

Fas2-ELISA y la técnica de sedimentación rápida modificada por lumbreras en el diagnóstico de la infección por Fasciola hepática.

MACO FLORES Vicente; MARCOS RAYMUNDO Luis; TERASHIMA IWASHITA Angélica*; SAMALVIDES CUBA Frine*; MIRANDA SÁNCHEZ Elba**, ESPINOZA BABILON Jose***; GOTUZZO HERENCIA Eduardo*.

SUMMARY

Human fascioliasis is a growing health problem, with an increasing worldwide incidence of reported cases. Improving its diagnosis through more sensitive and specific techniques is important to clinical practice and to epidemiology, specially to determine new endemic areas. *Objective:* To evaluate coprological techniques and serological tests for diagnosis of Fasciola hepatica (Fh) infection in humans. *Material and methods:* The study population involved children aged from 1 to 16 years, in a highly endemic area (Junin, Perú). A total of 194 stool samples and 158 sera were examined. Three coprological techniques were compared: formol-ether concentration (Ritchie's), spontaneous sedimentation (SST) and Lumbreras' rapid sedimentation (RST). Three serological test for Fh were evaluated: Arc 2 (double-diffusion), enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) and Fas2-ELISA. *Results:* RST showed higher recovery rates (20.61%) of eggs in stools than SST (13.40%) and Ritchie's (7.72%). The sensitivity of the serological tests was compared with total infected patients diagnosed by all the fecal tests: most sensitive was Fas2-ELISA with 96.77%, EITB was 71.87% and Arc 2, was 34.48%. *Conclusion:* We conclude that RST is better than the SST and Ritchie's techniques for the diagnosis of the chronic phase of human infection by Fh using fecal examinations, and that Fas2-ELISA is a very highly sensitive immunodiagnostic test, which may be used for the diagnosis of human Fh infection in both clinical and epidemiological settings, specially for screening human populations living in endemic areas. (*Rev Med Hered* 2002; 13: 49-57).

KEY WORDS: Fascioliasis, Fasciola hepatica, diagnosis, serologic, coprologic, sensitivity, Lumbreras' rapid sedimentation (RST), Fas2-ELISA, Perú.

RESUMEN

La fasciolosis humana es un problema de salud pública debido a la mayor incidencia de casos reportados en los últimos años alrededor del mundo. La necesidad de contar con técnicas o métodos de diagnóstico para Fasciola hepática de mayor sensibilidad y especificidad es importante tanto para la práctica clínica como para determinar zonas endémicas. *Objetivo:* Evaluar las técnicas coprológicas y serológicas para el diagnóstico de la infección por Fasciola hepática en humanos. *Material y métodos:* La población de estudio comprendió a niños en edad escolar entre 1-16 años de edad, pertenecientes a una zona de alta endemicidad (Junin, Perú). Se obtuvieron un total de 194 muestras de heces y 158 muestras de suero. Se evaluaron tres métodos coproparasitológicos: Método de Concentración

* Departamento de Medicina, Facultad de Medicina Alberto Hurtado, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt. Universidad Peruana Cayetano Heredia.

** Laboratorio de Parasitología, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana Cayetano Heredia.

*** Unidad de Biología Molecular, Laboratorios de Investigación y Desarrollo de Ciencia y Tecnología, Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana Cayetano Heredia.

éter-formol (MCEF), Técnica de Sedimentación Espontánea (TSE) y la Técnica de Sedimentación Rápida (TSR) modificada por Lumbreras, y tres métodos serológicos: Arco 2, Western blot para *F. hepatica* y Fas2-ELISA. **Resultados:** La TSR modificada por Lumbreras fue la de mayor rendimiento (20.61%) en comparación con la TSE (13.40%) y MCEF (7.72%). La sensibilidad de Fas2-ELISA fue de 96.77% superior a la del Western blot y Arco 2, con sensibilidades de 71.87% y 35.48%, respectivamente. **Conclusiones:** La TSR es superior a TSE y MCEF para el diagnóstico de la fasciolosis humana en la fase crónica. Fas2-ELISA, es una prueba de inmunodiagnóstico altamente sensible y que se propone debe ser usada como la prueba de diagnóstico de fasciolosis humana y de tamizaje de la infección en poblaciones humanas que habitan en regiones de alta endemicidad para esta parasitosis. (*Rev Med Hered* 2002; 13: 49-57).

PALABRAS CLAVE: Fasciolosis, *Fasciola hepatica*, diagnóstico, serología, coprología, sensibilidad, Técnica de Sedimentación Rápida modificada por Lumbreras, Fas2-ELISA, Perú.

