

## Evaluación del "IEFA" como técnica de inmunodiagnóstico en el programa de lucha contra la bilharziosis

Italo M. Cesari<sup>1</sup>, Leydi Mendoza<sup>1</sup>, Diana Ballen<sup>1</sup>, B. Alarcón de Noya<sup>2</sup>

El Inmunoensayo para la Fosfatasa Alcalina (**IEFA**) detecta la presencia de anticuerpos anti-fosfatasa alcalina de la membrana de los vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Su valor diagnóstico fue probado con 1.514 sueros de personas de tres comunidades diferentes del área endémica del interior de Venezuela y 322 sueros de personas del área capitalina de Caracas, encontrándose una sensibilidad de 91,1 - 96,8% con respecto a la prueba de precipitación circunoval (**PPCO**) (prueba de referencia) y de 60,8 - 80,9% con respecto a la **ELISA** (con antígeno de huevo). El **IEFA** fue 100% específico con sueros de sujetos residentes en localidades no endémicas. Esta metodología mostró > 84% de concordancia (prueba "kappa" de Cohen) con "Western Blot" de antígenos de membrana del adulto y concordancia positiva con la **PPCO** (40,6 - 77,1%) y la **ELISA** (51,4 - 69,1%) en las poblaciones endémicas estudiadas. Los resultados indican que el **IEFA** es aplicable a la pesquisa epidemiológica de la esquistosomosis mansoni en zonas endémicas y que la prueba es muy sensible para la detección de casos con baja carga parasitaria.

**Palabras clave:** Bilharziosis, inmunodiagnóstico, IEFA, APIA, western blot, esquistosomosis.

### INTRODUCCIÓN

En Venezuela, la bilharziosis o esquistosomosis, causada por *S. mansoni* y transmitida por el caracol acuático *Biomphalaria glabrata*, se encuentra localizada en la región centro-norte costera (Alarcón de Noya *et al.*, 1999). En la actualidad, las cargas parasitarias presentes en la mayoría de la gente infectada en nuestro país son bajas, observándose como consecuencia una baja sensibilidad en las pruebas coproparasitológicas (Alarcón de Noya *et al.*, 1999), requiriéndose alternativas de diagnóstico. El inmunoensayo para la Fosfatasa Alcalina (**IEFA**) es una prueba sobre fase sólida que pone en evidencia la presencia de anticuerpos contra la fosfatasa alcalina (**FA**) del parásito (Pujol *et al.*, 1989), un antígeno glicoprotéico relevante en la membrana de los vermes adultos (Cesari *et al.*, 1987; Pujol & Cesari, 1990). En el presente estudio, se evaluó la utilidad del **IEFA** con más de un millar de sueros para el diagnóstico epidemiológico de la esquistosomosis mansoni, comparándose con la **PPCO** (única prueba de detección de anticuerpos asociada con casos activos de

bilharzia), la **ELISA** (una prueba muy común realizada con antígeno de huevo) y con "Western Blot" (**WB**), esta última metodología con el propósito de corroborar y evaluar la respuesta inmune contra otros antígenos de membrana diferentes a la **FA**.

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Antígenos.** La **FA** del parásito se obtuvo de una fracción membranosa de vermes adultos extraída con *n*-butanol (v/v, 10 min/4°C) (extracto butanólico, **EB**) (Pujol & Cesari, 1990). El antígeno soluble de huevo (**ASH**) se obtuvo mediante la ultracentrifugación a 100.000 g/2 h/4°C de un homogeneizado de huevos de *S. mansoni* a pH 7,2 (Boros & Warren 1970); el **ASH** fue tratado con 2 mM Na-metaperiodato para disminuir las reacciones cruzadas con otros parásitos.

**Sueros.** Las muestras de sangre se recolectaron en comunidades diferentes: 1) Caraballeda (Edo. Vargas), donde hubo transmisión en el pasado (Alarcón de Noya *et al.*, 1987) y donde se encontró aproximadamente un 3,5% de pacientes adultos expulsando huevos de *S. mansoni* en las heces (determinado por el método de Kato-Katz); 2) La Candelaria (Edo. Aragua), donde había transmisión en el pasado y donde la población había sido tratada siete

<sup>1</sup> Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Apdo. 21827, Caracas 1020 A, Fax: 0212 504 13 82, E-mail: icesari@ivic.ve, <sup>2</sup> Sección de Biohelmintiasis, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela (U.C.V.), Apartado Postal 4417, Caracas 1010 A

meses antes de la toma de muestras (noviembre 1996) (comunicación personal de la Dra. T. Camejo, M.S.D.S.); 3) Belén (Edo. Carabobo), evaluada en el presente estudio, donde se encontró alrededor de un 4% de pacientes con coprología positiva; 4) Caracas (Dtto. Capital), lugar sin transmisión, de donde se obtuvieron 322 muestras de donantes voluntarios tomadas aleatoriamente del banco de sueros de Quimbiotec (I.V.I.C., Edo. Miranda).

