



La técnica de ELISA con antígenos del fluido seudocelómico de *Ascaris suum* en el diagnóstico de la ascariasis pulmonar experimental

An ELISA test with *Ascaris suum* seudocelomic fluid antigens for pulmonary experimental ascariasis diagnosis

Rosa Alva Gálvez¹, Elin Alvarado Polo¹, Wilson Casana Mantilla¹, José Quiroz Amaya¹, Miguel Ríos Gutiérrez¹ y César A. Jara²

¹Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. ²Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

RESUMEN

Producida por *Ascaris lumbricoides* y por *A. suum*, la ascariasis pulmonar se diagnostica mediante reacciones serológicas, para lo cual la calidad y disponibilidad del antígeno resulta ser un aspecto importante. En la presente investigación se determinó la eficacia de la técnica de ELISA-IgG indirecta usando antígenos del líquido seudocelómico (LSAs) de *A. suum* para el diagnóstico de la ascariasis pulmonar en *Mus musculus* machos BALB/c. El LSAs se extrajo de ejemplares hembras de *A. suum* obtenidas de cerdos naturalmente infectados; de estas mismas se obtuvieron huevos, los cuales fueron incubados in vitro en una solución de formol al 2% hasta lograr su condición de infectivos, los cuales (3200/ratón) fueron administrados oralmente a fin de lograr la infección experimental. Los sueros se obtuvieron a los 15 días post infección. Para la técnica se utilizó: 15.82ug/mL del LSAs, los sueros diluidos 1/200 y el conjugado Anti-Mouse IgG (1/1500) (BioRad). Se encontró el 90% de sensibilidad de la técnica ELISA-IgG indirecta utilizando LSAs y sueros de *M. musculus* BALB/c infectados experimentalmente con larvas de *A. suum*.

Palabras clave: Ascariasis pulmonar, líquido seudocelómico, *Ascaris suum*, sensibilidad, ELISA

ABSTRACT

Produced by *Ascaris lumbricoides* and *A. suum*, pulmonary ascariasis is diagnosed by serological reactions, for which the quality and availability of the antigen appears to be an important aspect. In the present study the effectiveness of the technique was determined using indirect ELISA-IgG antigens seudocelómico fluid (LSAs) of *A. suum* in the diagnosis of pulmonary ascariasis in male *Mus musculus* BALB/c. The LSAs were extracted of *A. suum* females obtained from naturally infected pigs; of the same females were obtained eggs, which were incubated in vitro in a solution of 2% formalin to achieve its infective condition, then the eggs (3200 / mouse) were administered orally to achieve the experimental infection. Sera were obtained at 15 days post infection. For the technique performed: 15.82 ug/mL of LSAs, 1/200 diluted sera and the anti-mouse IgG conjugate (1/1500) (BioRad) was used. It was found 90% sensitivity of the indirect IgG ELISA using sera LSAs and *M. musculus* BALB / c experimentally infected with *A. suum* larvae.

Keywords: Pulmonar ascariasis, seudocelomic fluid, *Ascaris suum*, sensibilidad, ELISA

INTRODUCCIÓN

La ascariasis es considerada como la infección parasitaria más común en los seres humanos; *Ascaris*, el agente causal, parasita cerca de 1,4 billones de personas en el mundo -aproximadamente una cuarta parte de la población mundial- y la mayoría de las infecciones se produce en países en vías de desarrollo, con la mayor morbilidad en niños y mujeres embarazadas^{1,2,3}. En niños en edad escolar, esta infección está asociada con pobre estado nutricional y anemia, que es motivo de preocupación ya que incrementa el riesgo de mortalidad^{4,5}.

La ascariasis en humanos se presenta bajo dos formas clínicas: la intestinal, causada por las formas adultas de *A. lumbricoides* y la pulmonar producida por las formas larvarias (L3) tanto de *A. lumbricoides* como de *A. suum*^{4,5,6}. El diagnóstico de la primera se realiza por la observación de huevos del agente etiológico, tanto fértiles como infértiles, en exámenes coproparasitológicos⁶ y de la segunda por métodos serológicos que tienen gran utilidad para apoyar el diagnóstico clínico, que en ocasiones se presenta asociada a alergias, y para efectuar estudios epidemiológicos^{7,8,9,10}.

A pesar de que la ascariasis intestinal se presenta con elevada frecuencia y lo mismo se puede decir de la pulmonar, no se cuenta con una prueba de ELISA estandarizada, tal como ocurre con otras helmintiasis como por ejemplo la cisticercosis^{11,12,13}, más bien, se han hecho estudios para la posible aplicación de la técnica de Western blot utilizando diversos tipos de antígenos^{14,15}. Uno de ellos es, el líquido seudocelómico que ha demostrado tener elevada capacidad antigénica, ser de fácil accesibilidad, obtenerse en elevadas cantidades respecto de otro tipo de antígenos, incluso de formas adultas del parásito muerto^{16,17}.

