

Estandarización de técnicas de *immunoblotting* para el diagnóstico de esquistosomiasis

Standardization of immunoblotting techniques for the diagnosis of schistosomiasis

Ceballos Yvanna¹, Marquez Ana¹, Incani Renzo Nino² y Ferrer Elizabeth^{1*}

RESUMEN: La esquistosomiasis es causada por parásitos del género *Schistosoma*, siendo *S. mansoni* el único presente en Venezuela. Las áreas endémicas del país se caracterizan por bajas cargas parasitarias, dificultando el diagnóstico parasitológico. La mayoría de las técnicas inmunológicas requieren de equipos costosos. Las técnicas de *Immunoblotting* pueden ser una alternativa. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue la estandarización de técnicas de *Immunoblotting* con antígeno soluble de huevo (SEA) de *S. mansoni*, con el fin de complementar las pruebas diagnósticas para esquistosomiasis. Se realizó la preparación del antígeno soluble de huevo de *S. mansoni* y se identificaron las condiciones óptimas de reacción para las técnicas *Dot blot* y *Slot blot*. Se observó que para ambas técnicas, la cantidad óptima de antígeno fue 0,25 microgramos/dot o slot, la dilución óptima del suero 1/100 y la dilución óptima del conjugado 1/3000, permitiendo diferenciar claramente positivos de negativos, por lo que en estudios posteriores podrían ser validadas para evaluar su uso en diagnóstico clínico y en estudios epidemiológicos.

Palabras clave: *Dot Blot*, esquistosomiasis, *Immunoblotting*, *Schistosoma mansoni*, *Slot blot*.

ABSTRACT: Schistosomiasis is a parasitic disease caused by parasites of the genus *Schistosoma*. *Schistosoma mansoni* is the only species present in Venezuela. Endemic areas of the country are characterized by low parasitic loads making difficult their parasitological diagnosis. Main immunological techniques require expensive equipments and immunoblotting techniques can be an alternative. The objective of this work was standardizing two immunoblotting methods -*Dot Blot* and *Slot blot*- with a soluble *S. mansoni* egg antigen (SEA) in order to provide a tool to complement diagnostic tests for schistosomiasis. The soluble *S. mansoni* egg antigen was prepared, and optimal reaction conditions for the *Dot blot* and *Slot blot* techniques were identified. The optimal amount of antigen was 0.25 micrograms/*Dot* or *Slot*, the optimal dilution of the serum was 1/100, and the optimal dilution of the conjugate was 1/3000 for both techniques. They allowed to clearly differentiate positives from negative cases and could be validated in subsequent studies to evaluate their use in clinical diagnosis and epidemiological studies.

Keywords: *Dot Blot*, *Immunoblotting*, *Schistosoma mansoni*, Schistosomiasis, *Slot blot*

INTRODUCCIÓN

La esquistosomiasis humana en Venezuela es producida por el parásito *Schistosoma mansoni* que tiene como hospedadores intermediarios a caracoles del género *Biomphalaria*. Los trematodos adultos, que se alojan en el sistema porta hepático y vénulas intestinales, producen huevos que son eliminados junto con las heces del hospedador. Al entrar en contacto con el agua los huevos eclosionan liberando un miracidio que penetra al caracol. Dentro de este hospedador intermediario y luego de dos generaciones de esporocistos se originan numerosas cercarias

nadadoras que infectarán al hospedador definitivo.

Las cercarias penetran activamente la piel del hospedador produciendo dermatitis y luego migran al sistema porta hepático donde alcanzan la madurez. La fase crónica de la enfermedad se caracteriza por procesos inflamatorios desencadenados por la presencia en los tejidos de los huevos producidos por el parásito adulto.

La esquistosomiasis en su conjunto es la segunda enfermedad parasitaria más importante del mundo y afecta a más de 232 millones de personas en 78 países (OMS, 2020).

