

EFICACIA DIAGNOSTICA DE LA REACCION INDIRECTA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES PARA EL ESTUDIO DE LA ESQUISTOSOMIASIS MANSONI*

AUTORES:

Lic. Jacqueline Serra Hernández
Lic. Eyra Damelys Rangel Escalante
Lic. Zulay Rached Utrera
Lic. Lizbeth Cecilia Rengel R.

ASESORES:

Dr. Renzo Nino Incani**
Econ. José A. García***

RESUMEN

En este trabajo se aplicó la Reacción Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes, a una población de 225 pacientes del Barrio Bicentenario III de Valencia con la finalidad de evaluar la eficacia diagnóstica de dicho método para el estudio de la esquistosomiasis mansoni. Dicha población había sido estudiada por otros autores mediante la prueba de ELISA obteniéndose una prevalencia de 37,9%, y la técnica de Precipitación Circumoval (PPCO) utilizando este último como método de referencia cuya prevalencia fue de 18,4%.

Los antígenos utilizados fueron cortes de vermes adulto y cortes de hígado de hamster infectados con la cepa brasileña BH de *Schistosoma mansoni*. La reacción se pone en evidencia utilizando un conjugado anti IgG humana marcado con isotiocianato de fluoresceína.

La evaluación serológica de la RIAF se llevó a cabo a través de los patrones para cada uno de los antígenos de vermes e hígado mediante los siguientes parámetros: sensibilidad, especificidad, falsos positivos, falsos negativos, valor predictivo de la prueba positiva, valor predictivo de la prueba negativa, falsos negativos de la prueba negativa, exactitud y prevalencia. Todos los parámetros anteriormente citados tanto para la RIAF vermes como para la RIAF hígado revelaron resultados semejantes: destacando la mayor utilidad de los antígenos vermes e hígado en su totalidad en relación a una mayor eficacia para los parámetros sensibilidad, falsos negativos y valores predictivos de la prueba negativa.

Es importante destacar que la utilización de patrón intestino reúne la mayoría de las condiciones necesarias para la obtención de resultados confiables que aportan un mejor criterio diagnóstico.

* Este trabajo se hizo acreedor al Premio: "Profesora Franca Billi", otorgado por la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas, año 1992.

Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud, Departamento de Parasitología, Escuela de Bioanálisis.

** Profesor del Departamento de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo.

*** Profesor del Departamento de Salud Pública.

INTRODUCCION

La esquistosomiasis es una enfermedad parasitaria producida por un vermes trematode perteneciente al género *Schistosoma* donde hasta ahora se conocen cinco (5) especies a nivel mundial que parasitan al hombre, siendo el único agente etiológico de la esquistosomiasis en Venezuela la producida por el *S. mansoni*.

En Venezuela la esquistosomiasis mansónica constituye un problema de salud pública, siendo el área Centro-Norte la más afectada (Otero y Col 1986). Por lo tanto se hace necesario buscar medidas más eficaces para su control.

En relación al diagnóstico de individuos infectados se ha presentado problemas en encontrar un método que sea lo suficientemente sensible, específico, económico, y fácil de realizar, todos estos requisitos han sido difíciles de agrupar en un solo método.

En vista de estas circunstancias se hace necesario resolver el problema de la eficacia diagnóstica, de allí los estudios realizados a varias técnicas serológicas, con la finalidad de hacer un diagnóstico precoz de la infección y con ello contribuir al control de las esquistosomiasis. Esta actividad es crucial para nuestra situación epidemiológica, donde los métodos coprológicos convencionales se muestran ineficaces.

Es necesario aumentar la especificidad y sensibilidad de estas técnicas serológicas y revisar la necesidad de utilizar combinaciones de técnicas serológicas, no sólo para un diagnóstico más certero, sino para definir el estado de evolución o forma clínica de la enfermedad (R.N. Incani, 1985). Se ha planteado el problema de la manera siguiente:

Las infecciones por *S. mansoni* recientes, crónicas, de baja intensidad y tratadas, dificultan el diagnóstico coprológico.

Cuando las medidas de control están dirigidas al tratamiento del individuo enfermo ésta no tiene una total efectividad, por lo tanto hay que recurrir a nuevas técnicas diagnósticas que reflejan la prevalencia real de la situación, cosa que en estos últimos años ha sido subestimada (Noya y Noya, 1981; Dávila y Aguiar, 1983).

El problema se plantea cuando se estudió una población de transmisión activa del Barrio Bicentenario III donde previamente se había realizado estudios coprológicos (Kato) y serológicos (ELISA), mostrando una gran diferencia de prevalencia.

Se pretende con este trabajo comparar los resultados obtenidos por las técnicas ELISA y PPCO esta última como prueba de referencia realizada por otros autores y ensayar la RIAF como una técnica más práctica que la anterior y cuya importancia se realza, si notamos que la experiencia nacional en relación al uso de métodos serológicos para el diagnóstico en estas parasitosis es precaria.

MATERIALES Y METODOS

Población y Muestra: La población seleccionada corresponde al sector III del Barrio Bicentenario, ubicado al Sur de Valencia, Edo. Carabobo. La muestra representada por 225 individuos escogidos mediante selección aleatoria de 8 manzanas sobre un total de 40 que constituyen el Barrio.

Análisis Estadístico: Sólo mediante el cálculo de los parámetros de sensibilidad, especificidad, el porcentaje de falsos positivos y negativos, los valores predictivos, la exactitud y la prevalencia, podemos establecer la utilidad diagnóstica de los procedimientos empleados.

Sueros: La sangre fue obtenida mediante punción venosa con venoject donde después de la coagulación se separó el suero por centrifugación; las diluciones utilizadas para la técnica fueron 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 con PBS; fueron separadas en alícuotas y conservados en congelación a -20 grados centígrados, hasta el momento de la ejecución de la técnica, previa inactivación a 56 grados centígrados por 30 minutos.

Ciclo del parásito en el laboratorio: El ciclo de *S. mansoni* se mantiene en el laboratorio mediante pases sucesivos entre hamsters y caracoles *B. Glabrata*. La cepa brasileña BH del parásito fue la utilizada en este estudio, caracoles de aproximadamente 1 cm de diámetro fueron expuestos a cinco miracidios y treinta días después se comienza a obtener al exponer lotes de caracoles a luz artificial por una o dos horas, a objeto de infectar los hamsters (Cesari y B. Alarcon de Noya, 1987).

Obtención del Ag (Vermes adultos y Granulomas hepáticos): Se sacrificaron hamsters con ocho semanas de infección, para luego por perfusión del Sistema porto-mesentérico con SSC a través del ventrículo izquierdo, previa ruptura de la vena porta. Los vermes adultos quedaban retenidos en una rejilla metálica, donde posteriormente se lavaban mediante tres cambios de SSF. El hígado era extraído del animal y se procedía a obtener trozos del mismo de unos diez milímetros cúbicos, para luego congelarlo y obtener los cortes con granulomas. Posteriormente se procedían a hacer bloques con resina OCT (cien vermes por cada bloque aproximadamente); que posteriormente eran conservados a -70 grados centígrados para su uso posterior y realizar los cortes en criostato de 6-7 micras de espesor—. Los cortes son colocados dentro de la pintura impresa en las láminas del porta-objeto (cuatro cortes por láminas), fijados y mantenidos congelados hasta su procesamiento.