Considerando la elevada prevalencia de la infección por *Ascaris*, tomando en cuenta que no existen investigaciones ni métodos diagnósticos orientados a la detección de la ascariasis pulmonar, que precede a la intestinal; por ello se propone la búsqueda de métodos alternos que permitan realizar un diagnóstico eficaz de dicha infección. Diversos autores han evaluado la utilización la técnica de ELISA para detección de anticuerpos contra diversos helmintos en sueros, observando buena correlación entre los resultados serológicos y parasitológicos^{11,12,13}. Sin embargo, uno de los problemas que se pueden presentar al utilizar estas técnicas tan sensibles, es que ocurran reacciones inespecíficas cuando se usan extractos crudos del parásito. El objetivo del presente trabajo fue determinar la sensibilidad de la técnica de ELISA usando los antígenos del líquido seudocelómico de *A. suum* en el diagnóstico de la ascariasis pulmonar experimental en *Mus musculus* cepa BALB/c, con la finalidad de obtener una técnica de diagnóstico con un antígeno de fácil acceso, cuando se presenten síntomas pulmonares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recolección de ejemplares hembras adultas de *A. suum*

Del intestino de *Sus acrofa* “cerdo” beneficiados en el Camal Municipal de El Porvenir (Trujillo, Perú) se recolectó 10 ejemplares hembras adultas de *A. suum*, las cuales se colocaron en placas de Petri con SSF 0,85% y lavadas, tres veces por aproximadamente 5 minutos cada vez, antes de ser colocadas en un termos conteniendo la misma solución, tibia los cuales fueron trasladados al laboratorio de Helminología Parasitaria de la Universidad Nacional de Trujillo.

Recolección y conservación de líquido seudocelómico¹⁷

En un ambiente estéril se realizó la extracción del líquido seudocelómico con la ayuda de una jeringa de tuberculina de 1mL. Se introdujo la aguja en la parte posterior de los ejemplares *A. suum* hembras entre el ano y la parte final, a fin de extraer el líquido el cual fue depositado en viales hasta un volumen aproximado de 1 mL/vial y se conservó a -20°C hasta su posterior uso.

Obtención de huevos infectivos de *A. suum*^{16,17}

De los ejemplares hembras de *A. suum* se separó los úteros en placas de Petri, luego, con ayuda de un estilete se rompió las paredes del útero con el propósito de liberar a los huevos. Los huevos obtenidos fueron lavados tres veces con SSF estéril y colocados en tubos con tapa rosca conteniendo una solución de formol al 2% durante 30 días, cambiando la solución diariamente hasta obtener los huevos infectivos (huevos con Larva 2).

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas del líquido pseudocelómico se determinó por el método colorimétrico de Bradford¹⁸.

Infección experimental en *M. musculus*

Al grupo control de 20 ejemplares de *M. musculus* cepa BALB/ c no se les sometió a ningún estímulo. Mientras que al grupo experimental se inoculó por vía oral 3200 huevos infectivos de *A. suum* en 0,12mL de SSF.

Obtención del suero hiperinmune¹⁹

A las dos semanas de la administración oral de los huevos infectivos se extrajo sangre de cada ejemplar por punción cardíaca de ambos grupos de ratones, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos para obtener el suero inmune. Se colocó el suero en viales y se conserva a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

Técnica de ELISA¹⁹

Se hizo la técnica de ELISA-IgG indirecta, del modo siguiente: (i) las placas de poliestireno en pocillos de fondo plano se sensibilizaron con 50µL de líquido pseudocelómico (15.82 ug/ mL) de *A. suum*, (ii) se incubaron a 4°C durante 18 horas, (iii) se lavó tres veces con 50µL por pocillo de PBS (pH 7.26) y Tween 20(0,05%), durante 5 minutos cada vez, (iv) se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con 50µL de leche en polvo (2.5%) diluida en PBS (pH 7.26) y Tween 20(0,05%), (v) se incubó a 37°C durante 1 hora, (vi) se lavó de modo similar a como se hizo en el paso iii, (vii) se agregó el suero (1/200) problema en volumen de 50 µL e incubar a 37°C por 1 hora, (viii) se lavó de modo similar a las anteriores, (ix) se agregó el conjugado Anti-mouse IgG –BioRad- (1/1500), (x) se incubó a 37°C durante 1 hora, (xi) se lavó nuevamente y se agregó 50 µL del sustrato ODP 0,04% en tampón citrato a pH 5,0 y peróxido de hidrógeno 0,03%, (xii) se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y (iii) se detuvo la reacción enzimática con 50µL de ácido sulfúrico 2N y se realizó la lectura de la absorbancia a 492 nm usando lector de ELISA (Perkin-Elmer) .