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas "Dr. Francisco J. Triana Alonso" (BIOMED) y Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Sede Aragua, Maracay, Venezuela.

² Laboratorio de Investigaciones en Bilharzia, Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Sede Carabobo, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

El área endémica de esquistosomiasis en Venezuela está en la región centro-Norte del país, existiendo un pequeño foco en la región andina (Hofstede *et al.*, 2014; Noya *et al.*, 2015). En Venezuela, las personas infectadas generalmente presentan cargas parasitarias leves e infección asintomática (Alarcón de Noya *et al.*, 2007).

El diagnóstico de esquistosomiasis se basa en métodos parasitológicos, inmunológicos y moleculares. La técnica parasitológica de Kato-Katz es la más utilizada, pero tiene baja sensibilidad cuando hay bajas cargas parasitarias (Alarcón de Noya *et al.*, 2007; Hofstede *et al.*, 2014). Las técnicas inmunológicas más utilizadas para detectar anticuerpos contra este parásito son el inmunoensayo enzimático (ELISA por sus siglas en inglés, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), la Prueba de Precipitación Circumoval (PPCO) y el *Western blot*. Para estas técnicas se requiere de equipos, materiales y reactivos costosos (Alarcón de Noya *et al.*, 2007).

En cuanto a los métodos moleculares, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) se ha empleado para la detección de la secuencia repetitiva de 121 pb de ADN de *S. mansoni* en suero, orina y heces humanas con buenos resultados (Pontes *et al.*, 2002; Ferrer *et al.*, 2015, 2020). Sin embargo, se requiere de infraestructura y reactivos costosos. Además, el paciente debe estar en fase activa para detectar el ADN del parásito, por lo que su sensibilidad es baja en la fase crónica de la enfermedad (Ferrer *et al.*, 2020).

Existen técnicas inmunológicas que se pueden hacer de forma manual y sin necesidad de equipamiento sofisticado. Éstas son algunas técnicas de *Immunoblotting* como *Dot blot* (mancha en punto) y *Slot blot* (mancha en línea), que son técnicas sencillas y rápidas (Cervantes *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2014). Por lo que, el objetivo de este trabajo fue la estandarización de las técnicas *Dot blot* y *Slot blot*, las cuales en estudios posteriores podrían ser validadas para su uso en el diagnóstico de esquistosomiasis.

Para la preparación del antígeno soluble de huevo de *S. mansoni* se utilizaron muestras de huevos obtenidas de cricetos dorados infectados experimentalmente y se siguió el protocolo de Noya *et al.* (1995). Los huevos fueron triturados en un homogenizador de tejidos en baño de hielo con una proporción de 1:2 volumen de huevo por volumen de tampón fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés *Phosphate Buffer Saline*), con cada uno de los siguientes inhibidores de proteasas: TLCK (Tosyl-L-Lysine-Chloromethyl Ketone) 1 mM, TPCK (Tosyl-L-Phenylalanine-Chloromethyl Ketone) 1 mM y PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride) 2 mM, con la finalidad de evitar la degradación de

las proteínas. Se centrifugó a 3000 rpm, 8°C, por 30 min. Posteriormente se separó el sobrenadante (antígeno soluble de huevo), se realizaron alícuotas y se guardaron a -20°C. La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (1976).

Se usaron 30 muestras de suero de pacientes con esquistosomiasis confirmada mediante diagnóstico clínico, métodos parasitológicos (Kato-Katz) e inmunológicos (ELISA e IFI) (controles positivos), 30 muestras de suero de pacientes con otras parasitosis producidas por helmintos (para identificar posibles reacciones cruzadas o falsos positivos, son los controles heterólogos); fascioliasis (3), teniasis (3), cisticercosis (3), hidatidosis (3), himenolepiasis (3), ascariasis (3), tricuriasis (3), enterobiasis (3), anquilostomiasis (3), estrongiloidiasis (3), confirmadas por métodos parasitológicos (coprología y biopsias) e inmunológicos (ELISA) y 30 muestras de suero de individuos sanos, sin historia de contacto con la parasitosis en estudio y negativos a técnicas inmunológicas (ELISA e IFI) para esquistosomiasis (controles negativos). De todos los grupos, se realizaron mezclas de estos sueros (empleando 10 µl de cada suero) para disminuir las variaciones entre ellos y estas mezclas fueron utilizadas para evaluar las diferentes condiciones en cada técnica.

