

Inmunodiagnóstico en *Didelphis marsupialis* usando un antígeno de *Paragonimus* de Venezuela

Immunodiagnostic in Didelphis marsupialis using an antigen of Venezuelan Paragonimus

► Erika Gómez Martínez^{1a}, Zoraida Díaz-Bello^{2b}, Reinaldo Zavala-Jaspe^{3b}, Marcos Tulio Díaz^{4a}, Oscar Noya^{4b}, Belkisyole Alarcón de Noya^{4b}

1. Magister *Scientiarum* en Parasitología.
2. Magister *Scientiarum* en Inmunología.
3. Licenciado en Biología.
4. Doctor en Parasitología.

- a. Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas Universidad de Oriente, Cumaná, Estado Sucre, Venezuela.
- b. Instituto de Medicina Tropical. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Distrito Capital, Venezuela.

Resumen

Los *Paragonimus* son trematodos que habitualmente viven en los pulmones de mamíferos carnívoros y omnívoros, entre ellos el hombre. En el oriente venezolano se encuentra el único foco de *Paragonimus* sp. donde *Didelphis marsupialis* es el único reservorio demostrado hasta ahora. Con el fin de tener herramientas de inmunodiagnóstico que detecten la presencia de *Paragonimus* sp. en esta especie, se elaboraron varios reactivos para realizar un ensayo inmunoenzimático ELISA. Entre ellos se obtuvo un antígeno crudo soluble de vermes adultos de *Paragonimus* y una inmunoglobulina de gallina anti-IgG de *Didelphis marsupialis*. Los mismos se capturaron en la localidad de Aguas Blancas, municipio Montes, estado Sucre, Venezuela, y se obtuvieron muestras sanguíneas; en el caso de estar infectados, los vermes adultos se extrajeron del pulmón. Los parásitos se homogenizaron y ultracentrifugaron para obtener la fracción soluble del parásito (FSPA) como antígeno para el ELISA y *Western blot* y detectar los anticuerpos en los *Didelphis marsupialis*. El análisis electroforético mostró 22 moléculas entre 6 y 82 kDa; por *Western blot* se presentó un reconocimiento antigénico de 8 moléculas siendo las de 112 kDa y 268 kDa las más reconocidas por los sueros positivos. Los sueros negativos no reconocieron ninguna proteína. La producción de IgY en gallinas permitió desarrollar las técnicas de inmunodiagnóstico para la búsqueda de anticuerpos específicos anti-*Paragonimus* sp. en *Didelphis*, cuya aplicación permitirá establecer la vigilancia epidemiológica de estos reservorios en áreas endémicas sin sacrificio de los mismos.

Palabras clave: *Paragonimus* sp. * *Didelphis marsupialis* * inmunodiagnóstico

Summary

Paragonimus are trematodes that normally live in the lungs of carnivorous and omnivorous mammals such as humans. An outbreak of *Paragonimus* sp. in which *Didelphis marsupialis* was the only wild reservoir incriminated was described in eastern Venezuela. In order to have immunological tools to

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

detect the presence of *Paragonimus* sp. in this reservoir, a whole antigen of the adult worm of this parasite was elaborated. *Didelphis marsupialis* were captured in the locality of Aguas Blancas, Montes municipality, Sucre state, Venezuela, from which blood samples were obtained and a search for worms was performed in lungs. Worms were homogenized and ultracentrifugated to obtain FSPA to perform immunoassay (ELISA) to detect antibodies in opossums. The electrophoresis analysis showed a pattern of 22 molecules between 6 and 82 kDa; by western blot, the antigenic recognition of 8 antigenic molecules appeared, 112 kDa and 268 kDa molecules being the most strongly recognized by positive sera. The negative sera did not recognize any band. The production of IgY in chicken enabled the development of reagents capable of performing a standard immunodiagnosis technique to find specific anti-*Paragonimus* sp. in *Didelphis marsupialis* in order to establish epidemiological surveillance of these reservoirs in endemic areas.

Key words: *Paragonimus* sp * *Didelphis marsupialis* * immunodiagnostic

Introducción

La paragonimiasis causada por trematodos pertenecientes al género *Paragonimus* es un problema de salud pública en países asiáticos y en algunos de Latinoamérica donde existe la costumbre de ingerir crustáceos de agua dulce crudos o semicrudos (1)(2). En el continente americano esta enfermedad se ha informado en Perú, Ecuador, México, Panamá, Brasil, Costa Rica, Colombia y Venezuela (2). Como resultado de la detección del primer caso autóctono de paragonimiasis en el municipio Cajigal, estado Sucre, Venezuela (3), también se evidenció en este estado, la presencia de cercarias, metacercarias, adultos en *Aroa pyrgus* sp., *Eudaniela garmani* y *Didelphis marsupialis* respectivamente (4-6). Posteriormente, en los municipios Sucre y Montes de ese mismo estado, se demostró la presencia de metacercarias y adultos en estos mismos hospederos (7)(8).

