

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE *TAENIA SOLIUM*, *TAENIA SAGINATA* E *HYMENOLEPIS NANA* EN MUESTRAS FECALES HUMANAS

Minda-Aluisa S.E.¹, Rodríguez-Hidalgo R.¹⁻²⁻³*,
Urresta-Montenegro D.¹, Celi-Erazo M.¹, Costa-Vera C.³
& Benítez-Ortiz W.¹⁻²



¹Centro Internacional de Zoonosis
Universidad Central del Ecuador (CIZ-UCE). Quito-Ecuador
²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - UCE. Quito-Ecuador
³Escuela Politécnica Nacional. Departamento de Física. Quito-Ecuador

Resumen

La teniasis e himenolepiasis son consideradas endémicas en el Ecuador. Estas zoonosis son causadas por las formas adultas de cestodos del género *Taenia* e *Hymenolepis*. La infestación por *Taenia* spp. es una zoonosis cuyas tasas de prevalencia varían en función de diversos factores socio-económicos y culturales. El comportamiento humano,

* Autor de Correspondencia: Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), 3^{er} piso Hospital del Día, Universidad Central del Ecuador. Apartado 17-03-100. Telefax (593.2)2904-801. Quito-Ecuador. e-mail: rrodriguez-ciz@ac.uce.edu.ec

al ser el hospedero definitivo, resulta fundamental para su persistencia, ya que la contaminación con heces humanas posibilita la infección de los animales, y el hábito de ingerir carne cruda o poco cocinada cierra el ciclo permitiendo la infestación humana por tenias adultas. En el caso de la infestación por *Hymenolepis* spp. los humanos y otros animales, como roedores, resultan infectados cuando consumen material contaminado por insectos (hospederos intermediarios). Los exámenes coproparasitarios para identificación de huevos, y los tamizajes en las muestras fecales, para visualización de proglótidos son utilizados como pruebas diagnósticas; además, de la implementación de diagnóstico molecular. De un total de 310 muestras fecales colectadas en dos Escuelas de la Provincia de Loja, Cantón Pindal analizadas por microscopía y PCR en tiempo real (q-PCR), se encontraron que todas las muestras fueron negativas para *Taenia solium* y ocho positivas para *Hymenolepis nana* (2.52%), en microscopía, mientras que, tres muestras positivas para *T. solium* (0.94%) y 18 positivos para *H. nana* (5.66%) fueron diagnosticadas por q-PCR. Por otro lado, ninguna muestra resultó positiva para *T. saginata* con ninguno de los dos métodos.

Palabras claves: q-PCR, *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana*, Ecuador, coprología

Introducción

Las infecciones parasitarias, causadas por cestodos y que afectan a los humanos son *Taenia solium* (Tsol), *Taenia saginata*

(Tsag), *Hymenolepis nana* (Hn). El hombre es el hospedador definitivo, mientras que, el cerdo, el bovino y las pulgas (*Xenopsylla cheopis*) son los huéspedes intermediarios, respectivamente (CFSPH, 2005). El ser humano puede ser también hospedero accidental del metacestodo de *T. solium*, causando la neurocisticercosis cuyo síntoma principal, la epilepsia, es de importancia en Salud Pública (Kraft, 2007; Chater *et al.*, 2009). El diagnóstico de teniasis se realiza por microscopía de heces fecales o la búsqueda de proglótidos por tamizaje de las heces. No obstante, su sensibilidad y especificidad son bajas (Salvatella & Eirale, 1996, Meza & Aguilar, 2002) y no permiten diferenciar entre las especies de *Taenia*. Técnicas actuales como las pruebas inmunológicas (Allan *et al.*, 1992; Wilkis *et al.*, 1999; Allan *et al.*, 2003) y las moleculares (Nunes *et al.*, 2006; Rodríguez-Hidalgo *et al.*, 2007) han permitido identificar la gravedad del problema en el hombre. La variación genética dentro de la especie de *T. solium* es aún desconocida aunque algunos autores ya se han encontrado diferencias de acuerdo a su ubicación geográfica (González *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2006; Maravilla *et al.*, 2008).