Para determinar la sensibilidad se tuvo en cuenta los verdaderos positivos y los falsos negativos²⁰.

RESULTADOS

Se encontró una concentración de proteínas de 4050 ug/mL y la observación de las placas en el lector de ELISA a una adsorbancia de 492 nm mostró nueve reactivos de los 10 probados; en consecuencia: la técnica de ELISA-IgG indirecta mostró una sensibilidad del 90% para detectar anticuerpos producidos en la fase pulmonar de la ascariasis, con los antígenos del líquido pseudocelómico de *A. suum*.

DISCUSIÓN

Los geohelminetos, dentro ellos la ascariasis intestinal, son entidades ampliamente estudiadas y, producto de ello, se conocen las prevalencias en diferentes países, se tiene referencias de su distribución global y se tiene en cuenta respecto de las consecuencias en el niño y madres gestantes parasitados^{1,2,3,4,5}; sin embargo, la ascariasis pulmonar, que precede a la intestinal, no es totalmente conocida. Una de las razones es, que tiene dos agentes etiológicos: *A. lumbricoides* y *A. suum*, de las cuales la primera continua su ciclo en el intestino (da lugar a la ascariasis intestinal) mientras que la segunda no. Entonces, los métodos parasitológicos tradicionalmente utilizados permiten demostrar la presencia del parásito, por la detección de sus huevos; sin embargo, presentan algunas limitaciones en tres circunstancias, por lo menos: (i)

cuando el parásito aun no produce huevos, (ii) cuando el parasitismo es causado sólo por ejemplares machos y (iii) cuando las larvas pulmonares no corresponden a *A. lumbricoides*.

Es pertinente, entonces, proponer una técnica que permita el estudio de la ascariasis pulmonar que se asocia a trastornos inherentes a la condición infectada de este órgano y a reacciones alérgicas, tanto en países en vías de desarrollo como en los desarrollados^{8,9,10}. La técnica de ELISA resulta ser la primera que surge en plantearse para ello porque: (i) presenta elevada sensibilidad, de modo que resulta de gran utilidad sobre todo para los casos negativos porque permite descartar de plano, la infección por *Ascaris*, (ii) se cuenta con materiales y equipos necesarios para su ejecución y (iii) presenta variables en cuanto al tipo de anticuerpo a detectar y si es directa o indirecta^{19,20}, por lo que ha sido diseñada y evaluada para el diagnóstico de enfermedades de impacto negativo para la salud como son la cisticercosis, hidatidosis y triquinosis^{11,12,13}.

Se ha evaluado el uso de la técnica de ELISA para detección de anticuerpos IgG contra helmintos, obteniendo buenos resultados. Sin embargo, uno de los problemas que se pueden presentar al utilizar técnicas tan sensibles, es que ocurran reacciones inespecíficas cuando se usan extractos crudos del parásito. En el diagnóstico serológico para la infección por *A. suum* se utilizan antígenos somáticos, de excreción- secreción y de superficie^{14,15}.

El estudio de la composición antigénica de diferentes extractos de *A. suum*, permitió comprobar la naturaleza antigénica compleja del líquido pseudocelómico. Diversos autores consideran que el mayor alérgeno de este helminto es ABA-1 (presente en el líquido pseudocelómico)¹⁶, que presenta homología con el antígeno TBA-1 de *Toxocara canis* pero no revela ninguna similitud evidente con cualquier otra proteína de nematodos¹⁷.

La elevada sensibilidad obtenida en el presente estudio demuestra que algunos de los anticuerpos generados debido a la infección por el parásito, fueron específicos contra los antígenos del líquido pseudocelómico de *A. suum*. Esto permite afirmar que en futuras investigaciones podría ser posible utilizar como fuente de antígenos al fluido pseudocelómico, en reemplazo de los antígenos somáticos, de superficie, de excreción-secreción o totales, porque: (i) son más fáciles de obtener, (ii) se adquieren en menor tiempo, (iii) se obtienen en buenas cantidades de áscaris vivas y muertas recientemente y (iv) presentan elevadas concentraciones de proteínas y has demostrado ser altamente antigénicas^{16,17}. Sin embargo, se debe evaluar la sensibilidad utilizando sueros de personas parasitadas en número adecuado, ya que por limitaciones de diversa índole en la presente investigación se examinaron pocos sueros, y dado el caso, la especificidad de dicha técnica utilizando sueros de personas con otras enfermedades.