Reacción Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes: Se utilizó la técnica de (Coudert y Col, 1967), modificada por (Kanamura, 1978). El conjugado utilizado fue una Anti IgG específica para cadena Gamma de IgG, marcado con isotiocianato de fluoresceína (marca Sigma y ATAB).

Se cubren los cortes con las diluciones seriadas del suero del paciente con la finalidad de formar el complejo Ag-Ac, que posteriormente será evidenciado con el conjugado utilizado, cuya positividad se hace evidente por la fluorescencia de las estructuras antigénicas, al ser observados en el microscopio de luz U.V., la Reacción negativa se caracteriza por una tinción parda o rojo ladrillo. También se toma en cuenta el tipo de patrón de fluorescencia (focal o difuso) y su localización intestino, tegumento y/o parénquima. Cada vez que se realizaba la técnica se montaba controles positivos y negativos de sueros provenientes del mismo barrio.

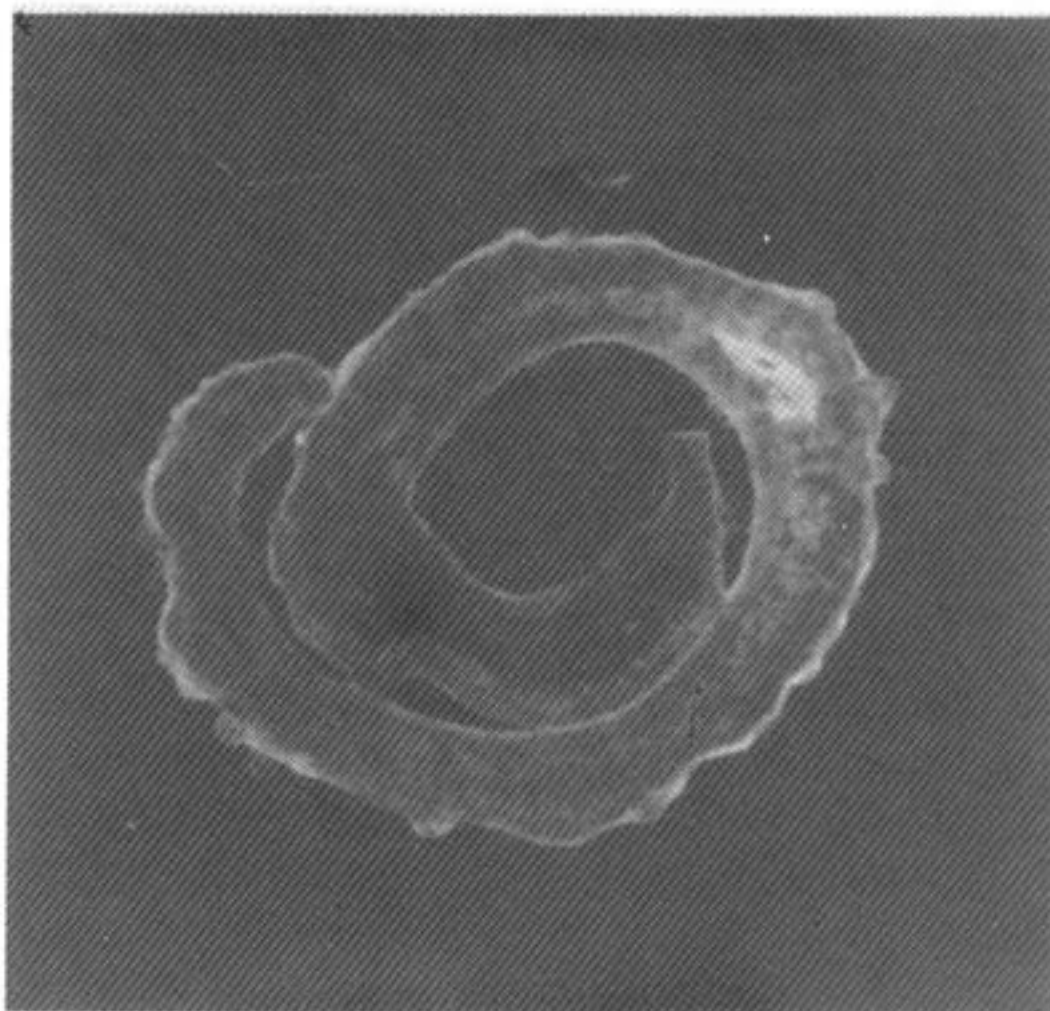
Título del Conjugado: Para cada dilución del suero se utilizó varias diluciones seriadas del conjugado en azul de Evans.

Se escoge como título del conjugado aquella dilución en la cual se puede detectar positividad con el suero positivo en su máxima dilución; y que a su vez no detecte fluorescencia con el suero negativo. El patrón de fluorescencia utilizado fue parénquima ya que es el primero que cae al hacer las diluciones seriadas del suero.

RESULTADOS

1. TITULACION DE LOS SUEROS PARA ESTABLECER EL CRITERIO DE POSITIVIDAD

Se determinó que a la dilución 1:40 fue donde la fluorescencia mostró su mayor porcentaje de positividad, correspondiendo para tegumento 15.1% parénquima 12.9%, intestino 10.7%, granuloma 16.0% y cáscara del huevo con 18.7% (Fig. N° 1). Esta dilución se tomó como punto de corte para definir positividad y negatividad en todas las subsecuentes observaciones. Estos porcentajes se obtuvieron del total de las diluciones realizadas para los 225 pacientes que representan el 100% de la población.



