 8 horas, e invadirlos principalmente por la región del pie mediante acción histolítica y mecánica perforando las células epiteliales y subepiteliales del caracol. Dentro se llaman esporoquistes, los cuales producen la primera generación de redias tres semanas posteriores a la penetración. Al término de una semana más se forma la segunda generación de redias y a continuación aparecen las cercarias, que maduran en el agua después de abandonar al caracol en grandes cantidades (un miracidio produce unas 500 a 650 cercarias), lo que hacen generalmente durante la noche, nadan ayudadas por su cola, en aproximadamente media hora se enquistan (proceso que implica la pérdida de la cola y el engrosamiento de las paredes de la cercaria) en esta etapa se les denomina metacercarias, las cuales se ubican en diferentes plantas acuáticas, objetos sumergidos o incluso suspendidas en la superficie del agua.

Los animales o el hombre adquieren la infección al consumir la vegetación acuática sobre todo si está húmeda, ya que la desecación mata fácilmente las metacercarias. En México, son importantes los berros (*Nasturium officinalis*), también se puede adquirir la infección bebiendo aguas contaminadas con metacercarias. Las metacercarias se desenquistan en el duodeno liberando parásitos juveniles o adolescarias, que mediante acción enzimática y movimientos vigorosos perforan la pared intestinal y en unas 3 horas, se encuentran en cavidad peritoneal en donde pasan de 3 a 16 días, después por movimientos reptantes avanzan por peritoneo, atraviesan la cápsula de Glisson y penetran al parénquima hepático del cual se alimentan los parásitos juveniles durante su migración hacia los conductos biliares en los que se fijan y crecen hasta el estado adulto, lo cual sucede en unos 3 a 4 meses después de la ingestión de metacercarias. Los parásitos adultos comienzan a producir huevos que salen al exterior con la bilis, arrastrados con las heces, completándose así el ciclo biológico (figura 10).^{7,10}

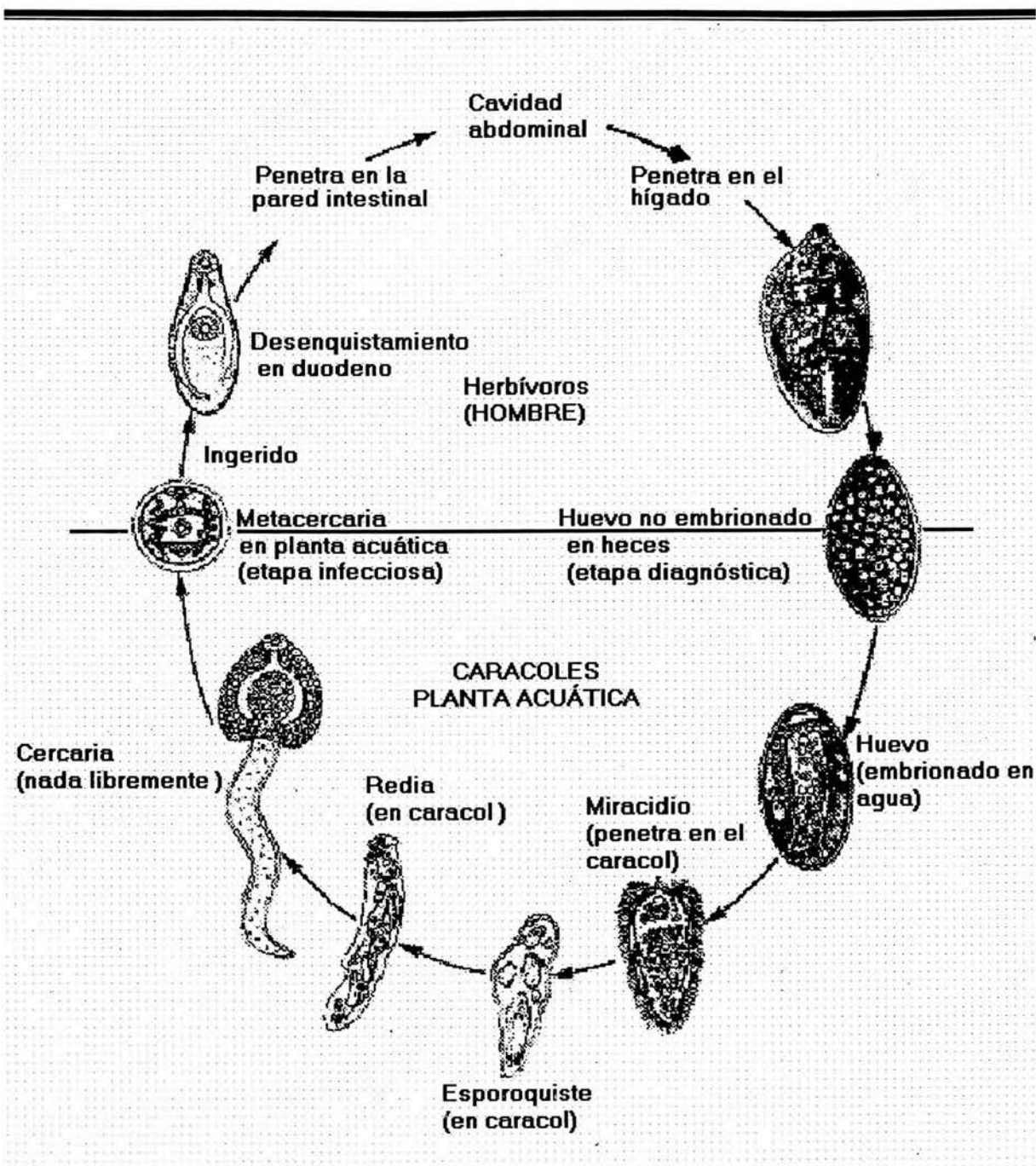


Figura 10. Representación del ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.¹¹

5.4. Epidemiología.

Dadas las características biológicas del parásito, se requiere de factores muy específicos para que se lleve a cabo la consecución del ciclo vital. Es primordial que existan colecciones de agua dulce, caracoles de la familia Lymnaeidae, que para México se han reportado *Lymnaea attenuata*, *Lymnaea cubensis*, *Lymnaea humilis*, *Lymnaea bulimoides* y *Lymnaea obrussa*.^{1,4,12} Las condiciones climáticas son críticas para el desarrollo de los caracoles *Lymnaea*. Los caracoles son más resistentes a las temperaturas bajas, pueden sobrevivir en el invierno. Las temperaturas altas también dañan el desarrollo de los estadios larvarios de la forma adulta. Las metacercarias pueden sobrevivir por largos periodos a temperaturas bajas si el nivel de humedad es suficiente, son susceptibles a la desecación y a temperaturas por arriba de 25°C.¹³ En cuanto a otros factores bióticos importantes se encuentran las plantas forrajeras con que se alimenta el ganado, como heno, alfalfa y trébol; para el humano son importantes los berros y la alfalfa.¹ No existen normas para la producción ni controles de calidad para la comercialización de estos vegetales, es imposible saber de donde proviene el berro, es habitual que sea simplemente recolectado de plantíos naturales en algunas corrientes de agua.⁹ En México, la fasciolosis humana sólo es motivo de informes aislados, a pesar de que algunos estados como el de México, Puebla e Hidalgo tienen características endémicas. La ingestión de berros silvestres (*Nasturium officinalis*) infectados con metacercarias y el desarrollo de esta patología es el factor común en los hallazgos de los últimos años.^{3,14}

Estimaciones recientes sugieren que dos millones de seres humanos son infectados con este parásito en todo el mundo y la incidencia aparentemente se ha incrementado desde 1980.^{15,16}

5.5. Patogenia.

El grado de cambios patológicos depende primariamente del número de adolescarias o parásitos juveniles que penetran la pared del intestino e invaden el hígado.¹⁰

La penetración de la pared del duodeno o yeyuno por parte de la metacercaria puede causar focos hemorrágicos e inflamación, pero estas lesiones usualmente no son evidentes clínicamente. Los parásitos juveniles migran a través del peritoneo, perforando la cápsula de Glisson, se localizan en el parénquima hepático produciendo inflamación del peritoneo con exudado serohemático, la cápsula de Glisson presenta engrosamiento e infiltrado leucocitario debido principalmente a eosinófilos, el hígado aumenta de tamaño, con presencia de microabscesos y necrosis. Una vez que los parásitos llegan a los conductos biliares, producen inflamación y edema de las paredes que van estimulando la fibrosis que es progresiva, lo que engrosa considerablemente los conductos con la consiguiente estasis biliar con concentraciones progresivas de sales que provocan litiasis. La estasis produce una presión inversa y, por consecuencia, atrofia del parénquima, con cirrosis y posible ictericia; cuando el número de parásitos es grande, hay atrofia del parénquima hepático, por compresión y cirrosis periportal. El parásito ejerce acción

expoliatriz ya que se alimenta de sangre y células hepáticas, además ejerce acción mecánica traumática y tóxica al liberar sustancias de excreciones-secreciones que contribuyen a la producción de la reacción tisular, junto con las sustancias que se liberan cuando los parásitos mueren.

Cuando las adolecarias “equivocan el camino” se llegan a encontrar en localizaciones ectópicas, peritoneales, pulmonares, cutáneas, entre otras.^{7,12,13,17}

5.6. Cuadro clínico.

En la fasciolosis se distinguen dos fases que son las siguientes:

Fase aguda.

También se le denomina inicial, invasiva, migratoria o hepática, comprende la migración de los parásitos juveniles hasta su establecimiento en los conductos biliares.

Los signos y síntomas pueden pasar inadvertidos o se puede presentar cefalea moderada o intensa, escalofrío, fiebre, urticaria de duración fugaz, anemia, hepatomegalia dolorosa debida a la congestión e inflamación del parénquima hepático, dolor en hipocondrio derecho de intensidad variable desde un simple malestar hasta cólico biliar.

Fase crónica.

Además recibe los nombres de obstructiva, biliar y de estado, abarca desde la maduración sexual de los parásitos y su permanencia en la luz de los conductos biliares hasta su muerte.

En esta etapa se acentúan los síntomas provocados por la presencia de parásitos adultos en su hábitat definitivo, las vías biliares. Se presenta como dato más importante el dolor que puede ser muy variado, retroesternal, abdominal difuso, en hipocondrio derecho, con irradiación hacia el hombro derecho. Puede existir hipertermia, astenia, hipodinamia, hepatomegalia, náusea, vómito, constipación con periodos de diarrea, intolerancia a los alimentos grasos e ictericia obstructiva.

Las complicaciones derivan de eventuales desplazamientos de *Fasciola hepatica* al conducto cístico, vesícula biliar, colédoco o ampolla de Vater, pudiendo obligar a cirugía de urgencia.

Estos tremátodos pueden realizar trayectos aberrantes, cuya sintomatología varía dependiendo del órgano afectado.^{7,13,14,17}

5.7. Diagnóstico.

El diagnóstico de fasciolosis es difícil y puede confundirse con otros problemas debido a los síntomas inespecíficos que se presentan, sin embargo, las manifestaciones clínicas en la fase aguda (hepática) pueden ser vagas o nulas; en algunos casos se puede presentar fiebre, dolor en hipocondrio derecho y hepatomegalia. En la fase crónica (biliar), la enfermedad da lugar a una colangiopatía crónica, generalmente sin eosinofilia y el cuadro clínico simula litiasis; en estas circunstancias los estudios de imagen (diagnóstico de gabinete) pueden ser útiles.

El ultrasonido puede ser de gran ayuda diagnóstica, ya que es posible observar estructuras ecogénicas irregulares móviles en el interior de la vesícula, y el colédoco dilatado con paredes engrosadas irregulares, sin embargo, estos hallazgos no son específicos ya que también se observan en la colangitis del síndrome de inmunodeficiencia adquirida y en la colangitis esclerosante. En la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE) se observan defectos vermiformes de llenado en colédoco. La tomografía axial computarizada no es específica, sólo muestra dilatación del tracto biliar con marcado engrosamiento de las paredes.^{13,14}

Debido a que el cuadro clínico, los estudios de laboratorio y de gabinete para fasciolosis son inespecíficos es necesario contar con pruebas serológicas sensibles y específicas para realizar un diagnóstico confiable de esta parasitosis.

5.7.1. Diagnóstico de laboratorio.

No es raro encontrar casos de fasciolosis con eosinófilos entre el 40 al 80% cuyo ascenso es progresivo durante la fase aguda, se estacionará en la fase crónica para descender paulatinamente hacia niveles casi normales y sobre todo después del tratamiento.