INTRODUCCIÓN

La concepción de la fasciolosis humana, zoonosis causada por el tremátode *Fasciola hepatica* (Trematoda: Fasciolidae) ha cambiado en los últimos años, habiéndose reportado zonas de alta prevalencia alrededor de todo el mundo (2,4,13). En una reciente revisión, se ha reportado un total de 7,071 casos humanos notificados por 51 países en los últimos 25 años distribuidos en África, América, Asia, Europa y Oceanía, siendo el mayor número de casos en América (13). Esteban y col. han reportado los mayores índices de prevalencia, obteniendo 68.2% y 15.4% a nivel local y global, respectivamente, en comunidades localizadas al norte del Altiplano Boliviano (7). El incremento de casos reportados de fasciolosis humana en los últimos años la ha situado como un problema de salud de orden mundial por lo que estos datos epidemiológicos adquieren relevancia debido a la patogenicidad que puede causar el tremátode durante sus estadíos de infección (18, 21).

Durante la fase aguda o migratoria, que dura aproximadamente de 8 a 12 semanas, el parásito produce sintomatología clínica principalmente fiebre, hepatomegalia e hipereosinofilia (4,14,16,18,21); en esta fase el diagnóstico se realiza mediante el uso de pruebas serológicas debido a la ausencia de huevos en heces (17).

Después de aproximadamente 3 meses el parásito llega a los conductos biliares donde adquiere la forma adulta y elimina huevos intermitentemente, los cuales son diagnosticados en el examen coprológico. Sin embargo, puede haber hallazgos espúreos por la costumbre de alimentarse con hígado crudo de animales infectados por *F. hepatica* (15,22). En la mayoría de casos la infección es asintomática aunque puede complicarse y causar obstrucción biliar (8,11,27), colecistitis aguda o crónica (21,26), ruptura hepática (18) y cirrosis (4,18).

Sin embargo, en muchos casos más de un examen

coprológico es necesario por la ovoposición intermitente del parásito (4, 10). En otras ocasiones nunca se evidencia la presencia de huevos en heces debido a que la fasciolosis puede adoptar formas extrahepáticas, aunque esto último no es común (21).

El diagnóstico de rutina está basado en la inmunoelectroforesis (Arco 2), a pesar que esta técnica es de alta especificidad presenta una sensibilidad limitada siendo usada principalmente como diagnóstico en la fase crónica. En los últimos años se han realizado esfuerzos para aumentar la sensibilidad de los exámenes serológicos (20) con la finalidad de obtener un diagnóstico precoz y junto a un tratamiento óptimo, evitar que el parásito cause daño hepático irreparable.

El diagnóstico parasitológico está basado en la identificación de huevos de *F. hepatica* en las heces o drenaje biliar o duodenal. Los exámenes coprológicos de rutina desde el examen directo hasta los métodos de concentración han sido utilizados para el diagnóstico de la fase crónica. Mediante los métodos coprológicos, tales como el Método de Concentración Éter-Formol y la Técnica de Kato-Katz, se han reportado altos índices de prevalencia. Aunque la Técnica de Kato Katz ha sido empleada en el diagnóstico de la infección experimental por *F. hepatica*, ésta tiene una baja sensibilidad lo cual limita su aplicación clínica (4). En 1975, Akahane y col. compararon cinco técnicas de concentración para detectar huevos de *Fasciola hepatica*, siendo el Método de Concentración Éter-formol el de más bajo rendimiento (4). En 1962, Lumbreras y col. comunicaron las modificaciones a una técnica de sedimentación, comentando además las ventajas de su uso en el diagnóstico, control terapéutico y en el estudio de fasciolosis humana en zonas endémicas (12).

El objetivo del presente estudio es evaluar tres métodos serológicos (Fas2-ELISA, Western blot y Arco 2) y tres coproparasitológicos (Método de Concentración Éter-formol, Técnica de Sedimentación

Espontánea y Técnica de Sedimentación Rápida modificada por Lumbreras); con la finalidad de obtener pruebas que permitan establecer un diagnóstico confiable y de alta sensibilidad en la infección por Fasciola hepática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de heces y suero

Las muestras de heces y suero fueron obtenidas durante el mes de diciembre de 2000 en la provincia de Jauja, Junín (Perú), zona endémica de fasciolosis humana.

Se recolectaron en total 194 muestras de heces y 158 sueros. Los participantes del estudio tuvieron una media de 8.76 años (rango 2 a 16; DS: 2.59) y una relación entre sexo masculino y femenino de 0.98. De los 194 participantes, 85 (43.81%) dieron una segunda muestra de heces.

Métodos serológicos

Para obtener el suero, todas las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2500 r.p.m. por 5 minutos. Cada muestra de suero fue separada en 2 alícuotas y depositadas en tubos cónicos de 1.8cc. Cada una fue rotulada con su respectivo número de identificación y conservadas a -20 °C.

Cada grupo de muestras fue procesada en 2 laboratorios distintos. Se realizó Fas2-ELISA en la Unidad de Biología Molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y Western blot para Fasciola hepática y Arco 2 en el Laboratorio de Apoyo de Parasitología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Las sensibilidades de las 3 pruebas serológicas realizadas han sido evaluadas considerando como gold standard el hallazgo de huevos en heces de Fasciola hepática por al menos un método coproparasitológico empleado.

