

1. Fasciola Hepática
2. Fascioliasis -- Ecuador -- Tesis y disertaciones acad.
3. Fascioliasis -- Investigaciones -- Laboratorios
4. Distomatosis
5. Parasitología -- Investigaciones -- Ecuador
6. Proteínas
7. Inmunología

Tesis
RA
644
- F37
C37
2000

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias de la Salud

Identificación de Proteínas Inmunogénicas de

62518

Fasciola hepatica

Isabel Casariego

USFQ = BIBLIOTECA

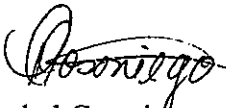
Tesis para la Obtención del Grado de Doctor en Medicina

Resumen de Tesis

Fasciolosis es una parasitosis que afecta tanto a animales como a seres humanos, provocando no sólo grandes pérdidas económicas, sino un importante problema de salud pública en zonas rurales alrededor del mundo. En Ecuador, como en otros países Andinos, se demostró que *Fasciola hepatica* infecta a campesinos de la Sierra Andina que se dedican a la crianza de ganado ovino (27).

El método de diagnóstico más empleado para esta enfermedad, es el examen parasitológico de heces (métodos de sedimentación). Sin embargo, este método ha probado tener una baja sensibilidad (37%) (7), lo cual debe haber contribuido a la subestimación del impacto de esta patología en la salud pública. Estudios recientes recomiendan el uso de técnicas serológicas para un diagnóstico certero de esta parasitosis. El uso combinado de pruebas de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) y Western Blot proporciona elevada sensibilidad y especificidad.

En este estudio se caracterizó la respuesta humoral contra diferentes proteínas excreción-secreción mediante la utilización de Western blot. Dos proteínas (68 y 29 kDa) son reconocidas con mayor frecuencia por los anticuerpos presentes en el suero de individuos infectados.



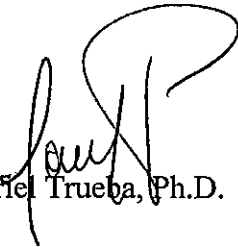
Isabel Casariego

Hoja de Aprobación

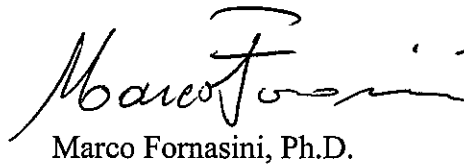
Estudiante: Isabel Casariego

Título de Tesis: Identificación de Proteínas Inmunogénicas de *Fasciola hepatica*

Jurado de Tesis:

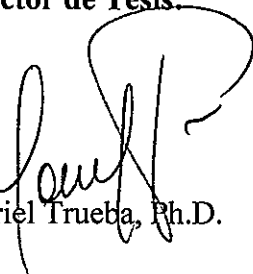


Gabriel Trueba, Ph.D.



Marco Fornasini, Ph.D.

Director de Tesis:



Gabriel Trueba, Ph.D.

Agradecimientos

Quiero agradecer a Gabriel Trueba por haber compartido conmigo la idea de esta investigación y por haberme guiado con mucha paciencia durante los años en que trabajé en este proyecto. Además, quiero agradecer a Sonia Zapata, Teresa Guerrero, Sonia Ontaneda y Marco Fornasini por toda la ayuda que me brindaron en cada paso.

Tabla de Contenidos

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO	4
ANTECEDENTES	5
IMPORTANCIA DE LA FASCIOLASIS.....	5
DIAGNÓSTICO DE FASCIOLASIS	6
JUSTIFICACIÓN	10
MATERIALES Y MÉTODOS	12
OBTENCIÓN DE <i>FASCIOLA HEPATICA</i>	12
SUERO SANGUÍNEO	12
OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS EXCRECIÓN SECRECIÓN	12
ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.....	13
WESTERN BLOT	13
RESULTADOS	15
CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	15
ELECTROFORESIS	15
WESTERN BLOT	15
CONCLUSIÓN	17
VÍNCULO CON TRABAJOS FUTUROS	28
BIBLIOGRAFÍA	32
CURRICULUM VITAE	36

Lista de gráficos y tablas

TABLA

TABLA #1. MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DEL ESTÁNDAR Y DE LOS ANTÍGENOS DE ES EMPLEADOS EN LA PRUEBA DE WESTERN BLOT 29

GRÁFICO

GRÁFICO #1: CURVA DE REGRESIÓN DE LOS VALORES DE ABSORBANCIA EN LA MEDICIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL ANTÍGENO ES DE *FASCIOLA HEPATICA* 30

FIGURA

FIGURA #1: WESTERN BLOT 31

Introducción

Fasciola hepatica es un tremátodo cuyo ciclo de vida ha sido dividido en seis fases principales. Una fase inicial comprende la expulsión de los huevos desde el interior del hospedero hacia el ambiente. Luego de 2 semanas de incubación, el miracidio ingresa a un hospedador intermediario: un caracol del género *Lymnaea* que habita en estanques de agua o acequias. Una cuarta etapa (dentro del caracol) comprende el desarrollo de esporocistos, redias y finalmente la salida de cercarias las cuales, en el medio ambiente, se transforman en metacercarias que se adhieren a plantas acuáticas o flotan en el agua. La etapa final del ciclo consiste en el consumo de estas plantas acuáticas o la ingestión de agua contaminada, lo cual deriva en la introducción de la cercariae en un nuevo huésped en el cual crecerán los parásitos adultos (7).

En su estado adulto este parásito es un tremátodo con forma de hoja que mide pocos milímetros (30 largo y 13 ancho) y se aloja en las vías biliares. En este sitio anatómico ocurre la fertilización la cual es principalmente cruzada entre dos parásitos, a pesar de que este parásito es hermafrodita (7).

Varios estudios reportan que el ganado ovino infectado puede eliminar cientos de miles de huevos del parásito diariamente, y que el período de infección dentro de estos huéspedes puede extenderse por 11 años o más. En la revisión sobre enfermedades tropicales de 1990 de la Organización Mundial de la Salud se reporta, la ausencia de estudios que provean información confiable acerca de la velocidad de expulsión de los huevos del parásito así como de su permanencia en huéspedes humanos (7).

En Perú y Bolivia la fasciolosis animal es prevalente en zonas elevadas (2.500 metros sobre el nivel del mar) y sus reservorios son fundamentalmente ruminantes y otros mamíferos domésticos (16,13,26). De acuerdo a los trabajos realizados en Perú y Bolivia, los factores de riesgo para la población humana son el habitar a una altitud de 2.500 metros sobre el nivel del mar, el consumo de vegetales crudos especialmente berro y la ingestión de agua de acequias sin tratamiento sanitario (7,26).

Los parásitos juveniles penetran el intestino delgado, la cápsula hepática y finalmente llegan a las vías biliares. La llegada de *F. hepatica* al hígado esta acompañada de extenso daño al parénquima debido a la abrasión mecánica y química que permite la migración del parásito y a la respuesta inflamatoria que esta genera. Esta fase de la enfermedad se conoce como fasciolosis aguda y se manifiesta con fiebre, hepatomegalia y prurito generalizado (7).

