ARTÍCULO ORIGINAL

Inmunodiagnóstico de fasciolosis humana y ovina empleando una fracción de 24-29 kDa de Fasciola hepatica obtenida mediante inmunoadsorción

MARCOS SILVA**, TEXIA GORMAN* y HÉCTOR ALCAÍÑO*

IMMUNODIAGNOSIS OF HUMAN AND SHEEP FASCIOSIS WITH A 24-29 KDA FRACTION OF *Fasciola hepatica* OBTAINED BY IMMUNOADSORTION.

*In order to identify specific and sensitive polypeptides for human and sheep immunodiagnosis of fasciolosis, the protein components of E-S products of adult **F.hepatica** were separated by gel filtration chromatography (Sephacryl S-300) followed by SDS-PAGE to identify a 24 - 29 kDa fraction. With this fraction a rabbit immune antiserum was prepared and then coupled to a sepharose column matrix to develop an affinity chromatography which permitted the direct immunoabsorption of these polypeptides from crude E-S extracts. The affinity adsorbed proteins were then assessed as antigen, using serum samples from 12 human patients and 20 sheep with fasciolosis as well as serum samples from 31 human patients and 20 non infected sheep, as controls, by Western blot analysis. The adsorbed antigenic fraction in positive human samples exhibited a sensitivity value of 91.6 % and a specificity value of 100%. The sensitivity values were 93.3% and 80% for chronic and prepatent sheep infection, respectively. On the other hand, none of the control human or sheep negative sera reacted against this fraction, demonstrating 100% specificity values. Therefore, it may be concluded that immunoabsorption of **F. hepatica** 24-29 kDa fractions from crude E-S extracts is an efficient procedure of obtaining antigens for accurate serodiagnosis of **F. hepatica** infection in human and animal species.*

Key words: Human fasciolosis, sheep fasciolosis, *Fasciola hepatica*, immunodiagnosis.

INTRODUCCIÓN

La fasciolosis afecta al hombre y a diversas especies domésticas y silvestres, las que contribuyen a su diseminación en las praderas. A pesar de tener una distribución cosmopolita, se presenta con mayor frecuencia en localidades con clima templado como parte de Sudamérica,

norte de África y países Mediterráneos. En Chile, la infección por *Fasciola hepatica* se encuentra ampliamente distribuida en las especies animales de interés pecuario, en especial entre ovinos y bovinos de todas las regiones del país con mayores prevalencias entre la IV y IX Regiones¹, con excepción de la provincia de Magallanes en la XII Región. Se ha podido identificar zonas

* Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. Casilla 2 Correo 15, Stgo. Chile.

** Escuela de Tecnología Médica y Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Andrés Bello. Stgo. Chile.

epidemiológicas de mayor importancia, como la región del Maule, en la cual se ha detectado a más del 90% del ganado bovino infectado¹. Este antecedente permite sospechar que existe una alta posibilidad de encontrar numerosos casos humanos en los sectores rurales de esa región².

El diagnóstico de la infección se establece por métodos directos, cuando se encuentra el parásito o sus huevos en las heces o bilis obtenida por sondeo duodenal; pero su utilidad es limitada en huéspedes infectados con baja cantidad de parásitos o nula cuando el parásito se encuentra en período de invasión y aún es inmaduro.

Por otra parte, el examen coproparasitario que se utiliza rutinariamente en animales no logra detectar el 100% de los casos infectados y no es útil en la fase prepatente de la enfermedad, antes que las fasciolas maduren sexualmente.

Ello ha determinado la búsqueda de técnicas serológicas para el inmunodiagnóstico de la fasciolosis, usando principalmente reactivos heterogéneos tales como mezclas de extractos antigénicos obtenidos a partir de parásitos adultos, estadios de éstos, o derivados metabólicos producto de la excreción-secreción de las fasciolas vivas. Sin embargo, su valor diagnóstico se ha visto limitado por la reactividad cruzada con otros parásitos y reacciones inespecíficas³⁻⁶.