Se probaron las siguientes cantidades de antígeno; 0,25; 0,5; 0,75; 1 y 1,25 µg, diluido en tampón carbonato-bicarbonato a pH 9,6 y se colocaron directamente sobre una tira de papel de nitrocelulosa (*Dot blot*), o utilizando un soporte (*Slot blot* manifold) para sellar el espacio en forma de línea en el papel de nitrocelulosa (*Slot blot*). Se utilizaron diferentes diluciones de los sueros (1/50, 1/100, 1/200) y conjugado anti-Inmunoglobulina Humana IgG acoplada a fosfatasa alcalina (Pierce) (1/3000, 1/4000 y 1/5000) en PBS, empleando sueros controles positivos, negativos y heterólogos. La cantidad óptima de antígeno, dilución óptima de suero y de conjugado fueron aquéllas en las cuales se obtuvo mayor diferencia de intensidad de color de la imagen entre los sueros controles positivos y negativos.

Para la técnica de *Dot blot* la membrana de nitrocelulosa se cortó en tiras de 5 cm para evaluar cada una de las condiciones, utilizando cuadros de 1 cm² para las diferentes cantidades de antígenos, las cuales se colocaron de forma manual sobre la membrana de nitrocelulosa, dejándose secar por 30 min. Las tiras fueron bloqueadas utilizando albúmina sérica bovina (BSA por sus siglas en inglés, *bovine serum albumin*) al 1% en PBS por 1 hora sobre un agitador a temperatura ambiente y se utilizaron para evaluar las diferentes condiciones. Cada tira se colocó en tubos con 5 ml de cada mezcla de sueros a las

diluciones mencionadas anteriormente y se incubó a temperatura ambiente sobre un agitador durante 1h.

Cada tira se lavó tres veces con 5 mL de una solución de PBS Tween 20 al 0,05% por 5 min. Posteriormente, se agregaron 5 mL del conjugado anti-IgG humana acoplado a fosfatasa alcalina a las diluciones anteriormente mencionadas. Después del lavado, de la forma antes descrita, se añadieron 5 mL del sustrato NBT-BCIP (Sigma), 0,33 mg/mL de NBT (*nitro blue tetrazolium* o nitroazul de tetrazolio) y 0,16 mg/mL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) en solución de

fosfatasa alcalina (Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,1M y MgCl₂ 50 mM, pH 9,5). Se incubó a temperatura ambiente hasta la aparición de las manchas en forma de punto (*dot*) en las diferentes cantidades de antígeno.

Para la técnica de *Slot blot* la membrana de nitrocelulosa se colocó en un soporte (*Slot blot manifold*) se añadieron los antígenos y una vez absorbidos a la membrana se sacó del soporte y se cortó de manera de tener las cantidades de antígeno a evaluar en cada tira y se continuó con la técnica de la misma forma que con *Dot blot*.