La respuesta del hospedador al parásito se caracteriza por leucocitosis (alrededor de 10000/mm³) y eosinofilia que abarca porcentajes desde 5% hasta 79%. Estos son signos frecuentes en la infección crónica. Otro signo asociado con el 50% de los casos de fasciolosis crónica es anemia, la cual puede ser leve o moderada, y en ocasiones alcanzar niveles de hemoglobina extremadamente bajos. La velocidad de sedimentación de eritrocitos sufre igualmente variaciones patológicas en estos pacientes, presentándose un aumento de ésta en la fase aguda y un incremento moderado en fases avanzadas. A pesar de no haber datos precisos acerca de la expresión de la enfermedad en las pruebas de función hepática, se ha reportado en algunos estudios una elevación de las transaminasas y la fosfatasa alcalina en la fase obstructiva (fasciolosis crónica) o en los episodios de cólico biliar que suelen presentarse acompañados de ictericia o de elevación de la

bilirrubina que no supera los 2 mg/dl (7). La infección con *F. hepática* estimula intensamente la inmunidad humoral, principalmente en infección aguda; permitiendo que la detección de anticuerpos sea un excelente medio de diagnóstico para esta patología (7).

Objetivo

Identificación, mediante Western blot, de antígenos inmunodominantes de *F. hepatica* que potencialmente podrían ser empleados en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico.

Antecedentes

Importancia de la fasciolosis

La *Fasciola hepatica* es un parásito que tradicionalmente ha sido causante de enfermedad en rumiantes y a éste se le atribuyen innumerables pérdidas económicas (7,13). A pesar de que este tremátodo infecta primordialmente a animales, se ha reportado en casi todo el mundo casos de infección en humanos (7). Un gran porcentaje de los casos infectados con este parásito proviene de las zonas más pobres del planeta, lo que conspira en contra de un buen sistema de información estadístico que esté encaminado al establecimiento de bases de datos acerca de la incidencia y prevalencia de dicha enfermedad. Entre los países afectados cabe citar a Egipto, Cuba, Perú, Francia, Portugal, España y Rusia como los que presentan un mayor número de casos reportados (7). Entre los países con un menor número de reportes figuran Argelia, Zimbabwe, Chile, Brasil, Uruguay, India, Irán, Israel, Bulgaria, Grecia e Italia (13). Según Hillyer (13) se ha detectado una alta prevalencia en regiones andinas de Bolivia y Perú. Existen múltiples trabajos realizados en Puerto Rico, Perú, y Cuba que describen la prevalencia de fasciolosis humana en estas zonas (5,10,11,13,17,26). Partiendo de estos datos se evidencia la amplia distribución geográfica de esta parasitosis: desde zonas tropicales hasta las regiones templadas de Europa y las montañas de los Andes.

Aparentemente, ningún trabajo acerca de la presencia de esta enfermedad en humanos ha sido realizado en Ecuador en años anteriores. Sin embargo, Astudillo (3) indica que ocasionalmente estos parásitos han sido encontrados durante cirugía de vesícula biliar realizadas en Quito y que esta parasitosis es una de las más comunes en

Ecuador (3). Existe bibliografía ecuatoriana del siglo XIX, en la que se menciona a la fasciolosis como una enfermedad importante de la región interandina (3). Un estudio reciente por Trueba et al. describe por vez primera la presencia de fasciolosis humana en comunidades andinas del Ecuador, utilizando la prueba de ELISA como método de diagnóstico (27)

Diagnóstico de Fasciolosis

Uno de los aspectos que ha dificultado la identificación de esta enfermedad en Ecuador es la carencia de un método de diagnóstico práctico. Esta parasitosis produce una sintomatología no específica que puede estar caracterizada por malestar general, dolor abdominal difuso y prurito generalizado (7,13).

Técnicas de imagen, como las radiografías abdominales y de tórax, colangiografía oral, percutánea, e intravenosa, tanto como endoscopías retrógradas colangiopancreatografía, han sido muy utilizadas en el diagnóstico de esta enfermedad (7). Sin embargo, se ha visto que estas técnicas no ofrecen resultados que permitan diferenciar entre la fasciolosis y otras enfermedades en las cuales se presenta dilatación de las vías biliares (7). Lo mismo ha ocurrido con la tomografía con radioisótopos en la cual no se puede detectar un patrón específico de la invasión hepática con *F. hepatica* (7).

La técnica de ultrasonido permite la detección de las lesiones provocadas tanto en hígado como en vías biliares por la invasión del parásito. Lesiones nodulares hipodensas sugestivas de infección con *F. hepatica* han sido detectadas mediante tomografías computarizadas. En estos casos la realización de nuevos estudios tomográficos posteriores al tratamiento antiparasitario demuestra una disminución de las lesiones encontradas (7). Sin embargo, los exámenes radiológicos mencionados requieren una

infraestructura compleja y representan un costo imposible de cubrir en las zonas rurales de los Andes ecuatorianos.

El examen parasitológico comprende la detección de huevos del parásito adulto, tanto en las heces como en el drenaje biliar de los individuos infectados. Esta técnica debe ser realizada por un laboratorista experimentado, es compleja y carece de sensibilidad (7,11,13,16,21). En un estudio comparativo se utilizaron cinco diferentes técnicas de separación de huevos de *Fasciola* de las heces de ganado. Las cifras obtenidas para los valores de recuperación de huevos con el empleo de cada técnica, fueron: método de formalina éter (5.3%), método de HCL éter (7.8%), método modificado de Weller-Dammin (37%), método de tampón citrato-Tween 80- éter (25.3%) y el método AMS III (Tween 80) con 30.5% de recuperación (7). Además de la diferencia en sensibilidad del método de sedimentación usado en la recuperación de huevos en las heces, otro factor que debe ser tomado en cuenta en la interpretación de los hallazgos es la posible ingestión de hígados infectados y la presencia de falsos valores positivos en el examen coproparasitario (7)

Algunos trabajos han estado encaminados al desarrollo y evaluación de métodos de diagnóstico para esta parasitosis. Los métodos serológicos ofrecen ventaja en sensibilidad con respecto a las pruebas parasitológicas, y algunas pruebas como el Western blot prometen una alta especificidad en la identificación de esta patología (16,13). Las técnicas de ELISA y Western blot (WB) utilizando antígenos ES, son las propuestas como herramientas futuras en el diagnóstico de esta infección (9,10,11,13,17,19,21,23).

Inicialmente los estudios diseñados para el desarrollo de las técnicas serológicas emplearon antígenos somáticos (antígenos obtenidos de la trituración de parásitos completos), antígenos de excreción-secreción y antígenos de tegumento (10,13). Posteriormente las investigaciones se han orientado al trabajo con antígenos de excreción-secreción (ES) por la supuesta especificidad de los mismos en el diagnóstico de fasciolosis (9,10,13). Algunos investigadores han comenzado a usar estos antígenos con resultados prometedores en el diagnóstico de la enfermedad en humanos (9).

La prueba de ELISA ha sido tema de discusión por su aparente inespecificidad en el diagnóstico de esta parasitosis cuando se la emplea en zonas en las que existen infecciones causadas por otros tremátodos. En varios estudios los resultados apoyan la presencia de reacción cruzada entre anticuerpos contra *F. hepatica* y anticuerpos contra *Schistosoma mansoni* (14,20,22). Uno de estos estudios reporta la clonación, secuenciamiento y expresión de un polipéptido antigénico que contiene secuencias de aminoácidos comunes para *F. hepatica* y *S. mansoni* (22). Una de las ideas propuesta, para explicar la ausencia de reacción cruzada en varios estudios, es la existencia de discrepancia entre los niveles de absorbancia considerados en diferentes trabajos para el reconocimiento de positividad o negatividad. Este rango de niveles intermedios de absorbancia, según algunos investigadores, puede ser explicado por la presencia de anticuerpos con reacción cruzada entre estos dos parásitos (13,22). Un estudio realizado por Hillyer y Serrano (14) describe la presencia de reacción cruzada entre *S. mansoni*, *F. hepatica* y *Paragonimus westermani*. Los artículos citados en este párrafo ofrecen datos objetivos de la presencia de reacción cruzada entre estas parasitosis y proponen posibles explicaciones para los resultados opuestos encontrados por algunos investigadores (13).

