

## Descripción de una técnica de sedimentación y tinción con azul de metileno (y de una variante) para el diagnóstico

Vet. Arg. ? Vol. XXXII ? Nº 327 ? Julio 2015.

Viñabal, A.E.1, Cafrune, M.M.1, Aguirre D.H.1, Bassanetti, A.F.1., Bertoni, E.A.1, Suárez, V.H.1

### Resumen

La fasciolosis es uno de los mayores problemas sanitarios de origen parasitario en los rumiantes del Noroeste argentino. Varias de las técnicas diagnósticas coprológicas para *Fasciola hepatica* adolecen de poca sensibilidad, de ser muy complejas e insumir mucho tiempo. Esta comunicación describe y evalúa dos métodos coprológicos alternativos para el diagnóstico de *F. hepatica* mediante su comparación con otras técnicas previamente descritas. El primero de ellos, denominado de sedimentación y tinción con Azul de Metileno (SAM) es de fácil lectura y al no emplear sales saturadas, está libre del inconveniente de deformar los huevos de *F. hepatica* en forma prematura. Este método reduce los sedimentos a través de sucesivos tamizados y contrasta claramente los huevos no teñidos (de color amarillento) con el resto de los detritos teñidos de azul. El segundo método, una variante del SAM, llamado de "recupero del Mc Master" (RMM), sigue los pasos del primero pero partiendo de material recuperado del sobrante del diagnóstico del recuento de huevos por gramo. El recupero tiene la ventaja de permitir un diagnóstico coprológico completo cuando las heces recibidas son de escaso volumen, hecho habitual en pequeños rumiantes. El resultado de ambos métodos es cuantitativo y hace referencia al número de huevos de *F. hepatica* por gramo de heces. Para evaluarlos se los comparó con tres técnicas de sedimentación como la de Dennis *et al.* (1954) descrita por el CICV del INTA Castelar (CICV), la misma técnica modificada por el Laboratorio de Servicio de Lucha Sanitaria (SELSA) y la técnica utilizada por el Laboratorio de Parasitología de la EEA-Bariloche. Se procesaron muestras individuales de heces provenientes de 29 animales (bovinos, ovinos y caprinos) de rebaños infestados con *F. hepatica*. Los resultados se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Con las técnicas propuestas el promedio de huevos de *F. hepática* por gramo (Fpg) contados con SAM (Fpg= 30,06) y RMM (Fpg= 27,59) fueron mayores ( $p < 0,001$ ) que los registrados con las de CICV (Fpg= 1,88) y SELSA (Fpg= 2,29). La comparación de los resultados del análisis con SAM (Fpg= 28,0) y la técnica de la EEA Bariloche (Fpg= 19,10) no mostró diferencias significativas ( $p < 0,17$ ). Estos resultados muestran una muy buena sensibilidad de los dos métodos propuestos, además de otras ventajas sobre las restantes técnicas evaluadas.

*Palabras clave: Fasciola hepatica, diagnóstico coprológico, rumiantes.*

### **Proposal and evaluation of a sedimentation and methylene blue staining technique (and a variant) for the diagnosis of *Fasciola hepatica*.**