La himenolepiasis por *Hymenolepis nana* e *Hymenolepis diminuta* son las más comunes en humanos y roedores (CDC, 2004; Soulsby, 1987). El diagnóstico se basa en la identificación de huevos en técnicas coproparasitarias (Salvatella & Eirale, 1996). Debido al pequeño tamaño del cestodo y a la destrucción de los proglótidos en el lumen intestinal, es raro encontrar estos elementos en las heces (Martínez-Barbabosa *et al.*, 2010).

El objetivo del presente estudio es comparar los resultados de dos métodos diagnósticos: microscopía y diagnóstico molecular en la detección de cestodos en las heces fecales humanas

Materiales y Métodos

Un total de 310 muestras fecales fueron colectadas en dos escuelas del Cantón Pindal, en la Provincia de Loja; 146 fueron niños y 164 niñas, en edades comprendidas entre los 6 y 14 años. Las muestras fecales fueron almacenadas en etanol absoluto, proporción etanol-materia fecal de

3:1, y en formol al 10% en proporciones iguales las cuales se almacenaron a 4°C hasta su definitivo almacenamiento a -20°C. Se utilizó las muestras con formol para el diagnóstico microscópico mediante la técnica de concentración en formoléter de Ritchie (Salvatella & Eirale, 1996), realizada en los laboratorios del Centro Internacional de Zoonosis de la Universidad Central del Ecuador (CIZ-UCE) en Quito-Ecuador.

Las muestras en etanol fueron procesadas en los laboratorios del Departamento de Parasitología del Leiden University Medical Center (LUMC) en Leiden, Holanda y se utilizaron para el aisla-

Tabla 1. Secuencia de Primers para TTH PCR

Primer y Sonda	Secuencia
Primer Tsol - ITS 145F	5'-ATG GAT CAA TCT GGG TGG AGT T-3'
Primer Tsol - ITS 230R	5'-ATC GCA GGG TAA GAA AAG AAG GT-3'
Probe Tsol - ITS 169Tq - FAM	5'-TGG TAC TGC TGT GGC GGC GG-3'
Primer Tsag - ITS F529	5'-GCG TCG TCT TTG CGT TAC AC-3'
Primer Tsag - ITS R607	5'-TGA CAC AAC CGC GCT CTG-3'
Probe Tsag - ITS 581Tq - Quasar	5'-CCA CAG CAC CAG CGA CAG CAG CAA-3'
Primer Hn - ITS1 1593F	5'-CAT TGT GTA CCA AAT TGA TGA TGA GTA-3'
Primer Hn - ITS1 1680R	5'-CAA CTG ACA GCA TGT TTC GAT ATG-3'
Probe Hn - Hna - 1622 - YY	5'-CGT GTG CGC CTC TGG CTT ACC G-3'

miento de ADN. Se tomaron 250 μ L de la suspensión etanol-heces en un vial y se centrifugó a 13000 g por 30 segundos. El etanol fue removido y el pellet fue lavado con NaCl 0.9%. Después el pellet fue resuspendido en 200 μ L de polivinilpolipirrolidona (PVPP) al 2%, incubado toda la noche a -20°C y, posteriormente, incubado por 10 minutos a 100°C. El protocolo de extracción fue descrito por Verweij *et al* (2001). El q-PCR fue utilizado con la metodología TaqMan de fluorescencia (Heping *et al.*, 2006), la misma que, diferencia entre Tsol, Tsag y Hn; de ahí su nombre en siglas *TTH* PCR. Las concentraciones de los componentes fueron: 25 mM de $MgCl_2$, 5mg/mL de seroalbúmina bovina (BSA), 25 μ M de los primers y 10 μ M de las sondas. El volumen de reacción final fue 20 μ L. La secuencia de los primers y sondas utilizados en la *TTH* PCR se describen en la Tabla 1. El programa del termociclador (CFX96 Real-time PCR Detection System, Bio-Rad, Hercules, California) fue: denaturación inicial de 15 min a 95°C, seguido de ciclos de denaturación de 15 s a 95°C, annealing de 30 s a 60°C y extensión de 30 s a 70°C. La temperatura final de la muestra fue de 15°C.