**Inmunoensayos.** La **PPCO** (Oliver-González, 1954), se consideró positiva cuando el suero produjo una reacción de inmunoprecipitación sobre 10% o más de huevos maduros de *S. mansoni*. Para el **ELISA** (Voller *et al.*, 1976), se utilizaron placas de poliestireno sensibilizadas con **ASH** (0,25 µg/ pozo) que se incubaron con diluciones séricas (1:200), la reacción antígeno-anticuerpo se reveló con anti-IgG humana-fosfatasa alcalina y *p*-nitrofenil fosfato. El *p*-nitrofenol se midió a 405 nm en un SpectraMAX 250 (Molecular Devices, EEUU) y el umbral de referencia se estableció tomando la media de los valores obtenidos para los sueros negativos más tres desviaciones estándar. En el **IEFA** (Pujol *et al.*, 1989), las placas se sensibilizaron con Proteína A (0,5 µg/pozo), se incubaron con diluciones séricas (1:100) y seguidamente se añadió **EB** (> 0,1 mU de FA/ml). La **FA** capturada se reveló por su reacción de hidrólisis sobre *p*-nitrofenil fosfato o 4-metilumbeliferil fosfato (**4-MUP**) a 37°C; la fluorescencia de la 4-metilumbeliferona liberada se midió en un SpectraFluor (Tecan, Austria). Para el **WB** (Towbin *et al.*, 1979), los antígenos del **EB** se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (15%) en

presencia de SDS (SDS-PAGE), en condiciones no reductoras, y se electrotransferieron a nitrocelulosa. Los polipéptidos transferidos se incubaron con los sueros y luego con anti-IgG-peroxidasa. Las reacciones se revelaron con Luminol y se registraron sobre películas argentadas (Hyperfilm, ECL-Amersham). La sensibilidad y la especificidad de las pruebas se calculó en forma estándar (tablas 2 x 2) y el grado de concordancia se estimó usando el índice "kappa" (k) de Cohen (Silcoks, 1983), el cual va desde -1 (desacuerdo) a +1 (total concordancia).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

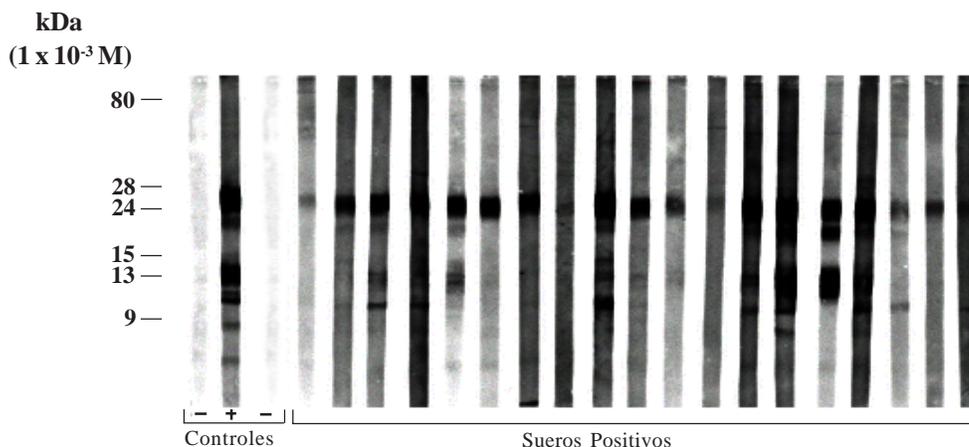
La población infantil (1 a 10 años) encuestada en Caraballeda y La Candelaria, no mostró huevos de *S. mansoni* en las heces, sugiriendo que actualmente no hay transmisión en esos lugares. La población encuestada en Belén, en todos sus grupos etarios mostró numerosos casos con cargas parasitarias variables (3 a 1928 huevos/g heces), indicando transmisión activa. Las pruebas inmunológicas mostraron individuos positivos en todas las poblaciones examinadas (Tabla 1). La prevalencia por **PPCO** (16,1% en Caraballeda; 8,0% en La Candelaria; 15,4% en Belén) fue siempre menor que por **IEFA** (33,9% en Caraballeda; 24,7% en La Candelaria; 19,3% en Belén) y que por **ELISA** (26,8% en Caraballeda; 27,3% en La Candelaria; 26,9% en Belén) en los tres sitios estudiados (Tabla 1). La prevalencia por **IEFA** fue mayor en Caraballeda (33,9%) comparada con La Candelaria (24,7%) y Belén (19,3%), mientras que por **ELISA** fue

**Tabla 1**  
Prevalencia de la esquistosomosis mansoni estimada por diferentes pruebas de inmunodiagnóstico en tres poblaciones del área endémica venezolana.