Los resultados de los exámenes coprológicos y serológicos no fueron confrontados hasta finalizado el procesamiento total de las muestras.

Arco 2

Se depositó 3.5ml de solución agar-agar al 1.2% en su fase líquida en una lámina portaobjetos dejando solidificar. Se practicaron perforaciones en que se depositaron: 5µl de solución antigénica (antígeno crudo de Fasciola hepática), 150µl de suero problema y 50µl de suero control positivo.

Se colocaron en una cámara húmeda por un lapso de 48 horas. Las bandas de precipitación en gel se visualizaron coloreando con Amido Schwarz.

Western blot (Electroinmunotransferencia Blot, EITB) para fasciolosis.

El antígeno secretorio y excretorio (E/S) crudo de Fasciola hepática, se obtuvo de la incubación del parásito adulto en un medio de cultivo para células RPMI-1640 conteniendo L-glutamina, bicarbonato de sodio (Sigma), penicilina 100 unidades/ml y 0.1mM fenilmetilsulfonilfluoride (Sigma), durante toda la noche a 37°C (28). Se retiraron los parásitos adultos y el sobrenadante fue centrifugado a 10000 r.p.m. por 15 minutos y dializado en varios volúmenes de agua estéril bidestilada por 24 horas a 4°C. Se determinaron proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad, Richmond, CA); se tomaron alícuotas y se guardó a -20°C.

El antígeno crudo (E/S) fue calentado por 15 minutos en 1 ml buffer de muestra (10% de glicerol, 5% de 2-mercaptoethanol, 2% de SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.001% bromofenol azul) antes de colocarlo en el gel de electroforesis.

La prueba de Western blot (EITB) (24), separó el antígeno en sus diferentes componentes proteicos de acuerdo al peso molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 15%. Luego las proteínas fueron transferidas por electroforesis sobre un papel de nitrocelulosa, donde fue enfrentado con muestras de sueros a la dilución de 1/20 para detectar IgG específico contra el antígeno (E/S) de Fasciola hepática. Se usó la enzima peroxidasa conjugada con anti-IgG humano a una dilución de 1/1000 para localizar el antígeno-anticuerpo. Se determinó el peso molecular de fracciones proteicas del antígeno usando estándares preteñidos comerciales de bajo peso molecular de 3 a 43KDa (Bio-Rad, Richmond, CA).

Se consideró seropositiva la prueba de Western blot cuando en el suero se determinó la presencia de IgG específica contra las proteínas de bajo peso molecular de 14 a 27 KDa del antígeno crudo (E/S) de Fasciola hepática, fracciones que han sido consideradas por varios autores con alta sensibilidad y especificidad.

Fas2-ELISA

Fas2-ELISA es un kit de inmunodiagnóstico producido por la Unidad de Biotecnología Molecular de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de Ciencia y Tecnología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

El ensayo se basa en la detección de anticuerpos IgG circulantes contra el antígeno Fas2, que es una cisteína proteinasa producida por el parásito *Fasciola hepatica* (5, 6).

Métodos coproparasitológicos

Las muestras de heces fueron conservadas en formol al 10% a razón de una parte de heces por tres partes de fijador y analizadas por 3 métodos coprológicos en el Laboratorio de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt. Para comparar el rendimiento y la sensibilidad de cada método coprológico, el personal técnico del laboratorio no fue advertido sobre la naturaleza del estudio.

Técnica de Sedimentación Espontánea

La técnica se llevó a cabo de acuerdo con las adaptaciones realizadas por Tello (23, 25). Se separó aproximadamente 4g de heces de cada recipiente y se hizo un homogenizado en 10 ml de solución salina hasta que se logró una suspensión adecuada. La mezcla fue vertida en un tubo cónico de plástico de 13 x 2.5cm, de 50 ml de capacidad filtrándola a través de gasa. Se completó el volumen del tubo con solución salina y se tapó herméticamente. Se agitó enérgicamente por 30s y se dejó reposar por 45 minutos.

Se eliminó el sobrenadante y con una pipeta se tomó una muestra del fondo del tubo. Se colocaron 4 gotas en dos láminas distintas, agregándole luego gotas de lugol y de solución salina a cada una. Finalmente las láminas portaobjetos fueron cubiertas con laminillas de celofán de 6x2cm. Se observó al microscopio (100X y 400X).

Método de Concentración Éter- Formol

Cada muestra fue procesada por el Método de Concentración Éter-Formol (MCEF) (9). Las muestras preservadas con el fijador fueron homogenizadas con formol adicional dependiendo de la cantidad y viscosidad de la muestra. Parte de ésta fue tamizada a través de dos capas de gasa en un tubo de centrífuga cónico de 15 ml, completándose con formol hasta 10 ml, luego de lo cual fue centrifugada a 2500 r.p.m. por 10 minutos para obtener de 0.5 a 1ml de sedimento. Se decantó el sobrenadante.