El ITS 1, por su nombre en inglés Internal Transcribed Spacer 1 (Ito *et al.*, 2003; Mayta *et al.*, 2000), fue el fragmento de ADN utilizado en la amplificación, donde el multiplex PCR amplifica un fragmento de 86 bp para el caso de Tsol y 88 bp para Hn.

Después del q-PCR, las curvas de amplificación están definidas por su valor Ct (Cycle Threshold), que son valores del ciclo del PCR donde los niveles de fluorescencia alcanzan un umbral determinado (Vaerman *et al.*, 2004; Heid *et al.*, 1996). Valores de Ct mayores a 40 corresponden a muestras negativas.

Resultados

De las 310 muestras procesadas por microscopía se obtuvieron 8 muestras positivas a Hn (2.58%) y no se demostró la presencia de huevos de *Taenia* spp. Mientras que, con q-PCR se obtuvieron 18 muestras positivas a Hn (5.81%) y 3 muestras positivas a Tsol (0.97%). En la Tabla 2 y 3 se presentan los resultados del estudio.

Tabla 2. Positividad de las pruebas comparando ambas.

Target	Microscopía		q-PCR	
	Nº Muestra (n=310)	%	Nº Muestra (n=310)	%
Tsol	0	0	3	0,94
Hn	8	2,52	18	5,66

Tabla 3. Comparación de los métodos utilizados.

Código	Edad	Sexo	Microscopía	q-PCR	
			Hn ^a	Hn ^b	Tsol ^b
ZR Et - 12	6	M	(++)	24.70	
LU Et - 149	7	F	(++)	23.92	
LU Et - 159	7	M	(+)		
LU Et - 161	7	M	(+)		
LU Et - 169	7	F		31.65	
LU Et - 175	7	F		37.41	
LU Et - 180	7	F		33.98	
LU Et - 231	7	M	(++)	24.22	
ZR Et - 42	8	M			36.56
LU Et - 200	8	F	(++)	23.64	
LU Et - 203	8	F	(++)	25.58	
ZR Et - 56	9	M		38.10	
ZR Et - 71	9	F		29.68	
LU Et - 255	9	F			36.14
LU Et - 293	9	F			36.51
LU Et - 268	10	F	(+)	25.33	
LU Et - 275	10	M		34.14	
ZR Et - 84	11	M		26.63	
ZR Et - 111	11	F		39.11	
LU Et - 260	11	M		32.45	
LU Et - 306	11	F		27.41	
LU Et - 319	12	M		33.59	
ZR Et - 97	14	F		32.76	
TOTAL			8	18	3

a = (+) hasta 10 huevos por placa. (++) de 10 hasta 30 huevos por placa.

b = Valor de Ct (Cycle Threshold)

Discusión

Las técnicas utilizadas en este estudio permitieron evidenciar la presencia de los parásitos en los casos indicados en las Tablas 1 y 2. La prueba microscópica de Ritchie no permite diferenciar entre huevos de *Taenia* spp., por la similitud que presentan entre ellos (Flisser *et al.*, 2006). Adicionalmente esta técnica es considerada una prueba de diagnóstico de tamizaje o screening (Fernandez & Díaz, 2003) debido a su baja sensibilidad y especificidad (Salvatella & Eirale, 1996, Meza & Aguilar, 2002). La utilización de coproparasitarios seriados o la comparación de metodologías permitirían maximizar la efectividad del diagnóstico (Navone *et al.*, 2005). Por otro lado, las pruebas moleculares, por su alta sensibilidad y especificidad (Méndez & Pérez, 2004), identifican el material genético del parásito adulto (Nickisch-Rosenegk *et al.*, 1999; Hoberg *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2002) o de los metacistos en heces fecales (Dinkel *et al.*, 1998; Yamasaki *et al.*, 2004; Stefanic *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2003, 2005, 2006). Los resultados encontrados en este estudio muestran la alta presencia de Hn, en las poblaciones humanas, debido al número de muestras diagnosticadas en cada técnica: 8 muestras en Ritchie y 18 muestras positivas en q-PCR. Adicionalmente, las muestras detectadas por el q-PCR confirman la sensibilidad y especificidad, superior de esta técnica, en comparación con las técnicas coproparasitarias. Probablemente la presencia de ADN en las heces, que se encuentran en las formas inmaduras, maduras, huevos y células de descamación del parásito, hace la diferencia de diagnóstico entre las técnicas moleculares