Pruebas	Antígeno	Caraballeda n = 254		La Candelaria n = 385		Belén n = 875	
		(+)	(%)	(+)	(%)	(+)	(%)
<b>PPCO</b>	<b>Huevo</b>	41	16,1	31	8,0	135	15,4
<b>ELISA</b>	<b>Huevo</b>	68	26,8	105	27,3	235	26,9
<b>IEFA</b>	<b>Adulto</b>	42	33,9	95	24,7	169	19,3

similar en todos los sitios (aprox. 27%). En Belén, el diagnóstico por **PPCO** y por **IEFA** tuvieron una alta concordancia ( $k = 0,77$ ). La diferencia en prevalencia encontrada en La Candelaria entre **PPCO** (8,0%) y **IEFA** (24,7%), se debe probablemente a que esta población poseía anticuerpos anti-**FA** circulantes ya que había sido tratada con Praziquantel unos siete meses antes de la toma de muestras. Cabe destacar que la **PPCO** comienza a hacerse negativa tres meses después de la quimioterapia (Cancio *et al.*, 1967, Rifaat *et al.*, 1969, Alarcón de Noya *et al.*, 1992), mientras que los anticuerpos anti-**FA** circulan aún 5 años después (Pujol *et al.*, 1989). En áreas no endémicas para bilharzia en Venezuela (Edo. Bolívar), la **PPCO** y el **IEFA**, contrario al **ELISA**, fueron 100% específicas (Alarcón de Noya *et al.*, 1997). Esta alta especificidad del **IEFA** fue confirmada además por la negatividad de los 322 sueros de donantes voluntarios de Caracas, lo cual excluye una reacción cruzada con otros parásitos y sugiere que en Caraballeda, una zona sin transmisión al momento del muestreo y con una

un elevado número de individuos positivos tanto por **IEFA** (33,9%) como por **WB** (33,9%), habiéndose observado en Caraballeda una alta concordancia entre estas dos pruebas ( $k = 0,86$ ). Esta interpretación se ve reforzada por el hecho de haber encontrado un pequeño porcentaje de la población adulta de Caraballeda (3,5%) coprológicamente positiva. En **WB**, se observó el reconocimiento específico y variable de unos 14 antígenos de membrana (10-150 kDa), especialmente un complejo antigénico de 24-28 kDa que fue reconocido por más del 95% de los pacientes (Fig. 1). No se excluye que algunos casos positivos por **PPCO/ELISA** y negativos por **IEFA** (<1,5% del total), resulten de una restricción genética en el reconocimiento de la **FA** (Pujol *et al.*, 1989). En el **IEFA**, los ensayos realizados con el sustrato fluorogénico **4-MUP** y con el sustrato cromogénico *p*-nitrofenil fosfato usando sueros de Belén, concordaron en más de 99%, pero el ensayo con el sustrato fluorogénico produjo resultados en un tiempo 6 veces menor, una ventaja para la utilización del **IEFA** en la pesquisa masiva de la esquistosomosis.



**Figura 1.** - Antígenos de EB separados por SDS-PAGE (15%) y analizados por WB con un pequeño grupo de sueros positivos para *S. mansoni*. Sueros control positivo (+) y negativo (-). Bandas reveladas con Luminol.

población tratada en 1982-83 (Alarcón de Noya *et al.*, 1987), muchas personas (>10 años) que resultaron positivas por **IEFA**, podrían estar todavía albergando algunos vermes adultos. Es sabido que *S. mansoni* puede vivir por más de 15 años en el hospedador (Harris *et al.*, 1984) y es posible que muchas personas infectadas en la época de transmisión y que no recibieron tratamiento, aún porten algunos vermes. Las secreciones y excreciones de los vermes remanentes estimularían una producción continua de anticuerpos anti-membrana, lo que se traduciría en

## CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que el **IEFA** es una técnica sensible y específica para detectar seropositividad por *S. mansoni* en zonas endémicas, con baja o pasada transmisión. Por su simplicidad, posibilidad de utilización masiva, eficacia y bajo costo, el **IEFA** puede ser utilizado de rutina en los programas de lucha contra la bilharziosis o esquistosomosis, pudiendo favorecer decisiones sobre aplicación quimioterapéutica en áreas no tratadas previamente.