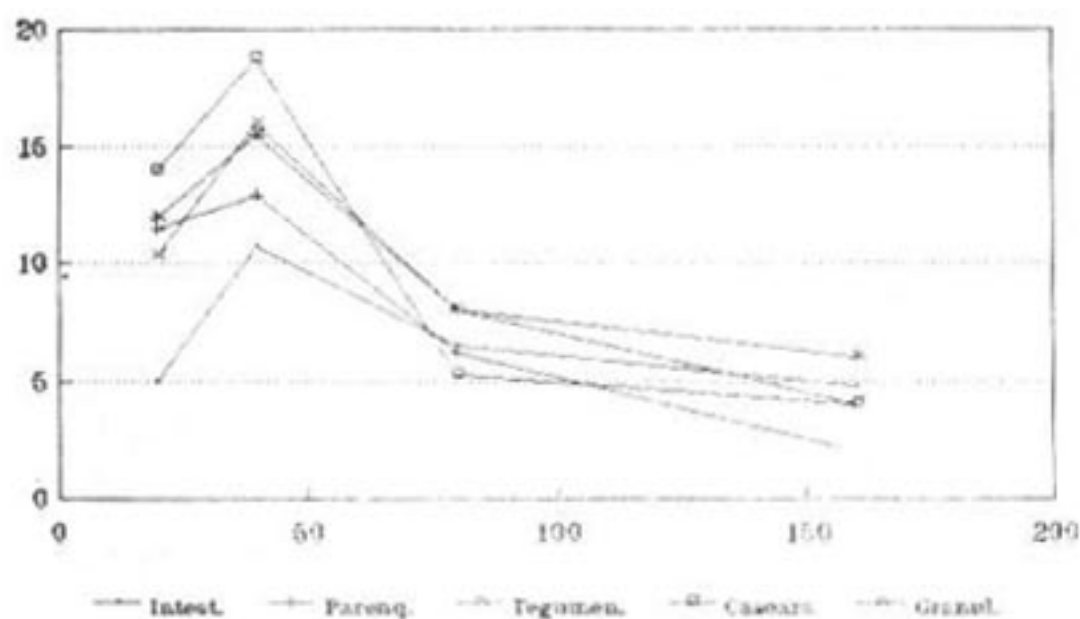
FLUORESCENCIA MENOS INTENSA EN EL PARENQUIMA DEL GUSANO (Fluorescencia difusa) y REACCIONES MAS INTENSAS EN TUBO DIGESTIVO Y TEGUMENTO. (Fluorescencia focal) 100x

2. COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS SEGUN DIFERENTES PATRONES DE FLUORESCENCIA PARA VERMES ADULTO Y CORTES DE HIGADO

2.1 Comportamiento de los patrones intestino, tegumento y parénquima de vermes adultos

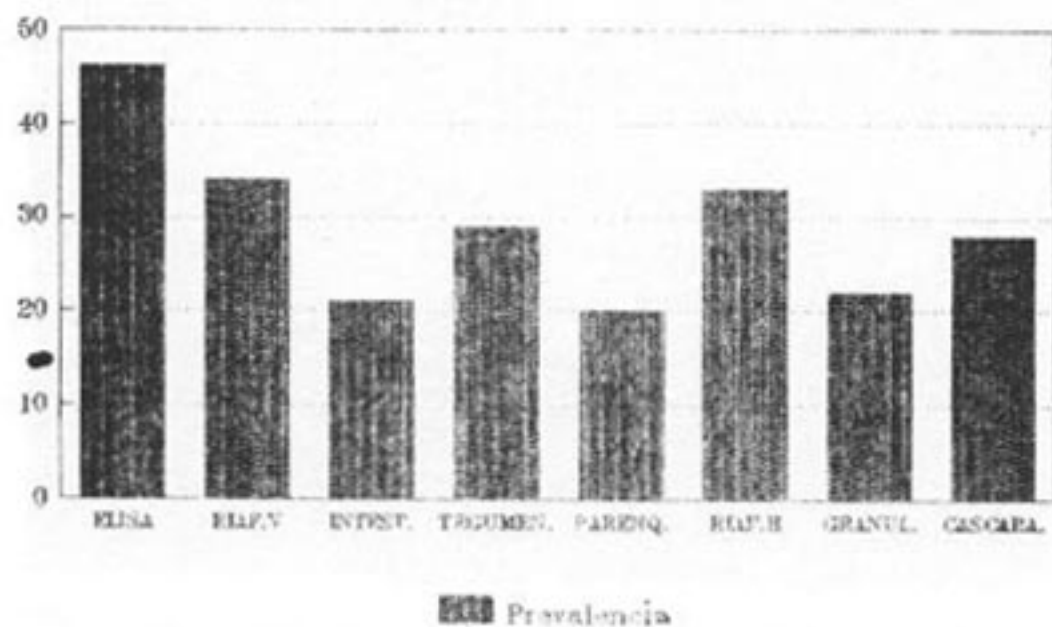
En la Fig. 2 se observa que el patrón tegumento fue el que presentó mayor porcentaje de positividad con 29.5%, seguido del patrón intestino con

FIGURA N° 1
RELACION % DE POSITIVIDAD
Según Diluciones



Barrio Bicentenario III Val. 89-90.

FIGURA N° 2
PORCENTAJE DE PREVALENCIA
Según Métodos Diag. y patrones



Barrio Bicentenario III Val 89-90.

21.4%, y parénquima con 20.1%; estas dos últimas cifras no parecen ser diferentes. Es importante señalar que los porcentajes obtenidos por los patrones intestino y parénquima reflejan valores de prevalencia cercanos a aquellos de la PPCO, prueba serológica de referencia. Los valores en porcentaje anteriormente mencionados resultan del total de casos positivos para cada uno de los patrones estudiados en el 100% de la población.

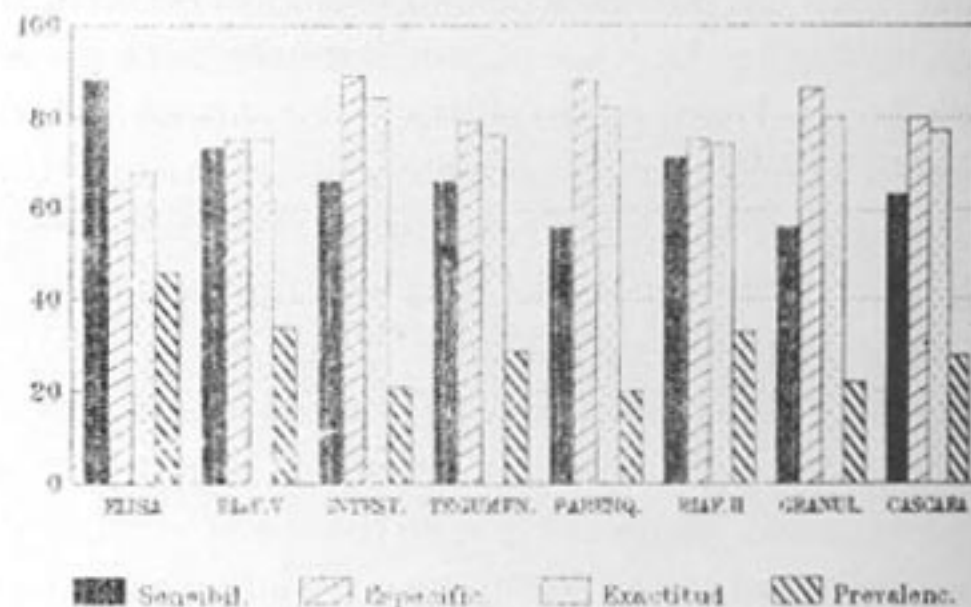
2.2 Comportamiento de los patrones granuloma y cáscara al utilizar como antígeno secciones de hígado de hamster infectado.

En la Fig. 2 se observa que el mayor porcentaje de lecturas positivas estuvo representado por el patrón cáscara del huevo con 27.7%, mientras que la positividad obtenida por el patrón granuloma fue de 21.9%. El porcentaje reflejado por el patrón granuloma es el que se asemeja al valor obtenido por la PPCO.