y coprológicas. Estas últimas para mostrar un resultado positivo deben detectar huevos los cuales son eliminados solo por el parásito adulto, afectando directamente la sensibilidad y especificidad de estas últimas. Adicionalmente, se evidenció que, de las ocho muestras positivas a Hn en microscopía, solo seis fueron también positivas a q-PCR (Tabla 2 y 3). Esto podría deberse, por ejemplo, a la cantidad de ADN mínima detectable de la técnica la cual está entre 10 ng y 1 µg aunque la cantidad óptima recomendada es de 100 ng a 1 µg (Dorak, 2010).

El diagnóstico de la teniasis por biología molecular ha utilizado diversas técnicas y procedimientos desde el primer estudio reportado en 1995 (Chapman *et al.*, 1995) en las que se incluyen al multiplex-PCR (Gonzalez *et al.*, 2000, 2002; Nunes *et al.*, 2003; Yamasaki *et al.*, 2004), PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Mayta *et al.*, 2000, Rodríguez-Hidalgo, 2007) and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Eom *et al.*, 2002; Vega *et al.*, 2003). En la actualidad, las técnicas de PCR en tiempo real han mejorado y facilitado el diagnóstico por su alta sensibilidad y especificidad. En este estudio, se pudo hacer la diferenciación entre la especie de *Taenia e Hymenolepis*, además de la cuantificación del ADN extraído. Esta información es de mucha utilidad en estudios de campo ya que se pueden realizar detecciones tempranas del parásito. Con esto se facilitaría el tratamiento y consecuentemente, el control de la enfermedad en áreas endémicas. Desafortunadamente, esta tecnología es costosa y requiere de laboratorios especializados que limita su aplicación en países en vías de desarrollo.

Por esta razón, es importante continuar con la investigación y búsqueda de alternativas de diagnóstico sencillas, eficientes, rápidas y de bajo costo.

Agradecimientos

Este estudio fue realizado gracias al apoyo del Dept. de Parasitología del "Leiden University Medical Center" en Holanda y al apoyo incondicional de los Profesores: Dr. Andrée Deelder, Dr. Magnus Palmblad, Dr. Jaco Verweij, Dr. L. van Lieshout y Mr. E.A.T. Brienen. Los autores quieren agradecer a las Escuelas: Zoila Rendón de Mosquera y Luis Urdaneta que participaron en el Estudio en el Cantón Pindal de la Provincia de Loja.

Referencias

Allan, J.C., Craig, P.S., Garcia Norval, J., Mencos, F., Liu, D., Wang, Y., Wen, H., Zhou, P., Stringer, R., Rogan, M., Zeyhle, E. (1992). Coproantigen detection for immunodiagnosis of echinococcosis and taeniasis in dogs and humans. *Parasitology*. 104: 347-355.

Allan, J.C., Wilkins, P.P., Tsang, V.C.W., Craig, P.S. (2003). Immunodiagnostic tools for taeniasis. *Acta Tropica* 87: 87-93.

Campbell G., Garcia H., Nakao M., Ito A. & Craig P. (2006). Genetic variation in *Taenia solium*. *Parasitology International*. 55:S121-S126.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Division of Parasitic Diseases. (2004). *Hymenolepis Infection*. Obtenido de <http://www.cdc.gov/>. [Citado 10 Sep 2010].