Se han realizado estudios inmunológicos en animales experimentalmente infectados con distintas especies de *Paragonimus* con el fin de dilucidar la respuesta en estos modelos de laboratorio frente a la infección parasitaria, permitiendo evaluar los títulos de anticuerpos en estos animales durante el curso de la infección (2)(9)(10). Sin embargo, la respuesta inmunológica frente a *Paragonimus* en un reservorio natural como *Didelphis marsupialis* no se ha descrito.

Con el objetivo de estandarizar y desarrollar las técnicas de inmunoensayo enzimático (ELISA) y *Western blot*, se preparó una fracción proteica soluble de verme adulto de *Paragonimus* sp. proveniente de *Didelphis marsupialis* capturados en los municipios antes citados y se produjo un anticuerpo de gallina IgY anti-IgG de *Didelphis marsupialis* que fue empleado en las técnicas diagnósticas con el fin de estudiar el perfil de reconocimiento antigénico de *D. marsupialis* como posible herramienta para la determinación de las áreas endémicas en Venezuela, sin recurrir al sacrificio de este animal.

Materiales y Métodos

Obtención de muestras de *Didelphis marsupialis*

Los mismos fueron capturados con trampas tipo Sherman y trasladados al laboratorio del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA) del estado Sucre, siguiendo la normativa para el uso de animales en docencia e investigación del código de bioética y bioseguridad (11). Una vez anestesiados con una sobredosis de pentotal sódico (50 mg/kg) se obtuvo sangre mediante punción cardíaca y luego se realizó la comprobación de la presencia de los vermes adultos de *Paragonimus* sp. en pulmones y demás órganos, a fin de obtener los parásitos adultos. Los sueros se preservaron con azida sódica y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

Preparación de la fracción soluble (FSPA) del aislado de vermes adultos de *Paragonimus* sp.

Los vermes adultos fueron lavados con solución de NaCl 0,85% y resuspendidos en una solución 50 mM de Tris pH 7,2. La preparación fue procesada en homogenizador Potter Everhart a 4 °C y ultracentrifugada a 100.000 x g por 2 horas a 4 °C y se agregó 50 mM de un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma) (12)(13). El sobrenadante (FSPA) fue dializado contra la solución 50 mM de Tris pH 7,2 durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se realizó la determinación de proteínas por el método de Bradford (14).

Producción de inmunoglobulina Y de gallina anti-IgG de *Didelphis marsupialis* (IGY ANTI-IGG-DM)

A partir de un suero de *Didelphis marsupialis* (Dm) proveniente de zona no endémica y con ausencia de vermes y huevos de *Paragonimus* sp se purificó la IgG mediante precipitación alcohólica, realizándole una electroforesis

en gel de poliacrilamida al 12% para verificar su pureza (15). Con la IgG purificada se inmunizaron 4 gallinas rojas (*Rhode Island*) de 25 semanas de edad, inoculándose intramuscularmente en tres ocasiones, en la primera dosis con 650 µg de inmunoglobulinas G totales de Dm (IgG-Dm) en adyuvante completo de Freund (Difco). Las siguientes inoculaciones fueron realizadas a la misma concentración en adyuvante incompleto de Freund. Las dosis se aplicaron cada 16 días (16). Los huevos de las gallinas se recolectaron e identificaron desde el día 26 hasta el día 40 post-inoculación primaria y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

Se purificó la IgY anti-IgG-Dm siguiendo la metodología de Polson y Von Wechmar (17) y Carrol y Stollar (18). Las yemas de los huevos de las gallinas inmunizadas fueron previamente lavadas con agua destilada, diluidas en *buffer* A pH 7,5 (Na₂HPO₄ 0,01 M; NaCl 0,1 M y azida sódica 0,01%) mezclándose fuertemente. Luego, se agregó polietilenglicol 6000 (PEG 6000) pulverizado al 3,5%. La mezcla se centrifugó a 15.000 x g por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido fue filtrado con gasa y algodón y se le realizaron dos precipitaciones más utilizando concentraciones de PEG 6000 al 12%. El precipitado obtenido fue resuspendido en *buffer* B (Na₂HPO₄ 0,01 M; NaCl, 0,1 M) en una proporción 1:1. Finalmente, se realizó una precipitación alcohólica y por último se realizó una diálisis contra *buffer* fosfato salino (PBS) pH 7,2 durante toda la noche a 4 °C. A la fracción así obtenida, se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (14) y se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5% en condiciones reductoras según Laemmli (19), con 15 µg de IgY anti-IgG-Dm, a 180 V constantes por 1 hora utilizando una fuente de poder Bio-Rad® (Hercules, CA. EE.UU.) y se evaluó su pureza, comparándola en el gel con una IgY comercial (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.).