La deficiencia de hierro, la elevación de la bilirrubina en casos de migración de parásitos por las vías biliares y los niveles elevados de fosfatasa alcalina y transaminasas (alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa) en suero son factores bioquímicos típicos en la mayoría de los pacientes infectados con este parásito.^{7,18}

El diagnóstico de laboratorio específico se inicia con la búsqueda de huevos del parásito, por medio de exámenes coproparasitológicos (en serie de tres), los métodos más apropiados son los de concentración por sedimentación como el método de formol-éter (Ritchie) y el de sedimentación en copas. Otro método para la búsqueda de los huevos del parásito, es el examen directo en fresco del contenido duodenal, el cual puede obtenerse por sondeo o utilizando la cápsula de Beal. La cantidad de huevos para hacer el diagnóstico específico puede ser insuficiente e intermitente. Por este motivo, las pruebas serológicas son una alternativa importante para llevar a cabo el diagnóstico indirecto de la enfermedad.^{1,7,18,19,20}

El diagnóstico serológico se puede realizar con diversas pruebas como:

- Fijación de complemento.

Esta prueba se basa en el principio de que los complejos antígeno-anticuerpo activan y consumen el sistema del complemento. En algún tiempo fue de gran utilidad diagnóstica, en la actualidad se encuentra prácticamente en desuso, por su gran laboriosidad y su relativamente baja sensibilidad.²¹

- Doble difusión.

Esta prueba se basa en que cuando el antígeno y el anticuerpo, se difunden en un medio semisólido (agar) forman un inmunoprecipitado estable que se visualiza fácilmente y es económica, pero su valor práctico en inmunodiagnóstico es limitado debido a su baja sensibilidad y a que los resultados se obtienen después de 18 a 24 horas.²²

- Hemaglutinación indirecta.

Fue descrita por Jacobs y Londe en 1957, esta técnica utiliza antígeno soluble absorbido a glóbulos rojos sensibilizados. El suero del paciente es incubado con células sensibilizadas, si éste tiene anticuerpos contra el parásito, los glóbulos rojos se aglutinarán. La desventaja de esta técnica es la variación de la calidad de los glóbulos rojos y la del antígeno.²³

-
- Contrainmunoelectroforesis.

Se le conoce también como inmunolectroforesis a contracorriente, se basa en la electroforesis simultánea de antígeno y anticuerpo, en direcciones opuestas de pozos separados en el gel, los anticuerpos se mueven hacia al cátodo, mientras que el antígeno se mueve al ánodo, en el punto de encuentro se observa una precipitación. Sus ventajas sobre la inmunodifusión es que el tiempo se acorta (30 a 60 minutos) y es 10 veces más sensible debido a que se fuerza la reacción.²⁴ El método está limitado a los antígenos con carga negativa. La contrainmunolectroforesis demostró ser útil en el diagnóstico de fasciolosis humana, pero se encontró que presenta reacciones cruzadas entre el extracto crudo de *F. hepatica* y el suero humano con otras infecciones parasitarias.²⁵

- Inmunofluorescencia indirecta.

La técnica de inmunofluorescencia indirecta ha sido usada en el diagnóstico de un gran número de enfermedades causadas por helmintos. Fraga y Coello fueron los primeros en usarla para diagnosticar fasciolosis humana, empleando miracidios como fuente de antígeno. Es rápida, adaptable a la automatización y los reactivos son estables. Los inconvenientes son la necesidad de instrumentos especiales, para lograr análisis sensibles se requiere de reactivos para el marcado del anticuerpo que sean purificados e inmunológicamente especiales y también marcadores de fluoróforos para reducir la fluorescencia de fondo.²⁶

-
- Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

El inmunodiagnóstico de fasciolosis ha sido mejorado por el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas usando extracto crudo de la forma adulta o productos de excreciones-secreciones para la detección de anticuerpos en suero. En particular, han mostrado una sensibilidad y especificidad adecuadas para este objetivo.¹⁹

5.7.2. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

El inmunoensayo enzimático, conocido como ELISA (del inglés Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay), fue descrito en 1971 por Engvall y Perlman.²⁷ En este sistema, el antígeno o el anticuerpo se adsorben a una fase sólida (microplacas de poliestireno, o bien membrana de nitrocelulosa) sobre la cual se llevan a cabo las reacciones. Se utilizan anticuerpos conjugados a enzimas; los primeros conservan su capacidad de unión específica al antígeno, mientras la enzima es capaz de catalizar una reacción en la cual el sustrato se transforma en un producto de color.

Es una prueba versátil, sensible y fácil de manejar, por lo que tiene aplicaciones muy variadas como diagnóstico de enfermedades infecciosas, cuantificación de hormonas, haptenos y titulación de anticuerpos, entre otras.

Existen variantes del ELISA: directo, indirecto, de captura y competitivo. Todos permiten la determinación de antígenos en fluidos biológicos, a excepción del método indirecto con el que se detectan anticuerpos. En el método directo, el anticuerpo

dirigido específicamente contra el antígeno es el que lleva la enzima unida. En cambio, en el método indirecto el conjugado enzima-anticuerpo reacciona con un primer anticuerpo, el cual ya reaccionó con el antígeno inmovilizado. En el de captura de antígeno, el conjugado enzima-anticuerpo reacciona con el antígeno que se ha unido antes a un primer anticuerpo adsorbido a la fase sólida. Se agrega el sustrato de la enzima y se mide la intensidad del color desarrollado, el cual es proporcional a la magnitud de la reacción antígeno-anticuerpo. En la figura 11 se esquematiza el ensayo indirecto para la búsqueda de anticuerpos.²⁸

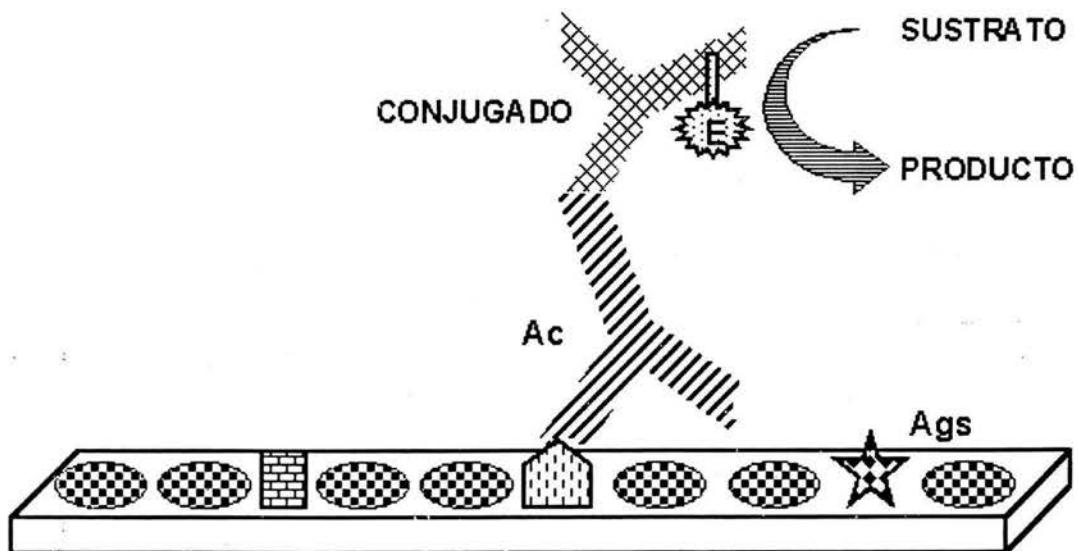


Figura 11. Representación del ELISA indirecto.²⁸

5.7.2.1. Características de los elementos que se usan en el ELISA.

- Fase sólida.

Se utilizan bolas de poliestireno, tubos de polivinilo, policarbonato, partículas de agarosa, poliacrilamida y placas plásticas microtituladoras.

La inmovilización del antígeno o anticuerpo en la fase sólida es por enlace covalente o por adsorción continua de interacciones no covalentes. Se debe determinar la concentración óptima de revestimiento para cada ensayo.

- Etapas de lavado.

Se debe realizar con una solución amortiguadora salina de fosfatos-Tween 20 (PBS-Tween 20), después de revestir la fase sólida. Esta fase es importante ya que pueden quedar residuos de material que reaccionen y alteren los resultados.

- Muestras a ensayar.

Algunas muestras contienen sustancias de peso molecular elevado, que pueden pegarse de manera inespecífica a la fase sólida. Este problema se puede reducir si la muestra se diluye en PBS conteniendo agente detergente (PBS-Tween 20).

- Antígeno

Para cada ensayo es necesario determinar la concentración óptima del antígeno, la cual se establece por titulación en "tablero de ajedrez".²⁹

-
- Conjugado

Para la obtención del conjugado se debe considerar lo siguiente:

a) Preparación de inmunoglobulina:

- Tipo de inmunoglobulina usada para la inmunización.
- Especie de animal usada en la inmunización (cabra, conejo, oveja).

b) La enzima debe de ser:

- Económica.
- De alto grado de pureza.
- De elevada actividad específica.
- Estable al almacenamiento.
- Soluble.
- Y no dar enlace cruzado.

Las más comúnmente usadas son la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina y la β -galactosidasa, debido a su estabilidad y a la reproducibilidad de resultados.

Los conjugados con peroxidasa duran mucho tiempo almacenados en forma liofilizada, sin perder su actividad.

- Sustrato

Debe de ser barato, soluble y de fácil manejo. Los sustratos para la enzima peroxidasa de rábano son el peróxido de hidrógeno o el peróxido de urea, que al ser

reducidos dan productos incoloros, por lo que se acompañan de cromógenos que al oxidarse en la reacción enzimática desarrollan color. De éstos, la empleada con más frecuencia es la orto-fenilendiamina, que permanece en forma soluble después de ser oxidada.

Los sustratos para la fosfatasa alcalina son el p-nitrofenil fosfato, que produce color al ser degradado por la enzima a temperaturas mayores de 30°C.³⁰

5.8. Antígenos.

Los parásitos son organismos altamente complejos compuestos de una variedad de antígenos, algunos de los cuales pueden ser alta o débilmente inmunogénicos, específicos, protectores, inmunosupresores o con reactividad cruzada. Estos antígenos pueden ser expresados diversamente en diferentes etapas de la infección, estadios del ciclo biológico del parásito y momentos en un solo estadio parasitario.

Los antígenos pueden ser somáticos (extracto crudo) o metabólicos (excreciones-secreciones). El antígeno somático se prepara con el organismo entero, en el proceso de solubilización se pueden perder componentes lábiles importantes y resultar mezclas complejas de antígenos.

Los antígenos metabólicos son las sustancias excretadas y secretadas por los parásitos en sus diferentes etapas de vida, aún en forma cruda, tienden a ser mezclas de pocos antígenos relativamente, que pueden proveer ventajas en al

menos una preselección y purificación del antígeno dada por el parásito vivo. Usualmente contienen antígenos biológica y funcionalmente relevantes y de aquí que su especificidad antigénica tiende a ser alta.^{31,32}

Los antígenos de excreciones-secreciones liberados por *Fasciola hepatica* son presentados en la circulación del huésped. Estas moléculas son derivadas del intestino del parásito y enviadas a la circulación del huésped por regurgitación regular de los contenidos intestinales digeridos.³³

Dalton y Heffernan en 1989 demostraron que cuando las formas maduras e inmaduras de *F. hepatica* se mantienen *in vitro* por 16 horas liberan enzimas proteolíticas, identificadas como cisteína proteinasas o tiol proteasas.³⁴

Las cisteína proteinasas son proteínas abundantes de los productos de excreciones-secreciones y recientemente se ha demostrado que son antígenos inmunodominantes en la infección humana.^{34,35}

Smith y colaboradores en 1993 purificaron y caracterizaron dos proteinasas catepsina L (L1 y L2), secretadas por *F. hepatica*, las cuales predominan en los productos de excreciones-secreciones y representan más del 80% de las proteínas contenidas en dichos productos cuando el parásito es cultivado *in vitro*. Además demostraron que estas catepsinas L son secretadas por todos los estadios parasitarios que existen en el huésped, incluyendo las formas juveniles.^{36,37}

Se han sugerido varias funciones a estas enzimas como: facilitar la migración a través de los tejidos, la adquisición de nutrientes y la evasión de la inmunidad del huésped.³⁸

Dos de las preparaciones antigénicas más comúnmente usadas para el diagnóstico de fasciolosis ovina son el extracto somático crudo y derivados metabólicos liberados *in vitro* o excreciones-secreciones de *Fasciola hepatica* adulta. Se ha logrado buena sensibilidad y especificidad utilizando cualquiera de las dos preparaciones en pruebas serológicas tales como hemaglutinación pasiva, inmunoensayo en capa delgada o ELISA.³⁹

Daveau y Ambroise Thomas, en 1982 usaron como antígeno productos de excreciones-secreciones de siete días en ELISA para la detección de anticuerpos anti-*F. hepatica* y reportaron fuertes reacciones cruzadas con otros parásitos. Espino en 1987 usó productos de excreciones-secreciones de 24 horas con IgG ELISA en el diagnóstico de fasciolosis crónica y reportó que la prueba fue sensible, específica y económica.⁴⁰

Carnevale en el 2000, evaluó el ELISA y micro-ELISA por su habilidad para detectar anticuerpos anti-*F. hepatica* en humanos usando antígeno de excreciones-secreciones. La sensibilidad de cada método fue de 100%, pero la especificidad fue 100% para ELISA y 97% para micro-ELISA. Con estos resultados se sugiere que ELISA puede ser usado como un método confirmatorio para el serodiagnóstico de fasciolosis humana.⁴¹

5.9. Tratamiento.

Los fármacos utilizados en el tratamiento de la infección de *Fasciola hepatica* son emetina, biotinol, nitazoxanida, praziquantel y triclabendazol.

