

Conservación de heces humanas para la detección de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*

Preservation of human stools for the detection of *Fasciola hepatica* excretory secretory antigens

Ingrid Domenech Cañete^I; Ricardo Marcet Sánchez^{II}; Mabel Figueredo Pino^{III}; Jorge Sarracent Pérez^{IV}

^I Máster en Infectología. Especialista de I Grado en Microbiología. Departamento de Parasitología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Ciudad de La Habana, Cuba.

^{II} Licenciado en Bioquímica. Departamento de Parasitología. IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

^{III} Técnico en Química. Departamento de Parasitología. IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

^{IV} Doctor en Ciencias Biológicas. Licenciado en Bioquímica. Departamento de Parasitología. IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: la fasciolosis en Cuba es una enfermedad endémica en el ganado y en los últimos años ha tenido un incremento en el número de casos reportados en humanos.

OBJETIVOS: por causa de las dificultades para realizar el diagnóstico de esta enfermedad en zonas rurales o alejadas del laboratorio se ha hecho necesario buscar soluciones preservantes, que permitan conservar las muestras de heces hasta el momento de la determinación de antígeno por el método de FasciDIG[®].

MÉTODOS: se utilizaron diferentes soluciones preservantes (dicromato de potasio 2 %, hibitane acuoso 0,5 %, glutaral 2 %, cloruro de benzalconio 1 %, azida sódica 0,04 % y agua destilada con *tween* 20 0,05 %) a temperatura ambiente, 4 °C y - 20 °C.

RESULTADOS: en las muestras preservadas a temperatura ambiente, las que no tenían preservante sufrieron un gran deterioro, mostraron valores superiores a las conservadas con agua *tween* 20 y con azida sódica. Esta última es un producto altamente tóxico, por ser un inhibidor de la cadena respiratoria y requeriría de un mayor cuidado en su utilización.

CONCLUSIONES: se sugiere que la solución preservante de agua destilada con

tween 20 0,05 % a temperatura ambiente mostró los mejores resultados en el estudio.

Palabras clave: *Fasciola hepatica*, conservación, diagnóstico.

ABSTRACT

INTRODUCTION: fascioliasis is an endemic disease in cattle in Cuba, but in the last few years, there has been an increase in the number of reported human cases.

OBJECTIVES: the difficulties in diagnosing this disease in rural areas or in zones far away from the laboratory make it necessary to find adequate solutions that allow preserving the stool specimens until the antigen is detected by the FasciDIG® method.

METHODS: several preserving solutions were used (2 % potassium dichromate, 0,5 % aqueous hibitane, 2 % glutaral, 1 % benzalkonium chloride, 0,04% sodic azide and 0,05 % distilled water with 20 tween) at room temperature, 4 °C and - 20 °C.

RESULTS: among the samples kept at room temperature, those with no preserve suffered a significant deterioration, and their values were higher than the ones of the samples conserved with distilled water with tween 20 and with sodium azide. The latter is a very toxic product and its use would require a greater care.

CONCLUSIONS: 0,05 % distilled water with 20 tween at room temperature was the preserving solution with the best results in this study.

Key words: *Fasciola hepatica*, preservation, diagnosis.

INTRODUCCIÓN

La fasciolosis producida por *Fasciola hepatica* es una enfermedad zoonótica de gran importancia médico-veterinaria. A pesar de que la infección humana es menos común que la animal,¹ en los últimos 25 años se ha informado un total de 6 848 casos en 51 países. En Cuba la enfermedad es endémica en el ganado y se presenta en humanos en forma de casos esporádicos y brotes epidémicos.^{2,3}

El diagnóstico en humanos está basado en el hallazgo de los huevos del parásito en las heces o en el fluido duodenal, pero este presenta serias dificultades, dado fundamentalmente por la eliminación de los huevos de forma intermitente por el parásito y por errores en el diagnóstico de laboratorio. Esto ha ocasionado que los sistemas inmunoenzimáticos de determinación de antígenos de excreción-secreción (AgES) del parásito constituyan una alternativa necesaria e indispensable para lograr este objetivo.^{4,5}

Cuba cuenta con el ensayo inmunoenzimático FasciDIG®, desarrollado en el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", altamente sensible y específico, que emplea el anticuerpo monoclonal (AcM) ES-78 y un conjugado peroxidasa-Ac policlonal obtenido en conejos, ambos contra antígenos de excreción-secreción de adultos de *F. hepatica*.⁶⁻⁸