Posteriormente se agregó NaCl al 0.09% hasta completar un volumen de 10ml y se centrifugó a 2500 r.p.m. por 10 min. Se decantó obteniéndose un sedimento de aproximadamente 1ml. Se adicionó formol al 10% hasta 5ml y acetato de etilo hasta completar un volumen

de 10 ml, agitándose vigorosamente la mezcla por 30 s. Se empleó acetato de etilo como sustituto del éter, debido a que es menos inflamable, de menor costo y menos dañino para su uso en el laboratorio y porque se ha demostrado que no se presentan distorsiones ni alteraciones en la morfología de los huevos, larvas o quistes de las muestras estudiadas (29).

Se centrifugó por 10 min. resultando 4 capas: una cantidad pequeña de sedimento en el fondo del tubo, una capa de formol, un tapón de detritus sobre la capa de formol y una capa de acetato de etilo en la superficie. El tapón de detritus fue eliminado desprendiéndola por medio de una bagueta. Se decantó todo el sobrenadante y se colocaron gotas del sedimento con una pipeta en dos láminas, a las que se les agregó lugol y solución salina, respectivamente. Finalmente las láminas portaobjetos fueron cubiertas con laminillas de celofán y observadas al microscopio óptico.

Técnica de Sedimentación Rápida modificada por Lumbreras

Esta técnica fue adaptada por el Dr. Hugo Lumbreras (12) del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Lima, Perú. De cada recipiente de plástico se tomaron de 4 a 8g de heces que fueron homogenizadas con una bagueta con agua corriente filtrada en un tubo cónico de 50 ml de capacidad. La mezcla se trasvasó a un recipiente de vidrio, de boca ancha, de 200 a 300ml de capacidad tamizándola con un colador de plástico. Se completó el volumen con agua filtrada y se dejó reposar por 30 minutos.

Luego se decantó los 2/3 del sobrenadante y se volvió a completar el mismo volumen inicial con agua filtrada. Se repitieron los mismos pasos 3-5 veces con un intervalo de 30 min., hasta que el sobrenadante quedó limpio. Finalmente, el último sedimento fue vertido en una placa petri de vidrio. Se observó al microscopio (10X, 100X).

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados en el SPSS 9.0 (Copyright(SPSS Inc., 1989-1999) y en el Epi Info (version 6.04a, 1996; Centers for Disease Control and Prevention CDC, Atlanta, Georgia, U.S.A.).

RESULTADOS

Exámenes coprológicos

Del total de 194 muestras examinadas por los tres métodos coprológicos, la TSR modificada por

Tabla N°1. Rendimiento comparativo de tres métodos parasitológicos en el diagnóstico de Fasciola hepática.

METODO	Número de muestras examinadas	POSITIVOS n (%)
MCEF	194	15 (7.73)
TSE	194	26 (13.40)
TSR	194	40 (20.61)

MCEF: Método de concentración eter-formol.

TSE: Técnica de sedimentación espontánea.

TSR: Técnica de sedimentación rápida modificada por Lumbreras.

Lumbreras obtuvo un mayor rendimiento (20.61%) en comparación con MCEF (7.73%) y TSE (13.40%), como se muestra en la tabla N°1. No hubo diferencia significativa entre MCEF y TSE ($X^2 = 3.30$; $P = 0.069$) como tampoco entre TSE y TSR ($X^2 = 3.58$; $P = 0.058$). Sin embargo, si hubo diferencia significativa entre TSR y MCEF ($X^2 = 13.24$; $P = 0.00$).

La sensibilidad de MCEF y TSE comparadas con la TSR modificada por Lumbreras fueron de 37.5% y 65.0%, respectivamente (ver Tablas N°2 y 3).

El total de las muestras de heces recolectadas fue de 279, de las cuales 85 correspondieron a una segunda muestra por persona. Esta segunda muestra fue recolectada al día siguiente de haber recibido la primera. Los resultados de analizar una o dos muestras mediante

Tabla N°3. Sensibilidad de la Técnica de sedimentación espontánea.

	TSR (+)	TSR (-)	TOTAL
TSE (+)	26	0	26
TSE (-)	14	153	167
TOTAL	40	153	193

Sensibilidad: 65.0%

Tabla N°2. Sensibilidad del Método de concentración eter-formol.

	TSR (+)	TSR (-)	TOTAL
CEF (+)	15	0	15
CEF (-)	25	153	178
TOTAL	40	153	193

Sensibilidad: 37.5%

los tres métodos coprológicos, se muestran en la tabla N°4.

Exámenes serológicos

Las 158 muestras de suero fueron procesadas por tres exámenes serológicos: Fas2-ELISA, Western blot y Arco 2. La sensibilidad del Fas2-ELISA (96.77%) fue mayor en comparación con Western blot (74.19%) y Arco 2 (47.61%).