La emetina y la dihidroemetina han sido usadas mundialmente. La dosis usual es 1 mg/kg diariamente por 10 días vía intramuscular o subcutánea. Con controles posteriores mediante exámenes coproparasitoscópicos y/o sondeos duodenales.

El biotinol se reporta como seguro y efectivo en dosis de 30 a 50 mg/kg por 5-15 días.

El praziquantel si bien es el fármaco de elección para el tratamiento de la mayoría de las trematodiasis, no resulta efectivo para el caso de la fasciolosis.

La nitazoxanida se ha utilizado en pacientes con buenos resultados a una dosis de 500 mg cada 12 horas por 6 a 7 días.

El triclabendazol ha resultado seguro y efectivo en dosis oral única de 10 mg/kg, aplicado a pacientes, con favorable respuesta clínica. Sin embargo, no ha sido aprobado para uso humano (excepto en Egipto), aunque éste es ampliamente recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). La OMS está colaborando con los fabricantes de triclabendazol para promover su registro para uso humano.^{1,16,42,43,44}

5.10. Profilaxis.

Las actividades de control son:

1. Lavar perfectamente los vegetales y cocinarlos.
2. Tomar agua hervida.
3. Cultivo de berros para el consumo humano en aguas libres de caracoles.
4. Control biológico de los caracoles con moluscocidas, esto evita la realización del ciclo biológico del parásito aunque esta medida es de meditarse porque el uso de sustancias químicas como el sulfato de cobre para eliminar los *Lymnaea*, puede alterar la ecología de los ríos y acequias donde viven y por lo tanto ser contraproducente.
5. Reducción del número de parásitos en el huésped, limitado básicamente a la aplicación de fármacos fasciolicidas.
6. Reducción de la coincidencia huésped-parásito, con pastoreo selectivo y el cercado de fuentes artificiales de agua.^{1,7,10}

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita que se encuentra fundamentalmente en regiones dedicadas a la cría de ganado ovino y bovino, donde genera impacto económico y sanitario. En el pasado, la fasciolosis se limitó a poblaciones dentro de los límites de cuencas, sin embargo, se han definido nuevos límites geográficos y se han incrementado las poblaciones en riesgo. Los estudios epidemiológicos de fasciolosis humana en México, han sido esporádicos y las encuestas que se han realizado han sido muy pocas.

El cuadro clínico y las pruebas de laboratorio son inespecíficas y se pueden confundir con otras patologías, por lo que se han reportado casos que, aún con el antecedente de ingesta de berros, el diagnóstico de fasciolosis se realizó durante el acto quirúrgico.

El diagnóstico parasitológico de *F. hepatica* se puede realizar con el estudio de contenido duodenal obtenido por medio de cápsula de Beal (que no es fácil de conseguir) o por sondeo duodenal (que es un procedimiento invasivo para el paciente). La búsqueda de huevos en materia fecal se lleva a cabo con exámenes coproparasitoscópicos (CPS) de sedimentación, sin embargo, cuando *F. hepatica* es inmadura (de 90 a 120 días de la ingestión de metacercarias) no se identifican los huevos en las heces y cuando ya alcanza su madurez sexual, los huevos se excretan

a intervalos irregulares por lo que es necesario realizar estudios CPS repetidos durante varias semanas.

Entre las pruebas serológicas reportadas se encuentran técnicas como doble difusión, contraelectroforesis, fijación de complemento, hemaglutinación indirecta e inmunofluorescencia, los cuales han caído en desuso porque en algunos casos son laboriosos, los reactivos requeridos son difíciles de conseguir, las reacciones cruzadas son importantes y la sensibilidad en ocasiones es relativamente baja.

Aún cuando la fasciolosis se sospeche clínicamente es difícil ubicar laboratorios donde se realice dicho diagnóstico, por lo antes mencionado el propósito de nuestro trabajo será elaborar y evaluar los antígenos somático y de excreciones-secreciones en ELISA que es un método serológico confiable, que además se podrá emplear en estudios seroepidemiológicos para valorar la prevalencia de esta parasitosis en nuestro país.

7. HIPÓTESIS

Si se preparan antígenos somático y de excreciones-secreciones de *Fasciola hepatica* y se evalúan con el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) indirecto, con el antígeno de excreciones-secreciones se esperan valores de sensibilidad (97.5% aproximadamente) y especificidad (98.5% aprox.) superiores a los que se obtendrán para el antígeno somático.

8. OBJETIVOS

- Obtener los parásitos adultos de *Fasciola hepatica* por medio de la disección de hígados de ganado vacuno y ovino infectados naturalmente para preparar antígenos.
- Preparar antígeno somático con el método de extracción sacarosa-acetona para el diagnóstico de fasciolosis.
- Preparar antígeno de excreciones-secreciones mediante la incubación de los parásitos en medio de cultivo para el diagnóstico de fasciolosis.
- Evaluar los antígenos somático y de excreciones-secreciones con el ELISA para determinar los parámetros serológicos.
- Evaluar muestras de suero de pacientes infectados por otros parásitos con ELISA para determinar el cruce inmunológico.

9. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.

- Criterios de inclusión.

Diez muestras de suero de pacientes con eosinofilia, cuadro clínico y evidencia parasitológica y/o histopatológica de fasciolosis, proporcionados por el InDRE.

Treinta muestras de suero de pacientes con eosinofilia, cuadro clínico compatible con: cestodiasis (n=10), nematodiasis (n=10) y protozoosis (n=10), con evidencia parasitológica y/o serológica, proporcionados por el InDRE.

Cien muestras de suero de individuos aparentemente sanos, sin eosinofilia, parasitológicamente negativos, facilitados por el InDRE.

- Criterios de exclusión.

Se excluirán muestras de sueros para control sano que presenten contaminación con hongos o bacterias, lipémicos o con hemólisis. Para el caso de los sueros con fasciolosis u otras parasitosis se excluyen aquellos que encuentren lipémicos o con hemólisis.

10. VARIABLES

Variables	Definición	Medición
Sensibilidad y especificidad para el antígeno somático.	Sensibilidad: es la capacidad de una prueba para detectar a los verdaderamente enfermos. ⁴⁵	E L I S A
Sensibilidad y especificidad para el antígeno excreciones-secreciones	Especificidad: es la capacidad de una prueba para detectar a los verdaderos sanos. ⁴⁵	

11. MATERIAL Y EQUIPO

Material biológico:

1. Hígados de ganado ovino y bovino infectados naturalmente proporcionados por rastros municipales del Estado de México. (Los necesarios para obtener suficientes parásitos para la preparación de los antígenos).

-
2. Diez sueros de pacientes infectados con *Fasciola hepatica* proporcionados por el InDRE.

 3. Treinta sueros de pacientes infectados con céstodos (n=10), nemátodos (n=10) y protozoos (n=10), los cuales pueden dar sintomatología de afección en hígado, facilitados por el InDRE.

 4. Cien sueros de pacientes aparentemente sanos, proporcionados por el InDRE.

Reactivos:

Acetona (Fermont)

Ácido dietilendiaminotetracético (Merck)

Ácido cítrico (J.T.Baker)

Ácido clorhídrico (Merck)

Ácido sulfúrico (Monterrey)

Agua bidestilada

Albúmina sérica bovina (Sigma)

Bicarbonato de sodio (Sigma)

Carbonato de sodio (T.J.Baker)

Citrato de sodio (Sigma)

Cloruro de sodio (Monterrey)

Conjugado IgG-peroxidasa (Inmutec)
Dihidrógeno fosfato de sodio (Merck)
Estreptomicina (Sigma)
Éter (T.J.Baker)
Formaldehído (T.J.Baker)
Fosfato monobásico de potasio (Fisher Scientific)
Fosfato dibásico de sodio (Fermont)
Gentamicina (Sigma)
Glucosa (Merck)
HEPES * (Sigma)
Hidróxido de sodio (Merck)
Iodo metálico (Sigma)
O-fenildiamina: OFD (Sigma)
Penicilina sódica (Sigma)
Peróxido de hidrógeno (Sigma)
PMSF ** (Bio-Rad)
Reactivo de Bradford (Bio-Rad)
RPMI 1640 (Sigma)
Timerosal (Sigma)
Tween 20 (Sigma)
Yoduro de potasio (Sigma)

*Ácido N { 2-hidroxyetil } piperazina-N'-(2-etanol) sulfónico

**Fenilmetilsulfonilfluoruro

Material:

Aguja hipodérmica No.19 (Sanko Industrial)

Cronómetro (Sper Scientific)

Filtros de membrana 0.22, 0.45, 0.80 μm (MSI)

Jeringa desechable de 10 y 20 mL (Plastipak)

Jeringa de cristal de 50 mL (Becton)

Magneto (Spinbar)

Matraz Erlenmeyer 125, 250, 500, y 1000 mL (Pyrex)

Matraz volumétrico 50, 100, 1000 mL (Pyrex)

Mechero Fischer

Micropipeta de 20-100 μL (Gilson)

Micropipeta de 200-1000 μL (Gilson)

Microplacas de titulación de poliestireno 96 agujeros (Nunc)

Papel filtro (hoja estéril)

Pipeta graduada de 1, 5 y 10 mL (Kimax)

Pipetas multicanales 100, 250 μL (Brand)

Pipetas Pasteur (Intramedic)

Pizeta de 500 mL

Probetas de 500 y 1000 mL (Pyrex)

Puntas desechables para micropipeta

Termómetro de -10 a 100°C (Brannan)

Tubos cónicos de 50 mL (Corning)

Tubos de ensaye 13 X 100 (Pyrex)

Tubos de ensaye 18 X 100 (Pyrex)

Vasos de precipitados de 50, 100, 250, 500,1000 mL (Pyrex)

Equipo:

Agitador magnético: Corning

Balanza analítica: Precisa 180ADDP050

Campana de flujo laminar: VECO

Centrífuga: Rolco 2080

Lector de ELISA: Bio-Rad 3550

Incubadora: Felisa

Refrigerador (4°C): OJEDA

Refrigerador (-20°C): REVCO VIT 1386

Ultracentrífuga: Beckman L8-55

12. MÉTODOS

12.1. Obtención de parásitos adultos de *Fasciola hepatica*.

Para obtener los parásitos adultos de *F. hepatica*, se colectaron y disecaron hígados de ganado ovino y bovino infectados naturalmente, sacrificados en rastros municipales. Se realizó cuidadosamente la disección de los conductos biliares de los hígados para extraer las formas adultas de *F. hepatica* sin lesionarlas, éstas se depositaron en un frasco con solución salina isotónica (SSI); se lavaron de 3 a 5 veces con SSI estéril aproximadamente durante 1 hora hasta remover toda la sangre y restos biliares, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos con SSI estéril suplementada con 800 UI/mL de penicilina sódica y 1 mg/mL de estreptomicina. Después se lavaron nuevamente tres veces con SSI estéril.

12.2. Preparación de antígenos de *Fasciola hepatica*.

12.2.1. Antígeno somático.

Las formas adultas de *F. hepatica* obtenidas de acuerdo al inciso 12.1 se depositaron en un homogeneizador estéril, se agregaron 4 mL de solución de sacarosa 0.25 M por gramo de tremátodos y se maceraron en baño helado hasta lograr la mayor dilaceración posible. La suspensión se aspiró con una jeringa de cristal de 50 mL y

aguja hipodérmica, se depositó lentamente en un frasco de boca ancha con tapón esmerilado que contenía acetona fría (-20°C) en proporción de 16 volúmenes por homogeneizado inicial. Se tapó y se agitó vigorosamente hasta que se homogeneizó perfectamente. Se dejó reposar durante 20 minutos en baño helado. La acetona se decantó, se repitió el mismo procedimiento y se prolongó el tiempo de reposo a 1 hora.

Nuevamente, se decantó la acetona y el sedimento se transfirió a tubos de centrifuga de 50 mL con acetona fría, se homogeneizó y centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos.