La titulación de la IgY anti-IgG-Dm se realizó mediante ELISA, sensibilizando una placa con una solución 10 µg/mL de IgG Dm purificada previamente diluida en *buffer* carbonato-bicarbonato (0,1 M) pH 9,6 e incubando durante 24 horas a 4 °C. Se realizaron tres lavados con *buffer* fosfato salino pH 7,2 con Tween 20 al 0,05% (PBS-Tween). Posteriormente, se adicionó IgY anti-IgG-Dm (purificada previamente) diluida 1:20, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000 y 1:5000 en leche descremada al 5% en PBS-Tween. Se incubó 1 hora a 37 °C y se realizaron tres lavados con PBS-Tween.

Se agregó anti-IgY conjugada a fosfatasa alcalina diluida 1:10.000 (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) y se incubó por 1 hora a 37 °C. Para revelar, se colocaron 50 µL de *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) en solución dietanolamina DEA (1mg/mL) y se incubó a 37 °C por 15 min. La reacción se detuvo con NaOH (1 M) y se leyó a 405 nm en un lector de ELISA Spectra Classic (TECAN, Oberdiessbach, Suiza). La especificidad de la IgY anti-

IgG-Dm se realizó enfrentando IgG de diferentes animales (conejo, ratón, perro, cobayo) e IgG humana mediante un inmunoensayo con las mismas condiciones descritas.

Reconocimiento del antígeno crudo de *Paragonimus* sp. por sueros de *Didelphis marsupialis* con ELISA

Para obtener el punto de corte del ELISA (20) se utilizaron 10 sueros de *Didelphis marsupialis* negativos parasitológicamente y provenientes de un área donde no se ha descrito la presencia de *Paragonimus* sp. Cada muestra se procesó por duplicado; las densidades ópticas resultantes se promediaron y al promedio se le sumó 3 veces la desviación estándar (X + 3DE) (21).

Una vez determinado el punto de corte, se evaluaron 10 sueros de *Didelphis marsupialis* confirmados parasitológicamente utilizando las condiciones del ELISA como se describe a continuación.

Las placas fueron sensibilizadas con 10 µg/mL del antígeno FSPA en *buffer* carbonato-bicarbonato (0,1 M) pH 9,6, e incubadas 24 horas a 4 °C. Posteriormente, en cada paso de incubación se realizaron 3 lavados con PBS-Tween. Las placas se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS-Tween (solución bloqueadora) por 1 hora a 37 °C. Se colocaron 50 µL/pozo de los sueros de *Didelphis marsupialis* diluidos 1:100 en solución bloqueadora y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Se adicionaron 50 µL/pozo de IgY anti-IgG Dm diluida 1:100 en solución bloqueadora y se incubó 1 hora a 37 °C. Se agregó anti-IgY conjugada a fosfatasa alcalina diluida 1:10.000 (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) y se incubó por 1 hora a 37 °C. Para revelar, se colocaron 50 µL de *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) en solución DEA (1mg/mL) y se incubó a 37 °C por 15 min. La reacción se detuvo con 50 µL de NaOH (1 M) y se leyó a 405 nm en un lector de ELISA Spectra Classic.

Reconocimiento del antígeno crudo de *Paragonimus* sp. por sueros de *Didelphis marsupialis* con *Western blot*

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% utilizando 20 µg/bolsillo de FSPA en condiciones reductoras y disociantes a 180 V constantes por 1 hora (19). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie, se digitalizaron y analizaron utilizando el programa Quantity One 1-D Biorad®, EE.UU.

La preparación antigénica (FSPA) fue separada por electroforesis y transferida a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm Bio-Rad®. La transferencia se realizó a 300 V por 1 hora a 4 °C. Después de la transferencia, el papel de nitrocelulosa fue cortado en tiras de 3 mm de ancho y bloqueado con leche descremada al 5% diluida en *buffer* fosfato salino pH 7,2 con Tween 20 al 0,05% (PBS-Tween) en agitación constante durante

toda la noche a 4 °C. Posteriormente, las tiras fueron incubadas individualmente con sueros de *D. marsupialis* diluido 1:100 durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante y lavadas por 15 minutos, 4 veces con PBS-Tween. Luego se incubaron las tiras con IgY anti-IgG-Dm diluida 1:100 por 1 hora a temperatura ambiente y lavadas bajo las mismas condiciones anteriores. Luego se incubaron las tiras con una dilución 1:10.000 de anti-IgY conjugada a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) por una hora a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizaron cuatro lavados y al retirar el último se colocó 1 mL de sustrato Super-Signal® West Pico Chemiluminescent (Pierce, EE.UU.) por un minuto (22) (23). Las tiras fueron reveladas por auto-radiografía, digitalizadas y analizadas utilizando el programa Quantity One 1-D Biorad®, EE.UU.