El Arco 2 (98.24%) tuvo una mayor especificidad que el Fas2-ELISA (91.22%) y Western blot (88.59%), como se muestran en las tablas No. 5, 6 y 7.

Se consideró como Fas2-ELISA positivo aquellos valores de absorbancia >0.200 nm. De acuerdo con este

Tabla N°4. Resultados de examinar una o dos muestras de heces, en el diagnóstico de Fasciola hepática.

POSITIVO	UNA MUESTRA n (%)	DOS MUESTRAS n (%)
MCEF	8 (8.2)	11 (11.2)
TSE	17 (17.3)	18 (18.4)
TSR	24 (24.5)	25 (25.5)

MCEF: Método de concentración eter-formol.

TSE: Técnica de sedimentación espontánea.

TSR: Técnica de sedimentación rápida modificada por Lumbreras.

Tabla N°5. Sensibilidad y especificidad de Fas2-ELISA en el diagnóstico de fasciolosis humana.

	HUEVOS EN HECES (+)	HUEVOS EN HECES (-)	TOTAL
Fas2-ELISA (+)	30	10	40
Fas2-ELISA (-)	1	104	105
TOTAL	31	114	145

Sensibilidad: 96.77%

criterio de positividad, 50 (31.64%) de 158 muestras de suero fueron positivos. De los 31 individuos con al menos un examen coprológico positivo para huevos de *Fasciola hepatica*, 30 (96.77%) fueron Fas2-ELISA positivo con un valor de absorbancia media de 0.385 nm (rango 0.218-0.683; DS 0.139) (Categoría 1) (ver Figura N°1) Dentro de este grupo, la única muestra de suero negativa para Fas2-ELISA con examen coprológico positivo tuvo una absorbancia de 0.173 nm (Categoría 6). Diez muestras de suero (8.7%) con examen coprológico negativo fueron Fas2-ELISA positivos, con una absorbancia media de 0.479 nm (rango 0.291-0.683; DS 0.157) (Categoría 2). Tres individuos a quienes no se les realizó examen coproparasitológico fueron seropositivos con una absorbancia media de 0.358 nm (rango 0.302-0.391; DS 0.049) (Categoría 3). De las 114 muestras de heces negativas para *Fasciola hepatica*,

Tabla N°7. Sensibilidad y especificidad del Arco 2 en el diagnóstico de fasciolosis humana.

	HUEVOS EN HECES (+)	HUEVOS EN HECES (-)	TOTAL
ARCO2 (+)	10	2	12
ARCO2 (-)	19	112	131
TOTAL	29	114	143

Sensibilidad: 38.48%

Tabla N°6. Sensibilidad y especificidad del Western blot (WB) en el diagnóstico de fasciolosis humana.

	HUEVOS EN HECES (+)	HUEVOS EN HECES (-)	TOTAL
WB (+)	23	7	30
WB (-)	9	105	114
TOTAL	32	112	144

Sensibilidad: 71.87%

104 (91.22%) fueron también negativas para Fas2-ELISA, obteniéndose en este grupo una absorbancia media de 0.094 nm (rango 0.10-0.205; DS 0.047) (Categoría 4). Finalmente, 10 individuos que no tuvieron muestra de heces fueron seronegativos para Fas2-ELISA y presentaron una absorbancia media de 0.089 nm (rango 0.02-0.159; DS 0.047) (Categoría 5). En total, 47 (27.21%) individuos en este estudio resultaron seropositivos para Fas2-ELISA de las 158 muestras incluidas.

DISCUSIÓN

La fasciolosis humana es de difícil diagnóstico principalmente en la fase aguda o invasiva, porque no puede ser diagnosticada por el examen de huevos en heces y depende de pruebas serológicas. Por ello, el

Tabla N°8. Prevalencia y sensibilidad de los 6 métodos utilizados en el diagnóstico de *Fasciola hepatica*.

METODO	PREVALENCIA %	SENSIBILIDAD %
EXAMENES COPROLOGICOS		
MCEF	7.73	37.5
TSE	13.40	65.0
TSR	20.61	
EXAMENES SEROLOGICOS		
Fas2-ELISA	27.21	96.77
Western Blot	20.88	71.87
Arco 2	6.57	34.48

MCEF: Método de concentración eter-formol.

TSE: Técnica de sedimentación espontánea.

TSR: Técnica de sedimentación rápida modificada por Lumbreras.

desarrollo de técnicas serológicas innovadoras de alta sensibilidad y especificidad permitirían establecer correctamente esta fase.

Con respecto a los métodos coprológicos empleados en el diagnóstico de Fasciola hepática, la TSR modificada por Lumbreras fue la que obtuvo un mayor rendimiento en comparación con los demás métodos de concentración. En la fase crónica, a menudo asintomática, el parásito adulto se aloja en las vías biliares hasta alcanzar su estado adulto. El grado de infección depende de la cantidad de especímenes adultos que se alojen en las vías biliares, por lo que el hallazgo de huevos en heces está en función del número de parásitos y de la cantidad de huevos que expulse éste.