Se decantó el sobrenadante y se extrajo la acetona. Se resuspendió en PBS pH 7.2 en proporción de 0.8 mL por volumen de homogeneizado inicial. Se agitó durante 16 horas a una temperatura de 4°C.

Se ultracentrifugó a 12 000 rpm durante 30 minutos a 4°C.

Se colectó el sobrenadante. Se dializó durante 48 horas contra PBS pH 7.2 y después se filtró con una membrana de nitrocelulosa con poro de 0.22 µm.

Se adicionaron los siguientes inhibidores de proteasas, ácido etilendiaminotetracético (EDTA 1mM) y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF 1mM).

Se almacenó el antígeno somático en alícuotas de 0.5 mL a -20°C hasta su uso.⁴⁵

12.2.2. Antígeno de excreciones-secreciones.

Se colocaron aproximadamente 10 formas adultas de *Fasciola hepatica* obtenidas de acuerdo al inciso 12.1 por cada 100 mL de RPMI 1640 amortiguado a pH 7.2 conteniendo glucosa 2%, HEPES 30 mM y gentamicina (80 µg/mL). Se incubaron a 37°C por 16 horas.^{34,46}

Se decantó el cultivo, se centrifugó a 15 000 rpm durante 20 minutos a 4°C.

El sobrenadante se concentró aproximadamente diez veces su volumen inicial por ultrafiltración con una membrana de Amicon YM 10 (peso molecular > 10 000) a 4°C. Se filtró con una membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm.

Se agregó una mezcla de inhibidores de proteasas compuesta por EDTA 1mM y PMSF 1mM.^{45,47}

Se almacenó en alícuotas de 0.5 mL a -70°C hasta su uso.

El contenido total de proteínas de los antígenos de *F. hepatica* se estimó con el micrométodo de Bradford.⁴⁸

12.3. Obtención de las muestras de suero.

Las muestras de suero de las personas parasitadas y aparentemente sanas se obtuvieron del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), mediante punción venosa, con volumen de 3 a 5 mL de sangre periférica, se aisló el suero, se le adicionó timerosal (1:10 000) y se almacenó en alícuotas de 0.5 mL a -20°C.

12.3.1. Muestras de suero del grupo control sano.

Para las muestras de suero del grupo control sano se seleccionaron a individuos aparentemente sanos, sin eosinofilia y con tres exámenes coproparasitológicos (CPS) negativos.

12.3.2. Muestras de suero de pacientes parasitados.

Para integrar el grupo de sueros de pacientes infectados con *Fasciola hepatica*, se tomó en cuenta que tuvieran cuadro clínico de fasciolosis, eosinofilia y evidencia parasitológica corroborada por la presencia de huevos de *F. hepatica* en los exámenes directo en fresco de contenido duodenal (obtenido con cápsula de Beal o

sondeo duodenal), en el coproparasitoscópico de concentración por sedimentación de Ritchie o por la presencia del adulto en biopsia hepática reportada por Patología.

Para los sueros de pacientes infectados con otros parásitos como quiste hidatídico, *Ascaris lumbricoides*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii* y *Toxocara canis*, se consideró que tuvieran el cuadro clínico compatible con la parasitosis diagnóstica, eosinofilia, evidencia parasitológica y/o serológica.

12.4. Estandarización del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

La prueba de ELISA se estandarizó de acuerdo a lo reportado por Engvall y Perlmann, (1972)²⁷ y Aguirre AM, (1993)⁴⁵ con algunas modificaciones. Se emplearon placas de poliestireno para microtitulación con 96 pozos de fondo plano.

La concentración de proteínas de los dos antígenos se determinó mediante diluciones con amortiguador de carbonatos pH 9.5, de acuerdo al método de Voller y colaboradores (1979)²⁹, en forma de tablero de ajedrez.

Cada pozo se sensibilizó con 100 µL del antígeno correspondiente y se incubó durante toda la noche a 4°C.

Las placas se lavaron tres veces durante 1 minuto y se dejaron en reposo durante 5 minutos con PBS-Tween 20 al 0.1%.

Para bloquear las placas a cada pozo se agregó 200 μ L de albúmina sérica bovina (ASB) al 1% diluída con PBS-Tween 20 al 0.1% y con incubación de una hora a 37°C.

Las placas se lavaron tres veces durante 1 minuto y se incubaron durante 5 minutos entre cada lavado con PBS-Tween 20 al 0.1%.

Se añadieron 100 μ L de suero diluido 1:200 en PBS-Tween 20 al 0.1% y se incubó 30 minutos a 37°C.

El control positivo consistió en una mezcla de sueros de pacientes con fasciolosis.

El control negativo se hizo a base de una mezcla de sueros de pacientes aparentemente sanos.

Se solicitaron muestras de referencia y se enviaron muestras de suero para su evaluación al CDC de Atlanta Georgia, EUA, pero se nos informó que en ese momento no les era posible realizar el diagnóstico de fasciolosis humana. Por consiguiente se emplearon sueros de pacientes parasitados corroborados con examen directo en fresco de contenido duodenal (obtenido con cápsula Beal o sondeo duodenal) o examen CPS de concentración por sedimentación Ritchie o por estudio histopatológico.

Después de la incubación con suero las placas se lavaron tres veces durante 1 minuto y se dejaron en reposo durante 5 minutos entre cada lavado con PBS-Tween 20 al 0.1%.

En cada pozo se depositaron 100 μ L de antigamaglobulina humana conjugada con peroxidasa (IgG-antihumana-peroxidasa), diluida 1:2000 y se incubó durante 30 minutos a 37°C.

Las placas se lavaron tres veces durante 1 minuto y se dejaron en reposo durante 5 minutos con PBS-Tween 20 al 0.1%.

Se agregó a cada pozo 100 μ L del sustrato ortofenilendiamina (OFD) disuelto a una concentración de 0.04% en amortiguador de citratos pH 5.0 adicionado con 0.012% de peróxido de hidrógeno y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos.

La reacción se detuvo con 100 μ L de ácido sulfúrico 2.5 M.

Las placas se leyeron en un lector de ELISA a 490 nm.

Cada ensayo se realizó por duplicado y los resultados se reportaron como cocientes de densidad óptica (CDO) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{CDO} = \frac{\text{DOP}}{\text{DON}}$$

Donde DOP es la densidad óptica a 490 nm del problema y DON es la media más dos desviaciones estándar de las densidades ópticas con el suero normal.⁴⁵

12.4.1. Criterio de positividad en la prueba de ELISA.

El Criterio de positividad (valor de corte) para cada antígeno se determina con la suma de la media más tres desviaciones estándar de los CDO de los sueros de grupo control obtenidos con la prueba de ELISA.

12.4.2. Análisis estadístico.

Para observar las significancia de las diferencias de las medias de los CDO con cada suero, se recurrirá al método gráfico de Dice y Leraas (1936),⁴⁹ que es un método que se emplea para simplificar el análisis estadístico debido a que permite representar en forma gráfica los datos estadísticos como son: la media, la media +/- la desviación estándar, la media +/- dos veces el error estándar y los valores

máximos y mínimos, de los grupos control sano, fasciolosis, céstodos, nemátodos y protozoos, registrados en el ensayo para cada uno de los antígenos. Para determinar la significancia estadística de las medias (del CDO antes mencionado) se empleará la prueba t de Student.^{50,51}

12.4.3. Evaluación serológica.

Los parámetros serológicos (figura 12) se determinaron de la siguiente forma:

- Sensibilidad.

Es la capacidad de una prueba para detectar a los verdaderamente enfermos (proporción de verdaderos positivos). Se obtiene al dividir el número de verdaderos positivos entre el número total de casos que tienen la parasitosis.

- Especificidad.

Es la capacidad de una prueba para detectar a los verdaderos sanos (proporción de verdaderos negativos). Obtenida al dividir el número de casos verdaderos negativos, entre el total de casos que no tienen la parasitosis.

-
- Valor de predicción para un resultado positivo.

Es la probabilidad de que un resultado positivo en el ELISA indique una verdadera infección. Este valor se estima dividiendo el número de verdaderos positivos entre el número total de casos seropositivos.

- Valor de predicción para un resultado negativo.

Es la probabilidad de que un resultado negativo en el ELISA indique verdaderamente ausencia de la parasitosis. Este resultado se estima dividiendo el número de verdaderos negativos entre el número total de casos seronegativos.

- Reactividad cruzada.

Proporción de sueros de individuos infectados con uno o varios parásitos diferentes a *Fasciola hepatica* que fueran positivos a la prueba.

- Eficiencia.

Valor porcentual en el diagnóstico de la infección o enfermedad que se estudia, es decir la capacidad para detectar al individuo infectado (o enfermo) y al sano, dentro de toda la muestra estudiada.

- Índice Kappa.

El índice Kappa es un test de concordancia (o eficiencia) que se basa en la comparación de índices de concordancia esperados (pe) con índices de concordancia observados (po).^{45,52,53}

Se calcula de la siguiente manera:

$$k = \frac{po - pe}{1 - pe}$$

$$\text{Concordancia en el caso (} po \text{)} = \frac{a + d}{n}$$

$$\text{Concordancia para el caso de los positivos (} P \text{)} = \left(\frac{e}{n} \right) \left(\frac{g}{n} \right) \binom{n}{n}$$

$$\text{Concordancia en el caso de negativos (} N \text{)} = f - (g - P)$$

$$\text{Concordancia en el caso (} pe \text{)} = \frac{P + N}{n}$$

FASCIOLOSIS

E		(+)	(-)	Totales
L	(+)	<i>a</i>	<i>b</i>	$a + b = e$
I	(-)	<i>c</i>	<i>d</i>	$c + d = f$
S	Totales	$a + c = g$	$b + d = i$	$a + b + c + d = n$
A				

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{b + d} \times 100$$

$$\text{Valor de predicción positivo} = \frac{a}{a + b} \times 100$$

$$\text{Valor de predicción negativo} = \frac{d}{c + d} \times 100$$

$$\text{Falsos positivos} = \frac{b}{a + b} \times 100$$

$$\text{Falsos negativos} = \frac{c}{c + d} \times 100$$

$$\text{Exactitud} = \frac{a + d}{a + b + c + d} \times 100$$

a = Verdaderos positivos

b = Falsos positivos

c = Falsos negativos

d = Verdaderos negativos

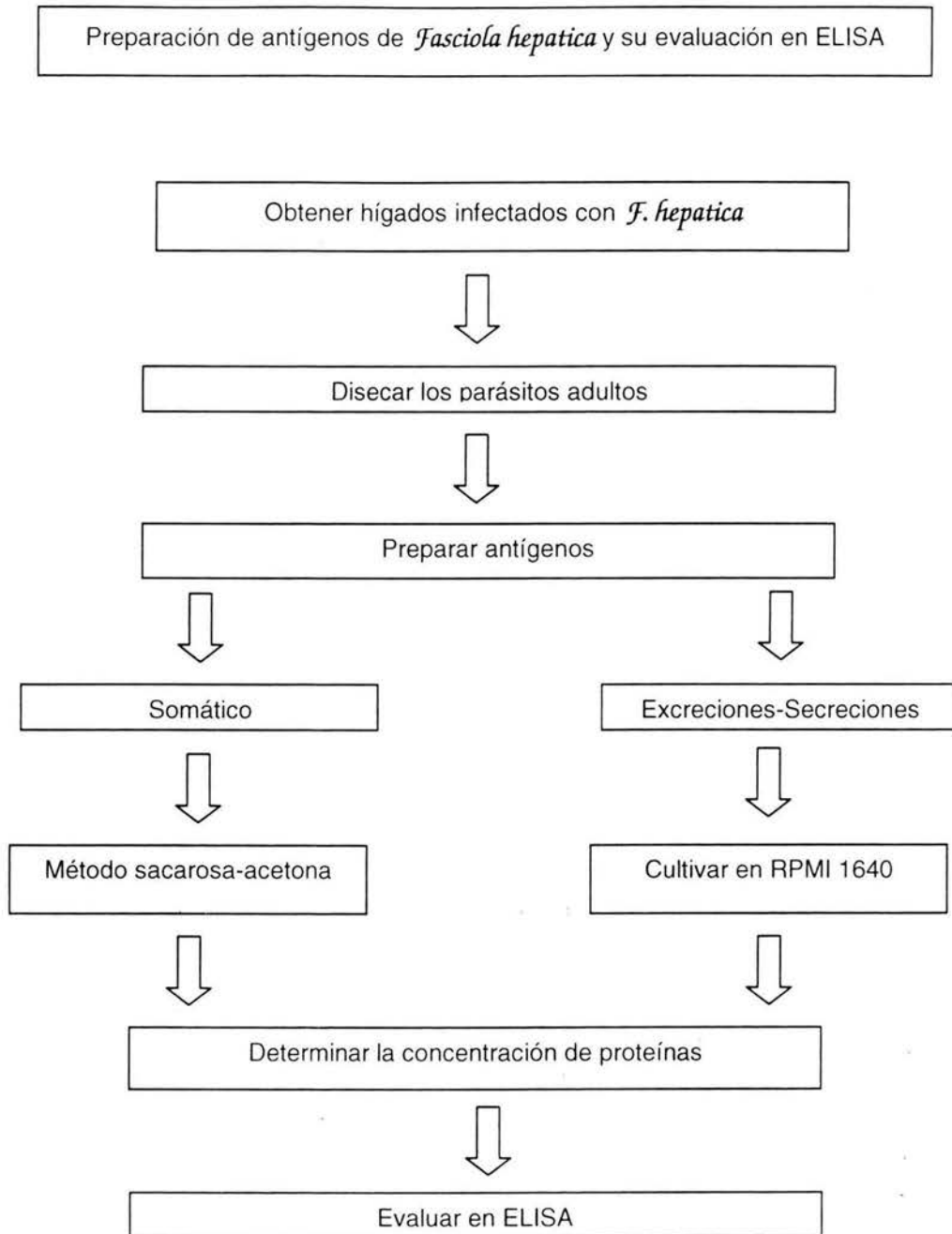
$a + b$ = Total de pruebas positivas

$c + d$ = Total de pruebas negativas

$a + b + c + d$ = Total de individuos con y sin enfermedad

Figura. 12. Cuadro de doble entrada (matriz de decisión).⁵³

13. DIAGRAMA DE FLUJO



14. RESULTADOS

Preparación de antígenos.