Análisis Estadístico

Los datos fueron sometidos a análisis estadístico no paramétrico. Los resultados se expresaron como medianas y sus intervalos de confianza del 95% se calcularon por el método de Hogdes y Lehmann en Hollander y Wolfe (24) para los detalles de los métodos no paramétricos. Para comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos se usó la prueba de Mann-Whitney (Wilcoxon). Las diferencias entre medianas se consideraron significativas si la probabilidad de que ellas fuesen al azar fue $p \geq 0,05$. Los cálculos se realizaron a través del Statistical Package MS Windows 7.25 desarrollado por el Dr. Carlos Sevcik (csevcik@ivic.ve).

Las gráficas se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism, Versión 2.00 para Windows. Se calculó la sensibilidad, especificidad y el índice de concordancia de ELISA contra la prueba parasitológica (20) (21). Las diferencias electroforéticas entre los mismos lotes fueron realizadas por comparación del número de bandas y la

intensidad de las mismas generados por el análisis con el programa Quantity One 1-D Biorad®, EE.UU.

Resultados

Producción de IgY de gallina anti-IgG-Dm

La concentración de proteínas obtenida de IgY fue de 2,736 mg/mL. En la electroforesis al 12,5% se observaron dos monómeros de aproximadamente 70-80 kDa y 20 kDa respectivamente, lo que representa la cadena pesada y la cadena liviana de la IgY; además, se evaluó su pureza al compararse con una IgY comercial (Figura 1). Se observó el reconocimiento de la IgY anti-IgG-Dm producida en todas sus diluciones a diferencia de las IgY de gallinas no inmunizadas, las cuales no presentan reconocimiento por IgG de *D. marsupialis* en ninguna de las diluciones (Tabla I).

Al evaluar la especificidad, se observó que el valor de densidad óptica más alto obtenido fue de 0,187 cuando la IgY anti-IgG-Dm se enfrentó a la IgG de cobayo. Asimismo, no se observó reconocimiento contra IgG de conejos, perros, ratón o humanos (Tabla II).

Evaluación de los sueros de *Didelphis marsupialis* contra el antígeno de *Paragonimus* sp. por ELISA

Se utilizaron 10 sueros de *D. marsupialis* sin infección por *Paragonimus* y provenientes de otra región del país sin presencia de esta parasitosis, con los cuales se obtuvo un punto de corte para el ELISA de 0,276 (Fig. 2).

De 20 sueros de *Didelphis marsupialis* capturados, 10 presentaron reactividad por ELISA a la FSPA con densidades ópticas por encima del punto de corte entre 0,427 y 1,257. Estos sueros provenían de animales parasitológicamente positivos (Figura 2). Se encontró

Tabla I. Títulos de la IgY de gallina anti-IgG Dm

Anticuerpo	Dilución de inmunoglobulina Y						
	1:20	1:50	1:100	1:200	1:500	1:1000	1:5000
DO de IgY anti-IgG Dm.	1,999	1,841	1,708	0,849	0,706	0,547	0,466
DO IgY no inmunizada	0,049	0,049	0,086	0,080	0,080	0,087	0,080
DO: Densidad Óptica; Dilución anti-IgY: 1:10.000							

Tabla II. Especificidad de IgY de gallina anti-IgG Dm A inmunoglobulinas G de distintas especies animales

Anticuerpo	Antígeno	Dilución	Densidad óptica
IgY anti-IgG Dm	IgG de ratón	1:20	0,029
IgY anti-IgG Dm	IgG de conejo	1:20	0,031
IgY anti IgG Dm	IgG de perro	1:20	0,078
IgY anti-IgG Dm	IgG de humano	1:20	0,085
IgY anti-IgG Dm	IgG de cobayo	1:20	0,187

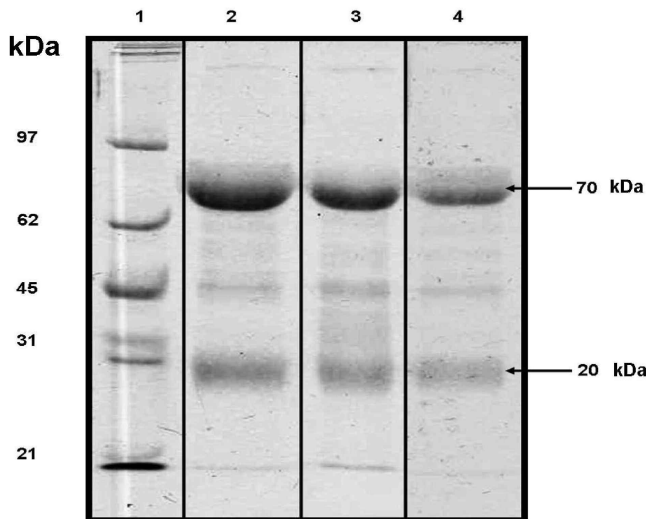


Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% de la IgY anti-IgG de *Didelphis marsupialis*. 1: Marcador de pesos moleculares; 2: IgY comercial; 3: IgY anti-IgG de *Didelphis marsupialis* producida en IMT; 4: IgY anti-IgG pre-inmune producida en IMT.

que el índice de concordancia entre el ELISA desarrollado y la prueba parasitológica fue de 100%. Igualmente, la sensibilidad y especificidad del ELISA fue de 100%.