CFSPH. The Center for Food Security & Public Health. (2005). *Taenia Infections*. Obtenido de <http://www.cfsph.iastate.edu>. [Citado 21 Sep. 2010]

Chapman, A., Vallejo, V., Mossie, K.G., Ortiz, D., Agabian, N. & Flisser, A. (1995). Isolation and characterization of species-specific DNA probes from *Taenia solium* and *Taenia saginata* and their use in an egg detection assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 33: 1283-1288.

Dinkel, A., von Nickisch-Rosenegk, M., Bilger, B., Merli, M., Lucius, R. & Romig, T. (1998). Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 1871-1876.

Eom, K.S., Jeon, H.K., Kong, Y., Hwang, U.W., Yang, Y.C., Li, X.M., Xu, L.Q., Feng, Z., Pawlowski, Z.S. & Rim, H.J. (2002). Identification of *Taenia asiatica* in China: Molecular, morphological, and epidemiological analysis of a Luzhai isolate. *Journal of Parasitology*. 88: 758-764.

Fernández P. & Díaz P. (2003). Pruebas Diagnósticas. *Cad Aten Primaria*. 10: 120-124.

Flisser A., Vargas-Parada L. & Laclette J.P. (2006). *Tenia solium*: un parásito cos-

mopolita. Investigación y Ciencia. 24-33

González L.M., Montero E., Harrison L., Parkhouse M. & Garate T. (2000). Differential Diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* Infection by PCR. Journal of Clinical Microbiology. 38(2): 737-744.

Gonzalez, L.M., Montero, E., Puentes, S., Lopez-Velez, R., Hernandez, M., Sciutto, E., Harrison, L.J.S., Parkhouse, R.M.E. & Garate, T. (2002). PCR tools for the differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis from different geographical locations. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 42: 243-249.

Heid C., Stevens J., Livak K., & Williams M. (1996). Real Time Quantitative PCR. Genome Res. 6: 986-994

Hoberg, E.P., Alkire, N.L., de Queiroz, A. & Jones, A. (2001). Out of Africa: origins of the *Taenia* tapeworms in humans. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences. 268: 781-787.

Ito, A., Nakao, M., Okamoto, M., Sako, Y. & Yamasaki, H. (2002). Mitochondrial DNA of *Taenia solium*: from basic to applied science. In: Singh, G., Prabhakar, S. (Eds.), *Taenia solium* Cysticercosis: From Basic to Clinical Science. CAB International. (pp. 47-56).

Ito A., Yamasaki H., Nakao M., Sako Y., Okamoto M., Sato M.O., Nakaya K., Margono S.S., Ikejima T., Kassuku A.A., Afonso S.M.S., Benitez-Ortiz W., Plancarte A., Zoli A., Geerts S. & Craig

P.S. (2003). Multiple genotypes of *Taenia solium*-ramifications for diagnosis, treatment and control. Acta Tropica. 87: 95-101.

Kraft R. (2007). Cysticercosis: An Emerging Parasitic Disease. American Family Physician. 76(1): 91-92.

Liu H., Wang H., Shi Z., Wang H., Yang C., Silke S., Tan W. & Lu Z. (2006). TaqMan probe array for quantitative detection of DNA targets. Nucleic Acids Research. 34(1).

Maravilla P., González-Guzmán R., Zúñiga G., Peniche A., Domínguez-Alpizar J.L., Reyes-Montes R. & Flisser A. (2008). Genetic polymorphism in *Taenia solium* cysticerci recovered from experimental infections in pigs. Infection, Genetics and Evolution. 8: 213-216.

Martínez-Barbabosa I., Gutiérrez-Cárdenas E., Gaona E. & Shea M. (2010). The prevalence of *Hymenolepis nana* in schoolchildren in a bicultural community. Rev Biomed. 21: 21-27.

Mayta, H., Talley, A., Gilman, R.H., Jimenez, J., Verastegui, M., Ruiz, M., Garcia, H.H. & Gonzalez, A.E. (2000). Differentiating *Taenia solium* and *Taenia saginata* infections by simple hematoxylin-eosin staining and PCR- restriction enzyme analysis. Journal of Clinical Microbiology. 38: 133-137.