Actualmente, la técnica de ELISA es una de las más empleadas, pero su especificidad depende de la fuente de antígeno utilizada ya que al emplear extractos parasitarios totales su evaluación no fue totalmente satisfactoria, demostrándose un 61,6% de sensibilidad y un 71,7% de especificidad en animales infectados⁷.

Por otra parte, el análisis mediante inmuno-electroforesis en geles de agarosa (inmuno-precipitación simple y cruzada) ha permitido determinar que los extractos parasitarios crudos de *F. hepatica*, muestran en la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones de reducción (SDS-PAGE), una composición antigénica variada; siendo más complejos los antígenos somáticos y de excreción-secreción (E-S) proveniente de parásitos adultos que de los juveniles⁸.

El empleo de antígenos mejor definidos ha permitido mejorar la sensibilidad y especificidad como lo demuestra un estudio que sometió antígenos de E-S de *F. hepatica* a cromatografía de exclusión por tamaño molecular seguido de SDS-PAGE e inmuno-electrotransferencia

enzimática o western blot (WB); seleccionándose cuatro fracciones cromatográficas de 400, 150, 29 y menor de 29 kDa de interés diagnóstico. La incorporación de sueros de ovinos, cerdos y equinos con distomatosis comprobada controles negativos y con otras parasitosis, permitieron establecer mediante ELISA que la fracción de 24-29 kDa sería la más promisoría por su alta sensibilidad y especificidad⁹.

Sin embargo, debido a la complejidad técnica y de equipamiento de este método de fraccionamiento, planteamos la elaboración de un suero hiperinmune en conejos con la fracción seleccionada, para posteriormente acoplarlo a una fase sólida que permitiera la adsorción directa de ésta por cromatografía de afinidad.

El objetivo de este trabajo es evaluar mediante WB el potencial diagnóstico de la fracción de 24-29 kDa purificada por inmuno-adsorción desde antígenos de E-S de *F. hepatica*, empleando para ello sueros de pacientes humanos, así como de ovinos naturalmente infectados en la etapa prepatente y patente de la infección.

MATERIAL Y MÉTODO

Los antígenos de E-S fueron obtenidos de ejemplares de fasciolas vivas colectadas en mataderos, lavadas sucesivamente en suero fisiológico y luego incubadas en solución Hedon-Fleig estéril por 18 horas a 37° C. El sobrenadante se ultracentrifugó (15.000 g/ 20 minutos) y luego dializó en agitación contra agua desionizada, durante 24 horas a 4° C siendo posteriormente liofilizado hasta un volumen de 1 ml, el cual se congeló a -70° C hasta su uso¹⁰. Su concentración de proteínas fue determinada por el micrométodo de Bradford¹¹.

Posteriormente el preparado E-S fue semipurificado sometiéndolo a fraccionamiento cromatográfico de filtración utilizando una columna de Sephacryl S-300 para ser posteriormente sometido a SDS - PAGE y así identificar la composición proteica de cada fracción, recuperándose el extracto de aproximadamente 24 - 29 kDa en el cuarto "peak"⁹, fracción ya identificada como altamente sensible y específica en animales^{9,12,13}.

Con dicha fracción se preparó un suero hiperinmune en dos conejos, mediante tres aplicaciones subcutáneas y una cuarta intraperitoneal (una por semana), de aproximadamente 100 µg

de proteína de inóculo de fracción cromatográfica diluida en igual volumen de coadyuvante de Freund. Se obtuvieron sangrías cada 15 días por punción de la oreja, comprobando la reactividad y especificidad de los anticuerpos mediante WB^{9,13-15}.