#### Summary

Fasciolosis is one of the major parasitic health problems in ruminants in northwestern Argentina. Several coprological techniques for the diagnosis of *Fasciola hepatica* are characterized by being of low sensitivity, highly complex and time-consuming. The present work describes and evaluates two alternative coprological methods for the diagnosis of *F. hepatica* by comparing them with other previously described techniques. One of them, denominated sedimentation and staining with methylene blue (SMB) is easy to visualize and does not distort the *F. hepatica* eggs prematurely because it does not require the use of saturated salts. This method reduces the sediments through repeated sieving and provides a clear contrast of non-stained eggs (yellowish) from the remaining blue-stained detritus. The other method, a variant of SMB, called "recovery from McMaster" (RMM), includes the steps of SMB but using the material recovered from the material remaining from egg counts per gram. The recovery has the advantage of allowing a complete coprological diagnosis when a small volume of feces is evaluated, which is typical in small ruminants. Both methods yield quantitative results and provide the number of *F. hepatica* eggs per feces gram. The methods were compared using three sedimentation techniques: that of Dennis et al. (1954) described by CICV from INTA Castelar (CICV), the same technique modified by the Laboratorio de Servicio de Lucha Sanitaria (SELSA) and the technique used by the Laboratorio de Parasitología at EEA-Bariloche. Fecal samples from 29 animals (cattle, sheep and goat) from herds infested with *F. hepatica* were individually processed. Results were analyzed using the non-parametric Kruskal Wallis test. Mean eggs of *F. hepatica* per gram (Fpg) counted with SMB (Fpg= 30.06) and RMM (Fpg= 27.59) were higher ( $p < 0.001$ ) than those recorded with CICV (Fpg= 1.88) and SELSA (Fpg= 2.29). No significant differences ( $p < 0.17$ ) were detected by comparing the results of SMB analysis (Fpg= 28.0) and that of EEA Bariloche (Fpg= 19.10). The present results show a very good sensitivity of the two proposed methods, as well as other advantages over the remaining evaluated techniques.

Keywords: *Fasciola hepatica*, coprological diagnosis, ruminants.

1Área de Investigación en Salud Animal-IIACS-CIAP, con sede en INTA Salta, CC 228, Cerrillos, 4400, Salta. Correo electrónico: \_\_\_\_\_

adquiere importancia económica regional no solo para las empresas comerciales, sino también para los medianos y pequeños productores. En los últimos años numerosos ganaderos incorporaron diversas tecnologías en sus hatos pero muchos siguen padeciendo limitantes productivas como, por ejemplo, severos problemas sanitarios. Entre estos, las parasitosis gastrointestinales (Suárez *et al.*, 2013) y, en particular, la fasciolosis, causan pérdidas económicas considerables en distintas zonas agroecológicas del NOA (Dwinger *et al.*, 1982; Aguirre *et al.*, 2005). La fasciolosis hepática es causada por el trematode *Fasciola hepatica*, que afecta sobre todo a los pequeños rumiantes, así como a los bovinos pero también a un gran número de animales domésticos y silvestres y al hombre (Mera y Sierra *et al.*, 2011). En el NOA se presenta en variedad de biotopos, como áreas inundables, zonas deprimidas (ciénagos) y a lo largo de cursos de agua o acequias para riego donde proliferan los caracoles del género *Lymnaea*, hospedadores intermediarios del trematode (Dwinger *et al.*, 1982; Cafrune *et al.*, 1996a, 1996b; Aguirre *et al.*, 2005, Grossberger *et al.*, 2013).

El diagnóstico de fasciolosis en el ganado se realiza generalmente en base a una anamnesis previa, la signología clínica y el hallazgo de trematodes en las vías biliares durante la necropsia de animales muertos o sacrificados. El diagnóstico de laboratorio se sustenta en el empleo de técnicas específicas, que pueden ser directas o indirectas (Euzéby, 1981). Las primeras se basan en la observación de huevos en las heces por microscopía durante la etapa crónica de la infestación y solo resultan positivas cuando existe una parasitación por formas adultas del trematode. Las técnicas indirectas inmunoenzimáticas como la de ELISA se basan en detectar coproantígenos de *F. hepática* en heces por medio de un anticuerpo monoclonal específico y permiten la detección de antígenos del trematode durante la fase aguda de la infestación por formas juveniles de *F. hepatica* que migran a través del tejido hepático.

Las técnicas tradicionales de observación de huevos de *F. hepática* en heces varían en algunos aspectos metodológicos pero básicamente son de sedimentación, flotación, o combinadas de sedimentación ? flotación y todas adolecen de problemas como su baja sensibilidad (probabilidad de clasificar correctamente a un individuo parasitado) o su complejidad y/o tiempos prolongados para concretarlas. En el primero de los casos, algunas técnicas tienen una limitada capacidad para detectar animales positivos, dando muchos falsos negativos y en otros casos su complejidad o el tipo de sales empleadas pueden llevar a variaciones en el diagnóstico.