Se prepararon dos antígenos de *Fasciola hepatica*, somático y de excreciones-secreciones. Posteriormente se cuantificó la concentración total de proteínas la cual fue de 2.24 mg/mL y 3.4 mg/mL respectivamente para cada antígeno.

Estandarización de la prueba de ELISA.

Se titularon los antígenos, mediante diluciones conforme al método de Voller y colaboradores, en forma de tablero de ajedrez para determinar la concentración de proteínas óptima de trabajo para cada antígeno.

Se realizaron diversos experimentos para determinar las concentraciones y los tiempos de incubación óptimos de: albúmina sérica bovina y de sustrato. También se evaluó la dilución de los sueros para cada antígeno. Todos estos datos se concentraron en el cuadro 1 para su mejor comprensión.

Parámetros técnicos	Compuesto	Concentración	Amortiguador	Tiempo de incubación	Temperatura de incubación
Antígenos	Ag Som Ag E-S	10 µg/mL 10 µg/mL	Carbonatos, 1M pH 9.5	Toda la noche (18 hrs.)	4°C
Bloqueador	ASB	1%	Salina de fosfatos 0.01M pH 7.2, Tween-20 0.1%	1 hora	37°C
Anticuerpo	Suero	1 : 200	Salina de fosfatos 0.01M pH 7.2, Tween-20 0.1%	30 min.	37°C
Conjugado	Antigamaglobulina humana con peroxidasa	1 : 2000 (Inmutec)	Salina de fosfatos 0.01M pH 7.2, Tween-20 0.1%	30 min.	37°C
Sustrato	Orto-fenilendiamina	0.4 mg/mL	Citratos, 0.1 M pH 5.0	20 min. oscuridad	Ambiente (18 a 24°C)
Bloqueador	Ácido sulfúrico	2.5 M	-	-	Ambiente (18 a 24°C)

Cuadro 1. Desarrollo de la técnica de ELISA para los antígenos de *Fasciola hepatica*.

Ag Som = Antígeno somático.

Ag E-S = Antígeno de excreciones-secreciones.

ASB = Albúmina sérica bovina.

Después de que se estandarizó el ELISA para los dos antígenos, éstos se probaron, con cinco grupos de sueros que se integraron de la siguiente forma:

- A) Individuos aparentemente sanos al que se le denominó control sano (n=100).
- B) Pacientes infectados con *Fasciola hepatica* (n=10).
- C) Pacientes infectados con céstodos (n=10).
- D) Pacientes infectados con nemátodos (n=10).
- E) Pacientes infectados con protozoos (n=10).

El criterio de positividad para los dos antígenos (figuras 13 y 14) fue a partir del valor de la media más tres desviaciones estándar de los cocientes de densidad óptica (CDO) del grupo control. Se empleó este criterio debido a que México es una población expuesta a infecciones por helmintos y existe gran posibilidad de cruce inmunológico. Los valores de corte en CDO para los antígenos se presentan en la siguiente tabla (1):

Antígeno	Valor de corte
Somático	3.08
Excreciones-secreciones	2.87

Tabla 1. Valor de corte en CDO para los antígenos de *Fasciola hepatica*.

ANTÍGENO SOMÁTICO

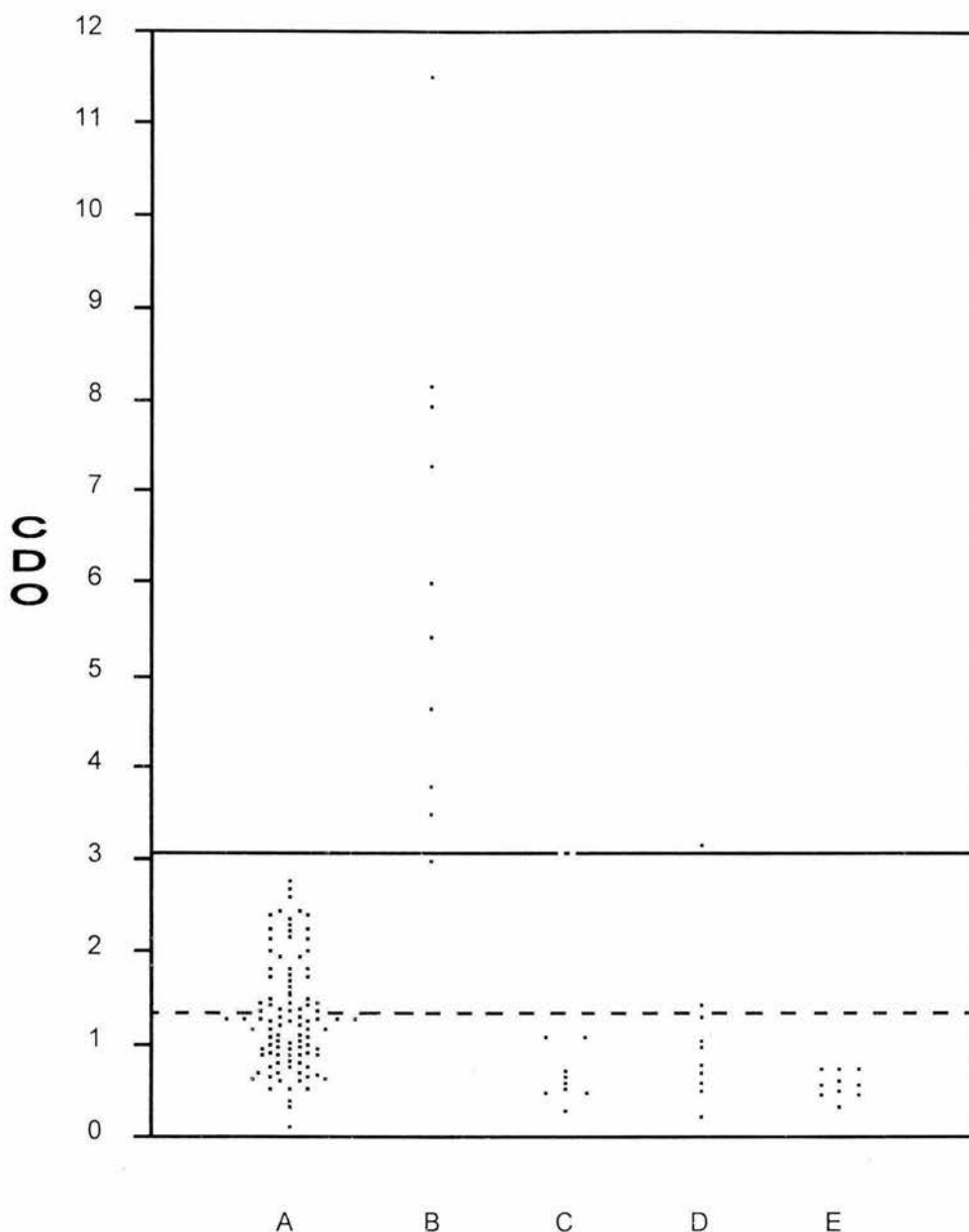


Figura 13. Distribución de los cocientes de densidad óptica (CDO) obtenidos en ELISA con antígeno somático de *Fasciola hepatica* con sueros de individuos: A) control sano, B) fasciolosis, C) céstodos, D) nemátodos, E) protozoos, cada punto representa una muestra de suero. La línea punteada representa el valor de la media de sueros de individuos del control sano y la línea continua indica el valor de la media más tres veces la desviación estándar (valor de corte). Se aprecia que 9 de 10 sueros del grupo de fasciolosis fueron positivos y 28 de 30 sueros con otras parasitosis fueron negativos.

ANTÍGENO DE EXCRECIONES-SECRECIONES

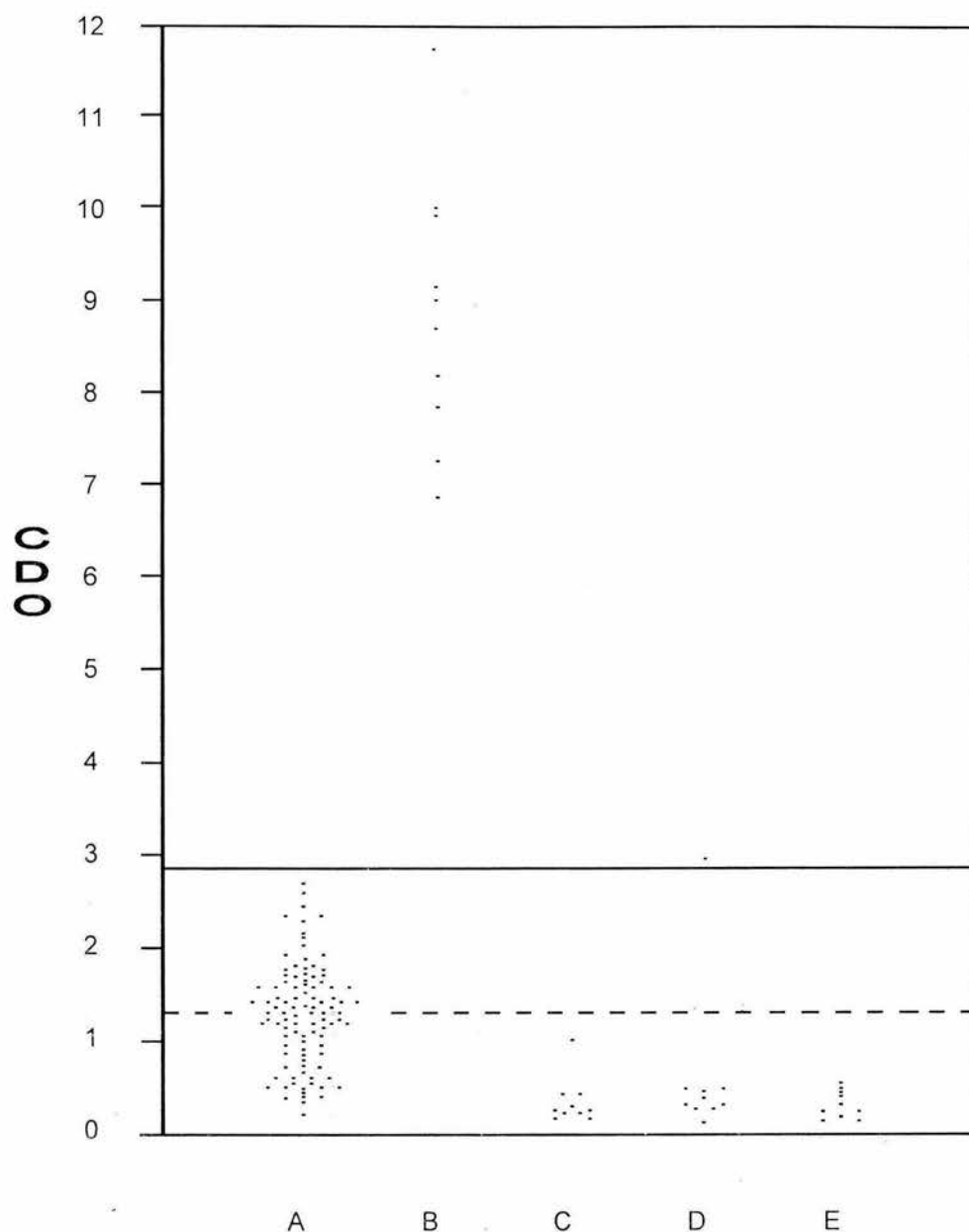


Figura 14. Distribución de los cocientes de densidad óptica (CDO) obtenidos en ELISA con antígeno de excreciones-secreciones de *Fasciola hepatica*. Cada punto representa una muestra de suero y se agrupan como: A) control sano, B) fasciolosis, C) céstodos, D) nemátodos, E) protozoos. La línea punteada representa el valor de la media de sueros de individuos del control sano y la línea continua indica el valor de corte. Se observa que los 10 sueros del grupo de fasciolosis fueron positivos y 29 de 30 sueros con otras parasitosis fueron negativos.