3. DISTRIBUCION DE LOS CASOS ESTUDIADOS SEGUN LAS TECNICAS DE ELISA, PPCO, Y RIAF (vermes adulto e hígado)

En la Fig. 3 se pueden observar los diferentes valores obtenidos en los casos estudiados al aplicar las técnicas diagnósticas siendo la más sensible la prueba de ELISA con un 45.9% de positividad seguido de la RIAF con un 33.9% para vermes adulto y 33.5% para secciones de hígado. Estas dos últimas cifras no parecen ser diferentes. La PPCO mostró una prevalencia de 18.5%.

FIGURA N° 3
% DE: SEN. ESPEC. EXACT. PREVAL.
Según Métodos Diag. usados



Barrio Bicentenario III Val 89-90.

4. SENSIBILIDAD DE LOS METODOS DE DIAGNOSTICO ELISA Y RIAF (vermes e hígado) Y SUS CORRESPONDIENTES PATRONES DE FLUORESCENCIA.

En la Fig. 3 se señala que el método de ELISA mostró ser la más sensible con un 88%, siendo la menos sensible la RIAF con los patrones parénquima de vermes y granuloma del hígado con un 56% para

ambos. Es importante destacar que la mayor sensibilidad en la RIAF se observó con los patrones intestino y tegumento con 66%, seguido del patrón cáscara con 63%.

Los antígenos de vermes e hígado vistos como un todo, mostraron valores similares de sensibilidad con 73% y 71% respectivamente.

5. ESPECIFICIDAD DE LOS METODOS DE DIAGNOSTICO ELISA Y RIAF CON ANTIGENOS DE VERMES E HIGADO

Se mostró una mayor especificidad para el patrón intestino con 89% seguido del patrón parénquima con 88% y granuloma con un 86%; siendo en valor para cáscara de 80% y tegumento 79%. Hay que señalar que la especificidad para los antígenos vermes e hígado en su totalidad fue de 75% para ambos. El porcentaje más bajo de especificidad correspondió a la técnica de ELISA con 64% (Fig. 3).

6. VALORES DE FALSOS POSITIVOS Y FALSOS NEGATIVOS PARA LA DETERMINACION DE LA EFICACIA DIAGNOSTICA DE LOS DIFERENTES METODOS UTILIZADOS.

6.1 Falsos positivos obtenidos según las diferentes pruebas

Este parámetro muestra aquellos casos que son incluidos en el diagnóstico de esquistosomiasis mansoni como casos positivos pero que en realidad no presentan infección en relación a la prueba de referencia PPCO. En este caso el porcentaje mayor de falsos positivos está representado por la técnica de ELISA con un 36%, lo cual se corresponde con la baja especificidad de dicha técnica seguido de la RIAF con 25% tanto para vermes como para hígado. Al analizar los patrones de fluorescencia de la RIAF en detalle observamos cifras de falsos positivos para tegumentos 21.1%, para cáscara 20%, granuloma 14%, parénquima 12% e intestino 11%. Los tres últimos patrones muestran mayor especificidad.

6.2 Falsos negativos obtenidos según las diferentes pruebas.

Este parámetro muestra aquellos casos que son excluidos de la infección y son clasificados como no poseedores de la misma, cuando en realidad sí la tienen.

La prueba que da resultados más falsamente negativos corresponde a la RIAF con los patrones parénquima y granuloma (hígado) con un 44% lo que indica su relación con la menor sensibilidad que ellos presentan.

El valor de falsos negativos por ELISA fue menor, con un 12%, seguido del obtenido por los antígenos RIAF vermes 27%, RIAF hígado 29%, patrón intestino y tegumento con un 34% y el patrón cáscara con un 37%.

Esto indica que la interpretación de la totalidad de los antígenos utilizados para la RIAF (vermes e hígado) reportan menos falsos negativos que la utilización o interpretación de sus correspondientes patrones de fluorescencia.

7. IMPORTANCIA DEL VALOR PREDICTIVO DE LA PRUEBA POSITIVA Y DE LA PRUEBA NEGATIVA PARA ESTABLECER LA EFICACIA DIAGNOSTICA.

7.1 Variaciones observadas en relación al valor predictivo de la prueba positiva.

Este parámetro establece la probabilidad de que la condición que se busca esté presente cuando la prueba sea positiva. Los parámetros más fidedignos en lo que respecta a este valor predictivo son para la RIAF con antígeno vermes el patrón intestino con un valor de 56%, seguido del patrón parénquima con un 51% y para la RIAF con cortes de hígado el patrón granuloma con 47%.

La prueba de ELISA con un 35% se muestra menos eficiente en este sentido seguido de RIAF hígado con 39%, RIAF vermes 40%, patrón tegumento 41%, patrón cáscara 42%. Es importante señalar que la evaluación de patrones en RIAF por separado muestra una mayor confiabilidad que la observada en el conjunto de sus antígenos correspondientes.

7.2 Variaciones observadas en relación al valor predictivo de la prueba negativa.

Este parámetro muestra la probabilidad de que el resultado negativo de la prueba ocurre en aquellos

casos que realmente no existe la condición buscada. Se observa que en la prueba de ELISA presentó un valor predictivo de la prueba negativa de un 96% más alto que los correspondientes a los demás métodos. Esto es importante ya que sólo un 4% de las determinaciones realizadas por ELISA escapan de la condición buscada (no infección). La RIAF vermes se muestra con un 93%, la RIAF hígado y el patrón intestino con un valor de 92%, tegumento y cáscara con un 91% y finalmente parénquima y granuloma con un 90%. Observamos que en este sentido la utilización del antígeno vermes en su totalidad refleja un mayor porcentaje del valor predictivo negativo, seguido del antígeno hígado. En relación a los patrones estudiados el patrón intestino muestra un valor más aceptable.

8. IMPORTANCIA DE LOS FALSOS POSITIVOS Y LOS FALSOS NEGATIVOS DE LAS PRUEBAS POSITIVAS Y NEGATIVAS RESPECTIVAMENTE PARA ESTABLECER SU VALOR DIAGNOSTICO.

8.1 Importancia de los falsos positivos de la prueba positiva según los diferentes métodos de diagnóstico

Este parámetro refleja la proporción del total de

pruebas positivas que no poseen la cualidad que es detectada por la prueba, observamos lo siguiente: ELISA con un 65% resultó ser la prueba que refleja el porcentaje más alto seguido de la RIAF hígado con 61%, RIAF vermes 60%, patrón tegumento con 59%, cáscara con 58%, granuloma con 53%, parénquima con 49% y finalmente intestino con un 44%, quien presentó una mejor eficacia para la condición buscada, resaltando así su mayor valor diagnóstico.

8.2 Importancia de los falsos negativos de la prueba negativa según los diferentes métodos

Esta condición muestra la proporción sobre el total de pruebas negativas que poseen la propiedad buscada y no son detectados.

