

## **Aplicación de técnicas rápidas y de biología molecular en la detección de parásitos en heces**

Dra. Isabel de Fuentes  
Instituto de Salud Carlos III, Madrid.  
ifuentes@isciii.es



## Diagnóstico clásico de las parasitosis intestinales:

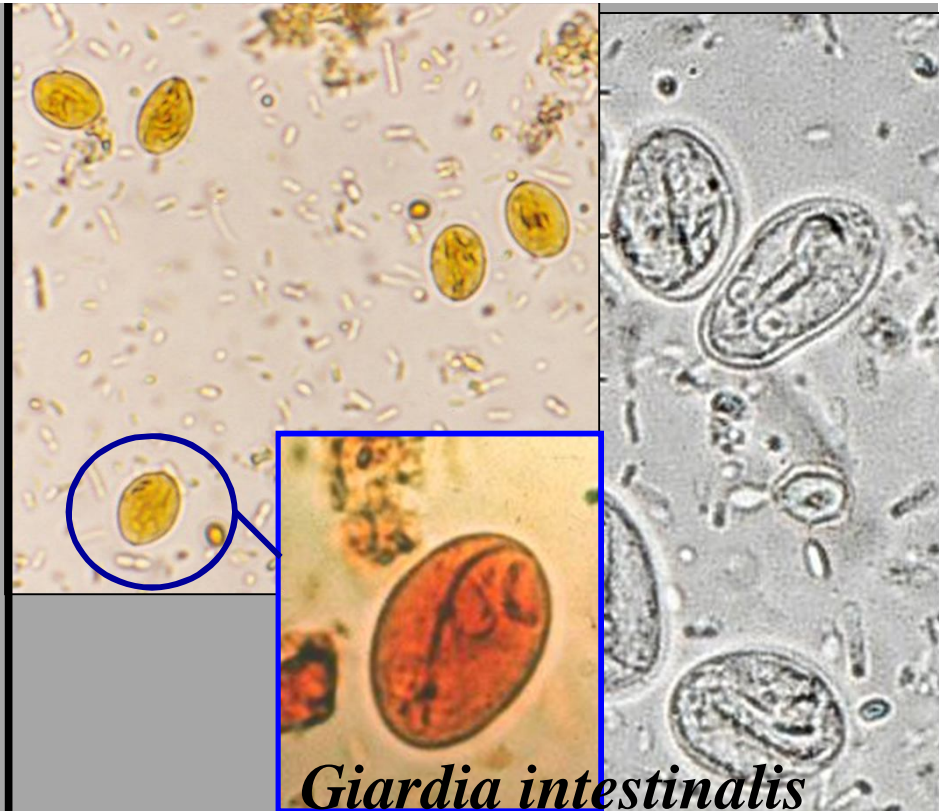
**Examen microscópico** de heces: aislamiento e identificación de las formas parasitarias que se eliminan

Estas determinaciones:

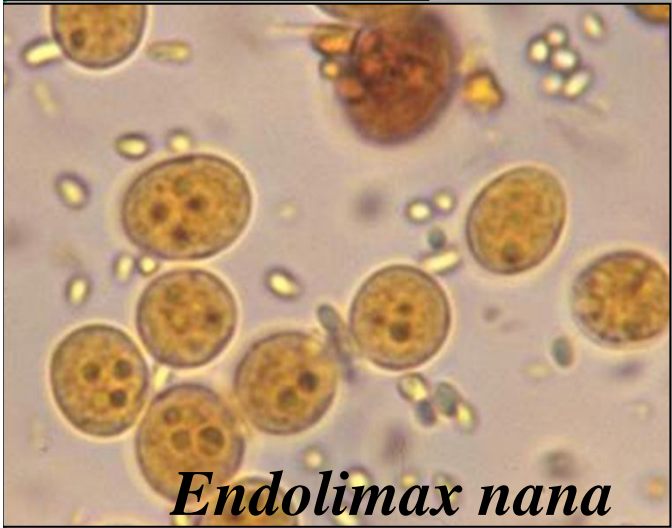
- Son en la mayoría de casos **específicas**, pero en otros no
- Pobre **sensibilidad**
- Sólo permiten el diagnóstico de la **infección patente**
- Toma de **muestras seriadas**
- Son muy **laboriosas**
- Requieren **especialización del analista**
- **Permite detección de más de una especie (poliparasitación)**



