

## **Propuesta para Premio de la Academia de Ciencia**

### **Título del Resultado:**

Desarrollo y evaluación de un sistema inmunoenzimático para la detección de *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) en moluscos hospederos: una herramienta para la vigilancia epidemiológica

### **Entidad Ejecutora Principal:**

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK)

### **Autoría Principal:**

Annia Alba Menéndez

### **Otros Autores:**

Hilda María Hernández Alvarez

Jorge Sánchez Noda

Ricardo Marcet Sánchez

Mabel Figueredo Pino

Jorge Sarracent Pérez

Jorge Fraga Nodarse

Antonio Alejandro Vázquez Perera

### **Colaboradores:**

3

### **Otra u otras entidades participantes:**

No

## **Resumen:**

**Antecedentes:** *Fasciola hepatica* es el principal agente causal de fasciolosis, una zoonosis parasitaria transmitida por moluscos que se encuentra ampliamente distribuida en el mundo y en reemergencia en humanos, y que en Cuba tiene gran impacto en la salud pública, la medicina veterinaria (afecta a los ganados bovino, ovino, caprino y en ocasiones porcino) y la economía. El escenario global de esta enfermedad incluye la ausencia de vacunas y la existencia de un único medicamento totalmente efectivo contra el parásito contra el cual, el desarrollo de resistencia es cada vez más frecuente. Por ello, el control eficaz de fasciolosis, como en el caso de otras enfermedades de transmisión vectorial, se basa en la aplicación de estrategias integrales que incluyan a los moluscos hospederos. En este sentido, es crucial detectar *F. hepatica* en los caracoles vectores para identificar los focos activos de transmisión y ejercer acciones de control eficaces. Sin embargo, los problemas de sensibilidad y especificidad de los métodos parasitológicos y los altos costos de las técnicas de biología molecular dificultan el monitoreo a gran escala de los sitios de riesgo. Por ello, el principal objetivo de este trabajo fue desarrollar un método específico y sensible basado en un sistema ELISA, debido a que resulta una plataforma diagnóstica relativamente simple y rápida, para su utilización en la vigilancia epidemiológica de las poblaciones de vectores.

**Problema resuelto según los objetivos del trabajo:** Se desarrollaron las capacidades de detección de focos activos de transmisión de *F. hepatica* de los Laboratorios Nacionales de Referencia de Zoonosis Parasitarias y de Malacología del IPK a partir del desarrollo e incorporación de dos nuevos métodos: un sistema ELISA específico, sensible que resulta adecuado para la vigilancia epidemiológica a gran escala de sitios de riesgo y una PCR múltiple altamente sensible, desarrollada durante la validación del sistema ELISA, que puede ser empleada como técnica confirmatoria.

**Resultado:** Así, entre los principales resultados del presente trabajo se encuentran la obtención, por primera vez en el mundo, de cuatro anticuerpos monoclonales anti-redias de *F. hepatica* específicos y, a partir de ellos, el desarrollo del primer sistema ELISA de doble AcM (FasciMol-ELISA) para la detección de *F. hepatica* en moluscos vectores. Para la validación del ELISA con poblaciones de campo se desarrolló, también, la primera PCR múltiple que detecta *F. hepatica* en el caracol *Galba cubensis*, principal vector de fasciolosis en Cuba, y que puede ser aplicable además en la detección del parásito en otros vectores. Se realizó el primer estudio a nivel internacional que utilizó un ensayo inmunoenzimático (FasciMol-ELISA) como método diagnóstico de *F. hepatica* en vectores y se realizó la primera comparación del ELISA con otras técnicas de detección (examen parasitológico y PCR múltiple) en poblaciones de campo de *G. cubensis* de Cuba. El FasciMol-ELISA identificó, con excelente grado de concordancia con la PCR múltiple, cuatro focos activos de transmisión de *F. hepatica* por *G. cubensis* en sitios pecuarios del occidente de Cuba considerados de alto riesgo, lo que demostró que este sistema es una herramienta útil y novedosa para la vigilancia epidemiológica de las poblaciones de vectores de fasciolosis. Las autoridades locales de Medicina Veterinaria (MINAGRI) fueron notificadas para la realización de estrategias de control lo que podría tener un impacto práctico y social evidente en la disminución de la transmisión de la enfermedad. Así, el presente estudio sienta las bases para la futura implementación del FasciMol-ELISA en el monitoreo de sitios de riesgo de fasciolosis tanto humana como animal, la detección de los focos activos de transmisión y la evaluación de las medidas de control. Este estudio se ha publicado en 4 revistas de impacto (>2) que evidencian la evolución de la presente propuesta desde la ciencia básica (desarrollo de anticuerpos monoclonales y del sistema ELISA) hasta la ciencia aplicada (evaluación del sistema ELISA en condiciones de laboratorio y de campo). El resultado cuenta con los avales de la dirección del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, la Dirección Nacional de Zoonosis Parasitarias (MINSAP) y el Laboratorio Nacional de Parasitología del Ministerio de la Agricultura referidos a su utilidad en el control de la transmisión de *F. hepatica*, tanto para la esfera de la salud pública como de la medicina veterinaria.