En este sentido por su mayor sensibilidad observamos que la prueba de ELISA no es capaz de detectar casos positivos sólo en un 4%, seguido de RIAF vermes con 7%, RIAF hígado y patrón intestino con 8%, tegumento y cáscara con 9% y finalmente parénquima y granuloma con 10%; mostraron no ser tan sensibles ya que es el valor más alto donde se escapan casos verdaderamente positivos.

EFICACIA DIAGNOSTICA PARA ESTUDIO DE ESQUISTOSOMIASIS

METODOS	PARAMETROS (%)									
	S	E	F+	F-	VPP	VPN	FPPP	FNPN	Ex	P
ELISA	88	64	36	12	35	96	65	4	68	46
RIAF.V	73	75	25	27	40	93	60	7	75	34
RIAF.H	71	75	25	29	39	92	61	8	74	33
INTESTINO	66	89	11	34	56	92	44	8	84	21
TEGUMENTO	66	79	21	34	41	91	59	9	76	29
PARENQUIMA	56	88	12	44	51	90	49	10	82	20
GRANULOMA	56	86	14	44	47	90	53	10	80	22
CASCARA	63	80	20	37	42	91	58	9	77	28

LEYENDA

S =Sensibilidad
E =Especificidad
F+ =Falsos Positivos
F- =Falsos Negativos

VPP =Valor Predict. Prueba Positiva
VPN =Valor Predict. Prueba Negativa
FPPP =Falsos Posit. Prueba Positiva
FNPN =Falsos Neg. Prueba Negativa
Ex =Exactitud. P =Prevalencia

casos que realmente no existe la condición buscada. Se observa que en la prueba de ELISA presentó un valor predictivo de la prueba negativa de un 96% más alto que los correspondientes a los demás métodos. Esto es importante ya que sólo un 4% de las determinaciones realizadas por ELISA escapan de la condición buscada (no infección). La RIAF vermes se muestra con un 93%, la RIAF hígado y el patrón intestino con un valor de 92%, tegumento y cáscara con un 91% y finalmente parénquima y granuloma con un 90%. Observamos que en este sentido la utilización del antígeno vermes en su totalidad refleja un mayor porcentaje del valor predictivo negativo, seguido del antígeno hígado. En relación a los patrones estudiados el patrón intestino muestra un valor más aceptable.

8. IMPORTANCIA DE LOS FALSOS POSITIVOS Y LOS FALSOS NEGATIVOS DE LAS PRUEBAS POSITIVAS Y NEGATIVAS RESPECTIVAMENTE PARA ESTABLECER SU VALOR DIAGNOSTICO.

8.1 *Importancia de los falsos positivos de la prueba positiva según los diferentes métodos de diagnóstico*

Este parámetro refleja la proporción del total de

pruebas positivas que no poseen la cualidad que es detectada por la prueba, observamos lo siguiente: ELISA con un 65% resultó ser la prueba que refleja el porcentaje más alto seguido de la RIAF hígado con 61%, RIAF vermes 60%, patrón tegumento con 59%, cáscara con 58%, granuloma con 53%, parénquima con 49% y finalmente intestino con un 44%, quien presentó una mejor eficacia para la condición buscada, resaltando así su mayor valor diagnóstico.

8.2 *Importancia de los falsos negativos de la prueba negativa según los diferentes métodos*

Esta condición muestra la proporción sobre el total de pruebas negativas que poseen la propiedad buscada y no son detectados.

En este sentido por su mayor sensibilidad observamos que la prueba de ELISA no es capaz de detectar casos positivos sólo en un 4%, seguido de RIAF vermes con 7%, RIAF hígado y patrón intestino con 8%, tegumento y cáscara con 9% y finalmente parénquima y granuloma con 10%; mostraron no ser tan sensibles ya que es el valor más alto donde se escapan casos verdaderamente positivos.

EFICACIA DIAGNOSTICA PARA ESTUDIO DE ESQUISTOSOMIASIS

METODOS	PARAMETROS (%)									
	S	E	F+	F-	VPP	VPN	FPPP	FNPN	Ex	P
ELISA	88	64	36	12	35	96	65	4	68	46
RIAF.V	73	75	25	27	40	93	60	7	75	34
RIAF.H	71	75	25	29	39	92	61	8	74	33
INTESTINO	66	89	11	34	56	92	44	8	84	21
TEGUMENTO	66	79	21	34	41	91	59	9	76	29
PARENQUIMA	56	88	12	44	51	90	49	10	82	20
GRANULOMA	56	86	14	44	47	90	53	10	80	22
CASCARA	63	80	20	37	42	91	58	9	77	28

LEYENDA
S =Sensibilidad
E =Especificidad
F+ =Falsos Positivos
F- =Falsos Negativos

VPP =Valor Predict. Prueba Positiva
VPN =Valor Predict. Prueba Negativa
FPPP =Falsos Posit. Prueba Positiva
FNPN =Falsos Neg. Prueba Negativa
Ex =Exactitud. P =Prevalencia

9. VALOR DE LA EXACTITUD PARA LA EFICACIA DIAGNOSTICA EN RELACION A LOS DIFERENTES METODOS UTILIZADOS

Este es un índice donde se consideran en forma conjunta las predicciones correctas tanto positivas como negativas sobre el total de los casos estudiados siendo el patrón más exacto el intestino con un 84%, seguido de parénquima con un 82%, granuloma 80%, cáscara 77%, tegumento 76%, RIAF vermes y RIAF hígado con un 75% y 74%, respectivamente. ELISA fue la prueba con una menor exactitud 68% (Fig. 3), esto es debido a su poca especificidad y su tendencia a valores aumentados de falsos positivos.

10. PREVALENCIA DE LA ESQUISTOSOMIASIS MANSONI SEGUN LOS DIFERENTES METODOS

Es aquí donde se muestra el número de casos portadores de la condición buscada (infección) sobre el total de casos estudiados. Se observa una discrepancia en lo que respecta a prevalencias obtenidas según los métodos realizados y la interpretación de sus correspondientes patrones. Siguiendo un valor de referencia obtenido por PPCO con un 18.4% de prevalencia, la mayoría de los resultados están fuera de este valor como los obtenidos en la prueba de ELISA con un 46% seguido de RIAF vermes 34%, RIAF hígado 33%, tegumento 29%, cáscara 28%. Las cifras de prevalencia que reflejan un valor más cercano al de referencia fueron obtenidos por los patrones granulomas 22%, intestino 21% y finalmente parénquima con un 20% (Fig. 3).

DISCUSION

En el presente trabajo se realizó la evaluación de una prueba diagnóstica, la Reacción Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes (RIAF) a los habitantes de un foco de esquistosomiasis en el Barrio Bicentenario III de Valencia al cual previamente se le había reportado una prevalencia de bilharziasis de 2.02% a través de la prueba coprológica de Kato y un 37.9% por la técnica serológica de ELISA (Zona II de Malariología y el Grupo de Investigación en esquistosomiasis 1987-1989).

Diversas técnicas como éstas la Reacción Periovular, la RIAF, la ELISA, la Hemaglutinación e Inmunodifusión se han utilizado, tanto a nivel experi-

mental, como en humanos con la finalidad de resolver el problema de la baja sensibilidad de los métodos parasitológicos en pacientes con poca carga parasitarias en las heces de aquellos que se encuentran en la fase crónica de la enfermedad.