*Entamoeba coli* *E. histolytica*



*Giardia intestinalis*

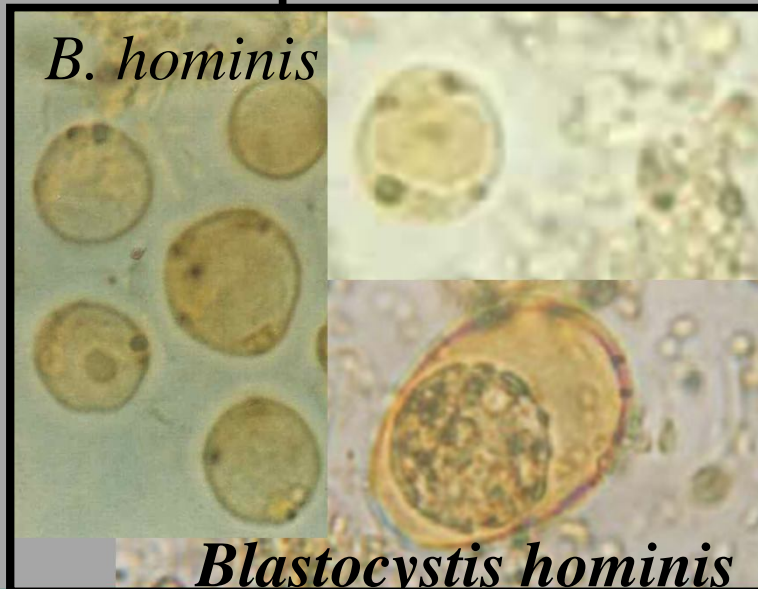


*Endolimax nana*



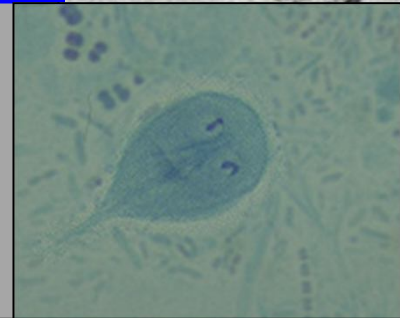
*Iodamoeba*

*Iodamoeba bütschlii*



*B. hominis*

*Blastocystis hominis*



## Inmunodetección de coproantígenos

-Ac (monoclonales y/o policl.) que reconocen Ag parasitarios (secreción, superficie, o somáticos)

- Desarrollado para el dco. protozoos y helmintos



### Esquema

Los Ac contra moléculas del parásito se inmovilizan sobre un soporte sólido (placas de ELISA, membranas inmunocromatográficas)



Los soportes sensibilizados se incuban con muestras diluidas de las heces problema



Los complejos inmunes Ag-Ac se detectan con Ac específico

- **Inmunodiagnóstico enzimático:** ELISA-Ag: alta S y E
- Requiere la adición de múltiples reactivos, pasos de lavados y tiempos de incubación
- Ventaja: procesar simultáneamente lotes de muestras y además, en la mayoría de los casos, presenta una S y E > que IC.
  
- **Inmunodiagnóstico no enzimáticos:** más rápidos y sencillos, como las pruebas inmunocromatográficas (IC). Se basan en la utilización de microesferas de materiales como el poliestireno, coloreadas, a las que se conjuga covalentemente un anticuerpo monoclonal anti-antígeno del parásito
- No necesitan equipos de laboratorio especiales y se utilizan de forma individual.

# Técnica de inmunocromatografía *Cryptosporidium/ Giardia*

Anticuerpos monoclonales específicos frente a antígenos de *Cryptosporidium/ Giardia*

Partículas de látex (microesferas de poliestireno) conjugado covalentemente  
con Anticuerpos monoclonales específicos