Este trabajo propone el empleo de una técnica basada únicamente en la sedimentación y tinción con Azul de Metileno (SAM) que, al no utilizar sales

saturadas, no deforma ni destruye prematuramente los huevos de *F. hepática* en caso de demora en la lectura. Por otra parte, las muestras recibidas en el laboratorio para análisis coprológico, usualmente conteo de huevos por gramo (hpg) según técnica de Mc Master modificada por Robert y O`Sullivan (1949), suelen ser de volumen insuficiente -particularmente cuando provienen de pequeños rumiantes- para realizar otros diagnósticos, como el de *F. hepatica*. Para solucionar este problema y lograr un diagnóstico coprológico completo se elaboró un método para recuperar el material usado en el hpg, que se denominó como de "recupero del Mc Master" (RMM).

El objetivo de esta comunicación es describir y evaluar estas dos metodologías (SAM y RMM) mediante su comparación con otras técnicas ya descritas para el diagnóstico de *F. hepatica*.

### **Materiales y métodos**

La técnica propuesta denominada método de sedimentación con Azul de Metileno (SAM), modificada a partir de Telemann (1908), Benedek (1943) y Willmott y Pester (1952) busca liberar al máximo la muestra de restos de vegetales, que son los que dificultan visualizar y contar los huevos de *F. hepatica*, originando fallas en el diagnóstico. Además, para facilitar la lectura, los restos vegetales se tiñen con Azul de Metileno logrando un neto contraste entre el azul oscuro del sedimento y los huevos, que permanecen de color amarillento porque no se tiñen. Mediante la recuperación de un número conocido de huevos de *F. hepatica* tras 1, 2 y 3 minutos de decantación en columnas de agua de 25 y 40 mm de altura, se evaluó el tiempo de precipitado, concluyéndose que el óptimo es de 3 minutos, ya que tiempos superiores producen un decantado más sucio y de difícil lectura.

La técnica de SAM consta de los siguientes pasos:

1. Se pesan 3 g de materia fecal.
2. Se tritura en mortero agregando agua hasta 80 ml.
3. Se tamiza con colador común de té, volcando el contenido en frasco homogeneizador con una tapa con malla tamiz de 240  $\mu$  de apertura.
4. Se vierte el contenido en una copa concentradora a través de un tamiz de 180  $\mu$ , agregando agua hasta 250 ml.
5. Se deja reposar 3 minutos.
6. Se descartan 125 ml del sobrenadante y se vuelve a completar los 250 ml con agua limpia.
7. Se deja reposar 3 minutos.
8. Cuando el sedimento es muy denso se debe lavar nuevamente con

- agua limpia repitiendo los pasos e y f.
9. Luego se descartan 125 ml de sobrenadante.
  10. Se agita el sedimento, para luego pasar tamizado mediante (malla de 150  $\mu$ ) el contenido a un frasco homogeneizador completando con agua hasta los 150 ml.
  11. Se homogeniza bien, para verter un tercio en un tubo de 50 cm de capacidad.
  12. De deja decantar durante 3 minutos.
  13. Se descarta el total del sobrenadante (aprox. 45 cm) mediante sifonado y con pipeta Pasteur descartar con cuidado el total del sobrenadante.
  14. Se agregan 2 gotas de Azul Metileno, dejar reposar 3 minutos.
  15. Se agregan 2 ml de agua, se remueve con pipeta Pasteur para luego cargarla cámara de lectura.
  16. Se lee al microscopio.