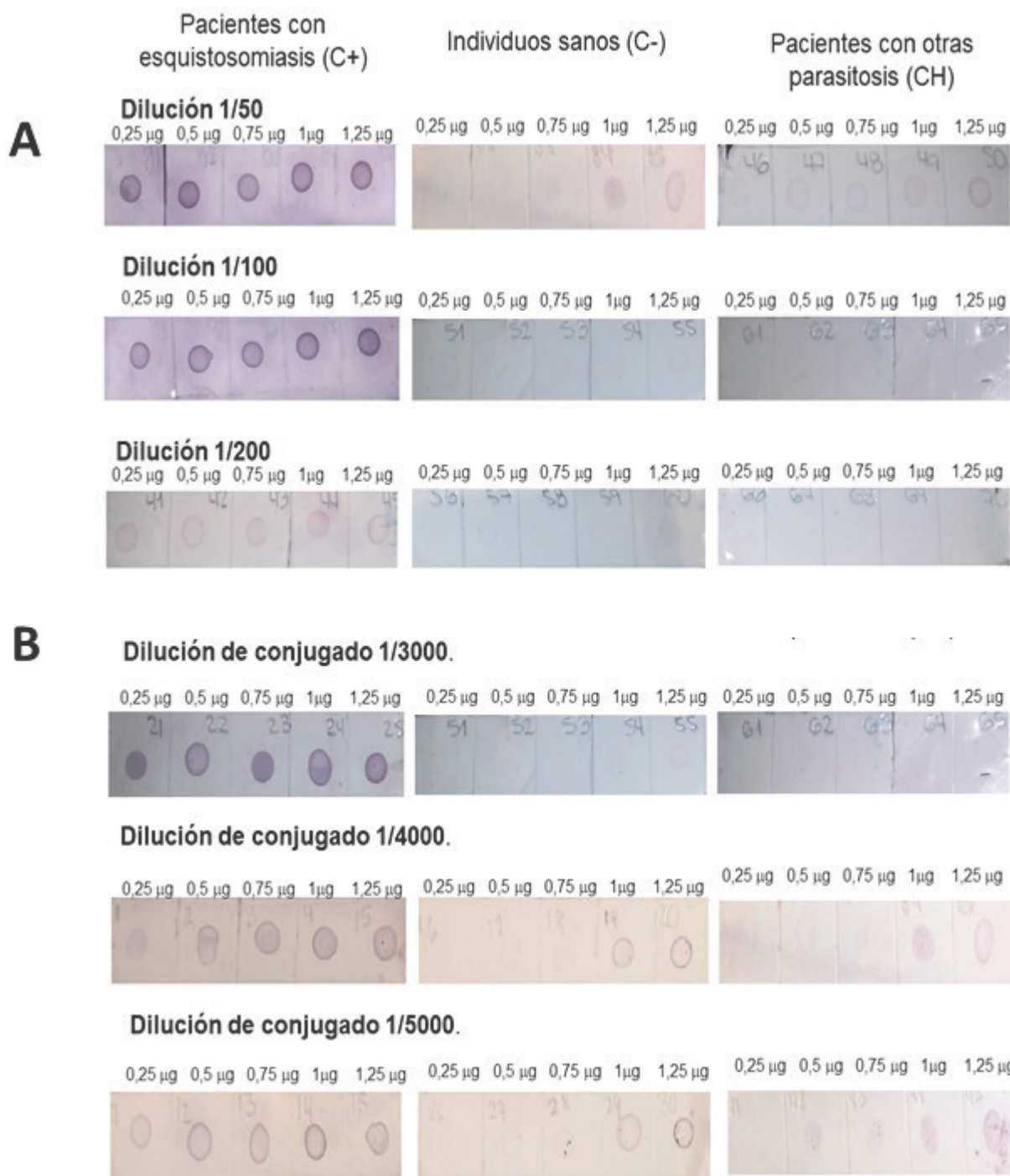


Figura 1. A Estandarización de la cantidad de antígeno y de suero en la técnica *Dot blot*. Se emplearon las diluciones 1/50, 1/100 y 1/200 de los sueros controles positivos (C+), negativos (C-) y heterólogos (CH), manteniendo una dilución fija de conjugado 1/3000. **B** Estandarización de la cantidad de antígeno y de conjugado en la técnica *Dot blot*. Se emplearon las diluciones 1/3000, 1/4000 y 1/5000 del conjugado y manteniendo una dilución fija de los sueros controles positivos (C+), negativos (C-) y heterólogos (CH) 1/100.