El análisis estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas en la prueba de Wilcoxon entre los sueros positivos y negativos evaluados ($p < 0,01$). La mediana y el intervalo de confianza del 95% de los positivos fue 0,7355 (0,6355 – 0,905) mientras que para los controles negativos fue de 0,170 (0,150 – 0,191).

Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% bajo condiciones reductoras y disociantes de la FSPA

Se obtuvieron 22 bandas proteicas con pesos moleculares entre 6 y 82 kDa cuando se empleó 20 µg/bolsillo. Las bandas de 8-9 kDa, 10-12 kDa, 20-21 kDa y 52 kDa fueron las más intensas en la tinción (Fig. 3).

Western blot de la FSPA con sueros de *Didelphis marsupialis*

En el Western blot, los sueros de *D. marsupialis* infectados con *Paragonimus* sp. presentaron algún tipo de reactividad a la FSPA, reconociendo hasta 10 moléculas de alto peso molecular. La molécula de 112 kDa (10/10) seguida por la molécula de 268 kDa (8/10) fue la más reconocida por los sueros positivos y ninguna lo fue por los sueros negativos. Los sueros negativos reconocieron una o ninguna banda de otros pesos moleculares (Fig. 4 y Fig. 5).

Discusión y Conclusiones

En Venezuela, luego de la demostración parasitológica del primer caso de paragonimiasis humana autóctona (3) en un estudio epidemiológico en el área de procedencia del paciente (municipio Cajigal), se diagnosticaron otros tres casos humanos de paragonimiasis en la misma región, los cuales fueron analizados por ELISA utilizando antígenos provenientes de Japón, debido a que en Venezuela no se contaba con técnicas diagnósticas para esta enfermedad (4). Con adultos provenientes de estos primeros estudios se elaboró un antígeno somático crudo de *Paragonimus* sp. el cual se utilizó para los primeros ensayos diagnósticos. Ningún otro antígeno venezolano de *Paragonimus* sp. se había evaluado hasta el presente.

La FSPA utilizada en esta investigación mostró por electroforesis al 15%, 22 moléculas proteicas entre 6 y 82 kDa, visualizándose en mayor concentración las bandas peptídicas de pesos moleculares bajos de 8-9 kDa, 10-12 kDa y 20-21 kDa; sin embargo, se observó un mayor número de bandas (8 bandas) con menor concentración, con pesos moleculares mayores de 25 kDa. Otros trabajos se han realizado comparando el uso de distintos antígenos de varias especies de *Paragonimus*, pero el procedimiento utilizado para la obtención del antígeno difiere del presente trabajo, en el cual para la preparación de la FSPA se realizó un proceso de ultracentrifugación a 100.000 x g durante 2 horas (25-27). Cornejo et

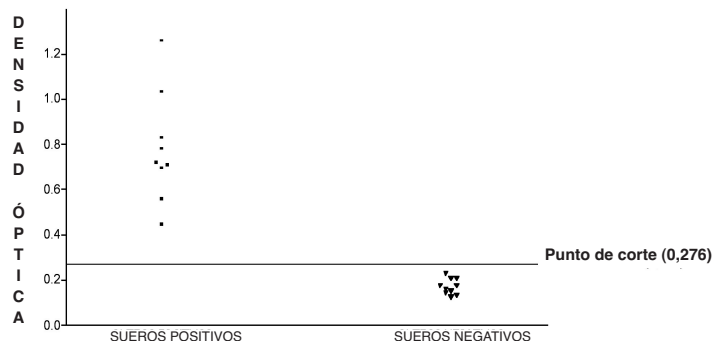


Figura 2. Evaluación de sueros de *Didelphis marsupialis* por ELISA.