## **Aporte científico personal de cada autor al Resultado:**

- **Annia Alba Menéndez** (IPK) (40%): diseñó la investigación, desarrolló el FasciMol-ELISA y la PCR múltiple, caracterizó el sistema y validó en condiciones de laboratorio y de campo, es autora principal de las cuatro publicaciones científicas del Resultado.
- **Hilda María Hernández Álvarez** (IPK) (15%): participó en el desarrollo y caracterización del FasciMol-ELISA y discusión de resultados.
- **Jorge Sánchez Noda** (IPK) (10%): participó en el desarrollo del FasciMol-ELISA y en el muestreo malacológico y validación del FasciMol-ELISA.
- **Ricardo Marcet Sánchez** (IPK) (5%): participó en el desarrollo del FasciMol-ELISA.
- **Mabel Figueredo Pino** (IPK) (3%): participó en el desarrollo del FasciMol-ELISA.
- **Jorge Sarracent Pérez** (IPK) (5%): participó en la discusión de los resultados.
- **Jorge Fraga Nodarse** (IPK) (7%): participó en el desarrollo de la PCR múltiple para la validación del FasciMol-ELISA.
- **Antonio Alejandro Vázquez Perera** (IPK) (15%): participó en el desarrollo y caracterización del FasciMol-ELISA, estudios de campo, muestreo malacológico y discusión de resultados.

## **Autor para correspondencia:**

- **Annia Alba Menéndez** ([annia@ipk.sld.cu](mailto:annia@ipk.sld.cu); [anniaalba@infomed.sld.cu](mailto:anniaalba@infomed.sld.cu)) Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, Autopista Novia del Mediodía km 6, Apartado Postal 601, Marianao 13, La Lisa, La Habana 11400, Cuba.

## **Colaboradores:**

**Alejandro Gil Ley:** Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana

**Oscar Otero:** Vicedirección de Investigaciones, Instituto Finlay

**Elizabeth Martínez:** IPK

## Comunicación Corta que describe el Resultado

### Desarrollo y evaluación de un sistema inmunoenzimático para la detección de *Fasciola hepática* (Trematoda: Digenea) en moluscos hospederos: una herramienta para la vigilancia epidemiológica

Annia Alba Menéndez, Hilda María Hernández Álvarez, Jorge Sánchez Noda, Ricardo Marcet Sánchez, Mabel Figueredo Pino, Jorge Sarracent Pérez, Jorge Fraga Nodarse, Antonio Alejandro Vázquez Perera