Otros estudios ponen en tela de juicio estas conclusiones al sugerir la utilidad de este método y la ausencia de reacción cruzada entre *F. hepatica* y otras parasitosis (9,24). Algunos trabajos sobre sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA en el diagnóstico de fasciolosis muestran cifras que varían entre 53-90% para los valores correspondientes a sensibilidad y de 93-100% para los valores de especificidad de esta prueba (11,25). A pesar de ello, en localidades en las que existen otras infecciones por tremátodos, es indispensable el desarrollo de pruebas más específicas como Western blot (WB) para el diagnóstico seguro y temprano de fasciolosis.

Los ensayos de WB llevados a cabo por Espino et al (10) han identificado proteínas ES con pesos moleculares de 37kDa, 26kDa, 24kDa, 22kDa y 13kDa como las más específicas. Estas proteínas fueron reconocidas por anticuerpos de pacientes con fasciolosis comprobada por examen coproparasitario (10). En otro estudio se describe proteínas de 25-30 kDa, así como un segundo grupo con pesos moleculares entre 150-160 kDa (21). Un estudio realizado por Hillyer y Soler de Galanes (15) identifica una proteína de 17 kDa con gran especificidad en el diagnóstico serológico de fasciolosis.

Estos y otros estudios sugieren la necesidad de investigar sobre nuevas técnicas de diagnóstico de una patología poco explorada y diagnosticada; pero con una prevalencia importante en muchas zonas del planeta (7,13). Las investigaciones han colocado al análisis de ELISA y Western blot como el camino correcto para la identificación de antígenos específicos de este parásito. Al momento existe literatura que sustenta el uso de los antígenos de excreción- secreción como el producto del parásito con mayor especificidad en la ejecución de los ensayos serológicos (9,19,21).

Justificación

La fasciolosis en Ecuador, probablemente, es una enfermedad de iguales proporciones a las encontradas en Perú y Bolivia (7, 13,16,17,26). Esta hipótesis está basada en las similitudes ecológicas y socioculturales de las comunidades campesinas andinas de estos tres países; así como en prevalencia elevada de fasciolosis animal en los Andes ecuatorianos (información verbal en el Camal Metropolitano de Quito). En el estudio realizado por Trueba et al. (27), en cuatro comunidades andinas ecuatorianas, se detectó la presencia de huevos de *F. hepatica* en todos los animales estudiados (20 ovejas) en la población de Cuturiví Grande localizada en la provincia de Cotopaxi a 3000 metros sobre el nivel del mar. En este mismo estudio se detectó que el 40 al 60% del ganado investigado en la población de Cayambe (2800-3200 metros sobre el nivel del mar) portaba huevos de *F. hepatica* en las heces (27).

La carencia de reportes de fasciolosis animal y humana en Ecuador puede deberse a múltiples factores, entre los más importantes se encuentran la distribución geográfica irregular de la enfermedad, la ambigüedad de las manifestaciones clínicas y la carencia de un método de diagnóstico sencillo y confiable. Al respecto, recientemente el equipo de Microbiología de USFQ desarrolló una prueba de ELISA que ha permitido la documentación de fasciolosis humana en Ecuador. Este estudio describe una prevalencia del 6% (9 pacientes de 150) de esta parasitosis en el grupo estudiado; de ellos la mayoría fueron niños infectados con fasciolosis provenientes de una comunidad indígena de los Andes ecuatorianos (27).

A pesar de la utilidad que ha tenido la prueba de ELISA, el uso de antígenos ES esta sujeta a variaciones ocasionadas por condiciones ligeramente diferentes de extracción y a la presencia de proteasas en los extractos de *F. hepatica*. El propósito de la presente investigación fue el identificar péptidos que reúnan los requisitos de especificidad y sensibilidad, cuyos genes podrían ser clonados y empleados en producción de proteína recombinante. Esta proteína ofrecería la posibilidad de contar con métodos de diagnóstico más estables y de superior calidad.

Materiales y Métodos

Obtención de *Fasciola hepatica*

Los hígados provenientes de ovejas parasitadas fueron obtenidos en el Camal Metropolitano de Quito. Los hígados fueron transportados al laboratorio, inmediatamente disecados y los parásitos colectados.

Suero Sanguíneo

El suero de individuos positivos en la prueba de ELISA (27) se obtuvo en la comunidad de Cuturiví Grande (provincia de Cotopaxi, Ecuador). Los controles positivos fueron facilitados por Ana María Espino del Instituto Pedro Kouri de La Habana, Cuba. Los controles negativos provinieron de personas no expuestas a la enfermedad.

Obtención de Antígenos Excreción Secreción

La obtención de los antígenos de ES se realizó mediante una modificación del procedimiento descrito por Rivera Marrero et al (21). Los parásitos son lavados sumergiéndolos múltiples veces en PBS 0.01 M (Tampón Fosfato Salina 0.01 M) a temperatura ambiente por 10 minutos, hasta eliminar los restos de bilis y sangre. Posteriormente son incubados en PBS (1ml de PBS por *Fasciola* adulta) durante 3 horas a 37°C. El sobrenadante se colecta, se centrifuga a 20000 r.p.m. por 1 hora y finalmente es congelado a -4°C.

La concentración de proteína del antígeno ES fue determinada mediante el uso de la prueba Bio-Rad protein Assay (BioRad, California USA). De acuerdo a las instrucciones del fabricante, se utilizó IgG bovina como estándar de concentración y se

midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. El cálculo de la concentración se realizó a partir de la siguiente fórmula de regresión:

$$c = \beta_0 + \beta_1 * a + \beta_2 * a^2 + \beta_3 * a^3$$

Donde c = Concentración, y a = Absorbancia.

Electroforesis de Proteínas

Para la separación de proteínas de antígeno ES, se empleó electroforesis preparativa SDS en geles de 12% acrilamida (SDS-PAGE) de acuerdo al protocolo de Laemmli (18). La cantidad de proteína sometida a electroforesis por gel fue 27 mg en una ranura de 10 cm por 1 mm. Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (Sigma, St Luis, USA), utilizando el protocolo de Trueba et al (28).

Western Blot

La membrana de nitrocelulosa, resultante de la transferencia, fue cortada en tiras de 5 mm de grosor y sumergida en solución bloqueante (1% leche desgrasada en polvo disuelta en PBS) por 1 hora a temperatura ambiente.

Cada uno de los sueros de pacientes ha ser analizados fueron diluidos en solución bloqueante (1:50) y 10 ml de esta dilución se incubó con una tira de nitrocelulosa por 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. El mismo proceso fue empleado para los sueros de control positivos y negativos. Las tiras fueron lavadas cuatro veces (1 minuto cada lavado), en una solución 0.05 % Tween 20 en PBS y colocadas por 1 hora en presencia de un anticuerpo de cabra contra IgG humana diluido 1:5000 (10). Este anticuerpo estaba marcado con fosfatasa alcalina (LifeTechnologies).

La solución reveladora consiste en el conjugado de Diaminobenzidina (DAB) diluido en solución tampón 3X. Se utilizó 400 µl de DAB en 20 ml de solución 10 mM

Tris, 10 Mm sulfato de magnesio, pH 9.0. Se colocaron las tirillas en la solución reveladora por 10 minutos aproximadamente hasta que fueran visibles las bandas. La reacción se detuvo al sumergir las tirillas en agua destilada.

Resultados

Concentración de proteínas

Utilizando la ecuación: $c = 0,0048 + 0,201*a - 0,103*a^2 + 0,03373*a^3$, se calculó que la concentración de proteínas del antígeno utilizado era de 12 µg/ml (Tabla # 1).