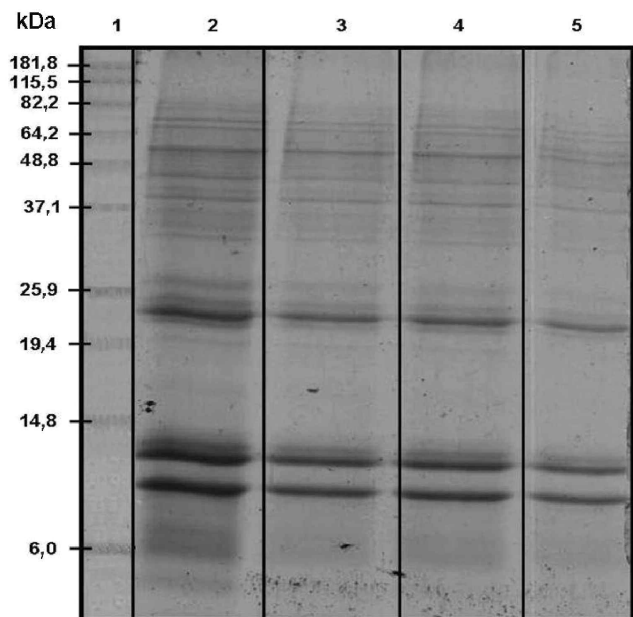


Figura 3. Electroforesis al 15% de la FSPA a diferentes concentraciones. 1: pesos moleculares, 2: 40 µg/bolsillo; 3: 20 µg/bolsillo; 4: 10 µg/bolsillo; 5 µg/bolsillo.

al, usando un extracto total de *Paragonimus mexicanus* en Perú (28), y Barquin *et al*, en Chile (29) obtuvieron un patrón de 15 y 13 moléculas por electroforesis, respectivamente. Por el contrario, Kyoung *et al*, usando un extracto crudo de *P. westermani* informaron la presencia de 26 moléculas proteicas comprendidas entre 10 y 229 kDa, en gel de electroforesis al 10% (27). Igualmente, Kong *et al*, describen un patrón proteico de un extracto crudo de *Paragonimus westermani* de 13 bandas proteicas siendo las más notables las de 15, 17 y 27 kDa, indicando que cada patrón proteico es especie y estadio específico (26).

Distintas técnicas serológicas, tales como ELISA y *Western blot*, se han utilizado para el diagnóstico de la paragonimiasis humana, pero pocas se han desarrollado para determinar infecciones en animales con *Paragonimus*. Algunos autores han medido títulos de anticuerpos en animales infectados experimentalmente con distintas especies de *Paragonimus*, pero ninguno en un reservorio natural como lo es el *Didelphis marsupialis*. Lee y Chang estandarizaron un ELISA para el seguimiento de los títulos de anticuerpos en gatos infectados experimentalmente hasta 16 semanas usando un antígeno crudo de *P. westermani* e informaron una buena sensibilidad (10).

En la presente investigación, el ELISA con la FSPA discriminó entre sueros de *Didelphis marsupialis* infectados y no infectados con *Paragonimus* sp. Para la normalización de esta técnica fue necesario la preparación de la IgY anti-IgG de *Didelphis marsupialis* (IgY anti-IgG-Dm) pues comercialmente no existe en el mercado anti-IgG de este marsupial para su utilización como conjugado.

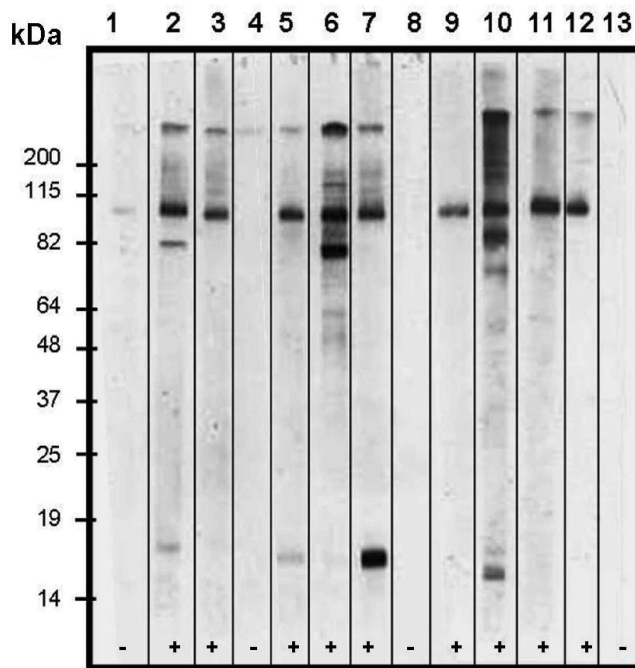


Figura 4. Reconocimiento antigénico por Western Blot de la FSPA por los sueros de *D. marsupialis*. Líneas 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, corresponden a sueros de *Didelphis marsupialis* infectados con *Paragonimus* sp. Líneas 1, 4, 8, 13, sueros de *Didelphis marsupialis* no infectados con *Paragonimus* sp.

Se utilizó IgY en base a las ventajas de este modelo, como lo es el alto rendimiento de IgY que se obtiene a través de los huevos y la facilidad de su purificación. Una vez determinada la actividad biológica de la IgY anti-IgG-Dm y su especificidad, se procedió a la estandarización del ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos anti-*Paragonimus* en *Didelphis marsupialis*. Los resultados obtenidos fueron 100% concordantes con los resultados parasitológicos, por lo que se sugiere la utilización de este método para estudios de vigilancia epidemiológica y delimitación de las áreas endémicas.