La principal ventaja de las técnicas de concentración para el examen de parásitos intestinales es su sensibilidad para detectar infecciones leves. La TSR modificada por Lumbreras tiene mayor sensibilidad que la TSE y MCEF, siendo este estudio un avance en comparar métodos coproparasitológicos que nos proporcionen resultados más confiables y de menor costo en el diagnóstico de esta distomatosis. En TSR se utiliza una mayor cantidad de muestras (4-8g) lo que explicaría su mayor rendimiento en comparación con TSE y MCEF donde se utiliza entre 1-2g de heces. Además en aquellos individuos que eliminen una menor cantidad de huevos, analizando una mayor proporción de muestra permitiría detectar un mayor número de casos. Si bien TSR es considerada como un método coprológico de elección en pacientes con sospecha de fasciolosis, también detecta helmintos y protozoarios aunque en menor proporción que la TSE (1).

Dentro de la evaluación de los exámenes serológicos, la sensibilidad del Arco 2 fue menor que Western blot y Fas2-ELISA. Esto se explica porque el Arco 2 está compuesto por un mosaico complejo de antígenos con pesos moleculares que varían entre 14 y 43KDa (5). Por otro lado, el antígeno Fas2 de 25KDa forma parte de este mosaico y es considerada como un antígeno inmunodominante en la infección por Fasciola hepática (5) la que utilizada en pruebas inmunoenzimáticas ofrece una mayor sensibilidad y especificidad tanto para el diagnóstico de las fases aguda y crónica. Así, de los 31 pacientes que fueron positivos al examen coprológico, 30 resultaron ser seropositivos para Fas2-ELISA. Esto indica la alta sensibilidad que tiene esta prueba en el diagnóstico de la fasciolosis humana, infección que en muchas ocasiones no es diagnosticada ya que además de ser necesarios exámenes coprológicos repetidos para detectar huevos de F. hepática en heces debido a la ovoposición intermitente del parásito, en muchos casos, nunca se llegan a detectarlos. De esta manera, parte de

los pacientes que fueron seropositivos con Fas2-ELISA y resultaron negativos a los 3 exámenes coprológicos, podrían estar en la fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, para establecer que este grupo de individuos (Categoría 2) está en fase aguda, es necesario realizar exámenes clínicos adicionales como recuento leucocitario (eosinofilia) o pruebas de función hepática que permitan acercarnos al diagnóstico. Asimismo, es importante tener en cuenta la posibilidad de que los pacientes de esta categoría, presenten una fasciolosis extrahepática, aunque este tipo de presentación no es habitual. En la Categoría 3 no podemos determinar la fase de la enfermedad debido a que no se recolectaron muestras de heces.

La menor sensibilidad del Western blot en comparación con Fas2-ELISA, podría explicarse debido a que las bandas diagnósticas pueden presentar menor intensidad en individuos con bajos niveles de anticuerpos circulantes. Consideramos que esta prueba puede obtener mejores resultados empleando antígenos purificados y aumentando su concentración.

El cálculo de la especificidad de las pruebas serológicas en este caso es inapropiado, ya que el gold standard que se ha considerado es el hallazgo de huevos de Fasciola hepática en heces, característico de la fase crónica. Por este motivo, aquellos pacientes con serología positiva pero con resultados negativo al examen coprológico (sospecha de fase aguda), no estarían siendo incluidos dentro del número de individuos catalogados como enfermos porque podría tratarse de un falso positivo.

Los sujetos incluidos en la Categoría 2 deben ser seguidos con exámenes de heces repetidos por un periodo de 2 a 3 meses en búsqueda de huevos de F. hepática, para determinar si la serología positiva se trató de un caso de fasciolosis aguda. De esta manera evaluaríamos la especificidad de la serología.

Sólo un individuo presentó Fas2-ELISA negativo con examen coprológico positivo. Este caso podría explicarse por la costumbre que tienen algunos pobladores de ingerir hígado crudo infestado por F. hepática. Sin embargo, el Western blot resultó positivo, lo que nos indicaría que este paciente presenta la enfermedad, tratándose de un falso negativo.

En base a nuestros resultados, la TSR modificada por Lumbreras es el examen coprológico de elección para diagnosticar esta parasitosis en la fase crónica, siendo superior al MCEF y la TSE en cuanto a su sencillez, costo y reproducibilidad.