La aplicación de la técnica RIAF como alternativa a la utilización de una técnica serológica se debió a la gran importancia en relación a la respuesta humoral proporcionada por el antígeno vermes adulto de *S. mansoni* (Smithers y Terry, 1969) que fue confirmada experimentalmente por (Pacheco de Montesinos, 1986).

Así mismo la cercaria y los huevos de *S. mansoni* contienen sustancias antigénicas capaces de estimular la producción de anticuerpos detectables por los métodos serológicos (Chieffi y Kanamura, 1978).

La Reacción de Anticuerpos Fluorescentes fue aplicada por primera vez en el diagnóstico de la esquistosomiasis por (Sadun y Col., 1960) y varios autores como (Anderson y Col., 1961), (Sadun y Col., 1961), (Pellegrinos., 1963), (Camargo y Col., 1965), (Kagan., 1965) y (Kagan., 1968); han estudiado diferentes aspectos de la prueba tales como la sensibilidad, la especificidad, tipo de antígeno más útil y modificaciones para hacer la técnica más sencilla. De esa experiencia se deduce que la RIAF presenta una sensibilidad entre 75% y 95%, según los autores y que en relación a la especificidad requería más estudios debido a la aparición de falsos resultados positivos (Moore y Col, 1968). También han sido señaladas reacciones cruzadas, particularmente en títulos bajos, de 1:10 por (Hoshino y Col, 1978). Es por ello que en el trabajo realizado las diluciones empleadas fueron a partir de la dilución 1:20.

Tomando la dilución 1:40 como límite para establecer positividad o negatividad; se obtuvo en nuestros resultados patrones de fluorescencia que mostraron mayor porcentaje de casos positivos, descartándose todos los valores por debajo de esta dilución, para con ello evitar los posibles falsos positivos o reacciones cruzadas que puedan alterar o enmascarar los resultados obtenidos por la RIAF.

Se han introducido modificaciones en la técnica de la RIAF entre ellas la propuesta por (Pothier y Xavier, 1969) ampliamente estudiadas por (Coudert y Col, 1974) la cual consiste en utilizar cortes de

adulto de *Schistosoma* obtenido bajo congelación. Según los autores, este antígeno es más estable y mantiene durante más tiempo la elevada sensibilidad y especificidad de la RIAF, siendo esto un aspecto importante en la realización de la técnica, uno de los antígenos para analizar la eficacia diagnóstica de la RIAF, fueron cortes de vermes adultos congelados con Tissue-Tek OCT.

La prueba de Precipitación Circumoval (PPCO) se utilizó como referencia debido a su alta sensibilidad y especificidad (Alarcón de Noya, 1987).

Debido a las múltiples desventajas que presenta la PPCO como son la dificultad en la obtención del antígeno (huevos viables del parásito) el mantenimiento del ciclo de *S. mansoni* en el laboratorio, la dificultad para la preservación del antígeno, el tiempo requerido para leer la reacción e interpretación de los resultados (2 días), han desalentado su uso como rutina de trabajo.

Se ha intentado utilizar la RIAF con corte de vermes adultos y cortes de hígado de hamster infectados como antígenos sustitutos de PPCO, ya que la RIAF carece de las desventajas mencionadas, en este sentido cabe destacar que se ha reportado la presencia de antígenos comunes entre parásito adultos y huevo (Hanna y Hillyer, 1984) anteriormente, además presenta una gran sensibilidad y especificidad (Wilson y col, 1974; Ruiz-Tiben y Col, 1979). También permiten identificar reacciones inespecíficas por la simple observación de la localización topográfica de la coloración fluorescente (Kanamura, 1985).

En nuestro trabajo adoptamos los criterios de patrones focal y difuso, para describir las diferentes respuestas obtenidas por la Reacción de Anticuerpos Fluorescentes (Van Helden y Col, 1975; Kanamura y Col, 1979). Estos últimos autores relacionando también la presencia de diferentes clases de inmunoglobulinas para los patrones de reacción, detectaron la presencia de anticuerpos específicos de las clases de IgA, IgM, IgG e IgE, correspondientes al tipo focal en pacientes con esquistosomiasis aguda, así como anticuerpos IgG para este mismo patrón en casos crónicos.

La fluorescencia de tipo difuso fue observada sólo en pacientes crónicos y correspondía a una respuesta de anticuerpos específicos IgG. Por otra parte, (Nkya, 1983), coincide con (Van Helden y

Col, 1975), al conseguir el patrón focal en el grupo más joven de pacientes por él estudiado. Debido a esto podemos observar que el anticuerpo que está siempre presente en mayor o menor proporción es el IgG, es por ello que se decidió en el presente trabajo la utilización del conjugado anti IgG humana, marcada con isotiocianato de fluoresceína.

(Kanamura y Col., 1979), también observaron que en algunos sueros de pacientes con infección crónica, la tinción fluorescente del vermes se modificaba a medida que aumentaba la dilución del suero y que la primera en desaparecer era la coloración del parénquima, luego el tegumento y finalmente el intestino.

Es por ello que para la determinación del título del conjugado se tomó como patrón de fluorescencia el parénquima. En nuestro estudio al comparar los resultados de los patrones de fluorescencia correspondientes al vermes adulto se observó lo siguiente: que el patrón tegumento con un 29.5% fue el valor más alto de positividad, seguido del intestino 21.4% y parénquima 20.1%; cabe señalar que éstas proporciones probablemente se deban al efecto de la dilución sobre los patrones, en especial a la desaparición del parénquima (Kanamura y Col., 1979).

(Hawazoe y Col, 1981); establece que la utilización del granuloma desarrollado en hígado como antígeno constituye un buen índice para la evaluación clínica y seroepidemiológica con resultados satisfactorios al ser aplicados en la RIAF.

CONCLUSIONES

1. La prevalencia obtenida con la Reacción Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes (RIAF) en la población estudiada varió de acuerdo a la fuente de antígeno utilizada, así como de acuerdo a los patrones de fluorescencia detectado en cada antígeno. Se obtuvieron valores de 34% con secciones de vermes adulto y 33% con secciones de hígado de hamsters infectados, cifras intermedias en relación a la prueba de ELISA, con 46% y PPCO con 18.4%, ésta última utilizada como prueba de referencia (ELISA y PPCO realizada por otros autores). La prevalencia obtenida de acuerdo a los patrones de fluorescencia fue de 29% para tegumento, 20% para parénquima, 21% para intestino, 28% para cáscara de huevo y 22% para granuloma.

2. La sensibilidad de la RIAF fue similar utilizando antígenos de vermes (73%) o de Hígado de hamsters infectado (71%), siendo estos valores inferiores a la ELISA (88%). La especificidad fue similar para ambos antígenos (75%) mostrándose superior a la ELISA (64%).