A partir de los huevos de *S. mansoni* (aproximadamente 0,5 g) se obtuvieron 5 mL del antígeno con una concentración de proteínas de 2,2 mg/mL, obteniéndose en total 11 mg del antígeno.

Se utilizó primero una dilución fija de conjugado 1/3000 para todas las condiciones para poder comparar. En la Figura 1 se observa la diferencia entre las mezclas de sueros positivos, negativos y heterólogos, siendo más evidentes con la cantidad de antígeno de 0,25 µg, ya que utilizando mayores cantidades se observa un ligero resultado positivo en forma de una mancha tenue con sueros negativos y heterólogos.

Por otra parte, utilizando la dilución del suero 1/50 en el caso del control positivo se evidencia un buen resultado, sin embargo, en el caso del control negativo y el control heterólogo se observan reacciones en las cantidades más altas del antígeno. Cuando se utilizó la dilución del suero 1/100 se evidenció una clara diferencia entre control positivo, negativo y heterólogo, siendo óptima para la técnica de *Dot blot* ya que al utilizar la dilución del suero 1/200, en el caso del control positivo la mancha es muy tenue, no permitiendo evidenciar claramente el resultado (Fig. 1A).

Para evaluar la dilución óptima del conjugado se mantuvo fija la dilución del suero 1/100, y se obtuvo en la dilución 1/3000 una clara diferencia entre control positivo, negativo y heterólogo (dilución óptima) mientras que en las otras diluciones (1/4000 y 1/5000), las mezclas de sueros positivos dan una reacción débil y se evidencia una mancha de reacción en los controles negativos y heterólogos (Fig. 1B).

Para la técnica de *Slot blot* se probaron las diluciones de suero de 1/100 y 1/200. Se utilizó una dilución fija de conjugado 1/3000. En la Figura 2A se observa la diferencia entre las mezclas de sueros positivos, negativos y heterólogos. No se observó mucha diferencia en las cantidades de antígeno, por lo tanto se toma a la primera cantidad de antígeno (0,25 µg), como la óptima para llevar a cabo la técnica, ya que permite un ahorro de antígeno y se puede observar la diferencia entre un resultado con las mezclas de sueros positivos, sueros negativos y sueros heterólogos.

A la dilución del suero 1/100 en el caso del control positivo se evidencia un buen resultado y se establecen negativos y heterólogos. Al utilizar la dilución del suero 1/200, el resultado obtenido en el control positivo es muy tenue, por lo que se establece la dilución del suero 1/100 como óptima para la técnica de *Slot blot*.

Se evaluó la dilución óptima del conjugado manteniendo fija la dilución del suero 1/100, como se observa en la Figura 2B. En la dilución 1/3000, las líneas se observan definidas, además se ve una

heterólogo (dilución óptima). En la dilución 1/4000 las mezclas de sueros positivos dan una reacción débil, además que el resultado se observa muy tenue.

En gran parte de las áreas endémicas de muchos países en vías de desarrollo, donde los recursos son limitados, no existen condiciones para realizar el diagnóstico inmunológico, lo que dificulta conocer las cifras de pacientes que tienen la enfermedad. Es necesario, para los programas de control, contar con herramientas diagnósticas que permitan conocer los casos positivos para el tratamiento a las personas infectadas. Por tal motivo, en el presente trabajo se planteó la estandarización de técnicas de *Immunoblotting* con antígeno soluble de huevo (SEA) de *S. mansoni*.

Para la estandarización de las técnicas de *Immunoblotting* se utilizó SEA debido a que estudios anteriores demostraron que es más específico que el antígeno del gusano adulto (20,8%) (Colmenares et al., 1993).