Estos sueros fueron posteriormente pasados a través de una columna de proteína A - Sefarosa (CL - 4B Fast Flow. Pharmacia) y los eluidos obtenidos conteniendo las inmunoglobulinas semipurificadas fueron dializados y congelados hasta su utilización¹⁶. Luego, éstos fueron acoplados covalentemente a una matriz de agarosa preactivada con Bromuro de Cianógeno¹⁷. Para ello, el eluido hiperinmune se descongeló y diluyó en buffer de acoplamiento constituido por NaHCO_3 0,2M - 0,5M NaCl pH 8,5, de modo de alcanzar una concentración de entre 5 - 10 mg de proteína por mL de gel. Se incubó a temperatura ambiente por dos horas en agitación. Se dejó eluir el contenido de la columna y luego se bloquearon los sitios activos remanentes con Glicina 0,2M pH 8,0 por dos horas a temperatura ambiente y finalmente se lavó para eliminar el exceso no acoplado con buffer de acoplamiento, seguido de buffer acetato 0,1M pH 4,0- 0,5M NaCl y buffer de acoplamiento nuevamente. Esta columna de cromatografía de afinidad permitió la adsorción de estos polipéptidos a partir de extractos crudos de E-S¹⁵.

Las proteínas así adsorbidas por afinidad, se probaron como antígenos mediante WB en 43 sueros humanos: 12 sueros de pacientes con la prueba de ELISA positiva a fasciolosis (6 de ellos con presencia de huevos al examen coproparasitario), 10 sueros negativos a *F. hepatica* y otras parasitosis y 21 sueros humanos provenientes de pacientes con otras parasitosis como: enfermedad de Chagas, toxoplasmosis, hidatidosis, cisticercosis, himenolepiosis, *Taenia saginata*, trichinellosis (agrupados en "pools" de 3 sueros por enfermedad parasitaria).

Se emplearon 40 sueros ovinos: 20 infectados con *F. hepatica* (5 de ellos en etapa prepatente), 10 negativos a fasciolosis y 10 sueros con otras parasitosis, y libres también de fasciolosis).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Utilizando la proteína inmunoabsorbida se obtuvo un alto valor de sensibilidad en humanos (91,6%), ya que 11 de los 12 pacientes serológicamente positivos a fasciolosis, lograron

detectarla al WB, mientras que ninguno de los sueros de los individuos sanos o con otras parasitosis la detectó. El individuo que resultó negativo no presentaba tampoco huevos del parásito en sus deposiciones. Sin embargo, considerando que entre los 12 pacientes estudiados, habían 6 pacientes confirmados por la presencia de huevos en sus deposiciones, todos los cuales detectaron la proteína inmunoabsorbida, se puede establecer por lo tanto que su sensibilidad fue de 100%. Por otra parte, este antígeno no fue reconocido por los pacientes sin fasciolosis o con otras parasitosis por lo que se determinó que su especificidad también fue máxima (100%). (Figura 1).

El antígeno obtenido por inmunoabsorción exhibió una sensibilidad de 93,3% en los ovinos en fase patente de la infección (14/15) y en los ovinos que cursaban la fase prepatente de la infección (ELISA positivos pero sin huevos en sus excrementos), 4 de los 5 sueros ovinos demostraron la detección de la banda antigénica de aproximadamente 29 kDa, lo que indica una sensibilidad de 80%. Al igual que los sueros humanos negativos, en los sueros de ovinos negativos o con otras parasitosis se encontró una especificidad de 100% (Tabla 1).

Los resultados confirman el potencial inmunodiagnóstico de la fracción proteica de 24 a 29 kDa, la cual al no ser detectada en forma inespecífica ni cruzada, demuestra un valor predictivo positivo (probabilidad que un individuo positivo a la prueba esté realmente infectado) de 100%, tanto en pacientes humanos como en ovinos en fase prepatente y patente de la infección. El valor predictivo negativo (probabilidad que un individuo negativo a la prueba no esté infectado) es también aceptable; correspondiendo a 96,8% en humanos y 95,2% para los ovinos en la fase patente y prepatente (Tabla 1). La eficiencia diagnóstica de esta fracción polipeptídica cuya estructura química correspondería a una catepsina o cisteín proteínasa o a una Glutación S transferasa, también ha sido señalada por otros autores¹⁸⁻²¹.

