

Incremento de la sensibilidad analítica del sistema FasciDIG® para el diagnóstico de *Fasciola hepatica*

Increase of analytical sensitivity of FasciDIG® system for the diagnosis of *Fasciola hepatica*

Lic. Ricardo Marcet Sánchez, Téc. Mabel Figueredo Pino, Dr. C. Fidel A. Núñez Fernández, Dr. C. Lázara Rojas Rivero, Dr. C. Jorge Sarracent Pérez

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la fasciolosis en Cuba es una enfermedad enzoótica en el ganado y en los últimos años existe un incremento en el número de casos en humanos. El diagnóstico coproparasitológico de la fasciolosis es poco sensible y laborioso, por lo que es importante el uso de los métodos inmuno-enzimáticos sobre todo aquellos que son capaces de detectar antígenos de este parásito en las heces. En el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" se cuenta con un sistema de detección de antígenos denominado FasciDIG® con una sensibilidad de 10 ng/mL.

Objetivo: aumentar la sensibilidad del FasciDIG® realizando modificaciones a este método diagnóstico.

Métodos: en un sistema simulado se evaluaron FasciDIG® y FasciDIG modificado, utilizando diluciones seriadas dobles de antígenos a concentraciones desde 1 000 ng/mL hasta 1,95 ng/mL. El FasciDIG se modificó utilizando como segundo anticuerpo el obtenido en conejos contra antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* conjugado con biotina seguido de la adición de un conjugado extravidina-peroxidasa comercial. Las heces se colectaron del recto de 96 reses destinadas para sacrificio y se evaluaron por ambos métodos. Se calculó el índice de concordancia Kappa entre ambos sistemas.

Resultados: el límite de detección obtenido para el FasciDIG® fue de 3,9 ng/mL mientras que el FasciDIG modificado detectó hasta 1,95 ng/mL. El índice de concordancia calculado entre los dos ensayos fue de 0,6238, que corresponde a un índice de acuerdo sustancial o bueno.

Conclusiones: el método FasciDIG modificado resultó tener una mayor sensibilidad analítica que el FasciDIG® y puede ser un complemento para el diagnóstico de la fasciolosis. Se debe incrementar el número de muestras y determinar la sensibilidad y especificidad utilizando la técnica de sedimentación copa-cónica seriada como regla de oro.

Palabras clave: *Fasciola hepatica*, diagnóstico, detección de antígenos.

ABSTRACT

Introduction: fasciolosis is an endemic disease in cattle in Cuba and there is an increase in the number of reported human cases in recent years. The copro-parasitological diagnosis of fasciolosis has low sensitivity and is hard-working; for that reason, it is important to use immunoenzymatic methods mainly those that can detect this parasite antigens in the feces. A system for antigen detection called FasciDIG®, with a reported sensitivity of 10 ng/mL has been developed in "Pedro Kouri" Institute of Tropical Medicine.

Objective: to increase the sensitivity of FasciDIG ® through some modifications to this diagnostic method.

Methods: two fowl dilutions (concentrations of antigen 1 000 ng/mL- 1.95ng/mL in H₂O Tween-20) were evaluated in a simulated system using FasciDIG® and modified FasciDIG. The FasciDIG® was modified using the secondary antibody obtained from rabbit against excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica* combined with biotin and then adding commercial conjugated extravidine peroxidase. Feces were collected from the rectum of 96 animals for slaughter and were evaluated by both methods, FasciDig® and modified FasciDig. Kappa index was calculated between both assays.

Results: the detection limit for the FasciDIG® was 3.9 ng/mL whereas the modified FasciDIG detected up to 1.95 ng/mL. The agreement index calculated between the two tests was 0.6238 corresponding to an index of substantive or good agreement.

Conclusions: the modified method is more sensitive than FasciDIG® and it can supplement the diagnosis of fasciolosis. The number of analyzed samples should be increased and the sensitivity and specificity should also be determined using the serial conic-cup sedimentation technique as the gold standard.