La metodología del "recupero de Mc Master" (RMM) basada en material excedente de la técnica del hpg, se realiza de la siguiente manera:

1. Una vez efectuado el hpg, se deja reposar el material restante (57,5 ml) entre 1 y 2 horas.
2. Se filtra luego ese material a través de un tamiz de 180  $\mu$ , lavando el tamiz y recuperando la muestra en una copa de concentración hasta completar 250 ml.
3. Se agita el sedimento con una espátula y se deja reposar 10 min.
4. Se descartan 100 ml de sobrenadante y se repone agua nuevamente hasta completar 250 ml.
5. Se agita el sedimento con una espátula y se deja reposar 6 min.
6. Se deja sedimentar y luego se descartan 125 ml y agregar nuevamente agua hasta 250 ml.
7. Se agita el sedimento con una espátula nuevamente y se dejar reposar 3 min.
8. Se descarta cuidadosamente el sobrenadante (200 ml) mediante sifonado.

Luego se debe continuar con el procedimiento siguiendo los pasos antes descriptos desde **j** hasta **p** de la técnica SAM)

Ambas técnicas son cuantitativas porque examinan el total del precipitado final que corresponde a un tercio del material procesado (3 g en 150 ml), o sea un gramo de heces. Por ende, los resultados refieren al número de huevos de *F. hepatica* por gramo de heces.

Para evaluar estas técnicas se las cotejó con tres técnicas de sedimentación: 1) la de Dennis *et al.* (1954) descripta por el CICV de INTA Castelar (Anónimo, 1982), 2) la misma técnica modificada por el Laboratorio del Servicio de Lucha Sanitaria (SELSA) (Anónimo, 1972) y 3) la utilizada por el Laboratorio de Parasitología de la EEA-Bariloche (Fiel *et al.*, 2011). La eficacia de las técnicas SAM y RMM se evaluó comparando los resultados obtenidos tras procesar las mismas muestras de heces con cada una de estas diferentes técnicas. Se emplearon muestras individuales de 26 animales (bovinos, ovinos y caprinos) provenientes de hatos ubicados en inmediaciones de Campo Quijano, departamento Rosario de Lerma (24°59' S, 65° 35' W), provincia de Salta, zona en la que previamente se había diagnosticado *F. hepatica* en el ganado. Se realizaron dos series de comparaciones; en la primera (n = 17) se contrastaron las técnicas SAM y RMM con las del CICV y de SELSA, mientras que en la segunda (n = 12) se cotejó la técnica SAM con la de la EEA Bariloche. Dado que los datos de las cuentas de huevos de helmintos no tienen una distribución normal, los resultados se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, empleando el programa INFO STAT (Di Rienzo *et al.*, 2008). Adicionalmente se registraron los tiempos necesarios para la preparación y la lectura de las muestras por la técnica SAM.

## Resultados y discusión

El Cuadro 1 muestra los resultados de la primera serie de comparaciones, donde se observa que las técnicas SAM y RMM tuvieron resultados similares, mostrando una eficacia muy superior y estadísticamente significativa ( $P < 0,001$ ) en relación con las otras dos técnicas evaluadas (CICV y SELSA). Cuadro 1.