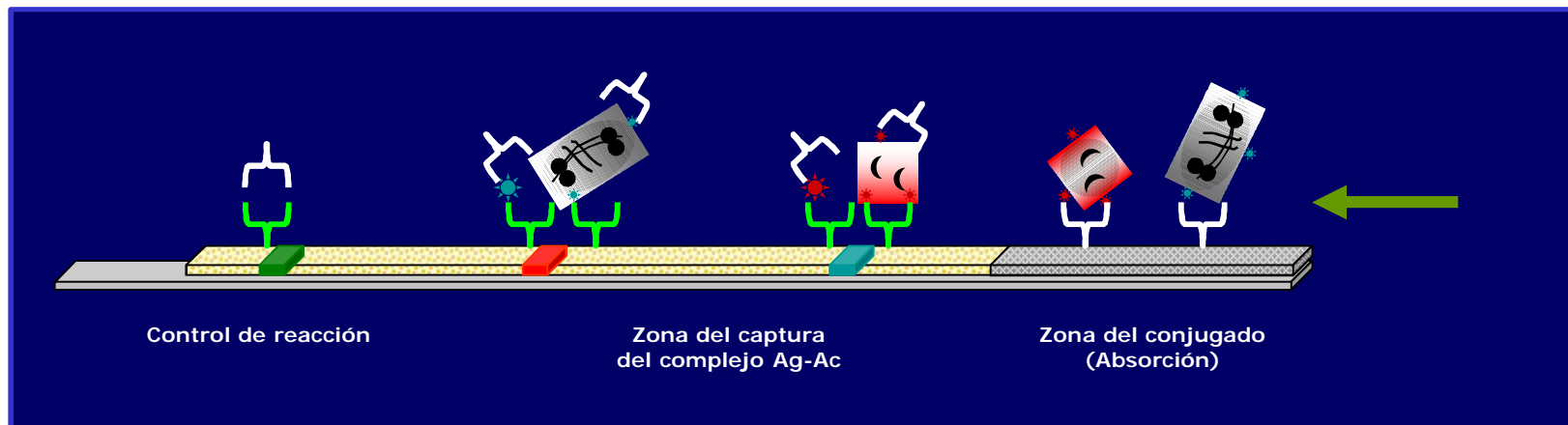
Presencia de los coproantígenos

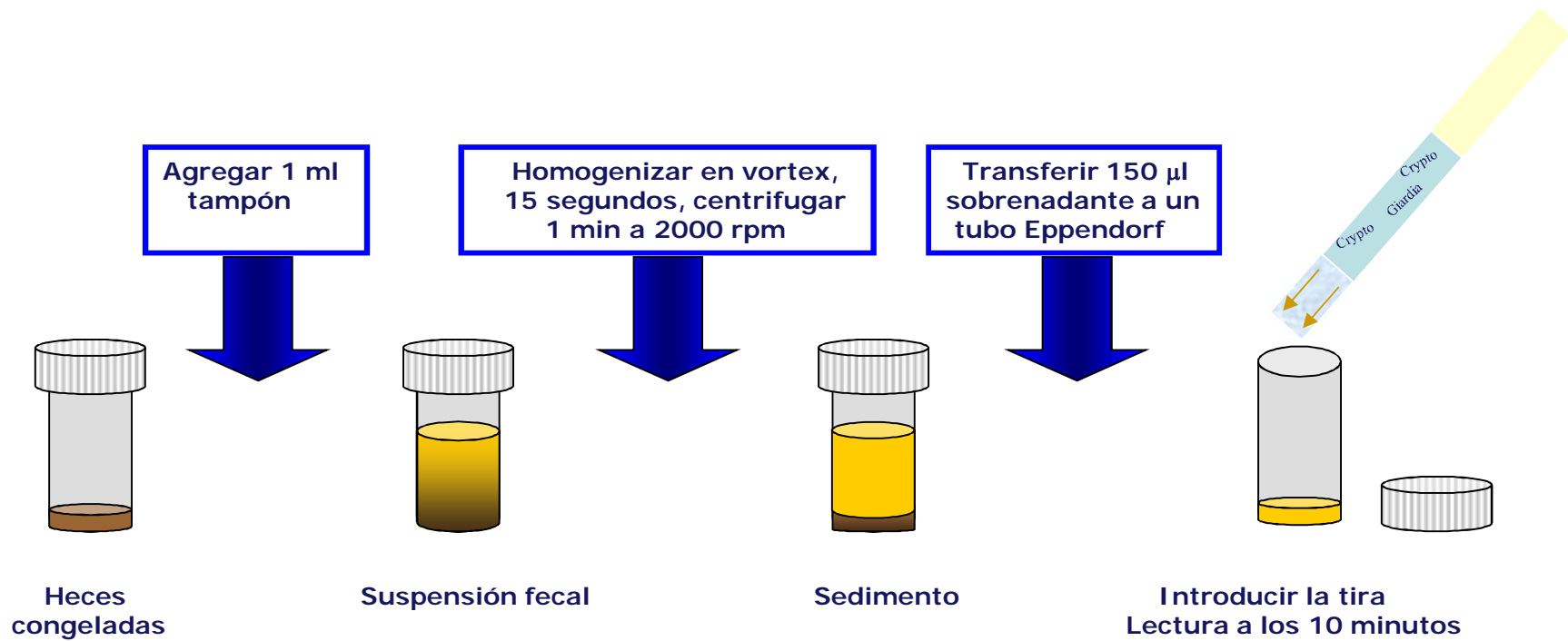


Complejo látex-Ac monoclonal-Ooquistes/Quistes



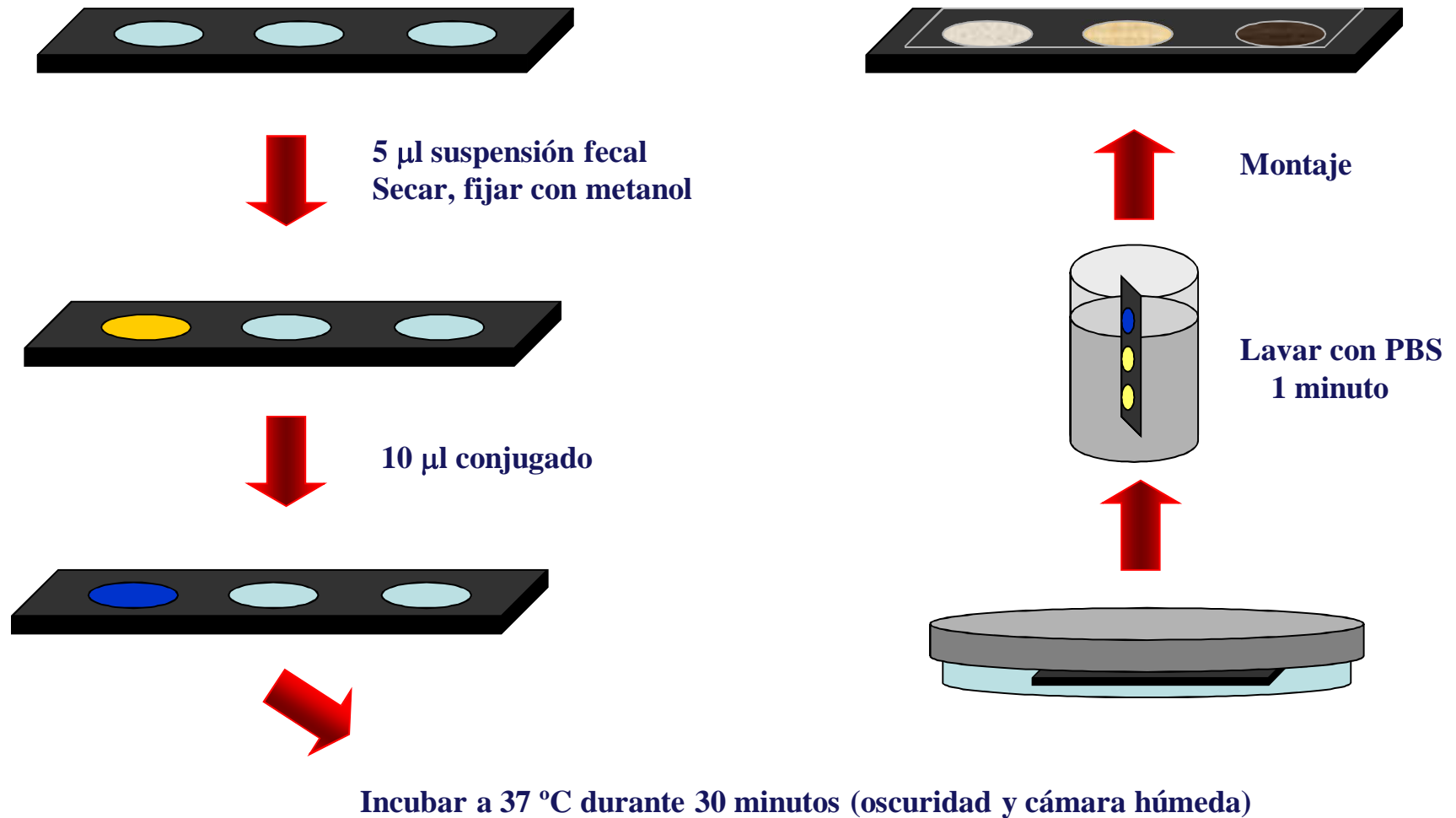
Migrar por una membrana de celulosa con Anticuerpos  
específicos que reconocen el complejo