Electroforesis

El patrón electroforético del antígeno de ES obtenido en este estudio se caracteriza por bandas con pesos moleculares ubicados por debajo de 68 kDa. Las bandas más intensas se encuentran en el rango de pesos moleculares entre 43-68 kDa, 20-29 kDa y 14-18 kDa.

Estas bandas fueron obtenidas consistentemente en varias pruebas realizadas con los antígenos de ES de *F. hepatica*. Otras pruebas realizadas con antígenos somáticos o antígenos de ES con SDS 10% presentaron problemas en la definición de las bandas. Los problemas más comunes fueron la presencia de bandas mal definidas al utilizar antígenos somáticos, o la ausencia de bandas con el uso de SDS.

Western Blot

Los resultados iniciales de Western blot de este estudio muestran reacción de proteínas del parásito con anticuerpos de los pacientes que previamente fueron reportados como positivos en la prueba de ELISA (27). Al tefir con azul de Coomassie el gel con el antígeno de ES se observaban bandas de bajo peso molecular. Las bandas mejor definidas tanto para el control positivo como para algunos de nuestros pacientes se encuentran en pesos moleculares entre 29-68kDa. Tres de los pacientes estudiados presentan bandas de

14kDa y 18kDa que no pueden ser identificadas en el control positivo. Los resultados de WB pueden observarse en la figura #1.

El suero del control positivo demostró una reacción clara con proteínas en el rango de 29-68kDa. En este ensayo, sin embargo, el control positivo muestra una zona de opacidad con bandas mal definidas entre los pesos moleculares 43-68kDa. Posiblemente esta zona de baja definición se debe a la presencia de múltiples bandas de peso molecular cercano las cuales se visualizan como una banda gruesa o poco definida. El control negativo no muestra ninguna reacción con proteínas de *F.hepatica*.

Los sueros de los pacientes 2, 3, 5 y 6 muestran diferentes bandas en el rango de pesos moleculares entre 29-68kDa. Estas bandas fueron también reconocidas por el control positivo. Los pacientes 4, 5 y 8 presentan bandas de pesos moleculares más bajos. En estos tres pacientes se evidencia una banda de aproximadamente 14kDa. El paciente 4 muestra una banda de reconocimiento de aproximadamente 18kDa. Los pacientes 1, 3 y 7 muestran bandas localizadas en pesos moleculares más altos, entre 97-200kDa. Estas bandas de pesos altos son también evidentes en el control positivo.

De los sueros de pacientes estudiados en esta prueba el patrón de reconocimiento de proteínas del control positivo y del paciente 3 muestra gran similitud. El paciente 3 es el caso con mayor reacción positiva para la prueba de ELISA y uno de los dos pacientes con examen coproparasitario positivo (27).

Conclusión

Las pruebas serológicas son sin lugar a duda el futuro en el diagnóstico temprano y seguro de la infección con *Fasciola hepatica*. Los datos mostrados en este estudio y en todos los estudios citados en el mismo, muestran la falta de viabilidad de otros recursos empleados tradicionalmente en el diagnóstico de esta patología. El cuadro clínico de esta enfermedad no permite la identificación temprana y certera de la misma (7). Por el contrario se requiere de un alto índice de sospecha por parte de los proveedores de salud para iniciar una evaluación completa encaminada a diagnosticar esta parasitosis. El examen coproparasitario es un método complejo y poco sensible que conspira en contra de una evaluación real del problema (7,13).

Por el contrario, la prueba de ELISA se ha convertido en una herramienta importante por su alta sensibilidad y especificidad (11,18), especialmente en regiones en donde las infecciones con otros tremátodos son poco probables o inexistentes. La prueba de WB ofrece nuevas posibilidades y a su vez plantea el desafío de desarrollar la técnica capaz de identificar una proteína antigénica específica. La prueba de WB desarrollada en esta investigación ha permitido identificar varias proteínas que estimulan la respuesta humoral durante la infección por *F. hepatica*. Sin embargo, la identificación de una proteína lo suficientemente antigénica y específica para detectar infecciones causadas por *Fasciola hepatica* no ha sido posible en este estudio.

La posibilidad de reacciones cruzadas entre proteínas antigénicas de *F. hepatica* y los antígenos de otros tremátodos ha sido la razón para el cuestionamiento del empleo de la técnica de ELISA en el diagnóstico de fasciolosis en ciertas regiones (13,20,22).

Varios investigadores sugieren el empleo de esta técnica que ha mostrado una alta sensibilidad y especificidad (11,25). En un trabajo publicado por Gorman et al. (11) en 1998, se describe la realización de la prueba de ELISA utilizando antígenos de ES crudos y purificados en el inmunodiagnóstico de fasciolosis bovina. Con el uso de antígenos crudos se calculó una sensibilidad del 53% y una especificidad del 100% para esta prueba. Al utilizar antígenos de ES purificados se obtuvo un incremento de la sensibilidad a 90% con una especificidad del 100% (11). En otro estudio publicado por Shaker et al. (25) se utilizó antígeno somático purificado para el diagnóstico de fasciolosis en humanos. La prueba de ELISA en este caso presentó una sensibilidad de 100% con una especificidad de 93% (25). De igual manera otros trabajos describen la ausencia de reacción cruzada entre *Fasciola hepatica* y otros tremátodos con el uso de DOT-ELISA en el diagnóstico de fasciolosis (21,24).

Algunos reportes sobre la existencia de antígenos con reacción cruzada y protección cruzada entre *F. hepatica* y *Schistosoma mansoni* han sido publicados en años anteriores (16,13,22). Estos estudios identifican claramente una desventaja en el uso de ELISA en zonas geográficas en que otros tremátodos podrían contribuir a resultados falsos positivos en el diagnóstico serológico de esta parasitosis. Sin embargo, el uso de la prueba de ELISA en el estudio realizado en las comunidades de la Sierra ecuatoriana (27) aparentemente está exento de este riesgo por la ausencia de infecciones causadas por otros tremátodos en esta región.

En un estudio realizado por Hillyer y Serrano se reporta la presencia de reacción cruzada entre proteínas antigénicas de *Fasciola hepatica* y *Paragonimus westermani* (14). *P. westermani* es un tremátodo que comparte características biológicas con *Fasciola*

hepatica y éste podría estar implicado en reacciones positivas falsas al emplearse la prueba de ELISA en el diagnóstico de fasciolosis en zonas en las que la paragonimiasis es una endemia. En Ecuador ha sido reportada la existencia de *Paragonimus mexicanus* en comunidades costeras de la provincia de Cotopaxi (12); sin embargo, tanto la localización geográfica como el cuadro clínico permiten claramente diferenciar fasciolosis y paragonimiasis en el contexto de la práctica clínica. *P. mexicanus* se localiza en zonas bajas del territorio ecuatoriano y este parásito produce una sintomatología pulmonar caracterizada por tos crónica, sudoración nocturna y hemoptisis (8). Por el contrario, fasciolosis es una patología prevalente en zonas de gran altitud de la Sierra ecuatoriana (27). La misma presenta una sintomatología no específica que comprende malestar general, náusea, dolor abdominal difuso y en ocasiones alteraciones de exámenes de laboratorio que sugieren obstrucción de las vías biliares por los parásitos adultos (7).

En consecuencia y debido a la alta sensibilidad de ésta, la prueba de ELISA ha sido empleada en este estudio como el método para identificar personas de comunidades indígenas de la Sierra ecuatoriana con anticuerpos contra *Fasciola hepatica* (27). Dicha prueba mostró una prevalencia de la enfermedad de aproximadamente 6 % (9 pacientes de 150) en este grupo de pacientes (27). Esta cifra coincide a grosso modo con las calculadas en estudios de prevalencia realizados con anterioridad en otras regiones (2,26).

