

Comparación de las técnicas Kato-Katz, TSET y TSR en el diagnóstico de infección por *Fasciola hepatica* en humanos

Comparison of the technique Kato-Katz, TSET and TSR in diagnosis of the infection by *Fasciola hepatica* in humans.

Nelson Uribe Delgado¹, Raúl Fernando Sierra Balcárcel¹, Cindy Tatiana Espinosa González¹

RESUMEN

Introducción: La Fasciolosis es una enfermedad causada por el parásito *Fasciola hepatica*, que afecta primordialmente a bovinos, ovinos, caprinos y en algunas zonas de forma endémica a los humanos. En la investigación clínica y epidemiológica de fasciolosis humana es importante contar con técnicas coprológicas de diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad. **Objetivo:** realizar la comparación de tres técnicas coprológicas para el diagnóstico de infección por *Fasciola hepatica* en humanos. **Metodología:** se procesaron 200 gramos de materia fecal de humanos contaminada experimentalmente con huevos de *F. hepatica* que se obtuvieron de análisis anteriores con muestras de ganado bovino y ovino. La muestra se dividió en 10 partes iguales; a cada una de estas muestras se les realizó la técnicas de Kato-Katz, técnica de sedimentación espontánea en tubo (TSET) y técnica de sedimentación rápida (TSR). Finalmente, la lectura de las muestras se basó en el diseño metodológico del doble ciego. **Resultados:** se encontró que la técnica de sedimentación rápida fue la más sensible de las tres evaluadas, detectándose positividad en 7,5 muestras de 10 analizadas; seguida por la técnica de Kato-Katz con 4,5 muestras y en último lugar la técnica de sedimentación espontánea en Tubo que mostró solo un resultado positivo. **Conclusión:** en este trabajo se encontró que la técnica de sedimentación rápida constituye la herramienta de elección para el profesional porque es la más sensible de las tres; además de ser sencilla, económica y de fácil aplicación en laboratorios de niveles uno y dos de complejidad para realizar un diagnóstico satisfactorio de fasciolosis humana. *Salud UIS* 2012; 44 (3): 7-12

Palabras clave: Diagnóstico de Fasciolosis por coprología, Kato-Katz, técnica de sedimentación espontánea en tubo, técnica de sedimentación rápida.

Nivel de evidencia: III

1. Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia
Correspondencia: Nelson Uribe Delgado. Bacteriólogo y Laboratorista Clínico
Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad Industrial de Santander
Doctor en Ciencias de la Salud Humana. Universidad de Salamanca, España. Ex-becario de la Fundación Carolina. Dirección: Cra 32 no. 29 – 31 oficina 2.206 Teléfono: 3204456726 Email: nelurdel@uis.edu.co
Recibido: 16 de Octubre de 2012 **Aprobado:** 28 de Noviembre de 2012

ABSTRACT

Introduction: fasciolosis is a disease caused by the parasite *Fasciola hepatica* which primarily affects cattle, sheep, and goats. In certain areas, it is endemic for human beings. In clinical and epidemiological research of human fasciolosis is important to get diagnostic techniques with high sensibility and specificity. **Objective:** perform the comparison between three coprological techniques for the diagnosis of infection by *F. hepatica* in humans. **Methods:** 200 grams of human feces were experimentally contaminated with *F. hepatica* eggs obtained from previous analysis with cattle and sheep faecal samples. The preparation was divided into 10 equal parts, each one was processed by the Kato-Katz technique, the spontaneous tube sedimentation technique (STST) and rapid sedimentation technique (TSR). Finally, all samples reading was based on the double-blind study design. **Results:** we found out that TSR was the most sensitive of the three techniques tested: 7,5 of 10 samples analyzed were positive, followed by the Kato-Katz technique with 4.5 of 10 samples and TSET with only one of 10 samples. **Conclusion:** This study concludes that the rapid sedimentation technique is the tool of choice for professionals because it is simple, inexpensive and easily applied in laboratories with levels complexity one and two, for a successful diagnosis of human fasciolosis. *Salud UIS* 2012; 43 (3): 7-12

Keywords: Fasciolosis diagnosis by coprology, Kato Katz, technique of spontaneous sedimentation in tube, rapid sedimentation technique.

INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una enfermedad causada por los parásitos *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*. Trematodos que afectan primordialmente a bovinos, ovinos y caprinos causando graves pérdidas económicas; y en algunas zonas de forma endémica a los humanos^{1,2}. Esta parasitosis constituye un problema importante de salud pública con casos reportados en humanos en los cinco continentes, especialmente en países en desarrollo^{3,4}.

Para cumplir su ciclo biológico, *F. hepatica* requiere la presencia en el ambiente de caracoles de la familia Lymnaeidae, que constituyen los hospederos intermediarios en los cuales por reproducción asexual se generan formas larvales denominadas cercarias, que salen del caracol para transformarse, en el agua o adheridas a plantas sumergidas en ella, en metacercarias que constituyen el estadio infectivo para los hospederos definitivos entre los que se encuentran especies domésticas como bovinos, ovinos, equinos, camélidos, caprinos y porcinos, conejos libres y cobayos como especies silvestres^{4,5}.

La infección en el ser humano (hospedador accidental) ocurre principalmente por la ingestión de agua y berros contaminados; aunque también se han reportado casos de fasciolosis asociados al consumo de otros vegetales como el jugo de alfalfa utilizado con fines medicinales⁶.

Las metacercarias se exquistan en el intestino delgado del hospedero definitivo y dan lugar a parásitos juveniles que migran a través de la cavidad peritoneal, penetran la

cápsula de Glisson y alcanzan el parénquima hepático, donde permanecen hasta llegar a la madurez sexual; una vez adultos, se localizan en los conductos biliares e inician el proceso de reproducción; es allí donde comienzan a depositar huevos operculados, ovalados y pigmentados por la bilirrubina, que llegan al exterior a través de las heces⁴.

En la fase aguda los síntomas se deben principalmente a la irritación mecánica que sufre el peritoneo y el tejido hepático por el paso de las formas inmaduras, que causan reacciones tóxicas y alérgicas. El paciente presenta una elevada eosinofilia sanguínea, además de cuadros febriles, dolor abdominal, trastornos gastrointestinales, urticaria y hepatoesplenomegalia como los signos y síntomas más característicos^{4,7}.

El parásito adulto dentro del conducto biliar causa inflamación e hiperplasia del epitelio del mismo; así como engrosamiento y dilatación, lo que trae como resultado colangitis y colecistitis; esto constituye, junto con el cuerpo del parásito, la causa de una obstrucción mecánica del conducto biliar^{4,7,8}.

Existen diversas formas de diagnosticar la Fasciolosis que se complementan y utilizan dependiendo de la fase de la infección, de las necesidades y recursos de los laboratorios.

El diagnóstico se puede hacer por métodos coprológicos, radiológicos e inmunológicos directos e indirectos. El de mayor uso por los bajos costos y su sencilla ejecución se basa en el hallazgo de huevos en heces.

A pesar de la utilidad del diagnóstico parasitológico directo y de su relación con la morbilidad, la coprología plantea varios problemas: se requiere de amplia experiencia en la identificación de los huevos *F. hepatica* y puesto que la expulsión de huevos es discontinua se precisa analizar al menos tres muestras antes de dar el resultado como negativo. Esto lleva a que la detección de huevos de este parásito se dificulte mediante el examen coprológico directo, por lo cual se requiere el empleo de técnicas de concentración, entre las que se destacan: la técnica de Kato-Katz, la técnica de sedimentación espontánea en tubo (TSET) y la técnica de sedimentación rápida (TSR) propuesta por Lumbreras y col. 1962^{4,10,11}.