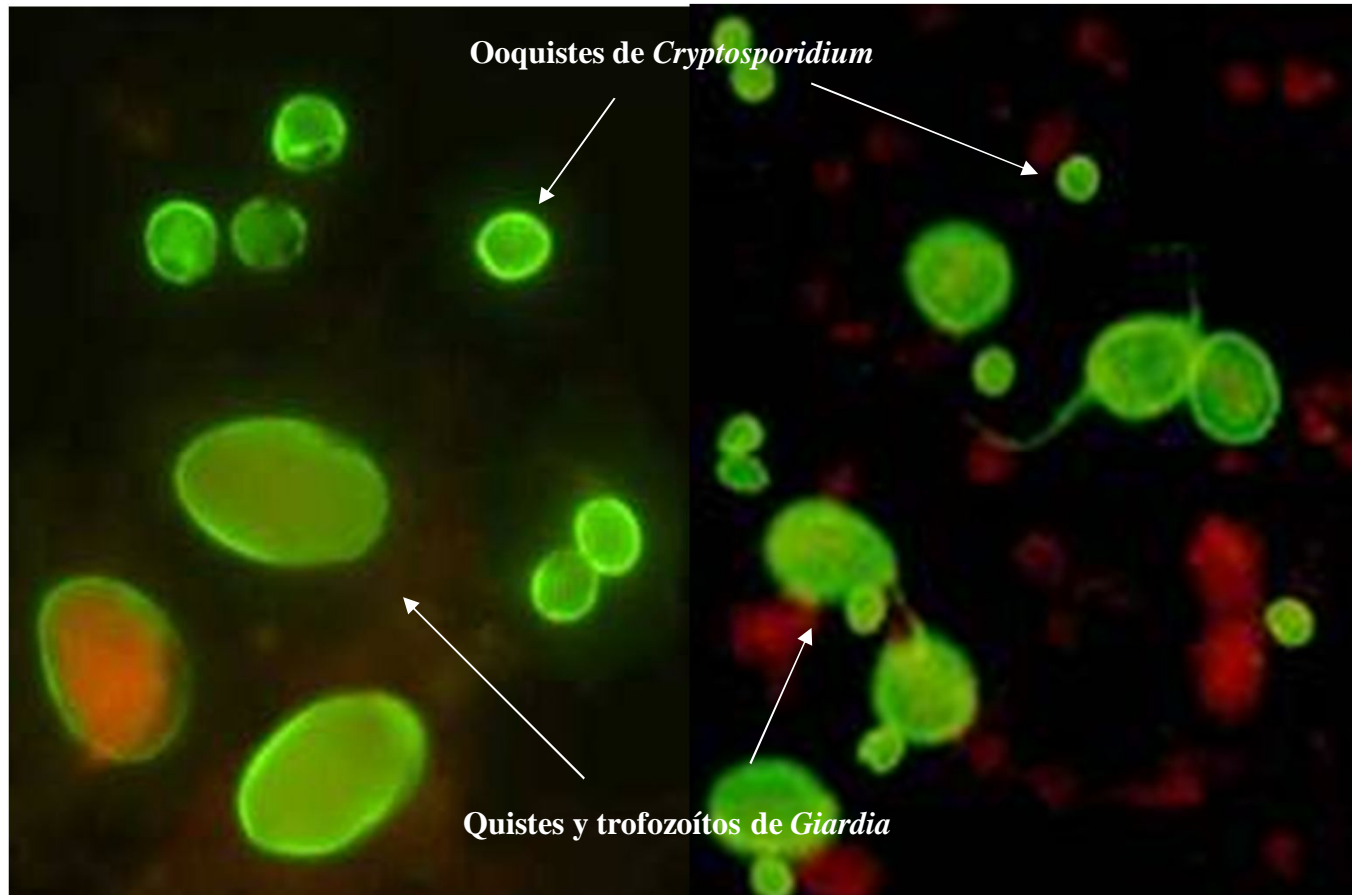
Tira	Negativo	<i>Giardia</i> (+)	<i>Giardia/Cryptosporidium</i> (+/+)	<i>Cryptosporidium</i> (+)