Dada la importancia del diagnóstico de *F. hepatica* en zonas rurales y conociendo las dificultades que existen en la conservación y transportación de las muestras,⁹ se ha hecho necesario la búsqueda de preservantes que garanticen su estabilidad, a temperatura ambiente por períodos de tiempo más o menos prolongados. Es por ello que se trazó como objetivo de este trabajo, utilizar diferentes soluciones preservantes de uso frecuente en los laboratorios de Cuba, y evaluar cuáles podrían ser útiles en la conservación de heces para su uso en el sistema de detección de antígenos de *F. hepatica*, a través del ensayo inmunoenzimático FasciDIG[®].⁶⁻⁸

Para la realización de un sistema simulado, se utilizaron 50 g de una mezcla de heces humanas procedentes de personas que resultaron negativas al examen parasitológico (examen directo con eosina y lugol, métodos de concentración de Willis, Ritchie y copa cónica). A la mezcla se le añadieron 100 mL de agua destilada, se dejó en reposo durante 20 min. Al sobrenadante colectado se le adicionó una solución de Ag ES de *F. hepatica* para una concentración final de 1 µg/mL (concentración saturante) en la solución de heces.⁹ Esta solución fue distribuida en frascos a los que se les añadieron diferentes sustancias como preservante: dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) 2 %, hibitane acuoso (clorhexidina) 0,5 %, glutaral (glutaraldehído) 2 %, cloruro de benzalconio (cloruro de lauril dimetil bencil amonio) 1 %, azida sódica (NaN₃) 0,04 % y agua destilada con *tween* 20 (polioxietileno sorbitano monolaureato) 0,05 %, a razón de 2 partes del preservante por 4 partes de solución de heces. Posteriormente, alícuotas de estas soluciones fueron sometidas a diferentes temperaturas (temperatura ambiente, TA: 27 °C - 30 °C; 4 °C y - 20 °C) durante diferentes tiempos (0, 7 y 30 d). Un control con antígeno al que no se le adicionó preservante y otro sin antígeno y sin preservante, fueron también incluidos en el estudio. Seguidamente, se procedió a la realización del ensayo inmunoenzimático FasciDIG[®] para la detección de antígeno. Se hicieron los experimentos por separado bajo las mismas condiciones de trabajo.

La solución de glutaral 2 % es el único de los antisépticos utilizados que mostró un efecto negativo drástico a todas las temperaturas, sobre el epítipo que reconoce el anticuerpo monoclonal ES-78 en el sistema FasciDIG[®]. El glutaral tiene efecto alquilante sobre las proteínas y provoca cambios estructurales en estas.¹⁰ Conociendo la naturaleza glicoproteica del antígeno de *F. hepatica* reconocido por el anticuerpo monoclonal ES-78,¹¹ se puede inferir que esta sustancia afecta la estructura del epítipo ([Fig. A, B y C](#)).

En las muestras positivas conservadas a 20 °C, se obtuvo disminución en las densidades ópticas a los 7 y a los 30 d con todas las soluciones preservantes, en relación con el control sin preservante, por lo que los autores de este trabajo sugieren que si la muestra se va a conservar a 20 °C es mejor mantenerla sin preservantes ([Fig. A](#)).

En las muestras conservadas a 4 °C, el hibitane acuoso 0,05 % y el agua más *tween* 20 0,05 % fueron los que mejores resultados mostraron. Un valor inferior se obtuvo con el cloruro de benzalconio. También la muestra control sin preservante a esta temperatura se mantuvo en buen estado por 30 d ([Fig. B](#)). Es de tener en cuenta que el hibitane y el cloruro de benzalconio son sustancias irritantes y cancerígenas, por lo que en estas condiciones de temperatura se consideró mantener la preparación de heces en agua *tween* 20 como preservante.

En las muestras preservadas a temperatura ambiente, principal objetivo de este estudio, las muestras sin preservante sufrieron un gran deterioro, mostraron valores superiores a las conservadas con agua *tween* 20 y con azida sódica ([Fig. A](#)). La azida sódica es un producto altamente tóxico por ser un inhibidor de la cadena respiratoria, y requeriría de un mayor cuidado en su utilización.