Key words: *Fasciola hepatica*, diagnosis, detection of antigens.

La fasciolosis o distomatosis hepática es una enfermedad zoonótica parasitaria de una amplia distribución mundial que afecta tanto a humanos como animales herbívoros y omnívoros. Está estimado que la infección por este parásito afecta a 2,4 millones de personas en el mundo, aunque en países de Asia y África se reporta una mayor incidencia.¹ Por otra parte, los problemas de salud más grandes se encuentran en países Andinos, áreas del Caribe, Norte de África, Oeste de Europa y el área del mar Caspio.²⁻⁴

En el mundo la fasciolosis causa grandes pérdidas económicas al incidir sobre animales productivos como vacunos, ovinos, cabras y búfalos,⁵ estimándose una pérdida de hasta 3 mil millones de dólares anuales.⁶

En Cuba esta enfermedad es enzoótica en el ganado y se presenta en humanos en forma de brotes epidémicos esporádicos.⁷

Tradicionalmente, el diagnóstico de la fasciolosis se realiza por examen microscópico de heces de pacientes o animales, basado en la detección de los huevos del parásito; sin embargo, el resultado puede ser negativo en la fase inicial o en la fase crónica de la enfermedad, en este último caso debido a la intermitencia en la eliminación de los huevos.⁸ Este método, aunque en la mayoría de las muestras analizadas es específico, demuestra una sensibilidad pobre, solo permite el diagnóstico de la infección aguda y patente, exige la toma de muestras seriadas, es laborioso y requiere determinado grado de especialización técnica del personal de laboratorio.⁹

En los últimos años, el avance en las investigaciones sobre esta enfermedad ha posibilitado el desarrollo de sistemas de detección más eficaces que apoyan la realización de estudios clínicos y epidemiológicos, necesarios para su control.^{10,11} Estos estudios sugieren que los inmunoensayos enzimáticos (ELISA) pueden ser muy útiles en el diagnóstico de esta parasitosis, por la posibilidad que brindan al detectar antígenos en heces con una buena especificidad y sensibilidad.^{10,12,13} Además, se han desarrollado formatos sencillos para este diagnóstico, como la inmunocromatografía,¹⁴ que se convierte en una herramienta útil en los laboratorios y en los ensayos de campo. En nuestro grupo se cuenta con un sistema de detección de antígenos en heces, FasciDIG®, con una sensibilidad analítica de 10 ng/mL.¹⁰ Se ha reportado además que este ensayo tiene una especificidad y sensibilidad diagnóstica de 100 % y 94,9 %, respectivamente, para coproantígenos respecto al examen parasitológico copa cónica luego de 6 muestreos, presentando un valor predictivo (+) de 100 % y un valor predictivo (-) de 89,5 %. Estos resultados sugirieron que se puede sustituir al examen parasitológico en su condición de regla de oro.¹³

Con el propósito de mejorar la sensibilidad analítica del sistema, se le realizó una modificación y así evaluar la sensibilidad analítica para su posible uso en el diagnóstico de la fasciolosis tanto humana como animal.

Se utilizó el método denominado FasciDIG®, descrito por *Espino* y otros¹⁰ con modificaciones y sin estas. Brevemente, como recubrimiento se utilizó el anticuerpo monoclonal ES78 (10 µg/mL) y como segundo anticuerpo el obtenido en conejos contra antígenos de excreción-secreción de adulto de *Fasciola hepatica* conjugado a peroxidasa para el FasciDIG® y con biotina para el FasciDIG modificado. Este último sistema requiere de la adición de un conjugado extravidina peroxidasa comercial (Sigma, USA) a la dilución 1/8 000, previamente estandarizado. La reacción fue revelada por la adición para ambos sistemas de una solución de sustrato (5 mg de ortofenilendiamina (OPD) + 5 µL de H₂O₂ + 12,5 mL de tampón citrato-fosfato pH 5,0). Finalmente, la reacción se detuvo a los 15 min para el FasciDIG® y a los 8 min para el sistema modificado. La absorbancia se midió a 492 nm en un lector de ELISA Sirio S Reader, Italia.