# Técnica de Inmunofluorescencia directa *Cryptosporidium/ Giardia*





## Inmunofluorescencia directa *Cryptosporidium*/*Giardia*



# Inmunodetección de coproantígenos

## Ventajas

- **la mayoría de las pruebas:** excelente S y E
- **no** requiere **personal experimentado**
- es un diagnóstico **rápido**, de **fácil interpretación**
- posibilita el **cribado** de **gran número** de muestras, de interés especial en casos de **brotos**
- habitualmente su **desaparición** de las heces se relaciona con la **eliminación** del parásito ante quimioterapia eficaz
- permite, en algunos casos, la **distinción de especies isomórficas** del mismo género (*Entamoeba histolytica* –patógena-/ *Entamoeba dispar* –no patógena).

# Inmunodetección de coproantígenos

## Desventajas

- **Mayor coste** de los reactivos, pero los costes de trabajo del personal son menores (el análisis de comparación de costes no es tan desfavorable ya que en las microscópicas deben incluirse los reactivos, controles de calidad, tiempo de trabajo y requerimiento de personal cualificado)
- Obligación de emplear **heces recientes o congeladas** en la mayoría de los ensayos comercializados
- En ocasiones, la necesidad de examinar **más de una muestra** para conseguir un resultado concluyente.

## Técnica de PCR

- Método in vitro de síntesis de ADN.
- Un segmento diana es específicamente ampliado.
- Copiado de forma exponencial por repetición de ciclos con diferentes periodos de temperatura de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa.
- Se obtiene millones de copias de la secuencia diana.
- Técnica específica, rápida, sensible, versátil

# Diagnóstico Molecular

## PCR

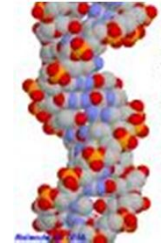
Diferentes métodos de **extracción ADN**:

-Según muestra

- Muestras **hepáticas, tejidos**, etc:
  - Extracción fenol-cloroformo
  - Buffer lisis proteinasa K
  - Kit extracción ADN

- Muestra de **heces**:
  - Kit extracción específico

Inhibidores: hemoglobina, bilirrubina, sales biliares, carbohidratos complejos



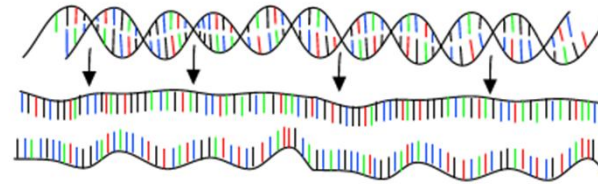


## PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

### Step 1 : denaturation

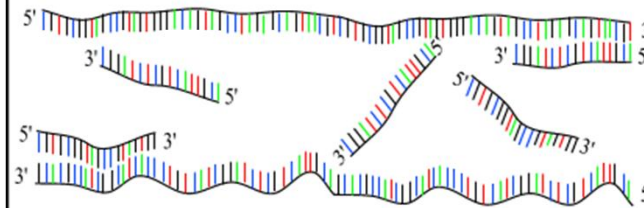
1 minut 94 °C



### Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

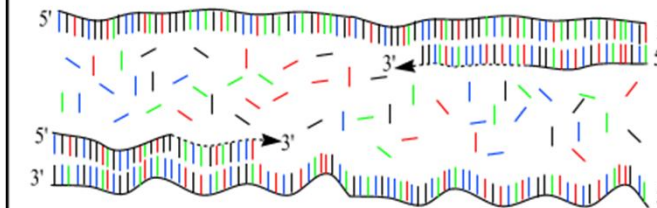
forward and reverse primers !!!



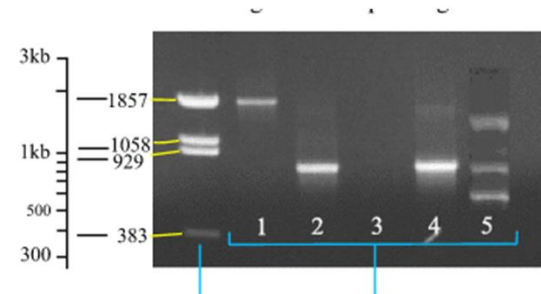
### Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

only dNTP's



(Andy Vierstraete 1999)



## HELMINTOS INTESTINALES

### Cestodos

*Taenia solium*  
*Taenia saginata*  
*Hymenolepis nana*

*Hymenolepis diminuta*  
*Dipylidium caninum*

### Nematodos

*Enterobius vermicularis*  
*Strongyloides stercoralis*  
*Anisakis* sp

No autóctonos: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Capillaria philippinensis*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Trichostrongylus* spp, *S. fuelleborni*

### Trematodos

*Fasciola hepatica*  
No autóctonos: *Fasciolopsis buski*, *Echinostoma ilocanum*, *Heterophyes heterophyes*, *Metagonimus yokogawai*, *Gastrodiscoides*, *Schistosoma* spp

---

---

No comercializados

## PROTOZOOS INTESTINALES

### **Aplicomplexa**

*Cryptosporidium* sp.