Méndez S. & Pérez E. (2004). La PCR múltiple en microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 22(3):183-92.

Meza-Lucas A. & Aguilar F. (2002). Teniasis humana por *Taenia solium*. Rev Mex Patol Clin. 49(2): 92-99.

Navone G.T., Gamboa M.I., Kozubsky L.E., Costas M.E., Cardozo M.S., Sisliauskas M.N. & González M. (2005). Estudio comparativo de recuperación de formas parasitarias por tres diferentes métodos de enriquecimiento coproparasitológico. Parasitol Latinoam. 60: 178-181.

Nickisch-Rosenegk, M., Silva-Gonzalez, R. & Lucius, R. (1999). Modification of universal 12S rDNA primers for specific amplification of contaminated *Taenia* spp. (Cestoda) gDNA enabling phylogenetic studies. Parasitology Research. 85: 819-825.

Nunes, C.M., Dias, A.K.K., Dias, F.E.F., Aoki, S.M., de Paula, H.B., Lima, L.G.F. & Garcia, J.F. (2005). *Taenia saginata*: Differential diagnosis of human taeniasis by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. Experimental Parasitology. 110: 412-415.

Nunes, C.M., Lima, L.G.F., Manoel, C.S., Pereira, R.N., Nakano, M.M. & Garcia, J.F. (2003). *Taenia saginata*: Polymerase chain reaction for taeniasis diagnosis in human fecal samples. Experimental Parasitology. 104: 67-69.

Nunes C.M., Lima L.G.F., Manoel C.S., Pereira R.N., Nakano M.M. & García J.F. (2006). Technical Report: Fecal specimens preparation methods for PCR diagnosis of human taeniosis. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 48(1): 45-47.

Rodríguez-Hidalgo R. (2007). The epidemiology of *Taenia* spp. and cysticercosis in Ecuador. Tesis previa la obtención del grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Gent. Gent-Bélgica. (pp. 126).

Salvatella R. & Eirale C. (1996). Exámen Coproparasitario. Metodología y empleo. Revisión técnico metodológica. Rev Med Uruguay. 12: 215-223.

Soulsby E.J.L. (1987). Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. Nueva Editorial Interamericana. 7ª. Edición. México, D.F.

Stefanic, S., Shaikenov, B.S., Deplazes, P., Dinkel, A., Torgerson, P.R. & Mathis, A. (2004). Polymerase chain reaction for detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* ("sheep strain") in naturally infected dogs. Parasitology Research. 92: 347-351.

Vega, R., Pinero, D., Ramanankandrasana, B., Dumas, M., Bouteille, B., Fleury, A., Sciutto, E., Larralde, C. & Frago, G. (2003). Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico: implications for clinical profile diversity and immunological technology. International Journal for Parasitology. 33: 1479-1485.

Verweij J.J., Pit D.S.S., van Lieshout L., Baeta S.M., Dery G.D., Gasser R.B. & Polderman A.M. (2001). Determining the prevalence of *Oesophagostomum bifurcum* and *Necator americanus* infections using specific PCR amplification of DNA from

faecal samples. Tropical Medicine and International Health. 6(9): 726-731.

Vaerman J.L., Saussoy P. & Ingargiola I. (2004). Evaluation of real-time PCR data. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents. 212-214.

Wilkins, P.P., Allan, J.C., Verastegui, M., Acosta, M., Eason, A.G., Garcia, H.H., Gonzalez, A.E., Gilman, R.H., Tsang, V.C.W. (1999). Development of a serologic assay to detect *Taenia solium* taeniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 60: 199-204.

Yamasaki, H., Nakao, M., Sako, Y., Nakaya, K., Sato, M.O., Mamuti, W., Okamoto, M. & Ito, A. (2002). DNA Differential Diagnosis of Human Taeniid Cestodes by Base Excision Sequence Scanning Thymine-Base Reader Analysis with Mitochondrial Genes. Journal of Clinical Microbiology. 40: 3818-3821.