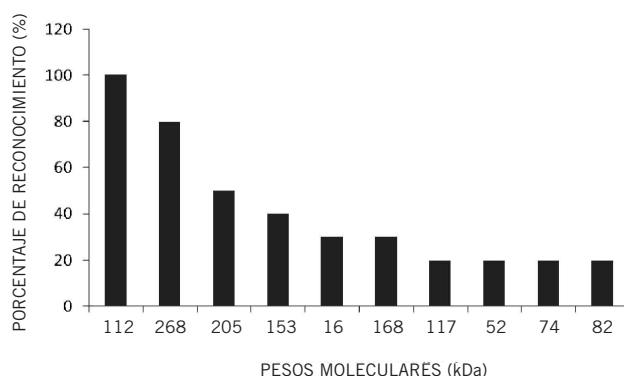


Figura 5. Frecuencia de reconocimiento por Western Blot de moléculas de la fracción soluble proteica de vermes adultos (FSPA) de *Paragonimus* sp. por sueros de *D. marsupialis* infectados (n= 10).

Los resultados por *Western blot* con sueros de *D. marsupialis* muestran que los sueros provenientes de los animales parasitológicamente positivos reconocieron 10 moléculas de alto peso molecular de la FSPA. La molécula de 112 kDa seguida de la de 268 kDa fue las más fuertemente reconocida por estos sueros, por lo que este método, utilizando la FSPA, podría ser un excelente método confirmatorio de infección por *Paragonimus* sp. en *Didelphis marsupialis*.

Hasta donde se ha investigado en la literatura, no existen trabajos en Venezuela o en Latinoamérica relacionados con el reconocimiento antigénico de extractos solubles de *Paragonimus* sp. por sueros de *Didelphis marsupialis*. Cuando se compara el patrón de reconocimiento antigénico de FSPA por los sueros de *D. marsupialis* aquí obtenido, con patrones de reconocimiento a este mismo antígeno por sueros de personas con paragonimiasis, se observa que son totalmente distintos ya que hay un reconocimiento de 8 moléculas con pesos moleculares aproximados de 101, 91, 71, 59, 44, 31, 5 y 3 kDa por los sueros humanos (30). Igualmente, otros autores han descrito, de acuerdo con la especie de *Paragonimus*, un reconocimiento antigénico de moléculas de bajo peso molecular que oscila entre 10-46 kDa por sueros humanos (25) (31) (32).

Finalmente, se concluye que la mayor concentración de componentes proteicos de la FSPA del aislado venezolano de *Paragonimus* sp. corresponden a pesos moleculares bajos. Por el contrario, el patrón de reconocimiento antigénico de la FSPA obtenido por *Western blot* con sueros de *Didelphis marsupialis* es de alto peso molecular, lo que difiere totalmente con el patrón de reconocimiento publicado para sueros humanos de pacientes con paragonimiasis.

La producción de IgY de gallina permitió desarrollar la técnica de ELISA y *Western Blot* para la búsqueda de anticuerpos específicos en *Didelphis marsupiales*, el cual es uno de los reservorios silvestres de mas enfermedades parasitarias en Venezuela, pudiéndose adaptar estos reactivos para la vigilancia epidemiológica de otros agentes infecciosos en este reservorio.

Tanto el ELISA como el *Western blot* para *Didelphis marsupialis* deben ser evaluados con una mayor cantidad de sueros de esta especie, lo que permitirá confirmar la sensibilidad de estos métodos.