Para la comparación de ambos sistemas en cuanto a sensibilidad analítica se utilizaron antígenos de excreción-secreción de adultos de *Fasciola hepatica* según *Espino* y otros.¹⁰ Se preparó un sistema simulado utilizando diluciones dobles de antígenos en H₂O-Tween 20, a concentraciones desde 1 000 ng/mL hasta 1,9 ng/mL. Se tomó como límite de detección, el valor de densidad óptica con el doble

de la media más dos desviaciones estándar de la densidad óptica del blanco (H₂O-Tween 20). Por otra parte, se realizó un estudio de detección de antígenos en heces de 96 bovinos procedentes del matadero de Nueva Paz, provincia de Mayabeque, utilizando FasciDIG® y FasciDIG modificado. Se determinó el índice Kappa o grado de concordancia entre ambos sistemas.¹⁵

Para el estudio en muestras de heces de bovino con el objetivo de establecer un valor de corte, entre positivo y negativo, se seleccionaron 53 heces provenientes de animales cuyos hígados habían resultado negativos en el examen anatomopatológico macroscópico y que además resultaron negativas por el método de copa cónica. El valor de corte se estableció por el método de la media de estos negativos más dos desviaciones estándar.¹⁶

Como resultado del estudio de los sistemas simulados de detección de antígenos se pudo observar un aumento de la sensibilidad analítica en el FasciDIG modificado fundamentado por el uso del anticuerpo policlonal anti antígeno biotinilado y la adición del conjugado extravidina-peroxidasa (Sigma, USA). La sensibilidad analítica del FasciDIG® fue de 3,9 ng/mL, mayor que la reportada antes por Espino y otros de 10 ng/mL, diferencia que puede ser justificada por la optimización del procedimiento de inmunización utilizado en la obtención del anticuerpo policlonal anti-antígeno de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* y algunas diferencias en el procedimiento de conjugación de estos anticuerpos a la peroxidasa. El límite de detección para el FasciDIG modificado fue de 1,9 ng/mL, se mostró una mayor sensibilidad con respecto al FasciDIG® (Fig.). Este resultado se explicaría porque el procedimiento de biotinilación aumenta la cantidad de sitios de unión a la extravidina-peroxidasa. La sensibilidad alcanzada está en concordancia con el trabajo realizado por Ubeira y otros, donde se reporta para el MM3 copro ELISA (sistema ELISA de elevada sensibilidad y especificidad donde al igual que FasciDIG modificado se utiliza un segundo anticuerpo biotinilado) un límite de detección de 1,1 ng/mL.¹⁷ Estos sistemas se diferencian fundamentalmente en que el MM3 copro utiliza el anticuerpo policlonal anti antígenos como recubrimiento y el anticuerpo monoclonal MM3 biotinilado como segundo anticuerpo. El FasciDIG modificado busca su especificidad utilizando el anticuerpo monoclonal ES78 como captura y usa como segundo anticuerpo el policlonal anti-antígeno biotinilado.

Otros de los métodos reportados en la literatura para el diagnóstico de la fasciolosis es el Fas2 ELISA.¹⁸ Este está basado en la captura de anticuerpos IgG anti-antígenos de *Fasciola hepatica* por una proteína purificada (antígeno inmunodominante, Fas2) de material regurgitado del parásito adulto en agua fría.¹⁸ En contraste con los métodos de detección de antígenos, los de detección de anticuerpos no discriminan entre la infección activa de la pasada, sobre todo en áreas endémicas y no son útiles para medir respuesta positiva al tratamiento.