3. Los antígenos de intestino se muestran como los mejores candidatos para un diagnóstico más fidedigno.

4. Se puede establecer que es notable la similitud de los resultados obtenidos para cada uno de los antígenos vermes adulto e hígado, desde el punto de vista de su capacidad diagnóstica.

5. Finalmente consideramos que es importante establecer criterios de lectura; para sensibilidad la utilización del antígeno vermes adulto en su totalidad muestra ser de mayor utilidad y para condiciones de especificidad, falsos positivos, exactitud y prevalencia se demostró que la utilización del patrón intestino refleja con mayor veracidad los parámetros antes señalados.

AGRADECIMIENTOS

Se expresa sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que de una manera u otra con su valiosa colaboración hicieron posible la realización de este trabajo.

Dr. Renzo Nino Incani, Profesor del Departamento de Parasitología de la Universidad de Carabobo, que con su asesoría y apoyo constante nos ha brindado la oportunidad de emprendernos en el camino de la investigación.

Econ. José A. García, del Departamento de Salud Pública.

Ing. Carlos Balzán, Jefe de la Sección de Esquistosomiasis de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental (Maracay).

Sres. Pedro Gómez y Luis Hernández, de la Zona II de Malariología y Saneamiento Ambiental (Valencia).

Grupo de Estudiantes de Medicina, del XI Semestre (1990).

Lic. Carmela Violante (Técnica RIAF).

Técnico Sinecio Rivas, encargado del Bioterio de la U.C.

Departamento de Parasitología de la U.C.

Histotecnólogo. Mirlan Remanton, Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Oncológico de Valencia.

Técnico César Matos, del Centro de Microbiología y Biología Celular del I.V.I.C.

Lic. Rosalina González, Coordinadora del Programa Docente de Pasantías II. Escuela de Bioanálisis.

Lic. Dilcia de Peña, Profesora de Pasantías II. (Rural)

Grupo Nacional de Investigaciones en Esquistosomiasis (Resultados métodos de ELISA).

Muy especialmente, a la población del Barrio Bicentenario III, porque sin ellos no hubiese sido posible la realización de este trabajo

REFERENCIAS

- ALARCON DE NOYA., B. (1988). Estudio en una población endémica de Esquistosomiasis *Mansoni* en Venezuela: Diagnóstico parasitológico e inmunológico. Trabajo de Ascenso para profesor agregado. Facultad de Medicina. Escuela Luis Razetti. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- AMBROISE-THOMAS., P. (1976). Immunofluorescence in the diagnostic, therapeutic follow-up and sero-epidemiological studies of some parasitic diseases. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 70:107-112.
- AMBROISE-THOMAS., P. & ANDREWS., P. (1976). Development of fluorescent antibodies directed against larval stages, eggs and adults of *Schistosoma mansoni* in mice harbouring unisexual or bisexual infections. *Tropenmedizin und Parasitologie* 87: 483-488.
- AMBROISE-THOMAS., P. & GRILLOT., R. (1980). L'hémagglutination indirecte dans la diagnostic des bilharzioses. Comparaison a l'immuno-fluorescence indirecte dans l'étude de 3624 serums humains. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 277-288.
- ANDERSON, R.I: SADUN, E.H. & WILLIAMS, J.S.A. (1961). Technique for the use of minute amounts of dried blood in the fluorescent antibody test for Schistosomiasis. *Exp. Parasit.* 11: 111-116.
- ANDRADE., Z. & SADIGURSKY., M. (1978). Immunofluorescence studies of *Schistosoma* structures which share determinants with circulating schistosome antigens. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 72: 316-317.
- BRUIJNING., C. (1965). The fluorescent antibody test for Schistosomiasis in experimentally infected mice. *Tropical and Geographical Medicine*, 17: 325-328.
- CAMARGO., M. E., HOSHINO-SHIMIZU., S. DA SILVA., L.C. (1965). A slide fluorescent antibody technique with adult worm antigen for the serological diagnostic of *Schistosoma mansoni*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 7: 327-331.