#### Introducción

La fasciolosis es una enfermedad de distribución mundial, reemergente en humanos, con estimados que oscilan entre 2,4-17 millones de personas infectadas y cerca de 180 millones en riesgo. Es una de las parasitosis más importantes para la salud pública en Cuba: al menos 8 brotes epidémicos importantes y diagnóstico constante de casos no relacionados durante todo el año. Es considerada hiperendémica en la masa ganadera de Cuba lo que afecta enormemente la salud animal, la disponibilidad de alimentos fundamentales a la población (e.g. carne, leche, queso), y la economía cubana. La constante circulación del parásito en animales domésticos supone, además, un elevado riesgo de transmisión a la población. El principal agente etiológico de fasciolosis, tanto en Cuba como en el mundo, es el la Duela del Hígado, *Fasciola hepática*. Este parásito afecta igualmente a una amplia diversidad de animales domésticos, fundamentalmente el ganado, con cuantiosas pérdidas económicas por conceptos de antiparasitarios, decomisos de hígados infectados, y rebajas en la producción de carne y leche. *Fasciola hepática* se transmite a los mamíferos a partir de una forma enquistada en la vegetación acuática o flotando en el agua, luego de su paso obligatorio por el interior de un molusco fluvial de la familia Lymnaeidae. Dentro de los moluscos, *F. hepática* se desarrolla durante un período de 35-45 días en un estado larval llamado redia. Este complejo ciclo de vida posibilita la interrupción de la transmisión parasitaria actuando en los distintos eslabones que lo componen. Sin embargo, la ausencia de vacunas y la existencia de un único medicamento totalmente efectivo contra el parásito contra el cual, el desarrollo de resistencia es cada vez más frecuente hace imprescindible que, como en el caso de otras enfermedades de transmisión vectorial, el control transite por la aplicación de estrategias integrales que incluyan a los moluscos hospederos. En este sentido el monitoreo activo, periódico y efectivo de las poblaciones de moluscos vectores de *F. hepática* en sitios de riesgo constituye un pilar fundamental de la vigilancia epidemiológica y el control eficaz de la transmisión parasitaria pues con ello se garantiza la identificación de los sitios activos de transmisión y la aplicación puntual de medidas para la eliminación de los focos, según las particularidades epidemiológicas de cada sitio, que prevengan que la infección llegue al hombre y a los animales domésticos. En este contexto, el desarrollo de inmunoensayos se convierte en una alternativa promisoriosa para detectar moluscos hospederos infectados con *F. hepática* = focos activos de transmisión. Actualmente, las únicas actividades de monitoreo y referencia del estado de infección, por *F. hepática*, de las poblaciones de las dos especies de moluscos vectores de Cuba: *Galba cubensis* (principal vector) y *Pseudosuccinea columella* (vector secundario) se realizan, en el Laboratorio de Malacología del IPK, mediante la disección de los caracoles colectados en el terreno (método parasitológico). En este sentido, la carencia de técnicas sensibles, simples y normalizadas para la detección de *F. hepática* en moluscos vectores dificulta la generalización de la vigilancia epidemiológica de la transmisión parasitaria y, con ello,

la identificación y el manejo de los focos activos, que impacta también, en el control de la fasciolosis durante brotes epidémicos.

Considerando todos los elementos antes mencionados, los ensayos tipo ELISAs podrían ser una herramienta adecuada para complementar las estrategias de control integrado que deben llevarse a cabo, tanto en Cuba y en el mundo, para mitigar el impacto de la fasciolosis. Sin embargo, en ausencia de antecedentes sobre este tipo de inmunoensayos con aplicación en el monitoreo de poblaciones de moluscos vectores, el desarrollo de un ELISA para este fin debe transitar necesariamente por la selección de un antígeno conveniente para la obtención de AcMs específicos contra redias (larva del parásito que se desarrolla en el molusco), que puedan utilizarse como reactivos inmunológicos, y por la aplicación, tanto de técnicas parasitológicas de referencia, como de métodos moleculares sensibles y específicos, para su evaluación.

### Resultados y Discusión

Para la obtención de anticuerpos monoclonales (AcMs) específicos contra redias de *F. hepatica* por la metodología clásica de hibridomas se seleccionó el antígeno más conveniente de tres preparaciones de *F. hepatica*: (1) un péptido sintético específico del extremo C-terminal de la citocromo C oxidasa I, (2) la fracción mayoritaria de bajo peso molecular del extracto total de redias y (3) el extracto total de redia (ETR). Para ello, se inmunizaron ratones BALB/c con cada antígeno y se evaluaron los sueros hiperinmunes. Así, se obtuvo poco reconocimiento del estadio de redia con el suero anti-péptido sintético y una elevada reactividad cruzada con extractos de moluscos con el suero anti-fracción de bajo peso molecular, posiblemente por la existencia de variaciones antigénicas entre estadios de *F. hepatica* y de mimetismo molecular con antígenos de moluscos, en cada caso respectivamente. Sin embargo, el ETR mostró una alta inmunogenicidad específica por lo que fue el antígeno seleccionado para el desarrollo de AcMs (publicación: Alba et al. *Parasitol Res.* **2014**; 113(9):3185-93). Así, se obtuvieron cuatro AcMs específicos contra redias y no reactivos con limneas: 1E4, 6G11 (isotipo IgM), 4E5 (IgG3) y 4G11 (IgG1), que reconocen, además, los adultos de *F. hepatica*. Esto, desde el punto de vista del diagnóstico, apunta a que estos AcMs son promisorios para la detección del parásito no solo en el hospedero intermediarios sino también en los hospederos definitivos. Se desarrolló entonces el primer sistema ELISA de doble anticuerpo para la detección de *F. hepatica* en moluscos hospederos, denominado FasciMol-ELISA, que utiliza dos de los 4 anticuerpos obtenidos: el AcM 1E4 como anticuerpo de captura del antígeno en el paso de recubrimiento y al AcM 4G11 conjugado a peroxidasa para la detección del Ag capturado. La detección se hace a partir de los extractos totales de las limneas diluidos 1/90 para *G. cubensis* y 1/20 para *P. columella* normalizadas según el valor de DO de la media más tres veces la desviación de los valores del blanco y se calcularon también los valores de corte para cada especie de limnea para la interpretación rápida de los resultados del ELISA (publicación: Alba et al. *Int J Parasitol.* **2015a**; 45: 113-119). Posteriormente, el sistema fue caracterizado experimentalmente en *G. cubensis* y *P. columella*, utilizando 267 moluscos de laboratorio sano (muestras negativas) e infectados experimentalmente con *F. hepatica* (muestras positivas) y comparado con la disección parasitológica (Regla de Oro). La evaluación del FasciMol-ELISA mostró el sistema es altamente sensible y específico (> 98%) en ambas especies con un grado de acuerdo excelente con la regla de oro (índice Kappa = 0,973 *G. cubensis* y 1 *P. columella*). Adicionalmente, el sistema fue evaluado con dos de los géneros más comunes que