*Cyclospora cayetanensis*

*Isospora belli*

### **Flagelados**

*Giardia duodenalis*

*Dientamoeba fragilis*

*Chilomastix mesnili*

### **Otros**

*Blastocystis hominis*

### **Ameba**

*Entamoeba histolytica*

*Entamoeba dispar*

*Entamoeba coli*

*Entamoeba hartmanni*

*Endolimax nana*

*Iodamoeba bütschlii*

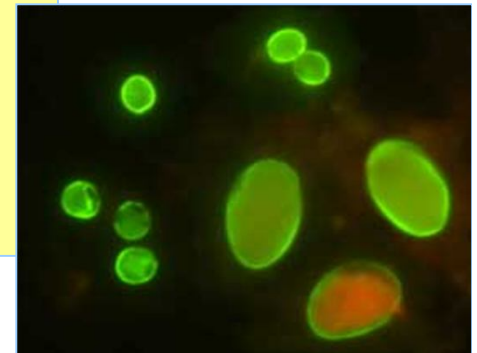
---



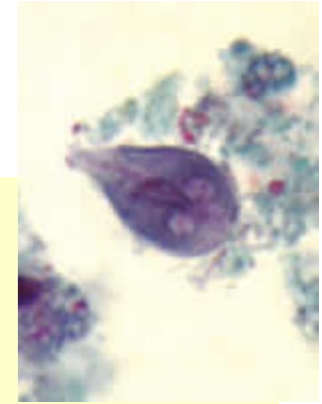
# *Giardia duodenalis*

## Inmunodetección de coproantígenos

- ELISA\_ detección de antígenos : S 88-100%, E 99%
- IFD: detección de quistes: S 94%, E 97%
- Inmunocromatografía rápida (ICT) S 99%, E 97%



## *Giardia duodenalis*



### Métodos moleculares

- Métodos biología molecular: **diagnóstico y caracterización**
- **PCR** (PCR, *nested*-PCR, PCR-RFLP, secuenciación).

Dianas: gen B giardina, TPI, HSP, SSrRNA). S 1-10 quistes

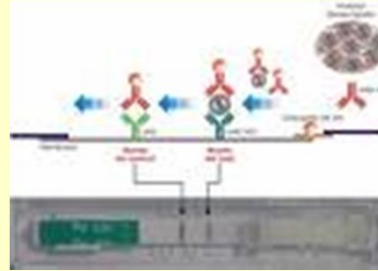
+ sensible que microscopía , => ELISA

- **PCR tiempo real**

# *Cryptosporidium*

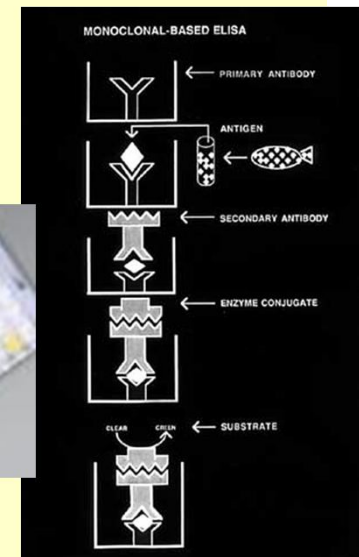
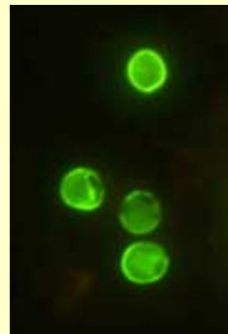
## Inmunodetección de coproantígenos

**ICR** S 93%, E 90%

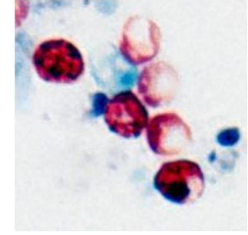


**ELISA\_Ag:** (Ag 18,20 Kda) (S 93%, E 99%)

**-IFD:** detección de quistes  
S 94%, E 100 %



## TÉCNICAS DE PCR



**Amplificación de secuencias** : 18SrRNA, COWP, HSP70, PolyT, TRAP-C1

Menor utilidad en diagnóstico en heces. Importancia caracterización

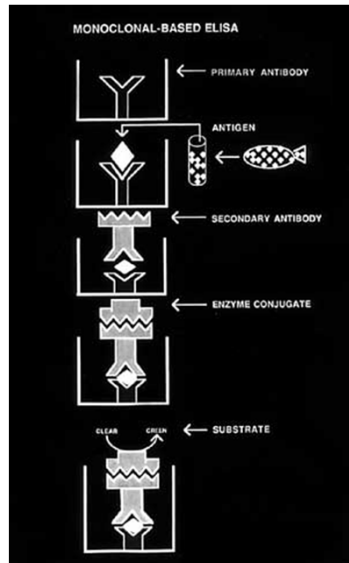
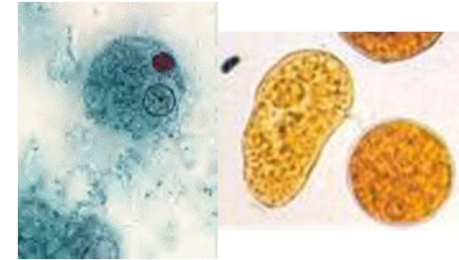
Gran utilidad diagnóstico otras muestras (esputo, pulmón, biopsia parfinada)