Por ejemplo, en las provincias chilenas de Curico, Talca y Linares se realizó, en 1993, un estudio de prevalencia de fasciolosis que abarcó una muestra de 5861 pacientes de estas zonas geográficas. En dicho estudio se utilizó la prueba de ELISA para

identificar anticuerpos en el suero de los pacientes y se reporta una prevalencia del 4% de esta parasitosis en la población estudiada (2). Otra investigación, llevada a cabo en seis poblaciones peruanas ubicadas a 10000 pies sobre el nivel del mar, se basó en el análisis coprológico y serológico de muestras de 1011 individuos de la zona. Este estudio muestra una prevalencia de fasciolosis del 9% con rangos entre 4.5 y 34.2% en las diferentes villas (26). En un tercer estudio realizado en Bolivia por Bjorland et al. (6) se utilizó una muestra de 91 habitantes del altiplano boliviano. Este trabajo mostró que un 49% de las personas estudiadas presentó anticuerpos contra *Fasciola hepatica* en la prueba de ELISA. Los investigadores en este estudio, realizado en los Andes bolivianos, extrapolaron estos resultados a toda la comunidad y estimaron una prevalencia del 23% en el territorio estudiado, (6). Cabe señalar que los datos del estudio realizado por Bjorland et al.(6) corresponden a la región del altiplano boliviano la cual presenta una de las cifras de endemicidad de fasciolosis más altas del mundo (13). Los tres estudios citados en este párrafo (2,6,26) fueron realizados en regiones con condiciones ecológicas y socioculturales similares a las encontradas en las comunidades campesinas implicadas en el presente trabajo. Estas similitudes nos permiten hacer una estimación más precisa de los resultados obtenidos en nuestra investigación en cuanto a la prevalencia de fasciolosis en los Andes ecuatorianos.

Teniendo en cuenta que los cálculos de prevalencia de fasciolosis presentados anteriormente (2,6,26) estuvieron basados en la prueba de ELISA como método de diagnóstico, resulta interesante comparar estas cifras con las obtenidas al usar el estudio coproparasitario con este fin. Al respecto, en el estudio realizado por Apt et al. (2) en las provincias chilenas de Talca, Linares y Curico se reporta la prevalencia de fasciolosis

calculada a partir del examen parasitológico de las heces como de 0.70%; en contraste con un 4% calculado con el uso de la prueba de ELISA. Estos datos permiten establecer una diferencia en la estimación de prevalencia con el empleo de examen coproparasitario y las pruebas serológicas. Y a su vez, coinciden con los resultados obtenidos en nuestro trabajo: los cuales muestran que de los 150 pacientes estudiados, 9 pacientes tuvieron resultados positivos para la prueba de ELISA (27), en comparación con sólo 2 pacientes en los cuales se evidenció la presencia de huevos de *F.hepatica* en las heces. Esto ha permitido una estimación de la prevalencia de fasciolosis de un 1.3% con el empleo del examen coprológico en la presente investigación. Los hallazgos de ambas investigaciones sugieren la baja sensibilidad del estudio parasitológico de las heces en el diagnóstico *Fasciola hepatica* (7,13,23) y resumen la necesidad de generar nuevos estudios encaminados a perfeccionar las técnicas serológicas presentes.

Prácticamente todos los pacientes con prueba de ELISA positiva (27) reconocieron proteínas de diferentes pesos moleculares en la prueba de WB desarrollada en este trabajo. Este hallazgo apoya la conclusión de que la baja especificidad de la prueba de ELISA no es un problema en los Andes ecuatorianos. La mayoría de pacientes que fueron estudiados con la prueba de ELISA (27) son personas altamente parasitadas con otros parásitos como nemátodos y céstodos. A pesar de ello, sólo 9 personas tuvieron valores positivos en dicha prueba (27). Estos resultados respaldan el uso de la prueba de ELISA en el diagnóstico de fasciolosis no sólo por su alta sensibilidad sino también por su especificidad en la detección de anticuerpos contra *F. hepatica* en los Andes ecuatorianos. Sin embargo, estas conclusiones son inferidas a partir de la similitud de los resultados obtenidos en este trabajo con los datos publicados por otros investigadores

(2,6,26). En este contexto se hace mandatoria la comparación de la prueba de ELISA empleada en nuestra investigación con la prueba de oro (examen coprológico) para la estimación exacta de la sensibilidad y especificidad de dicha prueba.

Una vez identificados los pacientes con resultados positivos para la prueba de ELISA se procedió a la realización de la prueba de WB con el fin de determinar el patrón de reconocimiento de los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes diagnosticados con fasciolosis (27). En este trabajo no se pudo identificar proteínas que sean consistentemente reconocidas por los anticuerpos presentes en el suero de pacientes positivos para la prueba de ELISA (27). La ausencia de otros tremátodos en la región andina ecuatoriana conspira en contra de una explicación a este resultado basada en la existencia de reacción cruzada entre *Fasciola hepatica* y otros parásitos con similares proteínas antigénicas. La lectura e interpretación de los niveles de absorbancia en la prueba de ELISA (27) puede explicar la discordancia entre los resultados de ésta prueba y los obtenidos posteriormente con el WB en este estudio. Es decir, los niveles intermedios de absorbancia pueden generar duda en el punto de corte para un resultado positivo o negativo en la prueba de ELISA (13). De igual manera diferentes estadios de la enfermedad podrían estar representados por una carga menor o mayor de anticuerpos y por lo tanto ofrecer cifras de absorbancia disímiles, o mostrar un patrón de reconocimiento dispar en la técnica de WB (16). Las diferencias entre la respuesta inmunológica de cada individuo es otra de las posibles razones que justifica la presencia de los diversos niveles de anticuerpos y por lo tanto las variaciones en el tipo de proteína reconocida por cada persona.

La propuesta de la técnica de Western blot, como herramienta para aumentar la certeza en el diagnóstico de fasciolosis, ha tenido gran acogida entre los diferentes grupos de investigadores (11,13,23). Recientemente más estudios apoyan el uso de antígenos ES para la realización de esta prueba. Estos antígenos parecen ser más específicos y la técnica de WB permite la identificación de los mismos al reaccionar con los anticuerpos de los pacientes infectados.

La mayoría de estudios reporta antígenos de ES identificados por WB que se encuentran en los pesos moleculares bajos: Hillyer & Soler de Galanes reportan bandas de 17 y 63 kDa en humanos, conejos y ovejas con fasciolosis (16,13). Otro estudio de fasciolosis humana propone la presencia de proteínas antigénicas con pesos moleculares entre 12.5-14.7 kDa (19). Algunas investigaciones realizadas en animales describen proteínas antigénicas cuyos pesos moleculares son semejantes a los encontrados en estudios de esta parasitosis en humanos. Dos de estas investigaciones muestran proteínas con pesos moleculares entre 28-30 kDa (11) y 13-37 kDa (10). Todos los artículos citados anteriormente se refieren a antígenos presentes en infección aguda.

A pesar de que la mayoría de artículos reporta la presencia de proteínas antigénicas de bajo peso molecular; en un estudio realizado por Rivera Marrero et al (21) se describe la presencia de bandas de pesos moleculares altos (150-169 kDa) al utilizar sueros de pacientes con infección temprana (2-6 semanas pos infección), en la reacción con antígenos de ES de *F. hepatica*. Otro grupo describe también la presencia de bandas de alto peso molecular (150-160 kDa) en pacientes con infección temprana y la ocurrencia de bandas de pesos moleculares bajos 17 y 63 kDa en pacientes con enfermedad aguda (19). Las bandas de algunos de los pacientes en el presente estudio se

encuentran entre 14-68 kDa, lo cual coincide con los rangos descritos por los estudios antes mencionados, en lo que concierne a infección aguda.