- CAMUS., Carlier, Y. CAPRON, M. BINA, J., FIGUEREIDO, J. PRATA, A. & CAPRON, A. (1977). Immunological studies in human schistosomiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 26: 482-488.
- CASTRO., L. GARCIA., M.E., RIERA., A.R., TAMI., A. VEGAS., R.A. & YSCADAR., P.M. (1990). Evaluación epidemiológica, clínica y diagnóstico pre y post-tratamiento de un foco de Esquistosomiasis, Barrio Bicentenario III. *Requisito para aprobar la Asignatura de Medicina Preventiva y Social II*. Dpto. de Salud Pública. Universidad de Carabobo.
- CESARI., I.M., & ALARGON DE NOYA., (1987). Ciclo Biológico de *Schistosoma mansoni* en: *Esquistosomiasis mansoni Diagnóstico y Control. Manual de Campo y Laboratorio*. (Cesari, I.M. & Alarcón de Noya, b., Edict). Centro de Estudios Avanzados, I.V.I.C., Caracas.
- COLLEY., D. GARCIA., A. LAMBERTUCCI, J. PARRA, J. KATZ., N. ROCHA, R. & GAZZINELLI, G. (1986). Immune responses during human schistosomiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 35: 793-802.
- COMITE ASESOR DE ESQUISTOSOMIASIS. (1987-1988). Dirección de Endemias Rurales. *Dirección General Sectorial de Malaria y Saneamiento Ambiental*. Venezuela. Documento.
- COUDERT., J. GARIN., J.P. AMBROISE-THOMAS., P. POTHIER., M. A. & THAI., K. T. (1968). Diagnostic serologique for Immunofluorescence sur coupes a la congèlation d infections a *Schistosoma mansoni*. *S. haematobium et S. intercalatum*. *Acta trop.* 2: 109-132.
- COUDERT., J. GARIN., J. P. AMBROISE-THOMAS P. & POTHIER., M. A. (1967). Premier resultants a propos du diagnostic serologique de la bilharziose por immuno-fluorescence sur coupes a la congelation de *Schistosoma mansoni*. *Ann Parasitol.* 42: 483-492.
- CHIEFFI., P. & KANAMURA., Y. (1978) Diagnóstico laboratorial de esquistosomiasis mansonica. *Revista brasileira de Malaria e Doenzas Tropicais*. 30 77-97.
- DAVILA DE BRIGGS., I. (1986). Epidemiología y diagnóstico de un foco de esquistosomiasis. *Area de Parasitología. Trabajo de Ascenso para Profesor Asistente. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo*. Valencia.
- DEELDER., A. EL-DOSOKY. I VAN MARCK., E. A. & QIAN., Z. (1985). Immunofluorescent localization of *Schistosoma mansoni* circulating cathodic antigen in tissues of infected mice using monoclonal antibody. *Z. Parasitenkd.* 71: 317-323.
- DEELDER., A. & KORNELIS., D. (1981). Immunodiagnosis of recently acquired *Schistosoma mansoni* infection. A comparison of various immunological techniques. *Tropical and Geographical Medicine*. 33: 36-41.
- DIAS., L. C. S., CAMARGO., M. E., HOSHINO., S., RAMOS., A. S., PIZA., J. T. & SILVA., L. C. (1971). Inqueritos popacionais de esquistosomose mansoni por técnicas serológicas de immunofluorescencia e de hemaglutinacao. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 13: 37-44.
- FILHO., A. KRUPP., I. & MALEK., E. (1965). Localization of antigen and presence of antibody in tissues of mice infected with schistosoma mansoni as indicated by fluorescent antibody techniques. *Departament of Tropical Medicine and Public Health, Tulane University School of Medicine and the Seamen s Memorial Laboratory of the V. S. Public Health Service Hospital, New Orleans, Louisiana*. 84-97.
- GRAY., D. F. (1969). *Curso de Inmunología*. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- HANNA, R. E. B. & HILLYER, G. (1984). Fasciola hepatica and Schistosoma mansoni: immuno-fluorescent localization and cross-reactivity. *Exp. Parasitol.* 57: 1-14.
- HEJDEN., H. TERPSSTRA., W. OKOT-KOBTER., B. & EYAKUZEN., V. (1975). Are there stage characteristic immunofluorescence patterns in schistosomiasis. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 69: 309-311.
- HOSHINO-SHIMIZU, S., CAMARGO, M. E. & NAGASSE, T. K. (1978). A stable polysaccharide reagent for the diagnosis of acute or recen T. cruzi infections. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 20: 208-212.
- KAGAN., I. G. (1985) Evaluation of routine serologic testing for parasitic diseases. *American Journal Public. Health*. 55: 1820-1829.
- KAGAN., I. G. (1968). Serologic diagnosis of Schistosomiasis. *Bulletin New York Academy Medicine*. 44: 262-277.
- KANAMURA-KAWADA., H. Y. (1985). Antigenos de diferentes formas evolutivas de *Schistosoma mansoni* para diagnóstico e acompanhamento serologico de pacientes submetidos a quimioterapias. *Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidad de Sao Paulo, para obtencao do grau de Doutor em Ciências*. (Inmunologia).
- KANAMURA., H. HOSHINO-SHIMIZU., S. & SILVA., L. (1978). Pattern of class specific fluorescent antibodies according to the infection in human schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 20: 76-81.
- KANAMURA., H. HOSHINO-SHIMIZU. S., CAMARGO., M. & DA SILVA., L. C. (1979). Class specific antibodies and fluorescent staining patterns in acute and chronic schistosomiasis mansoni. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 28: 242-248.
- NKYA., W. M. M. (1983). The effect of age on the specific immunoglobulin levels and immunofluorescence patterns in patients infected with *Schistosoma mansoni*. *East african Medical Journal*. 60: 669-675.
- ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. (1985). Control de la Esquistosomiasis. Informe de un Comité de Expertos de la O.M.S., Series de Informes Técnicos. 728. Ginebra.
- PACHECO DE MONTESINOS., M. (1986). Serología de la Esquistosomiasis experimental: influencia de la intensidad e interrupción de la infección sobre los títulos de anticuerpos. *Trabajo de ascenso para Profesor Asistente. Dpto. de Parasitología. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo*. Valencia.
- PELLEGRINO., J. I. (1963). Estado comparativo entre as reacoes de floclulacao, de immunofluorescencia e de fixacao do complemento. *Revista do Instituto de Medicina Tropical Sao Paulo*. 5: 147-153.
- POTHIER., M. A. & XAVIER., M. L. S. (1969). Premiers resultats a propos du diagnostic serologique de la bilharziose par immunofluorescence sus coupes a la congelation de *Schistosoma haematobium*. *Ann. Parasitologic*. 44: 387-390.
- RUIZ-TIBEN., E. HILLYER., G., KNIGHT., W. GOMEZ DE RIOS., I. & WOODALL., J. (1979). Intensity of infection with *Schistosoma mansoni*: its relationship tom the sensitivity and specificity of serological test. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 28: 230-248.

SADUN., E. H. WILLIAMS., J. S. & ANDERSON., R. I. (1960).
Fluorescent antibody technique for the serodiagnosis of
Schistosomiasis in humans. *Pro. Soc. Exper. Bio. Med.* 105:
289-291.

SADUN., E. H. ANDERSON., R. I. & WILLIAMS., J. S. (1961).
Fluorescent antibodies test for the laboratory diagnosis of
Schistosomiasis in humans by using dried blood smears
on filter paper. *Exp. Parasit.* 11: 117-120.

SANTIAGO., N. SROUR., S. VARGAS., Y. & VIOLANTE., C.
(1988). Reacción indirecta de anticuerpos fluorescentes en
pacientes infectados con schistosoma mansoni y tratado
con drogas esquistosomiasis: Oxamniquine o Praziquantel.
*Requisito para aprobar la Asignatura de Pasantía II de la
Escuela de Bioanálisis. Universidad de Carabobo. Facultad
de Ciencias de la Salud. Valencia.*

SMITHERS., S. R. & TERRY., R. J. (1969). The immunology of
Schistosomiasis in: *Adv. Parasit. Ed. B. Dawes. Volumen 7
Pd. 41 Academy Press, London.*

TORREALBA., W. J. PEREZ., A. & ALFARO., O. (1976). Reac-
ción de anticuerpos fluorescentes en el diagnóstico de la
esquistosomiasis mansoni. *Boletín de la Dirección de Ma-
lariología y Saneamiento Ambiental. Vol. XVI. 4: 320-332.*

VAN HELDEN., H.-P. T. TERPSTRA., W. J., OKOT-KOBTER., B.
M. & EYAKUZE., V. M. (1975). Are there stage-characte-
ristic immunofluorescence patterns in Schistosomiasis.
*Transaction of The Royal Society of Tropical Medicine and
Hygiene.* 69. 309-311.

WILSON., M. SÜLZER., A. J. & WALLS., K. W. (1974). Modified
antigens in the indirect immunofluorescence test for
schistosomiasis. *American Journal of Tropical Medicine
And Hygiene.* 23: 1072-1076.



INPREBIO
Instituto de Previsión Social
del Bioanalista

Trabajamos armoniosamente para el bienestar de nuestros afiliados...

- Seguro de Vida
- Seguro de Accidentes Personales
- Seguro de Hospitalización, Cirugía y Maternidad
- Seguro de Amparo Global para Laboratorios
- Seguro de Amparo Global para Vehículos
- Préstamos Personales
- Créditos Educativos
- Becas de Estudios para hijos de bioanalistas
- Proveeduría
- Planes turísticos (casas en Bahía de Plata)
- Planes culturales



**Vargas
Lab Supply C.A.**

**Applied
Biosystems**
HOEFER

Venta - Instalación
Servicio técnico
de instrumentos científicos

PCR, Espectrofotómetro, Electroforesis
Cromatógrafos centrífugos y todo para su
laboratorio

**Calle La Joya • Edificio Cosmos • Piso 9
Oficina 9-J • Chacao •**

Teléfono: 261.62.56 • Fax: 261.72.80