**Determinación de especies y genotipos** (brotes, estudios epidemiológicos)

- PCR-RFLP
- RAPD
- PCR en tiempo real
- Secuenciación
- Microarrays

# *Entamoeba histolytica*

## Inmunodetección de coproantígenos

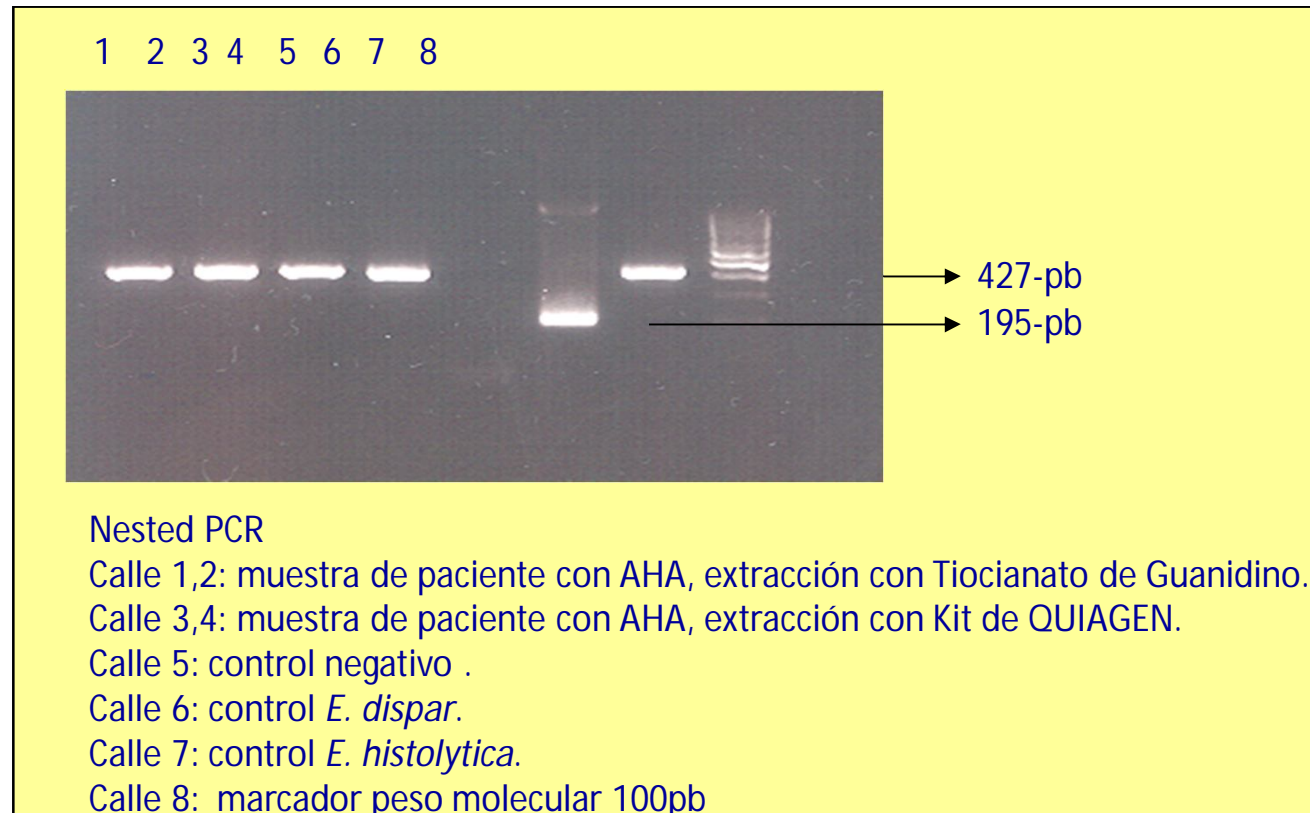


-- **ELISA – Ag** (Ac monoclonales frente a lectina Gal/galactosamina, o frente a Ag rico en serina de *E.histolytica*). Pocos tests diferencian *E.histolytica* de *E.dispar*

- **Inmunocromatografía en tiras:** Sólo o puede detectar *E.histolytica/dispar*, *Cryptosporidium* y *Giardia*