Existen otras técnicas que utilizan materia fecal para hacer el diagnóstico, un claro ejemplo es el sandwich ELISA para la detección de copro-antígenos, utilizando el AcM ES-78, método simple, rápido y eficaz en la detección de infección activa por *F. hepatica* en alpacas y otros animales. La sensibilidad, especificidad y valores predictivos de esta técnica, al ser comparados con el examen coprológico, harían pensar en la sustitución de este último. Es importante señalar que este tipo de pruebas es generalmente utilizado para estudios seroepidemiológicos y de infecciones por *F. hepatica* en rebaños de gran número de animales sometidos a pastoreo intensivo¹². De otro lado, en los laboratorios clínicos no es frecuente contar con todos los implementos, infraestructura, equipos y reactivos requeridos para realizar metodologías inmunológicas de esta dimensión. Por eso es necesaria la búsqueda e implementación de técnicas más accesibles, económicas y confiables para el diagnóstico de fasciolosis¹⁰.

Conociendo la importancia de ofrecer un diagnóstico certero en las infecciones por *F. hepatica* y disminuir la probabilidad de falsos negativos, es importante implementar técnicas de alta sensibilidad y especificidad. Por lo anterior, se propone como objetivo principal de este estudio determinar la técnica más sensible de las tres mencionadas previamente, ya que están descritas en la literatura para la detección de los huevos de este parásito en materia fecal de seres humanos.

METODOLOGÍA

Obtención de los huevos de *F. hepatica*: Se obtuvieron 300 huevos de *F. hepatica* a partir de materia fecal de ganado bovino y ovino procesada por el método de Dennis.

Contaminación experimental de la muestra: Se recolectaron 10 muestras de materia fecal humana negativas para parásitos al examen coprológico directo. Las muestras recolectadas se homogeneizaron en un vaso de precipitado de 500 mL y a la mezcla (200 g) se le adicionaron 300 huevos de *F. hepatica*; calculando una proporción de 1.5 huevos por gramo (h.p.g) de materia fecal, guardando la relación que puede existir en zonas no endémicas para humanos^{1,10}.

Se vertieron 15 mL de agua a la mezcla para conservar la consistencia blanda de la misma. Una vez contaminada la muestra con los huevos, se homogeneizó fuertemente durante 10 minutos con espátula, cerciorándose de mezclarla en su totalidad y finalmente, se procedió a dividir la muestra en partes iguales de 20g en frascos de plástico tapa rosca, y se preservó con formalina al 10%.

Procesamiento de la muestra: La muestra fue procesada por tres técnicas diferentes:

Técnica de Kato-Katz: Se aclararon 50 mg de heces sin diluir con el uso de glicerina; lo cual permite visualizar mejor las formas parasitarias.

En un frasco de vidrio, se dispuso solución de Kato (250 mL de agua, 250 mL de glicerina y 6 mL de verde de malaquita al 3%). Se introdujeron cortes rectangulares de papel celofán (22 X 30 mm), los cuales se dejaron por un tiempo de 24 horas antes de ser usados. Posteriormente se tamizó 0.5 g de la muestra de heces a través de una malla con poros de 500 µm de diámetro; luego se tomó el filtrado y se colocó en un molde de cartón (templete) con un orificio circular central de 6 mm de diámetro y 1.37 mm de profundidad, el cual estaba sobre un portaobjetos, se removió el molde cuidadosamente dejando la muestra de aproximadamente 50 mg sobre la lámina y se cubrió con una laminilla de papel celofán impregnada con la solución de Kato¹¹. Se esperó durante 60 - 120 minutos para estabilizar la preparación y se observó al microscopio en aumento de 100-400 X^{13,14,15}.

Técnica de sedimentación espontánea en tubo (TSET): Se basa en la capacidad que presentan algunas etapas parasitarias, como los huevos, para sedimentar espontáneamente en un medio menos denso y adecuado como la solución salina fisiológica al 0,9%.