Por lo tanto, se demuestra en este estudio que la purificación de antígenos de E-S mediante inmunoabsorción es un método eficiente, lográndose recuperar adecuadamente la fracción polipeptídica de 24-29 kDa, la cual puede emplearse como una valiosa herramienta inmunodiagnóstica para la fasciolosis humana y

Tabla 1. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de un Western Blot IgG en sueros humanos y ovinos utilizando el antígeno de 24 - 29 kDa obtenido por inmunoadsorción, en el diagnóstico de *Fasciola hepatica*

Sueros	Proporción	% Sensibilidad	% Especificidad	% Valor predictivo positivo	% Valor predictivo negativo
Humanos	11/12	91,6	100	100	96,8
Ovinos (Infección patente)	14/15	93,3	100	100	95,2
Ovinos (Infección prepatente)	4/5	80,0	100	100	95,2

Figura 1. Reconocimiento antigénico de la fracción inmunoadsorbida de 24-29 kDa mediante Western blot IgG en sueros humanos (A) y ovinos (B).

A. Carriles 1 - 11: Sueros humanos con fasciolosis, Carril 12: Control negativo. Carril a: Control negativo; b al e: sueros humanos con fasciolosis comprobada; f: Pool sueros humanos con hidatidosis; g: Pool sueros humanos con cisticercosis. B. Carriles: 1- 6 y 8 - 11 Sueros ovinos con fasciolosis; 7 y 12: Control negativo; 13: Pool ovinos en fase prepatente; 14: Pool I ovinos con hidatidosis; 15: Pool II ovinos con hidatidosis; 16: Suero ovino con *T. actinioides*.

animal, tanto en la fase migratoria del parásito (fase prepatente) como cuando ya está alojado en los canalículos biliares de sus hospederos. Su purificación y utilización en ensayos inmunodiagnósticos determinaría mejores resultados en la eficiencia diagnóstica de la pruebas o “kits” diagnósticos que se implementen en el futuro.

RESUMEN

Los componentes proteicos de los productos de excreción-secreción (E-S) de *F. hepatica* adultas fueron fraccionados por cromatografía

de filtración en gel (Sephacryl S-300), seguido de SDS-PAGE para identificar el eluido conteniendo la fracción de 24 - 29 kDa, de alta sensibilidad y especificidad en el inmunodiagnóstico de fasciolosis. Con este material se preparó un suero hiperinmune en conejos que luego fue acoplado a una matriz de sefarosa para generar una columna de cromatografía de afinidad que permitió la adsorción directa de estos polipéptidos. Las proteínas así adsorbidas por afinidad, se evaluaron como antígenos en 12 sueros humanos y 20 sueros de ovinos con fasciolosis (10 en fase prepatente y 10 en fase

patente de la infección) y en 31 sueros humanos y 20 sueros ovinos negativos a *F. hepatica*, como sueros controles, mediante Western blot. La fracción antigénica inmuoadsorbida exhibió una sensibilidad de 91,3% y una especificidad de 100% en los sueros humanos y en el caso de los ovinos en fase patente y prepatente de la infección, la sensibilidad obtenida fue de 93,3 % y 80%, respectivamente, siendo su especificidad de 100%. Por lo tanto, se puede concluir que la purificación de la fracción polipeptídica de 24-29 kDa de extractos E-S de *F. hepatica* mediante inmuoadsorción es un procedimiento eficaz para obtener antígenos para el inmunodiagnóstico de fasciolosis humana y animal.