Varios autores plantean la importancia de utilizar preservantes poco tóxicos y de bajo costo. En los últimos años muchos laboratorios han propiciado la búsqueda de diferentes preservantes de heces, libres de mercurio y formalina, que no traigan afectaciones morfológicas a los huevos y quistes vistos en el diagnóstico parasitológico.¹² Por otra parte, también se buscan preservantes que no traigan afectaciones en las estructuras antigénicas reconocidas en los sistemas de detección de antígenos en muestras de heces.¹³

Teniendo en cuenta estos resultados para el ensayo inmunoenzimático FasciDIG[®], se recomienda que la conservación de las muestras de heces a - 20 °C debe realizarse sin adicionarles preservos. Las muestras a temperatura de 4 °C sin preservantes o preparadas en agua *tween* 20 se pueden mantener hasta 1 mes. En caso de que no sea posible almacenar las muestras en condiciones de refrigeración, los autores del presente trabajo recomiendan el uso de agua *tween* 20 como preservante durante el tiempo que se conserve hasta la aplicación del procedimiento inmunoensayo enzimático.

Estudios posteriores deben realizarse para evaluar los preservantes seleccionados a las diferentes condiciones de almacenamiento, en muestras de heces de pacientes diagnosticados con *Fasciola hepatica*.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Roberto Hernández Merlo por su colaboración técnica para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Esteban JG, Barguez MD, and Mas-Coma S. Geographical distribution diagnosis and treatment of human fascioliasis: a review. *Rev Res Parasitol.* 1998;58:13-42.
2. González JF, Pérez O, Rodríguez G, Aros E, Lastre M. Fascioliasis humana epidémica, Cuba 1983. VI. Estudio clínico de 44 adultos del Hospital General de Fomento. *GEN.* 1985;39:276-81.
3. Espino AM, Díaz A, Perez A, Finlay CM. Detection of antigenemia and coproantigens during a human *Fasciola hepatica* outbreak. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2723-6.
4. Nagaty IM, Hegazi MM. Dot-ELISA copro-antigen and direct stool examination in diagnosis of giardiasis patients. *J Egypt Soc Parasitol.* 2007;37:641-8.
5. El Shazly AM, Soltan DM, El-Sheikha HM, Sadek GS, Morsy AT. Correlation of ELISA copro-antigen and oocysts count to the severity of *Cryptosporidium parvum* in children. *J Egypt Soc Parasitol.* 2007;37:107-20.
6. Espino AM, Marcet R, Finlay CM. Detection of circulating excretory secretory antigens in human fascioliasis by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 1990;28:2637-40.

7. Espino, A.M and Finlay, C.M. Sandwich enzyme-linked immunosorbent Assay for Detection of Excretory Secretory Antigens in Humans With Fascioliasis. J Clin Microbiol. 1994; 32: 190-3.
8. Dumenigo BE, Espino AM, Finlay CM, Detection of *Fasciola hepatica* antigen in cattle faeces by a monoclonal antibody - based sandwich immunoassay. Res Vet Sci. 1996; 60: 278-9.
9. Espino AM. Inmunodiagnóstico de la fasciolosis humana y su aplicación en brotes epidémicos [Tesis para Doctor en Ciencias Médicas]. Ciudad de La Habana: IPK; 2005.
10. Fedorko DP, Williams EC, Nelson NA, Calhoun LB, Yan SS. Performance of three enzyme immunoassays and two direct fluorescence assays for detection of *Giardia lamblia* in stool specimens preserved in ECOFIX. J Clin Microbiol. 2000; 38: 2781-3.
11. Díaz A, Espino AM, Marcet R, Otero O, Torres D, Finlay CM, et al. Partial characterization of epitope on excretory-secretory products of *Fasciola hepatica* recognized by Monoclonal Antibody ES78. J Parasitol. 1998; 84: 51-61.
12. Pietrzak-Johnston SM, Bishop H, Wahlquist S, Moura H, De Oliveira Da Silva N, Pereira Da Silva S, et al. Evaluation of commercially available preservatives for laboratory detection of helminths and protozoa in human fecal specimens. J Clin Microbiol. 2000; 38: 1959-64.
13. Daoan R, Fraser D, El-On J, Kassis I, Deckelbaum R, Turner S. Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of *Cryptosporidium spp.* in stool specimens from infants and young children in field studies. Am J Trop Med Hyg. 1995; 52: 134-8.

Recibido: 8 de enero de 2009.
Aprobado: 7 de marzo de 2009.

Dra. *Ingrid Domenech Cañete*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". AP 601, Marianao 13, Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: ingrid@ipk.sld.cu