Se tomó una cantidad aproximada de 5 g de materia fecal y se homogeneizó en 10 mL de solución salina hasta lograr una suspensión adecuada la mezcla fue filtrada con gasa doble en tubos Falcon de plástico con

capacidad de 50 mL. Se completó el volumen final del tubo con solución salina y se tapó herméticamente. Se agitó con fuerza durante 30 segundos; se dejó reposar por 45 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se tomó con una pipeta Pasteur una muestra del fondo del tubo y se colocaron tres gotas del sedimento en dos láminas portaobjetos diferentes, agregándole dos gotas de lugol a una de ellas y dos gotas de solución salina a la otra. Las láminas portaobjetos fueron cubiertas con laminillas de vidrio y se observaron al microscopio en aumentos de 100X y 400X^{9,15}.

Técnica de Lumberras: Se separó una cantidad aproximada de 5 g de materia fecal y se homogeneizó en 10 mL de solución salina fisiológica 0.9%, hasta lograr una suspensión adecuada. La mezcla fue filtrada con gasa doble en tubos Falcon de plástico de 50 mL. Se completó el volumen final del tubo con solución salina y se tapó herméticamente. Se agitó vigorosamente durante 30 segundos*; se dejó reposar por 60 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se completó de nuevo el volumen del tubo con solución salina fisiológica 0.9%; se agitó enérgicamente y se dejó sedimentar por 15 minutos*; se repitió de nuevo este paso disminuyendo el tiempo a 10 minutos*. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y con ayuda de una pipeta Pasteur, se depositó el sedimento de manera fraccionada y se diluyó con agua destilada sobre placas de Petri de vidrio y se revisó su totalidad en estereoscopio en aumentos de 20 - 30X^{15,16}. (El asterisco (*) indica las modificaciones realizadas en este experimento con base en la técnica descrita por Lumberras y col. En 1962).

Una manera efectiva para realizar el estudio propuesto es utilizar el método de doble ciego, el cual constituye una excelente herramienta metodológica para conducir el experimento^{17,18}. Para la interpretación y lectura de las muestras, en cada una de las técnicas realizadas se utilizó este método, el cual disminuye el sesgo obtenido por los observadores. Se consideró como muestra positiva aquella en la que se observara por lo menos un huevo de *Fasciola hepatica*.

En cada técnica, los datos reportados están indicados en cantidad de muestras positivas sobre el total de especímenes analizados. Los resultados obtenidos por los dos observadores fueron promediados para obtener las relaciones de positividad. La constante

de identificación en las muestras fue guardada por un tercero y no se hizo entrega de esta información a los investigadores hasta que el estudio finalizó.

RESULTADOS

Técnica de Kato-Katz:

Mediante esta técnica se detectaron positivas 4,5 muestras de las 10 analizadas que corresponde a una sensibilidad de 45%.

Técnica de sedimentación espontánea en tubo (TSET):

Mediante esta técnica se detectó positiva una muestra de las 10 analizadas correspondiendo a una sensibilidad de 10%.

Técnica de sedimentación rápida (TSR):

Se encontró que la técnica de sedimentación rápida fue la más sensible de las tres evaluadas pues se detectó positividad en 7,5 de 10 muestras analizadas.

Examen coprológico directo:

No se encontraron muestras positivas para *Fasciola hepatica* por esta técnica.

Estos resultados indican que la técnica de elección en los laboratorios de bajo nivel de complejidad, en el momento de una sospecha clínica de fasciolosis humana debería ser la técnica de sedimentación rápida, descrita previamente en la metodología.