Los resultados obtenidos demuestran que para la estandarización de la técnica de *Dot blot* fue suficiente 0,25 µg de antígeno de huevo del parásito, la dilución óptima del suero fue 1/100 y la dilución del conjugado 1/3000. Se evidencia que la cantidad de antígeno así como de suero utilizada en este estudio fue menor a la propuesta por Cervantes et al. (2013), lo cual permite utilizar poco material antigénico para la reacción.

En un estudio realizado por Mafuyai et al. (2006) se utilizaron 5 µl del antígeno soluble de huevo de *S. mansoni*, una dilución del suero de 1/100 y una dilución del conjugado de 1/1000. Los autores no definen la cantidad de antígeno, pero en el presente trabajo la dilución del suero empleado fue la misma y la dilución del conjugado fue mayor, permitiendo ahorro del mismo.

En la estandarización de la técnica de *Slot blot* las condiciones óptimas fueron las mismas que en *Dot blot*. Kumar et al. (2014) evaluaron diferentes cantidades de antígeno de *Plasmodium falciparum*, siendo óptima la cantidad de 1,25 µg, y la dilución del conjugado mayor que la utilizada en el presente trabajo. Estas cantidades tan bajas se deben a que el sistema de revelado de los autores fue quimioluminiscencia que emite señales muy fuertes. Aunque se ahorra en antígeno y conjugado, el sistema de quimioluminiscencia y el uso de anticuerpos monoclonales hacen a la técnica costosa y muy difícil de implementar en la mayoría de las áreas donde la esquistosomiasis es endémica.

En Sudamérica, la técnica de *Dot blot* se ha sugerido como una herramienta adecuada para realizar el diagnóstico de diferentes enfermedades y para realizar encuestas seroepidemiológicas, por ser práctica y económica sobre todo en zonas donde no se tiene acceso a laboratorios especializados; y por