infectan los moluscos cubanos (*Trichobilharzia* y *Cotylophoron*) y no existieron reacciones cruzadas. La evaluación del sistema a diferentes tiempos de infección experimental mostró que el FasciMol-ELISA es capaz de detectar el parásito en *P. columella* desde el día 4 post-infección y en *G. cubensis* a los 8 días post-infección. Este tiempo de detección garantiza el diagnóstico certero durante el 80-90% del tiempo de infección parasitaria en una y otra especie. En este sentido es importante destacar que, durante las dos primeras semanas de infección, cuando no ha comenzado aún la “explosión” de redias, la detección de las larvas en los caracoles es casi imposible cuando se realiza por técnicas parasitológicas, incluso por personas entrenadas. Por tanto, esto ubica al FasciMol-ELISA en un escaño superior al diagnóstico convencional en cuanto a sensibilidad y simplicidad. Además, teniendo en cuenta que las poblaciones naturales siempre presentan moluscos infectados en diferentes momentos, la efectividad del sistema permitirá no pasar ningún sitio activo pues basta un solo molusco detectado para considerar positiva la transmisión de fasciolosis (publicación: Alba et al. *Int J Parasitol.* **2015a**; 45: 113-119).

Una vez caracterizado el sistema en el laboratorio se decidió la aplicación en condiciones naturales. Sin embargo, teniendo en cuenta las limitaciones de la Regla de Oro (disección de moluscos y observación de larvas en el microscopio), se desarrolló la primera reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que detecta *F. hepatica* en *G. cubensis* utilizarla como método de referencia en la evaluación del FasciMol-ELISA en condiciones de campo. Se diseñaron cebadores que amplificaran 451 pares de bases de la región 18S ribosomal de *G. cubensis* como control interno de inhibición de la PCR por cada muestra para utilizarlos junto con un juego de cebadores específicos del ITS-2 de *F. hepatica* previamente descrito. Debido a que los cebadores diseñados para la especie de molusco cubana pertenecen a una región del gen 18S conservada en la familia Lymnaeidae (donde se agrupan las especies de moluscos vectores de fasciolosis), la PCR múltiple puede ser utilizada en otras especies de moluscos hospederos. Cabe destacar que la PCR múltiple detecta cantidades de ADN de *F. hepatica* en cualquier cantidad de ADN de caracol menores a las contenida en una sola larva lo que sugiere que la PCR múltiple puede brindar un diagnóstico específico del parásito en moluscos durante todo el tiempo de infección. Este resultado, unido al 100% de sensibilidad y especificidad alcanzado por la PCR cuando se evaluó en un sistema biológico controlado *F. hepatica* – *G. cubensis* (publicación: Alba et al. *Vet Parasitol.* **2015b**; 211 (3-4): 195-200;), sugieren que la PCR múltiple puede emplearse como método de referencia para la detección de *F. hepatica* en poblaciones de campo de *G. cubensis*.