La positividad serológica presente en cada grupo de sueros se resumió en la tabla 2, en donde los valores de positividad más altos fueron para el grupo de pacientes infectados con *Fasciola hepatica*. Para el antígeno somático fue de 90% y se observaron valores de positividad inferiores, para el control sano y protozoos 0%, seguido por los grupos de céstodos y nemátodos 10%. Para el antígeno de excreciones-secreciones la positividad fue de 100%, para los grupos control sano, céstodos y protozoos 0%, seguido por el grupo de nemátodos 10%.

Grupo	Antígeno somático		Antígeno de excreciones-secreciones	
	(+)	(%)	(+)	(%)
Control sano	0	0.0	0	0.0
Fasciolosis	9	90.0	10	100.0
Céstodos	1	10.0	0	0.0
Nemátodos	1	10.0	1	10.0
Protozoos	0	0.0	0	0.0

Tabla 2. Positividad serológica en la prueba de ELISA con antígenos de *Fasciola hepatica*.

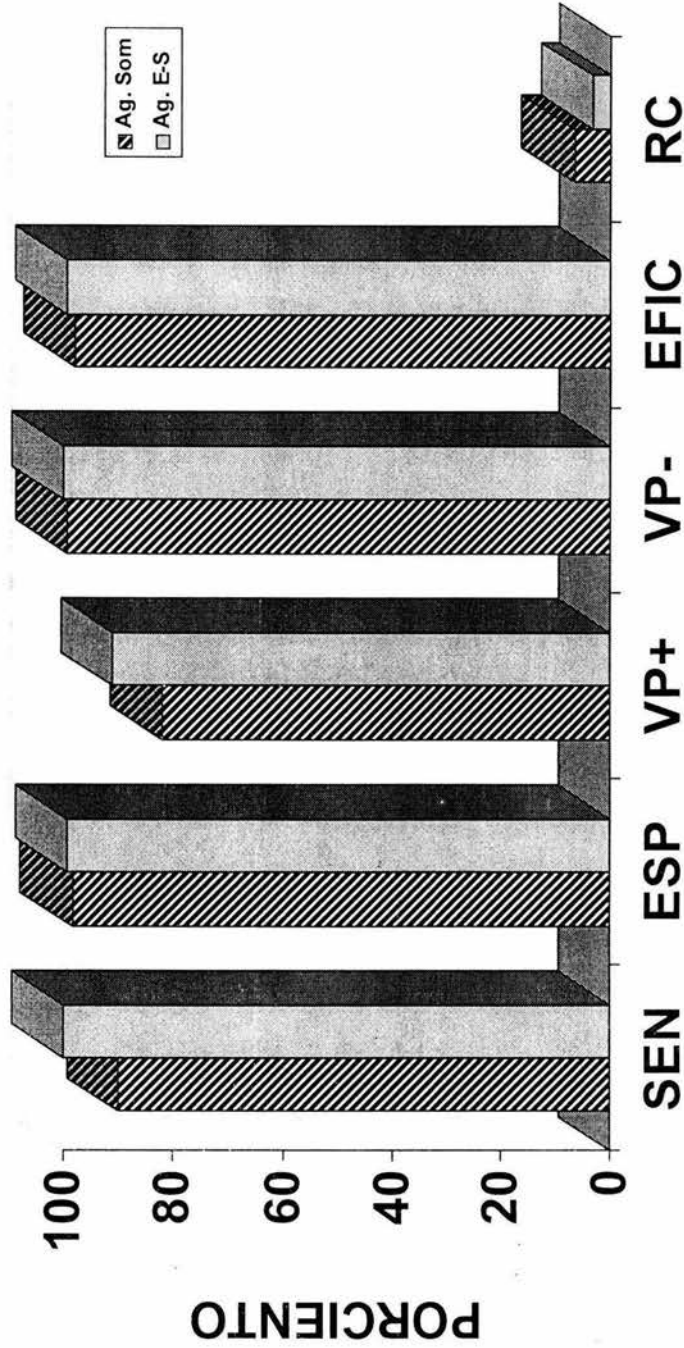
Una vez que se cuantificaron los sueros positivos y negativos de los cinco grupos, se determinaron los parámetros serológicos de sensibilidad, especificidad, valor de predicción positivo y negativo, eficiencia e índice Kappa en ELISA, cuyos resultados se muestran en la tabla 3.

Parámetro	Antígeno somático %	Antígeno de excreciones- secreciones %
Sensibilidad	90.00	100.00
Especificidad	98.46	99.23
Valor de predicción (+)	81.81	90.90
Valor de predicción (-)	99.22	100.00
Eficiencia	97.85	99.28
Índice Kappa	0.84	0.94

Tabla 3. Evaluación serológica de la prueba de ELISA con antígeno de *Fasciola hepatica*.

Al comparar los dos antígenos en términos generales los parámetros serológicos (sensibilidad, especificidad y eficiencia) son superiores para el antígeno de excreciones-secreciones. La reactividad cruzada para el antígeno somático fue 6.66% y para el antígeno de excreciones-secreciones de 3.33% (figura 15).

ANTÍGENOS DE *Fasciola hepatica*
SOMÁTICO VS EXCRECIONES-SECRECIONES



EVALUACIÓN SEROLÓGICA EN ELISA

Figura 15. Comparación de los parámetros de sensibilidad (SEN), especificidad (ESP), valores de predicción positivo (VP+), valores de predicción negativo (VP-), eficiencia (EFIC) y reacciones cruzadas (RC) en ELISA, de los antígenos somático y excreciones-secreciones.

Los datos estadísticos fundamentales como son la media, la media +/- la desviación estándar, media +/- dos veces el error estándar y los valores máximos y mínimos, de los grupos control sano, fasciolosis, céstodos, nemátodos y protozoos, registrados para cada uno de los antígenos en el ensayo, se presentaron en forma gráfica de acuerdo al método de Dice y Leraas,⁴⁹ lo que se observa en las figuras 16 y 17.

También se empleó la prueba estadística t de Student para evaluar la significancia estadística, sólo que con el método gráfico de Dice y Leraas el análisis estadístico es más fácil de apreciar.^{49,51}

Para el antígeno somático (figura 16), el área blanca del grupo de pacientes infectados con *F. hepatica* se observa por arriba de todas las áreas blancas de los grupos control sano, céstodos, nemátodos y protozoos, lo que indica que existe diferencia estadística significativa entre las medias del CDO del grupo infectado con las medias de los otros grupos ya mencionados.

Para el antígeno de excreciones-secreciones (figura 17) se observa un comportamiento similar, sin embargo, el valor de la media del CDO del grupo de fasciolosis es superior al del antígeno somático (8.86 y 6.12 respectivamente).

ANTÍGENO SOMÁTICO

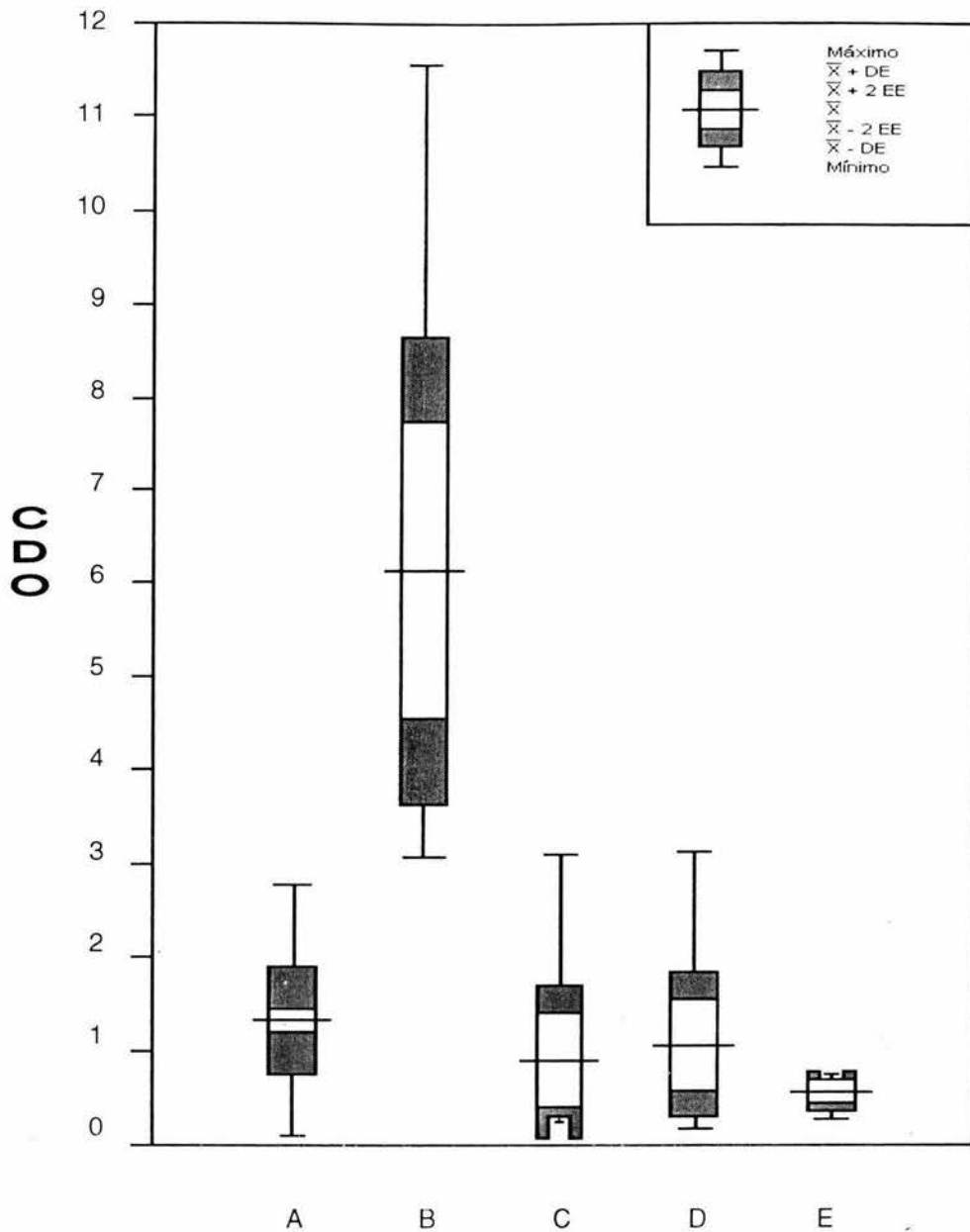


Figura 16. Visualización con base en el método de Dice y Leraas de los cocientes de densidad óptica (CDO) obtenidos en ELISA con antígeno somático de *Fasciola hepatica* con sueros de individuos: A) control sano, B) fasciolosis, C) céstodos, D) nemátodos, E) protozoos. Cuando las áreas blancas se traslapan las diferencias no son significativas.