CONCLUSIÓN

- La técnica de ELISA, usando los antígenos del líquido pseudocelómico de *Ascaris suum*, presenta una elevada sensibilidad en el diagnóstico de la ascariasis pulmonar experimental en *Mus musculus* machos BALB/c.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brookers S, Clements ACA, Bundy DAP. Global epidemiology, ecology, and control of soil-transmitted helminth infections. *Adv Parasitol*, 2006; 62: 221-261
2. Truscott JE, Hollingworth TD, Brooker SJ, Anderson RM. Can chemotherapy alone eliminate the transmission of soil transmitted helminthes? *Parasites & Vectors* 2014; 7: 266
3. Walker M, Hall A; Basáñez GM, Individual re-infection, household clustering and risk factors for human infection with *Ascaris lumbricoides*: new epidemiological insights. *PLoS Neg Trop Dis* 2011; 5(4): e1047
4. Solano L, Acuña I, Barón M, Salim A, Sánchez A. Influencia de las parasitosis intestinales y otros antecedentes infecciosos sobre el estado nutricional antropométrico de niños en situación de pobreza. *Parasitol Latinoam* 2008; 63: 12 - 19
5. Rodríguez-Morales A, Bardella RA, Case C, Arria M, et al. Intestinal parasitic infections among pregnant women in Venezuela. *Inf Dis Obstet & Gynecol* 2006; ID: 23125

6. Goodman D, Haji HJ, Bickle QD, Stoltzfus RJ, Tielsch JM, Ramsan M et. al. A comparison of methods for detecting the eggs of *Ascaris*, *Trichuris*, and hookworm in infant stool, and the epidemiology of infection in Zanzibari infants. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76(4):725-731.
7. Ndao M. Diagnosis of parasitic diseases: old and new approaches. *Interdis Perspect on Inf Dis* 2009; ID: 278246
8. Cooper PJ. Interactions between helminth parasites and allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009; 9(1): 29-37
9. Caraballo L, Acevedo N. New allergens of relevance in Tropical Regions: the impact of *Ascaris lumbricoides* infections. *WHO Journal*, 2011; 4: 77-84
10. Izumikawa K, Kohno Y, Hara K, Hayashi H, Maruyama H, Kohno S. Eosinophilic pneumonia due to visceral larva migrans possibly caused by *Ascaris suum*: a case report and review of recent literatures. *Jpn J Infect Dis* 2011; 64(5):428-432.
11. Esquivel-Velázquez M, Ostoa-Saloma P, Morales-Montor J, Hernández-Bello R, Larralde C. Immunodiagnosis of neurocysticercosis: ways to focus on the challenge. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:516042
12. Flores LA, Rodríguez HP. Estandarización de la prueba de ELISA para el inmunodiagnóstico de hidatidosis humana empleando antígenos de producción local. *Gac Med Bol* 2006; 29(1): 5-10.
13. Contreras MC, Acevedo E, Aguilera S, Sandoval L, Salinas P. Estandarización de la ELISA IgM e IgA para el inmunodiagnóstico de la triquinosis humana. *Bol Chil Parasitol* 1999; 54(4): 104-109.
14. Frontera E, Serrano FJ, Carrón A, Mora JA, Pérez JE, Reina D. Caracterización antigénica de *Ascaris suum* mediante SPG- PAGE y Western Blotting Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim. 2001;16 (1): 153-163
15. Escalante H, Liñan R, Davelois K, Diaz E, Huamanchay O. Antígenos de larvas pulmonares de *Ascaris suum* reconocidos por anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus* Parasitol Latinoam 2005; 60:132-137
16. Leiva Varas D, Colina Venegas J, Escalante H, Jara CA. Antígeno del líquido seudocelómico de *Ascaris suum* detectados por Western blot utilizando IgG producidos en *Oryctolagus cuniculus*. *REBIOL* 2012; 32(1): 8-12
17. Arteaga-García M, Jara CA. Antígenos del líquido seudocelómico de *Ascaris suum* detectados por Western blot utilizando IgY producidos en *Gallus gallus* var. Hisex Brown. *REBIOLEST* 2013; 1(2): e58
18. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem* 1976; 72: 248- 254
19. Margni R. Inmunología e inmunoquímica 4ª ed. Edit. Medica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. 1990.
20. Biswas R, Parija SC, Narayan SK. DOT-ELISA for the diagnosis of neurocysticercosis. *Rev Med trop S. Paulo*, 2004; 46(5): 249-252