La presente investigación muestra dos grupos de pacientes con diferentes bandas de reconocimiento. Un grupo (pacientes 4, 5, 8) con bandas de peso molecular bajo y otro grupo con bandas situadas en pesos moleculares intermedios y altos (pacientes 1,2,3,6,7). Como se ha mencionado anteriormente, algunos investigadores han sugerido que esta variación en los pesos moleculares puede estar dada por los estadios de la enfermedad en cada paciente (10,16,19,21). Sin embargo, nosotros consideramos más probable la existencia de diferentes respuestas inmunológicas teniendo en cuenta la variación entre individuos y el reconocimiento de diferentes moléculas antigénicas en el mismo período post-infeccioso (21). La variación en la respuesta inmunológica contra las diferentes proteínas de *F. hepatica*, u otras parasitosis, está relacionada no sólo con la naturaleza del antígeno sino con las características y la estructura genética de cada individuo (1).

El presente estudio se desarrolló con el uso de antígenos proteicos. Es importante, en consecuencia, tener presente que este tipo de antígeno es capaz de inducir una respuesta mediada por linfocitos T; células que a su vez intervienen en el desarrollo de tolerancia e inhibición de la respuesta generada a través de la formación de anti-idiotipos en enfermedad crónica o en estados de infección masiva con el parásito. Por otro lado, el complejo de histocompatibilidad (MHC) de cada individuo orquesta el desarrollo de una respuesta contra epítomos específicos mediada principalmente por linfocitos T. La incapacidad del MHC de ligar epítomos específicos de antígenos externos impide la presentación de éstos a las células T y por lo tanto se obstaculiza la activación de células B y la producción de anticuerpos. Lo contrario puede ocurrir con individuos que

reconocen perfectamente el idiotipo de la proteína en cuestión y por lo tanto ofrecen un patrón de reconocimiento en el estudio de sus anticuerpos. Otro posible mecanismo de tolerancia o inhibición de la respuesta inmunológica puede ocurrir a través de la presencia de citoquinas provenientes de los linfocitos T activados. Estos mediadores están presentes en el período pos infeccioso y parecen tener un efecto inhibitor de la respuesta inmunológica especialmente en infección crónica. Cualquiera de estas explicaciones sugiere la causa de la distribución desigual en los pesos moleculares de las proteínas reconocidas en la prueba de WB, lo que deriva en la incapacidad para identificar una proteína única y específica en el diagnóstico de fasciolosis en este estudio (1).

Las técnicas empleadas, las variadas interpretaciones de los resultados obtenidos en los múltiples estudios, la heterogeneidad en la respuesta inmunológica de cada individuo, y posiblemente los diferentes períodos de infección de los individuos en cada estudio, son algunos de los eventos que contribuyen a hacer más compleja la tarea de encontrar un método de diagnóstico sensible y específico para la infección con *Fasciola hepatica*.

Como ha ocurrido con estudios previos, este trabajo no tuvo éxito en identificar una proteína específica que sea reconocida por todos los pacientes con fasciolosis y que permita el diagnóstico certero de la misma. A pesar de ello es importante mencionar que estos resultados fueron obtenidos en un solo experimento por lo que cualquier conclusión futura debe hacerse sobre la base de nuevos ensayos que prueben la reproducibilidad del mismo. Igualmente serán necesarios futuros trabajos encaminados a perfeccionar la técnica descrita en la presente investigación.

La técnica de obtención de antígenos utilizada en este experimento implica un proceso que podría ocasionar dificultades prácticas en un futuro. Se requiere la obtención de los parásitos en una localidad distante y el proceso de separación de los antígenos implica un consumo considerable de tiempo. Además, es importante mencionar los problemas relacionados con el almacenamiento de las muestras y su futuro empleo en los ensayos de laboratorio. En este estudio, al utilizar muestras que estuvieron almacenadas a -4° C por varios meses (aproximadamente 6 meses), se evidenció la disminución de la intensidad de las bandas en la electroforesis de estas proteínas. Este evento indica una disminución en la cantidad de proteínas presentes en el antígeno luego de su almacenamiento y manipulación, lo cual conspira contra la adecuada interpretación de los posteriores resultados de las pruebas de ELISA y WB. Una probable explicación para este hallazgo es la presencia de proteasas que actúan en la degradación de los antígenos en cada paso de la prueba que implique la manipulación de los mismos. Técnicas de biología molecular que permitan la obtención de estas proteínas a partir de una biblioteca de DNA transformarían este proceso en un paso más eficiente en este tipo de experimentos. De igual manera debe considerarse el uso cauteloso de inhibidores de proteasas con el fin de evitar la degradación de los antígenos.

El problema presentado con la inadecuada definición de algunas bandas en el control positivo en la prueba de WB puede ser explicado por una cantidad excesiva de proteínas en la muestra utilizada. Otra posible explicación para este problema es que el suero utilizado reconoce múltiples proteínas de pesos moleculares similares, lo cual provoca una concentración mayor de anticuerpos en una zona de la membrana de nitrocelulosa. Futuros ensayos deberán comprender la medición precisa de la

concentración de proteínas en la muestra utilizada, así como la posible variación de la cantidad de esta muestra empleada en el estudio. El uso de un gel de acrilamida con mayor porcentaje podría contribuir a una mejor separación de proteínas con pesos moleculares similares y esto permitiría una visualización más clara en el reconocimiento posterior en la prueba de WB.

La concentración de proteínas en el antígeno de ES con la cual trabajamos para esta prueba parece ofrecer una cantidad adecuada de antígeno para la realización del experimento. A pesar de ello, el desarrollo de una manera más eficiente de obtener, concentrar y almacenar este antígeno es mandatorio en el futuro uso de este método de diagnóstico.

El presente trabajo ofrece datos preliminares en cuanto a la difícil tarea de identificar una proteína específica con el uso de Western blot en el diagnóstico de fasciolosis humana. Siendo el primer experimento sobre el tema realizado en el Ecuador, el mismo no debe ser tomado como la explicación definitiva a este dilema. Es indispensable la repetición, en condiciones controladas, de las pruebas realizadas en este ensayo.

La prueba de ELISA empleada como punto de partida en la identificación de pacientes con fasciolosis debe ser evaluada en cuanto a sensibilidad y especificidad con la adecuada comparación con la prueba de oro: recuperación de huevos del parásito de las heces mediante método de sedimentación. Las sugerencias de este trabajo en lo concerniente a obtención y manipulación de los antígenos usados en la prueba de WB deben ser estudiadas en futuros ensayos. Es importante el uso de antígenos frescos que hayan sido objeto de mínima manipulación y el empleo de inhibidores de proteasas para

optimizar la calidad de los mismos. La purificación de los antígenos usados (9,11) en el experimento podría ofrecer ventajas en cuanto a la identificación de una proteína de peso molecular específico.

Con la confirmación de la reproducibilidad de los resultados de este trabajo podrían hacerse conclusiones objetivas sobre el uso de la prueba de WB en el diagnóstico de fascioliasis en Ecuador. Esto permitiría propuestas concretas encaminadas a perfeccionar esta prueba e implementar su empleo en el país.

Vínculo con trabajos futuros

El presente estudio introduce un tema que debe generar futuros cuestionamientos y nuevas investigaciones en su respecto. La fascioliasis es un problema de salud en seres humanos, además de la causa de millonarias pérdidas económicas. Debido a que fascioliasis es una parasitosis que puede producir graves trastornos en quienes padecen la enfermedad, es indispensable la ampliación de la investigación serológica a otras regiones de los Andes Ecuatorianos.