ANTÍGENO DE EXCRECIONES-SECRECIONES

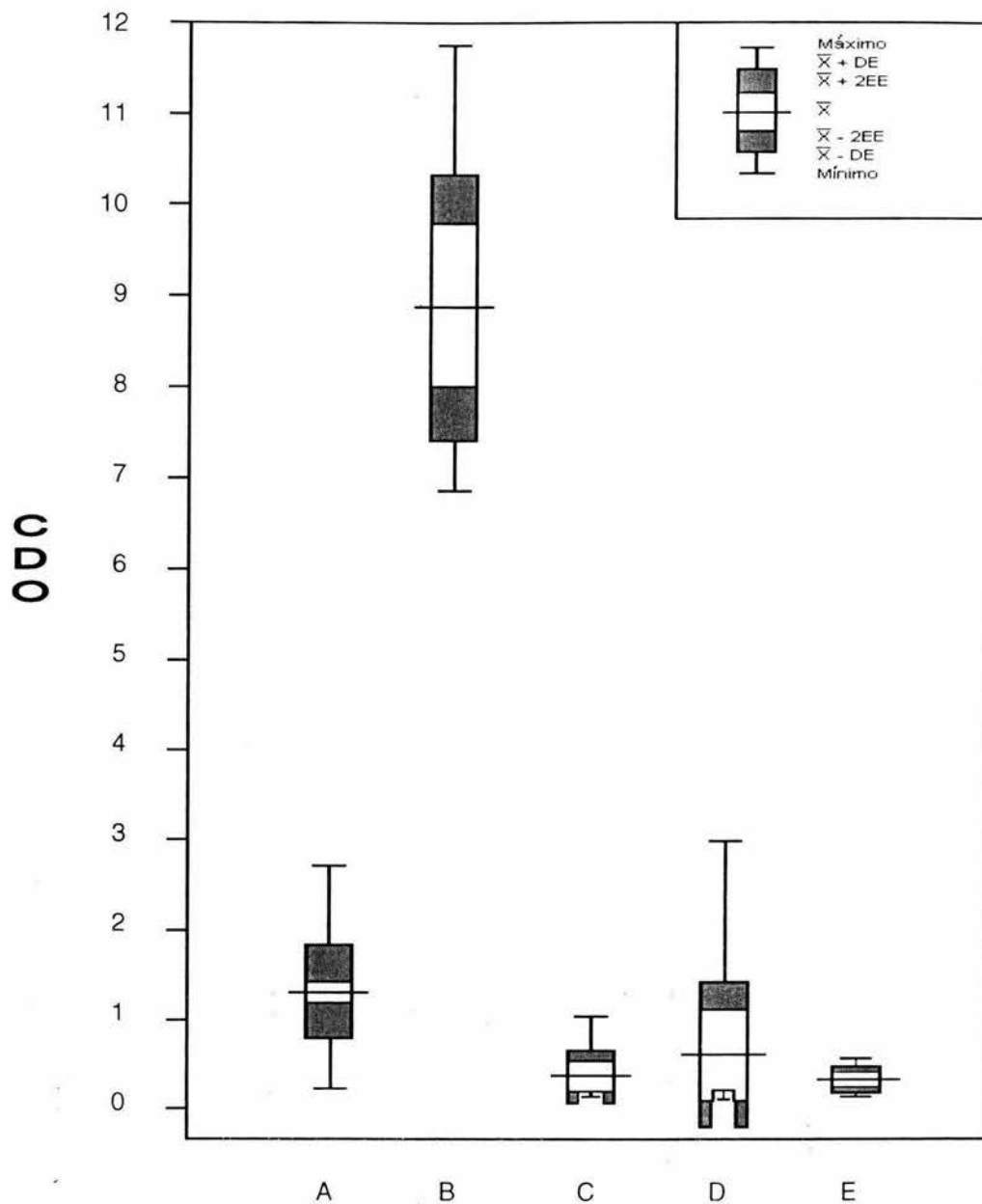


Figura 17. Visualización con base en el método de Dice y Leraas de los cocientes de densidad óptica (CDO) obtenidos en ELISA con antígeno de excrecciones-secreciones de *Fasciola hepatica* con sueros de individuos: A) control sano, B) fasciolosis, C) céstodos, D) nemátodos, E) protozoos. Cuando las áreas blancas coinciden las diferencias no son significativas.

En la figura 17, el grupo de fasciolosis muestra un rango de CDO (6.85 a 11.72) mayor que el de todos los grupos, lo que demuestra que con el antígeno de excreciones-secreciones se establece una marcada diferencia entre las medias de los CDO del grupo infectado con *Fasciola hepatica* en relación los grupos control sano, céstodos, nemátodos y protozoos.

La apreciación visual del método gráfico de Dice y Leraas coincidió con los resultados obtenidos al aplicar la prueba estadística de t de Student con una significancia de $p < 0.001$.

Para comparar la reactividad serológica de los sueros de pacientes infectados con *F. hepatica* a los antígenos somático y de excreciones-secreciones, se trazó una línea entre los puntos obtenidos de los CDO de cada suero para los dos antígenos y se obtuvo la imagen de la figura 18, en donde se evidenció claramente una mayor reactividad de dichos sueros con el antígeno de excreciones-secreciones.

Fasciola hepatica

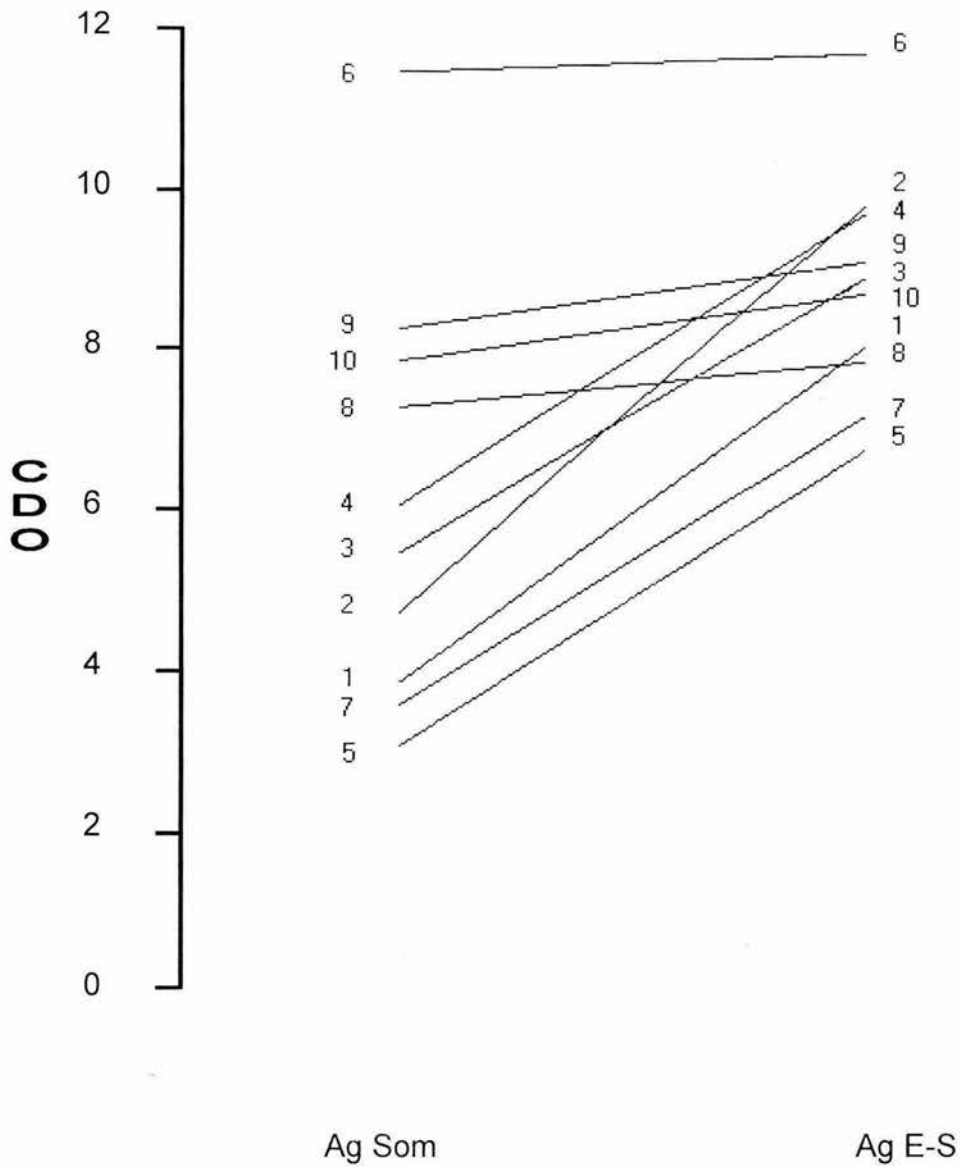


Figura 18. Comparación de la respuesta serológica en ELISA en cocientes de densidad óptica (CDO) contra antígenos somático (Ag Som) y excreciones-secreciones (Ag E-S) de *Fasciola hepatica* obtenida con 10 sueros de pacientes con fasciolosis clínicamente diagnosticada. La respuesta más acentuada hacia el antígeno de excreciones-secreciones, indica una mayor reactividad de los sueros hacia este antígeno.

15. DISCUSIÓN

Para elaborar los antígenos somático y de excreciones-secreciones de adulto, es necesario acudir a varios rastros municipales para obtener hígados de ganado ovino y bovino infectados con *Fasciola hepatica*, ya que los hígados aún con calcificaciones pueden tener pocos o ningún parásito y además la disección de los hígados debe ser cuidadosa dado que para la preparación de los antígenos se requieren parásitos íntegros y viables.

Al realizar el cultivo *in vitro* de los parásitos se extremaron las condiciones de esterilidad para evitar el riesgo de contaminación bacteriana y fúngica que pueden aportar proteínas inespecíficas al antígeno de excreciones-secreciones.

El valor de corte para cada antígeno se determinó con el valor de la media más tres desviaciones estándar del grupo control sano (figuras 13 y 14), fue por esta razón que en los dos antígenos se obtuvo una especificidad alta. Se empleó este criterio debido a que México es una población expuesta a infecciones por helmintos y existe gran posibilidad de cruce inmunológico.

Con este criterio en el antígeno somático, la sensibilidad (90%) disminuyó en relación a la del antígeno de excreciones-secreciones (100%) la cual se habría visto relativamente más favorecida si el valor de corte se hubiera determinado con la media más dos desviaciones estándar (tabla 3).

Los valores de los parámetros serológicos de sensibilidad (100%) y especificidad (99.23%), para el antígeno de excreciones-secreciones fueron superiores a los obtenidos por Sampaio S.M,¹⁸ quien utilizó productos de excreciones-secreciones como antígeno en ELISA y reportó una sensibilidad de 95% y una especificidad de 97%. El valor de sensibilidad (100%) coincidió con la reportada por Carnevale S.⁴¹ que evaluó el ELISA para detectar anticuerpos anti-*Fasciola hepatica* en humanos usando antígeno de excreciones-secreciones y obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100%.

Los valores de sensibilidad y especificidad tan altos para el antígeno de excreciones-secreciones, al parecer se debe a que los parásitos adultos de *F. hepatica* se incubaron en el medio de cultivo *in vitro* 16 horas a 37°C y como mencionan Dalton³⁴ y O'Neill⁴⁶ con esta metodología se logra obtener antígeno de excreciones-secreciones en un período de tiempo más corto y con menor cantidad de moléculas no reactivas y se evita o disminuye el cruce inmunológico. Esta última apreciación se corrobora en el presente trabajo porque el cruce inmunológico para el antígeno de excreciones-secreciones (3.33%) fue inferior que el del antígeno somático (6.66%).

Otras investigaciones que confirman lo antes mencionado son las de Daveau y Ambroise Thomas (1982), quienes utilizaron productos de excreciones-secreciones de 7 días de incubación y reportaron fuertes reacciones cruzadas con otros parásitos, en cambio Espino y colaboradores, emplearon productos de excreciones-secreciones de 24 horas de incubación con IgG ELISA en el diagnóstico de

fasciolosis crónica y reportaron que el ensayo fue sensible, específico y económico, además mencionan que existe identidad entre los antígenos obtenidos *in vitro* y los excretados por el parásito *in vivo*.^{40,47}

Por otra parte Cordova y colaboradores (1999),⁵⁴ evidenciaron que el antígeno de excreciones-secreciones de adulto, tiene abundantes cisteína proteinasas, estas proteasas han demostrado ser antígenos inmunodominantes de la infección humana, por ello han resultado ser más específicos para el diagnóstico serológico de fasciolosis.

En general los valores de los parámetros serológicos de sensibilidad y especificidad fueron superiores para el antígeno de excreciones-secreciones que para el antígeno somático, por tal razón también los valores de predicción positivo, negativo, eficiencia, e índice Kappa en ELISA fueron superiores para dicho antígeno.

El método de Dice y Leraas⁴⁹ se empleó para simplificar el análisis estadístico debido a que permite representar en forma gráfica los datos estadísticos como son: la media, la media +/- la desviación estándar, la media +/- dos veces el error estándar y los valores máximos y mínimos, de los grupos control sano, infectados con *Fasciola hepatica*, céstodos, nemátodos y protozoos, registrados en el ensayo para cada uno de los antígenos (figuras 16 y 17).

Al realizar la prueba t de Student^{50,51} se determinó que la diferencia entre las medias es estadísticamente significativa, es decir que la media del grupo infectado con fasciolosis es superior (t de Student $p < 0.001$) a la de los grupos control sano, céstodos, nemátodos y protozoos, lo cual coincide con el método gráfico de Dice y Leraas.