Como parte del proceso de validación del FasciDIG modificado para el diagnóstico, se realizó una comparación con el FasciDIG®, ensayo ya validado en diferentes países para el diagnóstico de la fasciolosis tanto humana como animal. Se emplearon 96 muestras de heces de bovinos colectadas del recto de animales destinados para sacrificio y se confeccionó una tabla de contingencia entre los valores obtenidos para las muestras positivas y negativas de ambos sistemas. Fue posible detectar un mayor número de casos positivos por el FasciDIG modificado que por el FasciDIG®, lo que está en correspondencia con la mayor sensibilidad analítica encontrada en el sistema modificado. Se encontró coincidencia en 20 de las muestras positivas para ambos sistemas y 13 muestras resultaron positivas con el FasciDIG modificado. Solo 2 de las muestras positivas por el FasciDIG® no fueron positivas por el sistema modificado (tabla). Estas 2 muestras, en FasciDIG modificado, tienen valores de densidad óptica muy cercanos al valor de corte calculado en este estudio. El grado de concordancia o índice kappa entre ambos

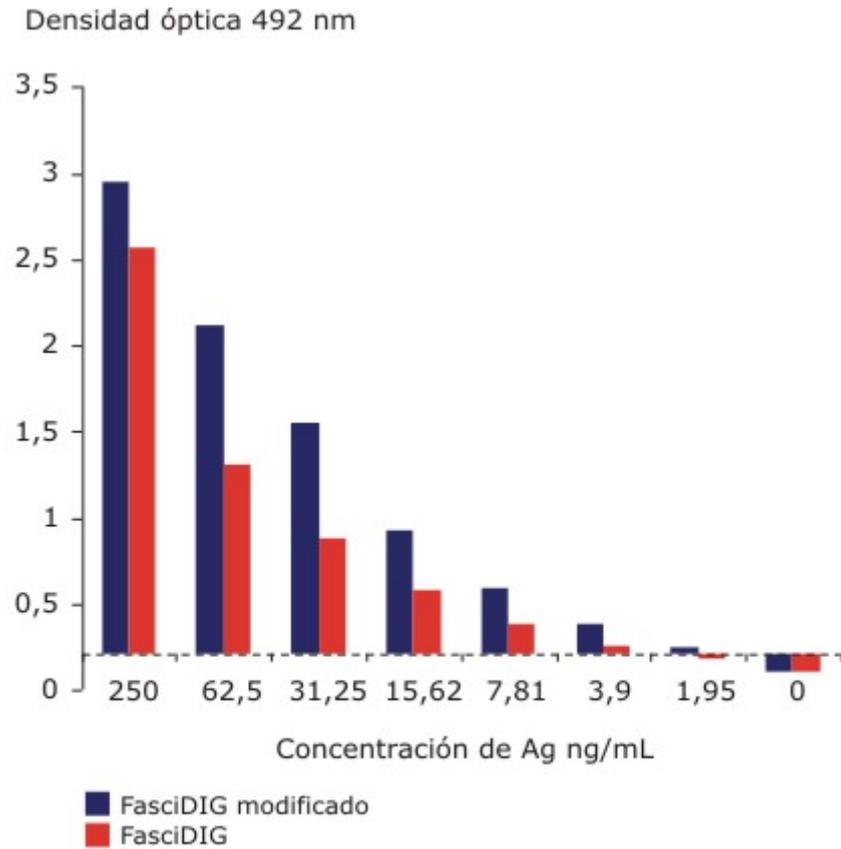


Fig. Sensibilidad analítica de los sistemas FasciDIG® y FasciDIG modificado.

métodos fue de 0,6238, en un intervalo de confianza de 95 % (IC 95 %; 0,4569-0,7907). Este índice de acuerdo sustancial o bueno entre ambos sistemas es un criterio que indica la posibilidad de utilizar cualquiera de los dos sistemas como herramienta de diagnóstico para fasciolosis. En el estudio realizado de sensibilidad analítica se encontró que el método modificado es más sensible lo cual indica que pudiera ser de mayor utilidad para este propósito. La mayor sensibilidad del ensayo modificado determina que el índice de concordancia no sea aún mejor.

Consideramos importante ampliar este estudio con un número mayor de muestras utilizando como regla de oro el método de concentración copa cónica y toma de muestras seriadas, o considerar la posibilidad de utilizar modelos animales donde la infección puede ser controlada durante el desarrollo del experimento.