Tabla 1. Resultados obtenidos por los dos observadores en las tres técnicas realizadas, con el método de Doble Ciego

Técnica	Observador	No. muestras positivas observadas	Promedio (% sensibilidad)
Kato-Katz	1	4	4,5 (45)
	2	5	
TSET	1	1	1 (10)
	2	1	
TSR	1	8	7,5 (75)
	2	7	
Examen directo	1	0	0 (0)
	2	0	

DISCUSIÓN

La sensibilidad de la TSR obtenida en este trabajo cuando se equipara en porcentaje (75%) no muestra diferencias sustanciales con valores reportados por Ecole National e Vétérinaire en 2007 para el método de Mc Master (69%; 86,1% y 91,9%) con muestras cuyas cargas parasitarias respectivamente, eran de un, dos y tres h.p.g. de materia fecal¹⁹. Estos datos sugieren que la técnica de Mc Master muestra una efectividad similar a la TSR; pero no es la técnica de elección para el diagnóstico de fasciolosis debido a su mayor complejidad y alto costo.

Utilizando la técnica de Kato-Katz, en un estudio de áreas hiperendémicas de fasciolosis en Bolivia, encontraron intensidades promedio de 238 y 613 h.p.g; con reportes individuales del examen entre 24 - 5064 h.p.g.²⁰. En nuestro estudio, trabajando con una intensidad de 1.5 h.p.g, se obtuvo una positividad de 45%. Los resultados obtenidos en los dos estudios demuestran que la técnica empleada a pesar de no resultar la más favorable ofrece buena sensibilidad.

Las tres técnicas empleadas en este estudio, arrojaron resultados que difieren entre sí, sobresaliendo la TSR propuesta por Lumbreras con las modificaciones realizadas en este trabajo. Esto puede deberse en gran parte a la cantidad de muestra tomada para su procesamiento (5g) en comparación al Kato-Katz (0,05g); por otro lado a que su lectura se realiza en todo el sedimento o por lo menos hasta encontrar el primer huevo que confirme la presencia de *F. hepatica* y no una fracción tomada al azar como se realiza en la TSET.

En concordancia con lo que ocurre en otras técnicas diagnósticas utilizadas tanto en estudios epidemiológicos como clínicos, como se mencionó anteriormente, ninguna de las tres evaluadas logró el 100% de sensibilidad.

Este estudio experimental se realizó con el propósito de adecuar una técnica diagnóstica segura y confiable para el hallazgo de huevos de *F. hepatica* en muestras de materia fecal humana con el fin de aplicar estos resultados en estudios posteriores y que pueda servir como ayuda a profesionales en zonas apartadas.

El trabajo demostró que la TSR constituye la herramienta de elección ya que ofrece un buen comportamiento para el diagnóstico de fasciolosis humana: ofrece alta sensibilidad; utiliza materiales de bajo costo y fácil acceso y ofrece resultados confiables que facilitan la orientación de un oportuno esquema terapéutico por parte del médico tratante.

Su empleo es viable en los laboratorios de niveles uno y dos de complejidad para realizar un diagnóstico efectivo.

Las técnicas coprológicas descritas en este artículo, particularmente la TSR, son herramientas diagnósticas de gran utilidad en varias parasitosis, especialmente para fasciolosis²¹, pero no se utilizan con frecuencia o son desconocidas por los profesionales de la salud.

AGRADECIMIENTOS

Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales CINTROP. Línea de epidemiología, diagnóstico y control de enfermedades causadas por tremátodos. Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad Industrial de Santander. Carlos Humberto García. Médico Veterinario y Zootecnista, Msc en Epidemiología. Financiamiento: Universidad Industrial de Santander, este artículo fue escrito en el marco del desarrollo del proyecto con código 5672 de la convocatoria interna de 2010.

CONFLICTO DE INTERÉS

No existe conflicto de intereses en el trabajo realizado por parte de ninguno de los autores