16. CONCLUSIONES

Una vez que se superan las contingencias para la obtención de hígados parasitados con *Fasciola hepatica*, es factible preparar los antígenos somático y de excreciones-secreciones en adecuada cantidad para realizar diagnóstico de laboratorio y estudios seroepidemiológicos.

Es posible utilizar ELISA para el diagnóstico serológico de la fasciolosis humana.

La evaluación de los antígenos con ELISA, indica que los mejores valores de cada parámetro se obtienen para el antígeno de excreciones-secreciones.

A pesar de que existen anticuerpos de reacción cruzada producidos por otros helmintos tisulares que son detectados con ELISA con ambos antígenos, esto sucede en menor proporción cuando se emplea el antígeno de excreciones-secreciones.

Los resultados confirman que en el 90% de los casos para el antígeno somático y en el 100% para el antígeno de excreciones-secreciones, es posible diferenciar serológicamente a los pacientes con cuadro clínico hepático por fasciolosis de los originados por otros agentes etiológicos parasitarios.

17. RECOMENDACIONES

- a) Purificar y caracterizar los antígenos de *Fasciola hepatica*.
- b) Identificar los antígenos inmunodominantes reconocidos en la infección humana, esencial para entender la respuesta inmune.
- c) Elaborar antígeno de excreciones-secreciones de *F. hepatica* en cantidad suficiente para ponerlo al alcance de los laboratorios estatales y de esta forma puedan implementar el ELISA para el inmunodiagnóstico de fasciolosis.
- d) Evaluar la prevalencia de fasciolosis humana en México.

18. ANEXOS

Solución 1. Solución salina isotónica (0.85%).

- Pesar 8.5 g de cloruro de sodio (NaCl)
- Disolver la sal en 1000 mL de agua destilada.

Solución 2. Solución salina de fosfatos 0.01 M, NaCl 0.15 M, pH 7.2 (PBS).

- Medir 800 mL de agua destilada.
- Agregar 100 mL de *PB 10X y 8.75 g de NaCl.
- Disolver las sales y ajustar el pH a 7.2
- Aforar a 1000 mL con agua bidestilada.
- Guardar a 4°C.

*PB 10X. 2.62 g de ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) fosfato de sodio monobásico monohidratado + 11.5 g de (Na_2HPO_4) fosfato de sodio dibásico anhidro. Disolver en 200 mL de agua bidestilada (calentar un poco hasta disolver los cristales) aforar a 1000 mL con agua bidestilada.

Solución 3. PBS-Tween 20, 0.1%

- A 500 mL de PBS pH 7.2 (solución 2) añadir 500 μL de Tween 20.
- Guardar a 4°C.

Solución 4. Solución de sacarosa (C₁₂H₂₂O₁₁) 0.25 M

- Pesar 85.57 g de sacarosa, disolver y aforar en agua bidestilada a 1000 mL.

Solución 5. Medio de RPMI 1640 pH 7.2, conteniendo 2 % de glucosa, 30 mM de HEPES, 80 µg/mL de gentamicina.

- Pesar 10.45 g de RPMI 1640.
- Pesar 0.20 g de HEPES.
- Pesar 20 g de glucosa.
- Pesar 80 mg de gentamicina.
- Disolver todos los reactivos en un vaso de precipitados de 1 L en agua bidestilada y agitar constantemente.
- Ajustar el pH a 7.2
- Aforar a 1000 mL.
- Filtrar en membrana de celulosa de 0.22 µm de diámetro.
- Guardar a 4°C.

Solución 6. Solución amortiguadora de carbonatos 1 M, pH 9.5

- Pesar 7.0 g de carbonato de sodio (CaCO₃).
- Pesar 2.8 g de bicarbonato de sodio (NaHCO₃).
- Disolver en agua bidestilada.
- Ajustar el pH a 9.5
- Aforar a 1000 mL.

Solución 7. Solución de albúmina sérica bovina (ASB), 1% en PBS-Tween 20.

-Por cada mL de solución de PBS-Tween 20 pH 7.2, agregar 0.001 g de ASB.

Solución 8. Solución de ácido sulfúrico 2.5 M ($\delta=1.84$ g/mL, 98% pureza).

-Tomar 136 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4).

-Añadir cuidadosamente a 850 mL de agua bidestilada y aforar a 1000 mL.

Solución 9. Solución amortiguadora de citratos, 0.1M pH 5.0

-Pesar 14.2 g de fosfato disódico (Na_2HPO_4).

-Pesar 9.34 g de ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$).

-Disolver en agua bidestilada.

-Ajustar el pH a 5.0

-Aforar a 1000 mL.

Solución 10. Solución de cromógeno/sustrato (ELISA) para peroxidasa.

-Por cada mL de solución buffer de citratos pH 5.0, se adicionan 0.0004 g de ortofenilendiamina (OFD) con peróxido de hidrógeno al 0.012%.

17. REFERENCIAS

1. Tay ZJ, Gutiérrez QM, Rodríguez QM, López MR, Romero CR. Microbiología y parasitología médicas. México: Méndez Editores, 1993: 3.163-3.170.
2. Schmidt GD, Roberts LS. Fundamentos de parasitología. México: Continental, 1984: 319-323.
3. Sánchez SS, Rojas OS, Reed SG, Torres SM. Fasciolosis hepatobiliar masiva. Rev Gastroenterol Mex 2000; 64:179-183.
4. Nava C, Metlich AM, Martí MM, Fascioliasis hepática: informe de un caso de fascioliasis coledociana. Rev Invest Clín 1974; 26: 181-185.
5. Palacio VF, López RH, Ayala AM, Valdez PE, Waller GA. Fasciolosis en vías biliares extrahepáticas. Rev Gastroent Mex 1983; 48: 99-101.
6. Iturralde AJC, López PM, Viniegra P, Ibarrola JL. Fasciolosis del colédoco: informe de un caso y revisión de la literatura. Rev Méd IMSS 1979; 18: 271-275.
7. Tay ZJ, Lara AR, Velasco CO, Gutiérrez QM. Parasitología médica. 6ª ed. México: Méndez Editores, 1996: 234-260.
8. Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. Parasitología clínica. 2ª ed. Barcelona: Salvat Editores, 1986: 488-491.
9. López LM, Hernández S, Acuña AM, Nari A. Fascioliasis en la República Oriental de Uruguay. Rev Med Uru 1999; 1: 1-13.
10. García LS, Bruckner DA. Diagnostic medical parasitology. New York: Elsevier, 1988: 250-254, 257-258.

-
11. Zaman V. Atlas color de parasitología clínica. 2ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1988: 260.
 12. Quiroz RE. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. México: Limusa, 1984: 232-251.
 13. Chen MG. Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literatura. Trop Dis Bull 1990; 87: 2-34
 14. Sánchez MI. Fascioliasis coledociana en México. Cir Gen 1996; 18: 201-204.
 15. O'Neill SM, Parkinson M, Dowd AJ, Strauss W, Angles R, Dalton JP. Immunodiagnosis of human fascioliasis using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L1 cisteine proteinase. Am J Trop Med Hyg 1999; 60: 749-751.
 16. Tolan RW. Fascioliasis. Med J 2001; 2: 1-13
 17. Atías A, Neghme A. Parasitología clínica. 2ª ed. Chile: Publicaciones técnicas Mediterraneo, 1984: 301-307.
 18. Sampaio LM, Correia Da Costa MJ, Da Costa VAM, y cols. Antigenic components of excretory-secretory products of adult *Fasciola hepatica* recognized in human infections. Am J Trop Med Hyg 1996; 54: 146-148.
 19. De Haro AI, Salazar SP, Cabrera BM. Diagnóstico morfológico de las parasitosis. 2ª ed. México: Méndez Editores, 1995: 105-107.
 20. Lamothe AR, Prieto GL. Helmintiasis del hombre en México. México: AGT Editor, 1988: 1-13.
 21. Rojas EO. Inmunología. México: Editorial Médica Panamericana, 1996: 119-120.

-
22. Stites PD, Terr IA, Parslow GT. Inmunología básica y clínica. 10ª ed. México: El Manual Moderno, 1998: 244-246.
23. Henry JB. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 9ª ed. Barcelona: Masson Salvat, 1993: 885-886.
24. Hudson L, Hay CF. Inmunología práctica. Barcelona: Jims, 1979: 133-135.
25. Hillyer VG. Immunodiagnosis of human fascioliasis by counter-electrophoresis. J Parasitol 1975; 61: 557-559
26. Flores CR, Quiroz RE, Ibarra VF. Fascioliasis. México: INIFAP, 1986: 221-222.
27. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. J Immunol 1972; 109: 129-135
28. Correa D, Mandujano A, Medina Y. Manual de técnicas modernas en inmunología. México: INDRE, SSA 2000: 15-24.
29. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. USA: Dynatech Laboratories INC, 1979: 125.
30. Ternynck T, Avrameas S. Técnicas inmunoenzimáticas. México: Iberoamérica, 1989.
31. Voller A, De Savigny D. Diagnostic serology of tropical parasitic diseases. J Immunol Methods 1981; 46: 1-29.
32. Lehner RP, Sewell MH. A study of the antigens produced by adult *Fasciola hepatica* maintained *in vitro*. Parasite immunol 1980; 2: 99-109.

-
33. Shehab YA, Hassan ME, Abou BM y cols. Detection of circulating E/S antigens in the sera of patients with fascioliasis by IELISA: a tool of serodiagnosis and assessment of cure. *Trop Med Inter Health* 1999; 4: 686-690.
 34. Dalton PJ, Heffernan M. Thiol proteases released *in vitro* by *Fasciola hepatica*. *Mol Bioch Parasitol* 1989; 35: 161-166.
 35. Córdova M, Herrera P, Nopo L, Bellatin J y cols. *Fasciola hepatica* cysteine proteinases: immunodominant antigens in human fascioliasis. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57: 660-667.
 36. Smith AM, Dowd AJ, McGonigle S y cols. Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 62: 1-8.
 37. Smith AM, McGonigle S, Dalton JP. Purification and characterization of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. *Eur J Biochem* 1994; 223: 91-98.
 38. Mckerrow JH. Parasite proteases. *Exp Parasitol* 1989; 68: 111-115.
 39. Ruiz-Navarrete MA, Arriaga C, Bautista CR, Morilla A. *Fasciola hepatica*: characterization of somatic and excretory-secretory antigens of adult flukes recognized by infected sheep. *Rev Lat Amer Microbiol* 1993; 35: 301-307.
 40. Espino AM, Duménigo BE, Fernández R, Finlay CM. Inmunidiagnosis of human fascioliasis by enzyme-linked immunosorbent assay using excretory-secretory products. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 37: 605-607.

-
41. Carnevale S, Rodríguez IM, Santillán G y cols. Immunodiagnosis of human fascioliasis by and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a micro-ELISA. Clin Diag Lab Immunol 2001; 8: 174-177.
 42. Alonso MJ, Amérigo GMJ, Álvarez RL, Erdozain RI. Fascioliasis humana con presentación atípica y grave. Tratamiento con Triclabendazol 1998; 16: 28-30.
 43. Rossignol JF, Abaza H, Friedman H. Successful treatment of human fascioliasis with nitazoxanida. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1998; 92: 103-104.
 44. Romero CR. Microbiología y parasitología humana. 2ª ed. México: Editorial Panamericana, 1999: 705-708.
 45. Aguirre AM. Tesis M en C. Elaboración de antígenos de *Toxocara canis* y su evaluación con la técnica de ELISA. UNAM, 1993: 45-55.
 46. O' Neill SM, Parkinson M, Strauss W y cols. Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* infection (fascioliasis) in a human population in the Bolivian altiplano using purified cathepsin L cysteine proteinase. Am J Trop Med Hyg 1998; 58: 417-423.
 47. Espino A, Borges A, Duménigo BE. Coproantígenos de *Fasciola hepatica* de posible utilidad en el diagnóstico de la fascioliasis. Rev Panam Salud Pública 2000; 7: 225-231.
 48. Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.

-
49. Dice L, Leraas H. A graphic method for comparing several sets of measurements: contributions from the laboratory of vertebrate genetics. American academy of arts & sciences 1936; 1: 1-3.
 50. Taro Y. Estadística. México: Editorial Harper & Row Latinoamericana, 1979: 336-351,737.
 51. Savin C, Márquez J, López RLM, Bojórquez Luis M. Biología: interacción de experimentos e ideas. México: Limusa, 1974: 101-108.
 52. Manual de Procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología. OPS/OMS. 1994. 13-22.
 53. Fescina R, Simini R, Belitzky R. Evaluación de los procedimientos diagnósticos, aspectos metodológicos. Salud Perinatal 1985; 2: 39-44.
 54. Córdova M, Reátegui L, Espinoza JR. Immunodiagnosis of human fascioliasis with *Fasciola hepatica* cysteine proteinases. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1999; 93: 54-57.