CORRESPONDENCIA

ERIKA GÓMEZ MARTÍNEZ

Laboratorio de Parasitología

Instituto de Investigación en Biomedicina

y Ciencias Aplicadas IIBCA

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre

Cumaná, estado SUCRE, Venezuela

E-mail: eri1578@hotmail.com

Referencias bibliográficas

1. Toscano C, Yu S, Nunn P, Mott K. Paragonimiasis and tuberculosis, diagnostic confusion: a review of the literature. *Trop Dis Bull* 1995; 92: R1-R26.
2. Waikagul J. New species of *Paragonimus* (Trematoda: Troglotrematidae) from a cat infected with metacercariae from mountain crabs *Larnaudia larnaudii*. *J Parasitol* 2007; 93(6): 1496-500.
3. Alarcón De Noya B, Abreu G, Noya O. Pathological and Parasitological aspects of the first autochthonous case of human paragonimiasis in Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 1985a; 34 (4): 761-5.
4. Alarcón De Noya B, Noya O, Torres J, Botto C. A field study of paragonimiasis in Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 1985b; 34: 766-9.
5. Tongu Y, Noya O, Iwanaga Y, Hata H, Alarcón De Noya B, Botto C, *et al.* Morphological features of larval stages of Venezuelan *Paragonimus*. *Jpn J Parasitol* 1990; 39: 356-64.
6. Noya O, Alarcón De Noya B, Tongu Y, Yokogawa M, Archedera H, Hata H, *et al.* Morphology of *Paragonimus* adult worms from Venezuela. *Jpn J Parasitol* 1992; 41(1): 1-9.
7. Díaz M, Marin M, Basirullah A. Estudios morfológicos de la metacercaria y adulto de un trematodo del género *Paragonimus*, parasitando *Eudaniela garmani* y *Didelphis marsupialis*, con observaciones en el sistema reproductor masculino y femenino. *Acta Cient Venez* 2002; 53 (Sup.1): 209.
8. Marín M. Ocurrencia y algunos factores biológicos del gusano del pulmón (*Paragonimus mexicanus* Miyasaki e Ishii, 1968) en algunas localidades del Estado Sucre. (Tesis de grado) Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 2003.
9. Lee C, Im J, Goo J, Lee H, Hong S, Shen C, *et al.* Serial CT findings of *Paragonimus* infested dogs and the Micro-CT findings of the worm cysts. *Korean J Radiol* 2007; 8(5): 372-81.
10. Lee O, Chang J. ELISA of paragonimiasis in cat by crude and purified antigens of *Paragonimus westermani*. *Kisaengchunghak Chapchi* 1986; 24(2): 187-93.
11. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Código de Bioética y Bioseguridad 2da edición. Gaceta oficial. Caracas, Venezuela. 31pp. 2003.
12. Cesari I. *Schistosoma mansoni*: distribution and characteristics of alkaline and acid phosphatase. *Exp Parasitol* 1974; 36: 405-14.
13. Cesari I, Ferrer A, Kombila M, Richard E, Decam E, Lishu Q, *et al.* Specificity of the solid fase alkaline phosphatase immunocapture assay for the diagnosis of human *Schistosoma mansoni* infection. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1998; 92: 38-9.
14. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem* 1976; 72: 248-52.
15. Margni R. Inmunología e inmunohistoquímica fundamentales. 2da Edición. Buenos Aires: Panamericana; 1977.

16. Akita E, Nakay S. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *J Food Sci* 1992; 57(3): 629-34.
17. Polson A, Von Wechmar B. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immun Comunic* 1980; 9(5): 475-93.
18. Carrol S, Stollar D. Antibodies to calf thymus RNA polymerase II from egg yolks of immunized hens. *J Biol Chem* 1983; 258(1): 24-6.
19. Laemmli V. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 1970; 227: 680-5.
20. Engvall E, Perlmann P. ELISA: quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem* 1971; 8: 871-4.
21. Hanrahan E, Madupu G. Review of epidemiology & biostatistic for the usmle. Connecticut, Estados Unidos: Appleton & Lange; 1994. p.111.
22. Noya O, Fermin Z, Alarcon De Noya B, Losada S, Colmenares C, Hermoso T. Humoral immune response of children with chronic schistosomiasis. Isotype recognition of adult worm antigens. *Parasite Immunol* 1995; 17(6): 319-28.
23. Walker G, Feather K, Davis P, Hines K. A new enhanced chemiluminescent substrate for the development of the horseradish peroxidase label in Western blotting applications. *J NIH Res* 1995; 7: 76.
24. Hollander M, Wolfe D. Non parametric statistical procedures. New York: Willey; 1973.
25. Kim S, Kong Y, KIM S, Yong S, Cho S. Immunoblot observation of antigenic protein fractions in *Paragonimus westermani* reacting with human patients sera. *Korean J Parasitol* 1988; 26 (4): 239-43.
26. Kong Y, Chung J, Yun D, Kim L, Kang S, Ito A, *et al.* Variation of antigenic proteins of eggs and developmental stages of *Paragonimus westermani*. *Korean J Parasitol* 1997; 35(3): 197-202.
27. Kyoung H, Hyuck A, Myung S, Han-Jong R. Demonstration of species-specific and cross reactive components of *Paragonimus westermani* crude worm antigen by EITB. *Korean J Parasitol* 1989; 27(1): 9-14.
28. Cornejo W, Tantalean M, Huiza A. Estructura antigénica de *Paragonimus mexicanus*. *Rev Perú Med Trop* 1993; 7 (2): 81-9.
29. Barquin N, Lamothe R, Flisser A. *Paragonimus mexicanus*: an antigenic analysis. *Bol Chil Parasitol* 1982; 37(3/4): 42-6.
30. Abdul-Hadi S, Diaz-Bello Z, Zavala-Jaspe R, Lujano-Rangel M, Gómez E, Figueira I, *et al.* Paragonimiasis pulmonar. Descripción de un caso. *Invest Clin* 2008; 49 (2): 257-64.
31. Kim S, Cho S. Protein composition and antigenicity of the tegument from *Paragonimus westermani*. *Korean J Parasitol* 1993; 31(3): 269-76.
32. Slemenda S, Maddison S, Jong E, Moore D. Diagnosis of paragonimiasis by immunoblott. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 39(5): 469-71.

Aceptado para su publicación el 24 de septiembre de 2010