A partir de este momento, se procedió a la colecta de individuos de *G. cubensis* en 12 sitios considerados de alto riesgo de transmisión (alta actividad pecuaria). Así, de enero a abril de 2015, se colectaron 767 *G. cubensis* de ecosistemas fluviales dentro de áreas ganaderas que se trasladaron vivos a los laboratorios del IPK. Cada individuo fue diseccionado bajo el microscopio para la búsqueda de larvas de *F. hepatica* (Regla de Oro), y posteriormente homogenizado y analizado tanto por la PCR múltiple como por el FasciMol-ELISA (publicación: Alba et al. *Parasites & Vectors.* **2016**; 9(1): 22; doi: 10.1186/s13071-016-1303-1). En 11 de los 12 sitios se comprobó la existencia de altas densidades de moluscos vectores en diferentes cuerpos de agua dulce ubicados dentro de las zonas de pastoreo, por lo que el riesgo de transmisión de *F. hepatica* en todas estas localidades es elevado (coexistencia de hospederos intermediarios y definitivos). El análisis del estado de infección por *F. hepatica* realizado con el FasciMol-ELISA en

767 individuos de *G. cubensis* (principal vector de *F. hepatica* en Cuba) arrojó: una prevalencia de infección de 5,3% y la existencia de 4 focos activos de transmisión parasitaria en 4 sitios (3 en Pinar del Río: vaquerías 121, 115 y 108, y 1 en Artemisa: vaquería 505). De ellos, tres sitios habían sido previamente descritos como focos de *F. hepatica* por Vázquez et al. (2015) utilizando la técnica de disección parasitológica lo que evidencia la persistencia del ciclo de vida de *F. hepatica* en la naturaleza y la necesidad de ejercer medidas eficaces de control. Los resultados obtenidos por el FasciMol-ELISA se comprobaron con la PCR múltiple desarrollada que confirmó los 4 sitios detectados por el ELISA como positivos a *F. hepatica*. Contrariamente, el método de disección, técnica de rutina y considerada aun como la Regla de Oro, falló en detectar Vaquería 108 como foco de transmisión lo que evidencia los problemas de sensibilidad de este método (publicación: Alba et al. *Parasites & Vectors*. **2016**; 9(1): 22; doi: 10.1186/s13071-016-1303-1). Cabe destacar que, aunque la positividad de la PCR múltiple fue mayor (56/755) que la obtenida con el FasciMol-ELISA (40/755), como se espera cuando se utiliza un método molecular, no se encontraron diferencias significativas entre ambos métodos ( $X^2 = 6,283$ ;  $P = 0,0981$ ) que mostraron un grado de acuerdo excelente (índice Kappa = 0,822).

Más allá de los números, el FasciMol-ELISA destaca por la facilidad en términos de realización de la técnica y de interpretación del resultado pues se basa en una técnica de rutina en laboratorios clínicos de manipulación simple, que no necesita conocimientos malacológicos ni parasitológicos específicos, ni de infraestructura específica de las técnicas de biología molecular y que no trae aparejado posibles problemas de degradación y contaminación que son frecuentes al trabajar con ácidos nucleicos. El procesamiento de la muestra es simple y la interpretación de los resultados es rápida, objetiva y simple, y puede realizarse incluso a simple vista (muestras positivas desarrollan color). Muy ligado a la facilidad está el número de muestras por unidad de tiempo que puede analizarse. Así, el FasciMol-ELISA permite el procesamiento de un gran número de muestras (200), con el mismo esfuerzo, en apenas 6-7 horas. Esta misma cantidad de muestra requeriría de al menos 2-3 días por la PCR múltiple. Estas características, unido a su especificidad y sensibilidad respaldan el empleo de este sistema como herramienta diagnóstica para la vigilancia epidemiológica a gran escala de sitios de riesgo de fasciolosis (publicación: Alba et al. *Parasites & Vectors*. **2016**; 9(1): 22; doi: 10.1186/s13071-016-1303-1).

### Conclusiones

El FasciMol-ELISA constituye una herramienta diagnóstica útil, práctica, sensible y específica en el monitoreo a gran escala de poblaciones naturales de vectores de fasciolosis en sitios de riesgo. Su implementación de rutina permitiría la pesquisa de sitios de transmisión parasitaria, la detección de los focos activos y la evaluación de las medidas de control. Sin antecedentes de otros estudios en este sentido, estos resultados constituyen una prueba de concepto válida para incorporar los inmunoensayos en la detección de *F. hepatica* en hospederos intermediarios. Por otra parte, la alta sensibilidad y especificidad de la PCR múltiple respaldan su empleo como técnica confirmatoria cuando se requiera.