Futuros trabajos podrían no sólo confirmar la reproducibilidad de los resultados de este estudio, sino encontrar el camino para el mejoramiento del diagnóstico serológico de esta patología dentro del país. Es importante la realización de nuevos ensayos de las técnicas utilizadas en este experimento teniendo en cuenta las sugerencias hechas a raíz del mismo.

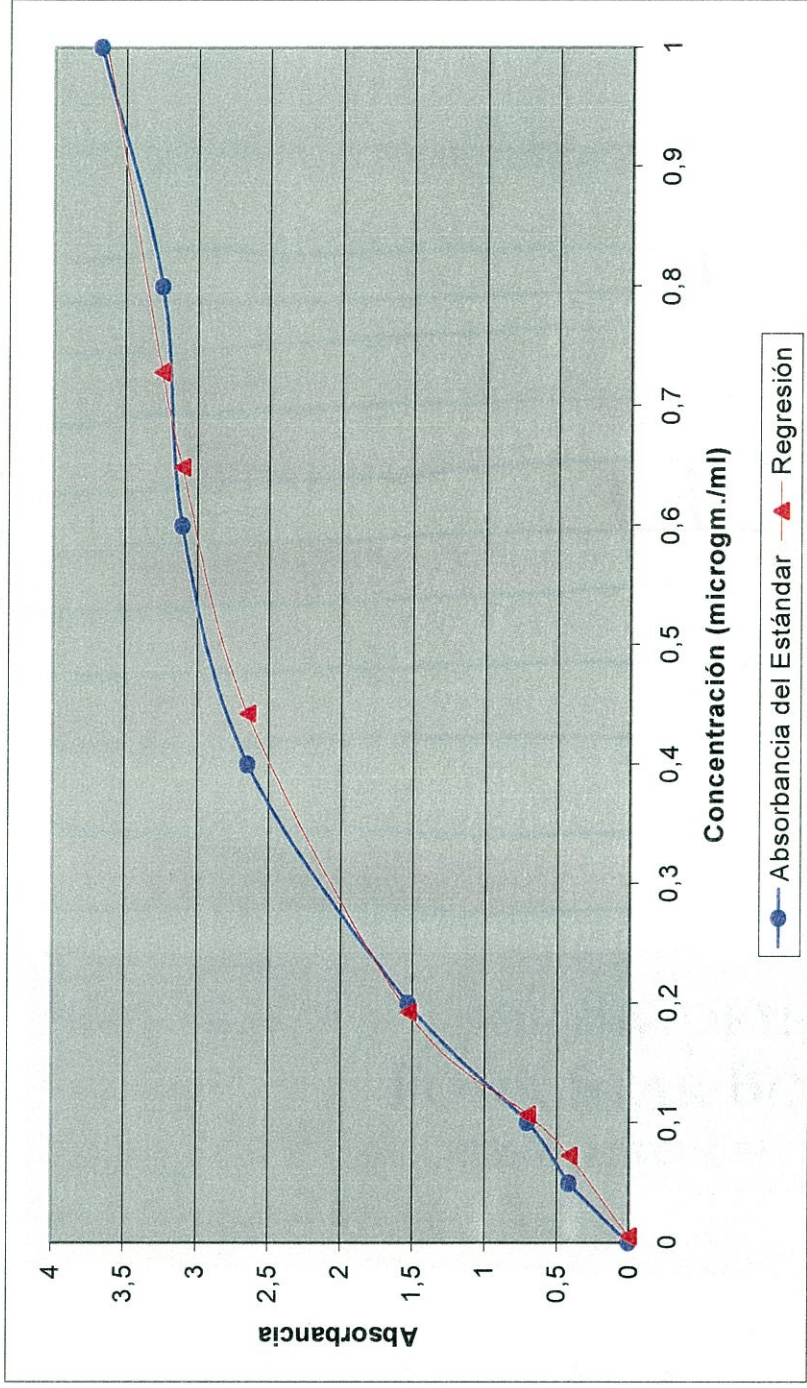
Este trabajo puede representar la introducción a una serie de estudios en el desarrollo de técnicas de Biología Molecular para el diagnóstico de otras parasitosis, que como la fascioliasis, no son diagnosticadas y tratadas en la práctica clínica actual en el Ecuador.

Tabla #1. Medición de la Concentración de Proteínas del Estándar y de los Antígenos de ES empleados en la prueba de Western Blot

Diluciones	Concentración mg/ ml	Volumen standard µl	Volumen H2O µl	Absorbancia	Regresión
1	0.05	35	965	0.41	0,0722
2	0.1	71	929	0.70	0,1065
3	0.2	143	857	1.53	0,1920
4	0.4	286	714	2.65	0,4418
5	0.6	429	571	3.11	0,6482
6	0.8	571	429	3.25	0,7280
7	1.0	714	286	3.68	1,0305
Antígeno E/S	?	100	900	0.04	0,0126
Control	-	-	1000	0.00	0.00

En la tabla aparecen los valores para las concentraciones de las siete diluciones del estándar y los valores de absorbancia correspondiente para cada uno de ellos. Con el uso de un volumen similar al empleado para las concentraciones estándar se estima la concentración de proteínas en los antígenos de ES, a partir de la absorbancia de esta muestra. En esta prueba se utiliza un control (agua destilada) cuya absorbancia es de 0. Este control permite la calibración del espectrofotómetro y la estimación real de la absorbancia para cada una de las muestras. En la columna extrema derecha aparecen los valores de los puntos en el gráfico de regresión para cada una de las muestras estudiadas.

Gráfico #1: Curva de regresión de los valores de absorbancia en la medición de concentración de proteínas en el antígeno ES de *Fasciola hepatica*



Curvas para los valores de concentración y absorbancia obtenidos durante el experimento y las concentraciones calculadas con la fórmula de regresión: $c = \beta_0 + \beta_1 * a + \beta_2 * a^2 + \beta_3 * a^3$. Esto permite la estimación más precisa de la concentración de proteínas presente en el antígeno de ES de *Fasciola hepatica* utilizado en este experimento.

Figura #1: Western Blot



Esta figura muestra la imagen de la prueba Western blot. Las columnas numeradas representan los nueve pacientes estudiados. El control positivo está identificado por Ct+ y el control negativo por Ct-. La columna de la izquierda muestra las bandas que representan los diferentes pesos moleculares del estándar utilizado para esta prueba. Los números ubicados a la izquierda de esta columna son los pesos moleculares correspondientes a cada una de las bandas del estándar. Tanto el control positivo como los pacientes 2, 3, 5 y 6 muestran diferentes bandas en el rango de pesos moleculares entre 29-68kDa. Los pacientes 4, 5 y 8 presentan bandas de pesos moleculares más bajos entre 14kDa y 18kDa.