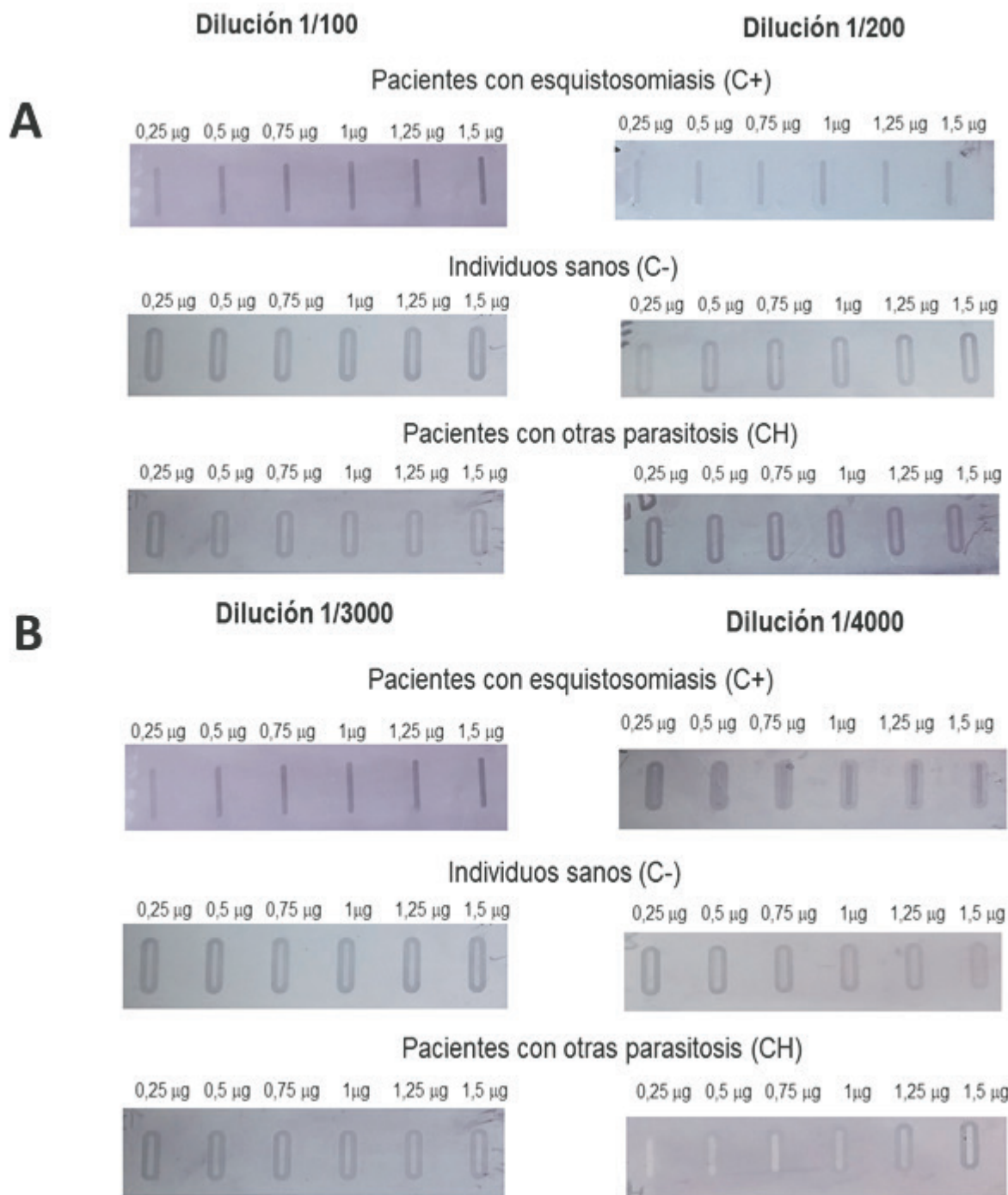


Figura 2. A Estandarización de la cantidad de antígeno y de suero en la técnica *Slot blot*. Se emplearon las diluciones 1/100 y 1/200 de los sueros controles positivos (C+), negativos (C-) y heterólogos (CH) y manteniendo una dilución fija de conjugado 1/3000. **B** Estandarización de la cantidad de antígeno y de conjugado en la técnica *Slot blot*. Se emplearon las diluciones 1/3000 y 1/4000 del conjugado y manteniendo una dilución fija de los sueros controles positivos (C+), negativos (C-) y heterólogos (CH) 1/100.

su versatilidad ya ha sido utilizada en la detección de infecciones con bacterias, virus y otros parásitos (Cervantes *et al.*, 2013).

La técnica de *Dot blot*, en comparación con la técnica de *Slot blot*, no requiere de un soporte, lo cual facilita su uso en el área clínica donde con un segmento pequeño de membrana de nitrocelulosa y los reactivos puede llevarse a cabo la reacción. Ulloa *et al.* (2014) concluyen que dicha técnica de diagnóstico es útil y sencilla, no requiere de equipos especiales, y puede ser utilizada como una técnica

cualitativa para evaluar un gran número de muestras en estudios de diferentes infecciones parasitarias en áreas endémicas.

En el caso de fascioliasis, *Dot blot* o *Dot-ELISA* se ha aplicado con éxito para la detección de anticuerpos. *Dot-blot* tiene ciertas ventajas: las membranas de nitrocelulosa con antígenos son estables, todos los pasos de incubación se realizan a temperatura ambiente, y los resultados se pueden leer a simple vista sin requerir equipos costosos. La prueba es aplicable para diagnosticar en campo, así como en **11**

laboratorios que no están bien equipados. El *Dot blot* es simple y permite prueba de múltiples muestras al mismo tiempo (Mas-Coma *et al.*, 2014).

Los resultados demuestran que la utilización de técnicas como *Dot blot* y *Slot blot* con antígeno soluble de huevo podría ser una alternativa en el diagnóstico de la esquistosomiasis en escenarios de limitados recursos económicos. El bajo costo y la sencillez en su aplicación las hacen candidatas para estudios posteriores de validación para evaluar su uso en diagnóstico clínico y para estudios epidemiológicos.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

Universidad de Carabobo, Proyecto DIPISA-PG-2017-004.