Este es el primer estudio en que se ha evaluado Fas2-

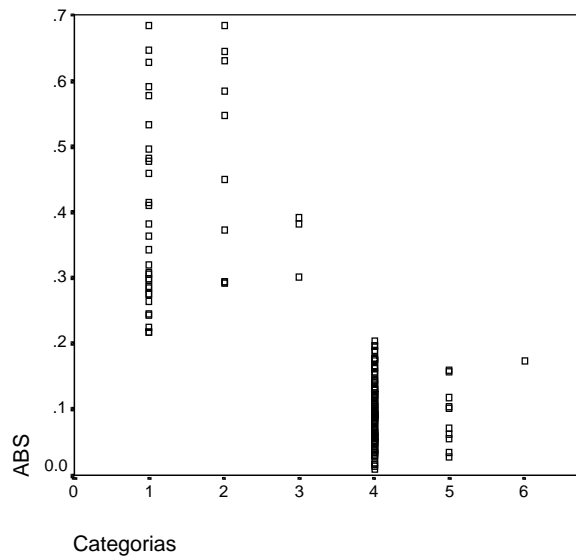


Figura Nº1. Resultados del Fas2-ELISA en sueros de 158 personas.

Los puntos representan la absorbancia media 450 nm (Abs 450 nm) obtenidos del total de sueros examinados. Se consideró positivo aquel valor de absorbancia > 0.200 nm.

Categoría 1 (n=30), aquellos con exámenes coprológico y serológico positivos.
 Categoría 2 (n=10), aquellos con examen coprológico negativo y serológico positivo.
 Categoría 3 (n=3), aquellos que no tuvieron muestras de heces y fueron al examen serológico positivo.
 Categoría 4 (n=104) aquellos que fueron a los exámenes coprológico y serológico negativos.
 Categoría 5 (n=10) aquellos que no tuvieron muestra de heces y que fueron al examen serológico negativo.
 Categoría 6 (n=1) aquel que fue al examen coprológico positivo y serológico negativo.

ELISA con otros métodos serológicos y coprológicos en zonas de alta endemicidad. Estudios previos han demostrado que Fas2 es un marcador antigénico altamente sensible y específico para el diagnóstico de la infección por *Fasciola hepatica* en humanos (5,6), en vacunos (3) y en alpacas (19).

Finalmente, nuestros resultados nos permiten afirmar que el método serológico como Fas2-ELISA podría ser empleado como prueba de tamizaje para determinar zonas endémicas en estudios epidemiológicos posteriores.

Agradecimientos:

Agradecemos al Dr. Eduardo Nicoletti, Director del Hospital Domingo Olabegoya (HDO) de Jauja, al Dr. Pedro Martínez, Subdirector del HDO y a los Sres. Fernando Robles Sánchez y Ronald Pedro Vila Barrios del Puesto de Salud CLAS, Julcán, por su apoyo técnico. A Rosa Castillo y Reyda Tejones por su apoyo en el procesamiento de las muestras de suero. Al grupo de estudiantes de la Facultad de Medicina Alberto Hurtado de la UPCH y a todo los pobladores de los distrito de Huertas y Julcan, sin cuya colaboración no se hubiese podido realizar este estudio.

Este estudio fue autofinanciado por los autores, la Unidad de Biología Molecular, el Laboratorio de Apoyo

de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y por el Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Lima, Perú.

Los autores dedican este estudio a la memoria del Dr. Hugo Lumbreras cuyo legado mantiene vivo el espíritu por la investigación.

Correspondencia:

Eduardo Gotuzzo Herencia
 Instituto de Medicina Tropical "Alexander Von Humboldt". Hospital Nacional Cayetano Heredia. Av. Honorio Delgado s/n Urb. Ingeniería, San Martín de Porres, Lima 31-Perú.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alvarez-Bianchi H. Parasitosis intestinal. Aspectos diagnósticos. *Revista de gastroenterología del Perú* 1984; 4:113-116.
2. Bjorland J, Bryan RT, Strauss W, Hillyer G, McAuley JB. An Outbreak of Acute Fascioliasis Among Aymara Indians in the Bolivian Altiplano. *Clinical Infectious Diseases* 1995; 21: 1228-33.
3. Chavarry E, Espinoza JR, 2001. Immunodiagnosis of bovine fasciolosis by Fas2-ELISA. In preparation.
4. Chen MG, Mott KE. Progress in Assessment of Morbidity Due to *Fasciola hepatica* Infection: A Review of Recent Literature. *Tropical Diseases Bulletin* 1990; 87(4) (suppl): R1-R38.
5. Córdova M, Herrera P, Nopo L, Bellatin J, Náquira C, Guerra H, Espinoza J. *Fasciola hepatica* cysteine proteinases: immunodominant antigens in human fascioliasis. *The American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 1997; 57(6): 660-666.
6. Córdova M, Reátegui L, Espinoza J. Immunodiagnosis of human fascioliasis with *Fasciola hepatica* cysteine proteinases. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1999; 93:54-57.
7. Esteban JG, Flores A, Angles R, Mas-Coma MS. High endemicity of human fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz valley, Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1999; 93: 151-156.
8. Farfán G, Saona P. Ictericia obstructiva durante la gestación, Estudio clínico de 70 casos. *Revista de gastroenterología del Perú* 1987; 7:178-186.
9. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Laboratory Methods for Diagnosis of Parasitic Infections. In: Bailey & Scott's *Diagnostic Microbiology*, Tenth Edition. Mosby, Inc., 1998. pp:859-860.
10. Hillyer GV, Soler de Galanes M, Rodríguez PJ, Bjorland J, Silva de Lagrava M, Ramirez GS, Bryan RT. Use of the Falcon(Assay Screening Test-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (FAST-ELISA) and the Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot (EITB) to Determine the Prevalence of Human Fascioliasis in the Bolivian Altiplano. *The American Journal of Tropical Medicine*