REFERENCIAS

1. Mas-Coma S. Human Fasciolosis. Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control. Londres, IWA Publishing; 2004: p. 305.
2. Wilches C, Jaramillo JG, Muñoz DL, Robledo MS, Vélez ID. Presencia de infestación por *Fasciola hepatica* en habitantes del valle de San Nicolás, oriente antioqueño. Infectio 2009; 13(2): 92-99.
3. Mas-Coma MS, Esteban JG, Bargues M. Epidemiología de la Fasciolosis humana: Revisión y propuesta de nueva clasificación. Bull WHO 1999; 77: 340-346.
4. Llop A, Valdés M, Zuazo J. Microbiología, parasitología médicas. La Habana, 2001, Editorial Ciencias Médicas; tomo III: 381-388.
5. Estrada V, Gómez M, Velásquez L. La higiene del ganado y la Fasciolosis bovina, Medellín y Rionegro, 1914 - 1970. Iatreia 2006; 17(4): 393-407.
6. Marcos L, Maco V, Samalvides F, Terashima A, Espinoza JR, Gotuzzo E. Risk factors for *Fasciola hepatica* infection in children: a case-control study. T Roy Soc Trop Med H 2006; 100: 158-166
7. Freitas A, Colmenares C, Alarcón B, García M, Díaz O. Fasciolosis humana en el municipio Mara, estado

- Zulia, Venezuela: prevalencia y factores asociados. *Invest Clin* 2009; 50(4): 497–506.
8. Pulido AP, Castañeda R, Arbelaez G. *Fasciola hepatica*: Pedagogía de diagnóstico por laboratorio y su situación en Colombia. *REDVET* 2010; 12(5B):1-11.
 9. Pajuelo G, Luján D, Paredes B, Tello R. Aplicación de la técnica de sedimentación espontánea en tubo en el diagnóstico de parásitos intestinales. *Rev Biomed* 2006; 17: 96-101.
 10. Fuentes MV, Malone JB, Mas-coma MS. Validation of a mapping and prediction model for human Fasciolosis transmission in Andean very high altitude endemic areas using remote sensing data. *Acta Tropica* 2001; 79: 87–95.
 11. Espinoza JR, Terashima A, Herrera P, Marcos LA. Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la Economía de las zonas endémicas. *Rev Perú Med Exp Salud Pública* 2010; 27(4): 604-612.
 12. Li E. O, Leguía G, Espino A, Duménigo B, Díaz A, Otero O. Detección de anticuerpos y antígenos para el diagnóstico de *Fasciola hepatica* en alpacas naturalmente infectadas. *Rev investig vet Perú* 2005; 16 (2):143-153.
 13. Botero D, Restrepo M. Parasitosis humanas. 4ª ed. Medellín:Corporación para investigaciones biológicas, 2003; p. 460 - 461.
 14. Universidad Federal de Santa Catarina - Departamento de Microbiología y Parasitología, CCB. Métodos de exámenes coprológicos. Laboratorio de Protozoología, Brasil 2002.
 15. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre. Serie de Normas Técnicas, Lima: 2003; No.37: p. 13 – 24.
 16. Maco V, Marcos L, Terashima A, Samalvides F, Miranda E, Espinoza J, et al. Fas2- ELISA y la técnica de sedimentación rápida modificada por lumbreras en el diagnóstico de la infección por *Fasciola hepatica*, *Rev Med Hered* 2002; 13(2): 49-57.
 17. The Skeptic's dictionary. Disponible en: <http://skepdic.com/control.html>(acceso el 25 de octubre de 2011)
 18. Day S, Altman D. Statistics notes: blinding in clinical trials and other studies. *BMJ*. 2000; 26;321(7259):504. Disponible en: <http://www.bmj.com/content/321/7259/504.full>. (Acceso el 25 de octubre de 2011)
 19. Ecole national e vétérinaire, 23 Chemin des Capelles. Comparison of methods for the veterinary diagnosis of liver flukes (*Fasciola hepatica*) in cattle. *Bulletin USAMV-CN* 2007; 6 (1-2): 14-19.
 20. Esteban JG, Flores A, Angles R, Mas Coma S. High endemicity of human Fasciolosis between Lake Titicaca and La Paz Valley, Bolivia. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene* 1999; 93:151-156.
 21. Chacón N, Contreras R, Márquez W, Salinas R, Romero J. Importancia de la referencia médica en el diagnóstico de parasitosis intestinales por métodos coproparasitológicos. *RFM* 2007; 30 (1)