Tabla. Tabla de contingencia entre FasciDIG y FasciDIG modificado en 96 muestras de heces de bovinos

	FasciDIG®			Total
		Positivo	Negativo	
FasciDIG modificado	Positivo	20	13	33
	Negativo	2	61	63
	Total	22	74	96

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mas-Coma S. Human fascioliasis. En: Cotruvo JA, Dufour A, Rees G, Bartram J, Carr R, Cliver DO, et al., editors. Waterborne zoonoses: Identification, causes and control. London, UK: World Health Organization (WHO); 2004. p. 305-22.
2. Mas-Coma S. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. J Helminthol. 2005;79:207-16.
3. Karahocagil MK, Akdeniz H, Sunnetcioglu M, Cicek M, Mete R, Akman N, et al. A familial outbreak of fascioliasis in Eastern Anatolia: a report with review of literature. Acta Trop. 2011;118:177-83.
4. Maguire JH. Schistosomiasis. En: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Trematodes and other flukes. New York: Churchill Livingstone; 2005: 3276-85.
5. Charlier J, Meulemeester L, Claerebout E, Williams D, Vercruysse J. Qualitative and quantitative evaluation of coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. Vet Parasitol 2008;153:44-51.
6. Spithill TW SP, Sexton LS, Bozas E, Morrison CA, Creaney J, Parsons JC. Development of vaccine against of *Fasciola hepatica*. In: JPD, editors. Fasciolosis. Ireland: Wallingford: CAB International; 1999. p. 377-410.
7. Rojas L, Vazquez A, Domenech I, Robertson LJ. Fascioliasis: can Cuba conquer this emerging parasitosis? Trends Parasitol. 2010;26:26-34.
8. Espino AM, Marcet R, Finlay CM. *Fasciola hepatica*: detection of antigenemia and coproantigens in experimentally infected rats. Exp Parasitol. 1997;85:117-20.
9. Espino AM, Millan JC, Finlay CM. Detection of antibodies and circulating excretory-secretory antigens for assessing cure in patients with fascioliasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1992;86:649.
10. 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.
11. Mezo M, Gonzalez-Warleta M, Carro C, Ubeira FM. An ultrasensitive capture ELISA for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3). J Parasitol. 2004;90:845-52.
12. Espino AM, Diaz A, Perez A, Finlay CM. Dynamics of antigenemia and coproantigens during a human *Fasciola hepatica* outbreak. J Clin Microbiol. 1998;36:2723-6.
13. Espino AM. Inmunodianoóstico de la Fasciolosis humana y su aplicación en brotes epidémicos [Doctoral thesis]. La Habana: Departamento de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"; 1997. p. 65.
14. Gupta A, Dixit AK, Dixit P, Mahajan C, Sharma RL. Evaluation of dipstick-ELISA using 28 kDa *Fasciola gigantica* cathepsin I cysteine proteinase (FgCL3)

for serodiagnosis of fasciolosis in naturally infected goats. *Vet Parasitol.* 2011;176:165-9.

15. Rigby AS. Statistical methods in epidemiology. v. Towards an understanding of the kappa coefficient. *Disabil Rehabil.* 2000;22:339-44.

16. Crowther JR. *ELISA Theory and Practice.* Totowa, New Jersey: Human Press; 1995. 1-219 p.

17. Ubeira FM, Muino L, Valero MA, Periago MV, Perez-Crespo I, Mezo M, et al. MM3-ELISA detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in preserved human stool samples. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81:156-62.

18. Espinoza JR, Maco V, Marcos L, Saez S, Neyra V, Terashima A, et al. Evaluation of Fas2-ELISA for the serological detection of *Fasciola hepatica* infection in humans. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76:977-82.

Recibido: 30 de enero de 2012.

Aprobado: 3 de mayo de 2012.

Ricardo Marcet. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", Autopista Novia del Mediodía Km 6 ½. AP 601. Marianao 13, CP 11300. La Habana, Cuba. Correo electrónico: marcet@ipk.sld.cu