Bibliografía

1. Abbas K.A., Lichtman A.H., Pober J.S., 1997. Cellular and Molecular Immunology. Third Edition. W.B Saunders Company
2. Apt W., Aguilera X., Vega F., Alcaino H., Zulantay I., Apt P., Gonzalez V., Retamal C., Rodriguez J., Sandoval J., 1993. Prevalence of fascioliasis in humans, horses, pigs, and wild rabbits in 3 Chilean provinces. Bol Oficina Sanit Panam. Nov;115(5):405-14
3. Astudillo C., 1977. Clínica Parasitológica. Universidad Central del Ecuador.
4. Astudillo C., Astudillo F., 1985. Sumilla de últimas observaciones de fascioliasis en Quito. Clínica Parasitológica. Primera Edición. Universidad Central del Ecuador. pp.246-248
5. Bendezu P., Frame A., Hillyer G.V., 1982. Human fascioliasis in Corozal, Puerto Rico. J Parasitol. 68(2): 297-9
6. Bjorland J., Bryan R.T., Strauss W., Hillyer G.V., McAuley J.B., 1995. An outbreak of acute fascioliasis among Aymara Indians in the Bolivian Altiplano. Clin Infect Dis. Nov;21(5):1228-33
7. Chen M.G., Mott K.E., 1990. Progress in Assessment of Morbidity due to *Fasciola hepatica* infection. Trop Dis Bull, 87:R1-R38
8. Cook G.C. (Editor), 1996 Manson's Tropical Diseases. W.B Saunders Company, London, England

9. Espino A.M., Dumenico B.E., Fernández R., Finlay C.M., 1987. Immunodiagnosis of Human Fasciolosis by Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay Using Excretory-Secretory Products. *Amer. J Trop.Med.Hyg.*37(3): 605-608
10. Espino A.M., Sauret N., Escobar L., Dumenico B.E., 1993. Identificación y Aislamiento de Antígenos Comunes de *Fasciola hepatica*. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 45(1): 20-26
11. Gorman T., Sánchez R., Fredes F., Alcaino H., 1998. Inmunodiagnóstico de Fasciolosis Bovina Mediante ELISA y Western Blot. *Parasitol al Día* 22: 16-22
12. Guevara A., Vieira J.C., Araujo E., Calvopina M., Guderian R.H., Carlier Y., 1995. Antibody isotypes, including IgG subclasses, in Ecuadorian patients with pulmonary paragonimiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* Jul-Aug;90(4):497-50
13. Hillyer G.V., Immune Responses and Immunodiagnostic Procedures on Fasciolosis in Humans (Comunicación verbal)
14. Hillyer G.V., Serrano A.E., 1983. The antigens of *Paragonimus westermani*, *Schistosoma mansoni*, and *Fasciola hepatica* adult worms. Evidence for the presence of cross-reactive antigens and for cross-protection to *Schistosoma mansoni* infection using antigens of *Paragonimus westermani*. *Am J Trop Med Hyg.* 32(2):350-8
15. Hillyer G.V., Soler de Galanes M., 1988. Identification of a 17-kilodalton *Fasciola hepatica* immunodiagnostic antigen by the enzyme-linked immunotransfer blot technique. *J Clin Microbiol.* 26(10):2048-53
16. Hillyer G V., Soler de Galanes M., Rodriguez-Perez J., Bjorland J., Silva de Lagrava M., Ramirez Guzmán S., Bryan RT., 1992. Use of the FALCON assay Screening Test-Enzyme- Linked Immunoelctrotransfer Blot (EITB) to Determine the

- Prevalence of Human Fasciolosis in the Bolivian Altiplano. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46(5): 603-609
17. Knobloch J., 1985. Human Fasciolosis in Cajamarca/Perú. II Humoral antibody responses and antigenaemia. *Trop. Med. Parasit* 36, 91-93
 18. Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227:213-221.
 19. Osman M.M., Helmy M.H., 1994. Molecular Weight Determination of *Fasciola* Antigens Specific for Diagnosis of Acute Fasciolosis. *J Egypt.Soc. Parasitol.*, 24: 471-478
 20. Rasmussen K.R., Hillyer G.V., Kemp W.M., 1985. Isolation and partial characterization of an antigen shared between *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*, and *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol* . 71(6):792-8
 21. Rivera Marrero C.A., Santiago N., Hillyer G.V., 1988. Evaluation of Immunodiagnostic Antigens in the Excretory-Secretory Products of *Fasciola hepatica*. *J Parasit.*74(4): 646-652
 22. Rodriguez-Perez J., Rodriguez-Medina J.R., Garcia-Blanco M.A., Hillyer G.V., 1992. *Fasciola hepatica*: Molecular Cloning , Nucleotide Sequence, and expression of a Gene Encoding a Polypeptide Homologous to a *Schistosoma mansoni* Fatty Acid-Binding Protein. *Journal of Experimental Parasitology*. Vol. 74, N° 4: 400-407
 23. Ruiz-Navarrete MA., Arriaga C., Bautista C.R., Morilla A, 1993. *Fasciola hepatica*: characterization of Somatic and Excretory-Secretory Antigens of Adult Flukes Recognized by Infected Sheep. *Rev.Lat.-Amer. Microbiol.* 35: 301-307

24. Shaeen H., Al Khafif M., Farag R.M., Kamal K.A., 1994. Serodifferentiation of Human Fasciolosis from Schistosomiasis. *Tropical and Geographical Medicine*. Vol 46 N°5: 326-327
25. Shaker A., Demerdash Z., Mansour W.A., Hassanein H.I., El Baz H.G., El Gindy H.I., 1994. Evaluation of specific *Fasciola* antigen in the immunodiagnosis of human fasciolosis in Egypt. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 24:463-470
26. Stork M.G., Venables G.S., Jennings S.M.F., Beesley J.R., Bendezu P., Capron A., 1973. An Investigation of Endemic Fasciolosis in Peruvian Village Children. *J Trop Med Hyg.* 76(9):231-5
27. Trueba G., Guerrero T., Fornacini M., Casariego I., Zapata S., Ontaneda S., Vasco L., 2000. Detection of *Fasciola hepatica* infection in a community located in Ecuadorian Andes. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 62: 518
28. Trueba G.A., Bolin C.A., Zuerner R.L., 1992. Characterization of the periplasmic flagellum proteins of *Leptospira interrogans*. *J. Bacteriol.* 174:4761- 4768

Curriculum Vitae

ISABEL CASARIEGO
icasariego@hotmail.com

EDUCACION

Doctor en Medicina / Bachelor of Arts, June 2001
Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador

Técnica en Estadística Médica, Julio 1991
Instituto Politécnico de la Salud "Dr. Carlos J. Finlay", La Habana, Cuba

EXPERIENCIA PROFESIONAL:

Abril 2000 – Agosto 2000

Rotaciones Electivas

Escuela de Medicina, Universidad del Sur de la Florida (USF), Tampa, Florida

Realicé rotaciones electivas en Consulta Externa y Hospitalización en Medicina Interna (Hospital General de Tampa), Inmunología y Alergia (VA Hospital James A. Haley, Tampa), Microbiología (Escuela de Medicina, USF) y Problemas Sociales en Medicina (Escuela de Medicina, USF)

Noviembre 1993 - Septiembre 1994

Supervisora de Registros Médicos

Hospital Metropolitano, Quito, Ecuador

Supervisé la organización del departamento de registros médicos y la codificación de las historias médicas de acuerdo al sistema de Codificación Internacional de Enfermedades.

Agosto 1991 - Septiembre 1993

Estadística Médica

Hospital Calisto García, La Habana, Cuba

Elaboré indicadores hospitalarios de las áreas de especialidades médicas.

PUBLICACIONES

Trueba, Gabriel, et.al. *Detection of a Fasciola hepatica infection in a community located in the Ecuadorian Andes*, Am J Trop Med Hyg. 2000 Apr; 62 (4): 518

EXPERIENCIA EN INVESTIGACION

Abril 1997 – Febrero 2000

Asistente de Investigación

Laboratorio de Microbiología, USFQ, Quito, Ecuador

Asistí en el desarrollo de pruebas ELISA y Western Blot para la identificación de antígenos de *Fasciola hepatica* en suero sanguíneo

HONORES

Lista del Canciller, USFQ, Enero 1994 a Julio 2000



Isabel Casariego