LITERATURA CITADA

- Alarcón de Noya, B., Ruiz, R., Losada, S., Colmenares, C., Contreras, R., Cesari, I. y Noya, O. (2007). Detection of schistosomiasis cases in low-transmission areas based on coprologic and serologic criteria the Venezuela experience. *Acta Tropica*, 103, 41-49.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Cervantes, A., Martínez, I., Reyes, P., Shabib, M. y Gutiérrez, B. (2013). Estandarización de la técnica Dot-ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* y su comparación con ELISA y *Western blot*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32, 363-368.
- Colmenares, C., Fermín, Z., Losada, S., Spencer, L., Masroua, G., Noya, O. Alarcón de Noya, B. (1993). Reactividad cruzada en el inmunodiagnóstico de la esquistosomiasis. *Acta Científica Venezolana*, 44, 211.
- Ferrer, E., Pérez, F., Bello, I., Bolívar, A., Lares, M., Osorio, A., León, L., Amarista, M. e Incani, R.N. (2015). Polymerase chain reaction for the amplification of the 121-bp repetitive sequence of *Schistosoma mansoni*: a highly sensitive potential diagnostic tool for areas of low endemicity. *Journal of Helminthology*, 89, 769-773.
- Ferrer, E., Villegas, B., Mughini-Gras, L., Hernández, D., Jiménez, V., Catalano, E. e Incani, R.N. (2020). Diagnostic performance of parasitological, immunological and molecular tests for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in a community of low transmission in Venezuela. *Acta Tropica*, 204, 105360.
- Hofstede, S.N., Tami, A., Van Liere, G.A.F.S., Ballen, D. e Incani RN. (2014). Long-term effect of mass chemotherapy, transmission and risk factors for *Schistosoma mansoni* infection in very low endemic communities of Venezuela. *Acta Tropica*, 140, 68-76.
- Kumar, S., Zheng, H., Deng, B., Mahajan, B., Grabias, B., Kozakai, Y., Morin, M. J., Locke, E., Birkett, A., Miura, K. y Long, C. (2014). A Slot Blot Immunoassay for quantitative detection of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in mosquito midgut oocyst. *PLOS ONE*, 9(12), e115807.
- Mafuyai, H., Uneke, C., Njoku, M. y Chuga, G. (2006). DOT-ELISA and parasitological examination for diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in Nigeria. *Helminthologia*, 43, 11-15.
- Mas-Coma, S., Bargues, M.D., y Valero, M.A. (2014). Diagnosis of human fascioliasis by stool and blood techniques: update for the present global scenario. *Parasitology* 141, 1918-1946.
- Noya, O., Katz, N., Pointier, J., Théron, A. y Alarcón de Noya, B. (2015). Schistosomiasis in America. En Franco-Paredes C & Santos-Preciado JI (Eds.). *Neglected Tropical Diseases-Latin America and the Caribbean* (11-43). Springer.
- Noya, O., Losada, S., Alarcón de Noya, B., González, S., Hermoso, T., Balzan, C. y Cesari, I. M. (1995). Effect of chemotherapy on immune response to egg antigens of *Schistosoma mansoni* in chronically infected children from areas of low transmission. *Parasite Immunology*, 17, 111-117.
- OMS. (2020). Esquistosomiasis. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/es/>. Último acceso Julio 15,2020.
- Pontes, L., Días, E. y Rabello, A. (2002). Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66, 157-162.
- Ulloa, E., Sandoval, R., Ayala, E. y Vázquez, J. (2014). Evaluación de las pruebas *Dot blot* y aglutinación de látex para el diagnóstico de cisticercosis en Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31, 297-301.

Recibido: 20 de agosto de 2020

Aceptado: 02 de febrero de 2021