REFERENCIAS

- 1.- ALCAÍÑO H A, APT W. Algunos antecedentes sobre la fasciolosis animal y humana. Monog de Med Vet 1989; 11: 14-29.
- 2.- APT W, AGUILERA X, VEGA F, et al. Fasciolosis en poblaciones rurales con alta prevalencia de infección animal. Rev Méd Chile 1992; 120: 621-6.
- 3.- PFISTER K. Serodiagnosis of fasciolosis in ruminants. Rev Sci Tech Off Int Epiz 1990; 9: 511-8.
- 4.- HILLYER G V, SOLER DE GALANES M, BUCHON P, BJORLAND J. Herd evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of *Fasciola hepatica* infection in sheep and cattle from the Altiplano of Bolivia. Vet Parasitol 1996; 61: 211-20.
- 5.- ESPINO A M, BORGES A, DUMÉNIGO B E. Coproantígenos de *Fasciola hepatica* de posible utilidad en el diagnóstico de la fascioliasis. Rev Panam Salud Publica/ Pan Am Public Health 2000; 7: 225-31.
- 6.- SARIMEHMETOGLU H O. Application of Western Blotting for the Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* in cattle using Excretory/Secretory Antigens. Turk J Vet Anim Sci 2002; 26: 1061-5.
- 7.- GORMAN T, MORENO P, LORCA M, et al. Inmunodiagnóstico de la fasciolosis animal mediante una prueba inmunodiagnóstica (ELISA). Parasitol al Día 1991; 15: 87-93.
- 8.- GORMAN T, CONCHA V, ALCAÍÑO H, et al. Caracterización de antígenos de *Fasciola hepatica* mediante inmunoprecipitación en agarosa. Parasitol al Día 1992; 16: 81-6.
- 9.- FREDES F, GORMAN T, SILVA M, ALCAÍÑO H. Evaluación diagnóstica de fracciones cromatográficas de *Fasciola hepatica* mediante Western Blot y ELISA en animales infectados. Arch Med Vet 1997; 29: 283-94.
- 10.- MORILLA A, BAUTISTA C. Manual de Inmunología. Edit Diana México. 1986. 397 p.
- 11.- BRADFORD M. A rapid and sensitive method for microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, Annal. Biochem 1976; 72: 248-54.
- 12.- SILVA M, URARTE E, MERCADO R, GORMAN T. Aplicación de inmunoelctrotransferencia empleando antígenos de excreción-secreción en el diagnóstico de fasciolosis humana. Parasitol al Día 1993; 17: 144-6.
- 13.- GORMAN T, VALDÉS A, FREDES F, et al. Reconocimiento antigénico de ovinos naturalmente infectados con *Fasciola hepatica*, monitoreado a través de inmunoelctrotransferencia enzimática (Western blotting). Arch Med Vet 1995; 27: 33-40.
- 14.- GORMAN T, ABALLAY J, FREDES F, et al. Immunodiagnosis of fasciolosis in horses and pigs using western blots. Int J Parasitol 1997; 27: 1429-32.
- 15.- SILVA M A. Purificación mediante inmuoadsorción y evaluación inmunodiagnóstica de fracciones antigénicas relevantes de *Fasciola hepatica*. Tesis para Grado académico Magíster en Ciencias Biológicas, Mención Inmunología. Facultad de Medicina, Universidad de Chile 2001. 86 p.
- 16.- EY P, PROWSE S, JENKIN C. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b from mouse serum using protein A-Sepharose. Immunochemistry 1978; 15: 429-36.
- 17.- PHARMACIA, SWEDEN Uppsala. Pharmacia fine chemicals. Handbook in Affinity Chromatography. Principles and Methods. 1988; 13-18.
- 18.- YAMASAKI H, AOKI T, OYA H. A cystein proteinase from the liver fluke *Fasciola* spp. Purification, characterization, localization and application to immunodiagnosis. Jpn J Parasitol 1989; 38: 373-84.
- 19.- O'NEILL S M, PARKINSON M, STRAUSS W, et al. 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: 417-23.
- 20.- CARNEVALE S, RODRÍGUEZ M, GUARNERA E, et al. Immunodiagnosis of fasciolosis using recombinant procathepsin L cystein proteinase. Diagn Micr Infect Dis 2001; 41: 43-9.
- 21.- RUIZ A, MOLINA J M, GONZÁLEZ J, et al. Humoral response of goats experimentally infected with *Fasciola hepatica* against cysteine proteinase of adult fluke. Vet Res 2003; 34: 435-43.