## SUMMARY

The alkaline phosphatase immunoassay (**APIA**) detects the presence of antibodies to the adult *Schistosoma mansoni* worm membrane alkaline phosphatase. The diagnostic value of **APIA** was tested with 1,514 sera of patients from three different Venezuelan endemic communities and 322 sera from Caracas. Sensitivity of **APIA** was in the range of 91.1 – 96.8% in comparison to the circumoval precipitin test (**COPT**) (gold standard) and 60.8 – 80.9% in comparison to **ELISA** (done with egg antigens). **APIA** was 100% specific when tested with sera from subjects resident in non endemic localities. It showed > 84% agreement (Cohen "kappa" test) with "**Western Blot**" performed with adult worm membrane antigens and a positive agreement with **COPT** (40.6 – 77.1%) and **ELISA** (51.4 – 69.1%) in the three endemic populations studied. Results indicate that **APIA** may be applied to the epidemiological survey of schistosomiasis mansoni in endemic zones, being very sensitive for the detection of people with low parasitic charge.

**KEY WORDS.** Bilharziosis, immunodiagnosis, IEFA, APIA, western blot, Schistosomiasis.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Sr. César Matos por el mantenimiento del ciclo de *S. mansoni* y por la obtención del material biológico. Nuestro reconocimiento a todas las comunidades del área endémica que colaboraron en la realización del presente estudio, a todo el personal de la Sección de Biohelmintiasis (Instituto de Medicina Tropical, I.M.T./U.C.V.), de Malariología (M.S.D.S., Edo. Aragua), e INSALUD (Edo. Carabobo) por su colaboración en la toma, procesamiento y ensayo de las numerosas muestras obtenidas en las salidas de campo, al gobierno de Venezuela y al Banco Mundial por el financiamiento otorgado (Proyecto PCEE-PNUD VEN/96/002).

## REFERENCIAS

- Alarcón de Noya, B., Noya, O., Urbáez, R. & Rísquez, J. (1987). Reactivación del foco bilharziano de Caraballeda en 1980-83. Boletín Dir. Malariol. San. Amb., **27**: 86-93.
- Alarcón de Noya, B., Spencer, L. & Noya, O. (1992). Pre- and Post-treatment immunodiagnostic evaluation in human schistosomiasis mansoni. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **87** (Suppl. IV): 271-276.
- Alarcón de Noya, B., Cesari, I.M., Losada, S., Colmenares, C., Balzán, C., Hoebeke, J. & Noya, O. (1997). Evaluation of alkaline phosphatase immunoassay and comparison with other diagnostic methods in areas of low transmission of schistosomiasis. Acta Trop., **66**: 69-78.
- Alarcón de Noya, B., Balzán, C., Arteaga, C., Cesari, I., & Noya, O. (1999). The last fifteen years of schistosomiasis in Venezuela: features and evolution. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **94**: 139-146.
- Boros, D.L. & Warren, K.S. (1970) Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. J. Exp. Med., **132**: 488-507.
- Cancio, M., Rivera de Sala, A., Ramírez de Arellano, G. & Rodríguez-Molina, R (1967). Circumoval antibodies measurements during treatment of experimental schistosomiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., **16**: 729-734.
- Cesari, I.M., Pujol, F.H., Rodríguez, M. & Alarcón de Noya, B. (1987). Antigenic enzymes of *Schistosoma mansoni*: possible use for immunodiagnosis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **82** (Suppl. IV): 175-177.
- Harris, A.R., Risell, R.J. & Charters, A.D. (1984). A review of schistosomiasis in immigrants in Western Australia, demonstrating the unusual longevity of *Schistosoma mansoni*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **78**: 385-388.
- Oliver-González, J. (1954). Anti-egg precipitations in sera of human infected with *Schistosoma mansoni*. J. Infect. Dis., **95**: 86-91.
- Pujol, F.M., Alarcón de Noya, B. & Cesari, I.M. (1989). Immunodiagnosis of schistosomiasis mansoni with APIA (Alkaline Phosphatase Immunoassay). Immunol. Invest., **18**: 1071-1080.
- Pujol, F. & Cesari, I.M. (1990). Antigenicity of adult *Schistosoma mansoni* alkaline phosphatase. Parasite Immunol., **12**: 189-198.
- Rifaat, M., Ismail, I., El Mahallawy, M., Awaad, S. & Essawy, M. (1969). Comparative study of some immunological tests for schistosomiasis before and after treatment. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **63**: 338-342.
- Silcocks, P.B.S. (1983). Measuring repeatability and validity of histological diagnosis - a brief review with some practical examples. J. Clin. Pathol., **36**: 1269-1275.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **76**: 4350-4354.
- Voller, A., Bartlett, A. & Bidweell, D. (1976). Enzyme immunoassays for parasitic diseases. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **70**: 98-105.