- and Hygiene 1992; 46(5):603-609.
11. Kianman W, Pérez J, Palacios GD. Ictericia obstructiva por *Fasciola hepatica*. Boletín Sociedad Peruana de Medicina Interna 1996; 9:151-153.
 12. Lumbreras H, Cantella R, Burga R. Acerca de un procedimiento de sedimentación rápida para investigar huevos de *Fasciola hepatica* en las heces, su evaluación y uso en el campo. Revista Médica Peruana 1962; 31(332):167-174.
 13. Mas-Coma MS, Esteban JG, Barguez MD. Epidemiología de la fascioliasis humana: revisión y propuesta de nueva clasificación. Bulletin of the World Health Organization 1999; 77(4): 340-346.
 14. Millan JC, Martinez R, Lazo O, Perez J, Mustelie AM. Síndrome similar a larva migrans visceral en el curso de la fascioliasis hepática. Revista Cubana de Medicina Tropical 1985; 37(1): 26-29.
 15. Náquira C, Náquira F, Aleman C, Angulo W, Arias J, Cano P, Honorio J, Saucedo R, Segami M. Distomatosis hepática humana en dos localidades del valle del río Mantaro. Revista Peruana de Medicina Tropical. 1972; 1 (1): 33-37.
 16. Náquira C. Fasciolosis. Diagnóstico 2000; 39(4): 187-188.
 17. Náquira-Velarde F. Diagnóstico de Fascioliasis. Boletín Peruano de Parasitología 1995; 11: 93.
 18. Náquira-Vildoso F, Marcial-Rojas RA. Fascioliasis. Marcial-Rojas, ed. Pathology of protozoal and helminthic diseases with Clinical Correlation. New York: Krieger Publishing Co., 1975. pp: 477-489.
 19. Neyra V, Chavarry E, Espinoza JR, 2001. Cysteine proteinases Fas1 and Fas2 are diagnostic markers for *Fasciola hepatica* infection in alpacas (*Lama pacos*). Submitted to Veterinary Parasitology.
 20. O'Neill S, Parkinson M, Dowd A, Strauss W, Angles R, Dalton J. Short report: immunodiagnosis of human fascioliasis using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L1 cysteine proteinase. The American Journal of Tropical Medicine & Hygiene 1999; 60(5):749-751.
 21. Picoaga J, Lopera J, Montes J. Fascioliasis en Arequipa. Boletín Peruano de Parasitología 1980; 2(1-2):1-11.
 22. Stork MG, Venables GS, Jennings SMF, Beesley JR, Bendezu P, Capron A. An investigation of endemic fascioliasis in Peruvian village children. Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1973; 76: 231-235.
 23. Tello R, Canales M. Técnicas de diagnóstico de enfermedades causadas por enteroparásitos. Diagnóstico 2000; 39(4): 197-198.
 24. Tsang V, Brand J. An Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot Assay and Glycoprotein antigens for diagnosing human Cysticercosis (*Taenia solium*). Journal of Infectious Disease 1989; 159:50-59.
 25. Vera L, Tello R, Terashima A, Alvarez H. Evaluación en campo de la técnica de sedimentación espontánea (TSE) para el diagnóstico de enteroparásitos. Revista Médica Herediana 1996; 7 (1),50.
 26. Vilca A. Fascioliasis en Vesícula y Vias Biliares en el Hospital Regional del Cusco durante 16 años. Revista de Gastroenterología del Perú 1982; 2:113-117.
 27. Vilchez M, Vildosola H, Martota H, Rios H, Palomino M, Anemia Severa y Fascioliasis Crónica. Revista de Gastroenterología del Perú 1983; 2:161-168.
 28. Wanchai M, Chaisiri W, Pewpan I, Vichit P. *Fasciola gigantica*-specific antigens: Purification by a continuous-elution method and its evaluation for the diagnosis of human fascioliasis. The American Journal of Tropical Medicine & Hygiene 1999; 61(4):648-651.
 29. Young KH, Bullock SL, Melvin DM, Spruill CL. Ethyl Acetate as a Substitute for Diethyl Ether in Formalin-Ether Sedimentation Technique. Journal of Clinical Microbiology 1979; 10(6): 852-853.