## Diagnóstico Molecular

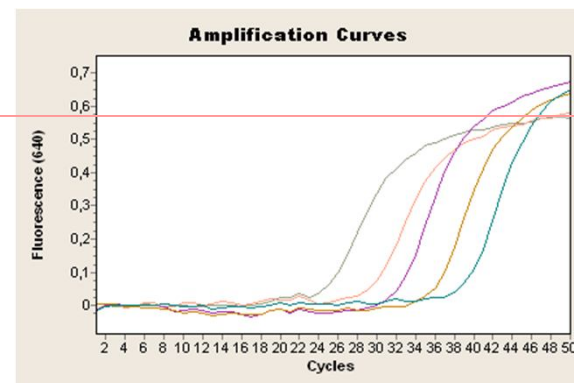
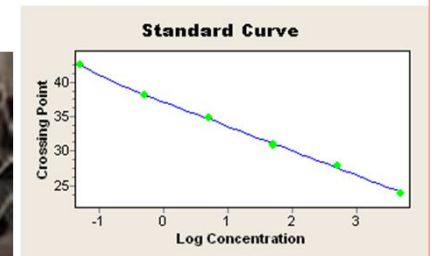
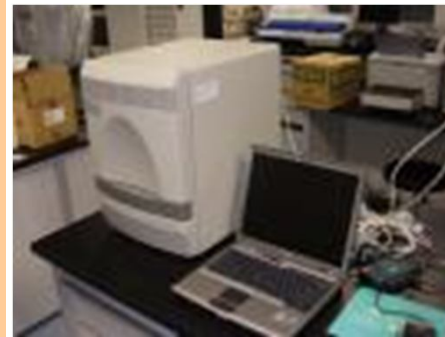
PCR *nested* diferenciación de *E.histolytica*/ *E.dispar*:  
ssurRNA. 1ª amplificación 1076pb



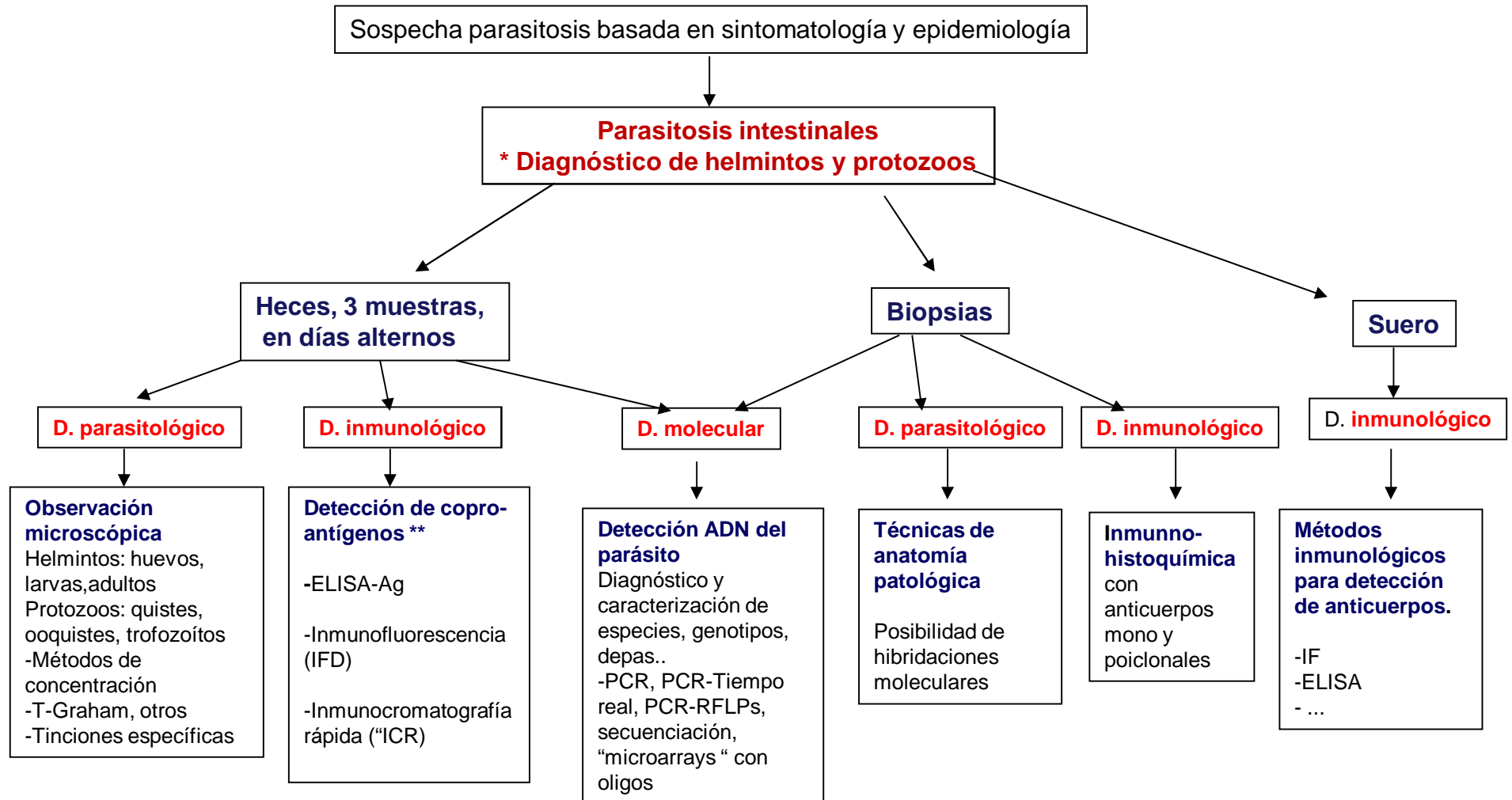
# PCR tiempo-real

-Amplificación 18S rRNA

c) TaqMan2 +  
específica+cuantitativa  
Detectan <0,5 cel/ml



## ESQUEMA GENERAL DE DIAGNÓSTICO DE PARASITOSIS INTESTINALES



\*\* : Heces frescas o congeladas para diagnóstico de algunas especies.



**!!!GRACIAS!!!**