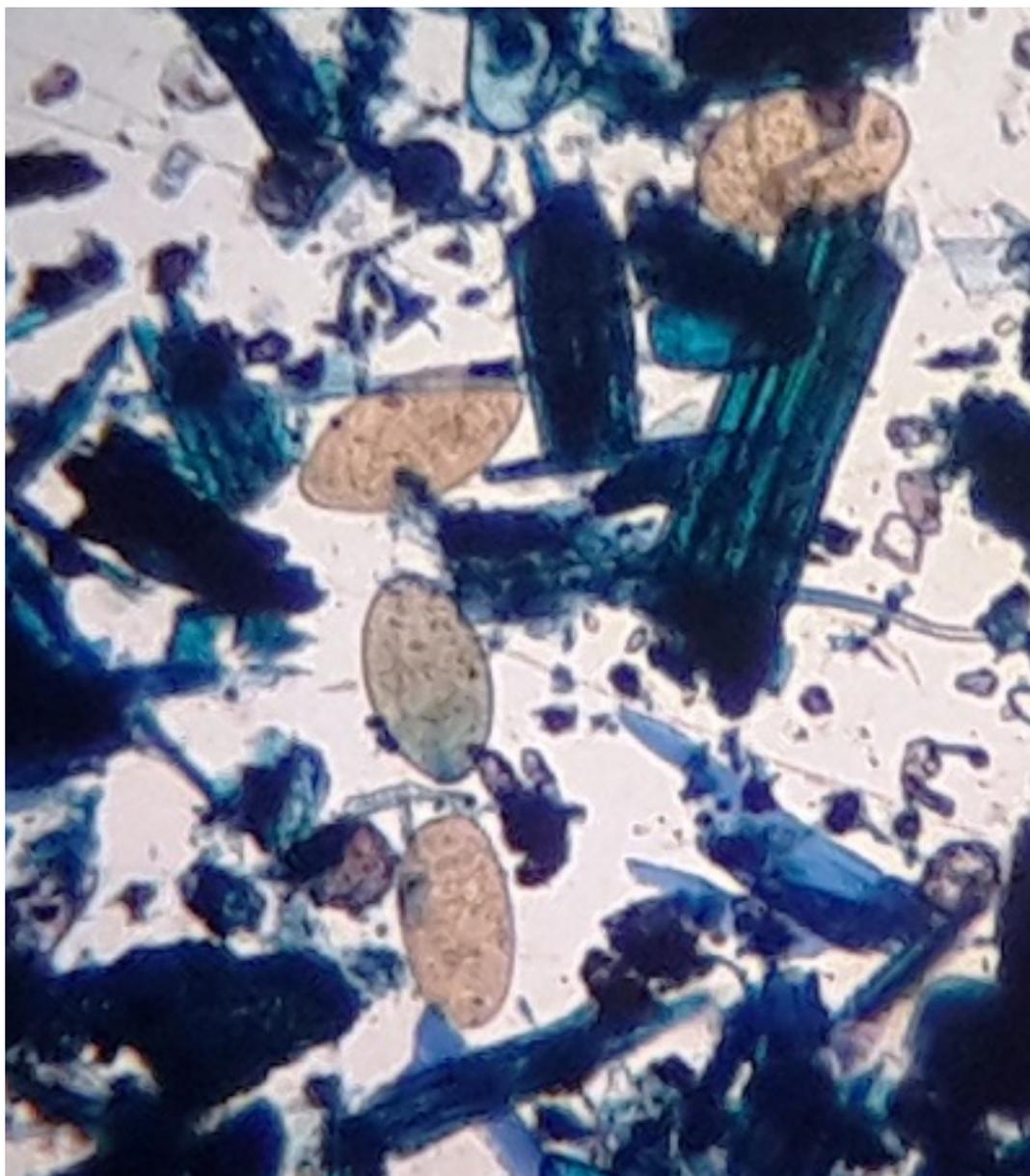
Técnica	n	Media	Desvío estándar	Mediana	Valores extremos	P
SELSA	17	<b>1,88</b>	4,24	1	0-17	< 0,0001
CICV	17	<b>2,29</b>	4,79	0	0-18	
SAM	17	<b>30,06</b>	44,97	8	0-160	
RMM	17	<b>27,59</b>	45,3	15	0-149	

**Cuadro 1:** Valores obtenidos a partir del análisis de los resultados para cuatro técnicas diagnósticas, expresados como número medio de huevos de *Fasciola hepatica* por gramo de heces. De las 17 muestras analizadas en esta serie, una

sola resultó negativa con las cuatro técnicas, mientras que las restantes (n = 16) fueron positivas para las técnicas de SAM y RMM. Contrariamente con las técnicas del CICV y SELSA se obtuvieron respectivamente 10 y 7 muestras negativas, corroborando la menor sensibilidad (falsos negativos) de estas dos técnicas. Por otro lado, la comparación entre la técnica SAM y la de la EEA Bariloche no mostró diferencias significativas (Cuadro 2), aunque la primera tuvo un mejor desempeño.

Técnica	n	Media	Desvío estándar	Mediana	Valores extremos	P
EEA Bariloche	12	<b>19,1</b>	14,71	26	may-36	< 0,169
SAM	12	<b>28</b>	10,5	20	jul-47	

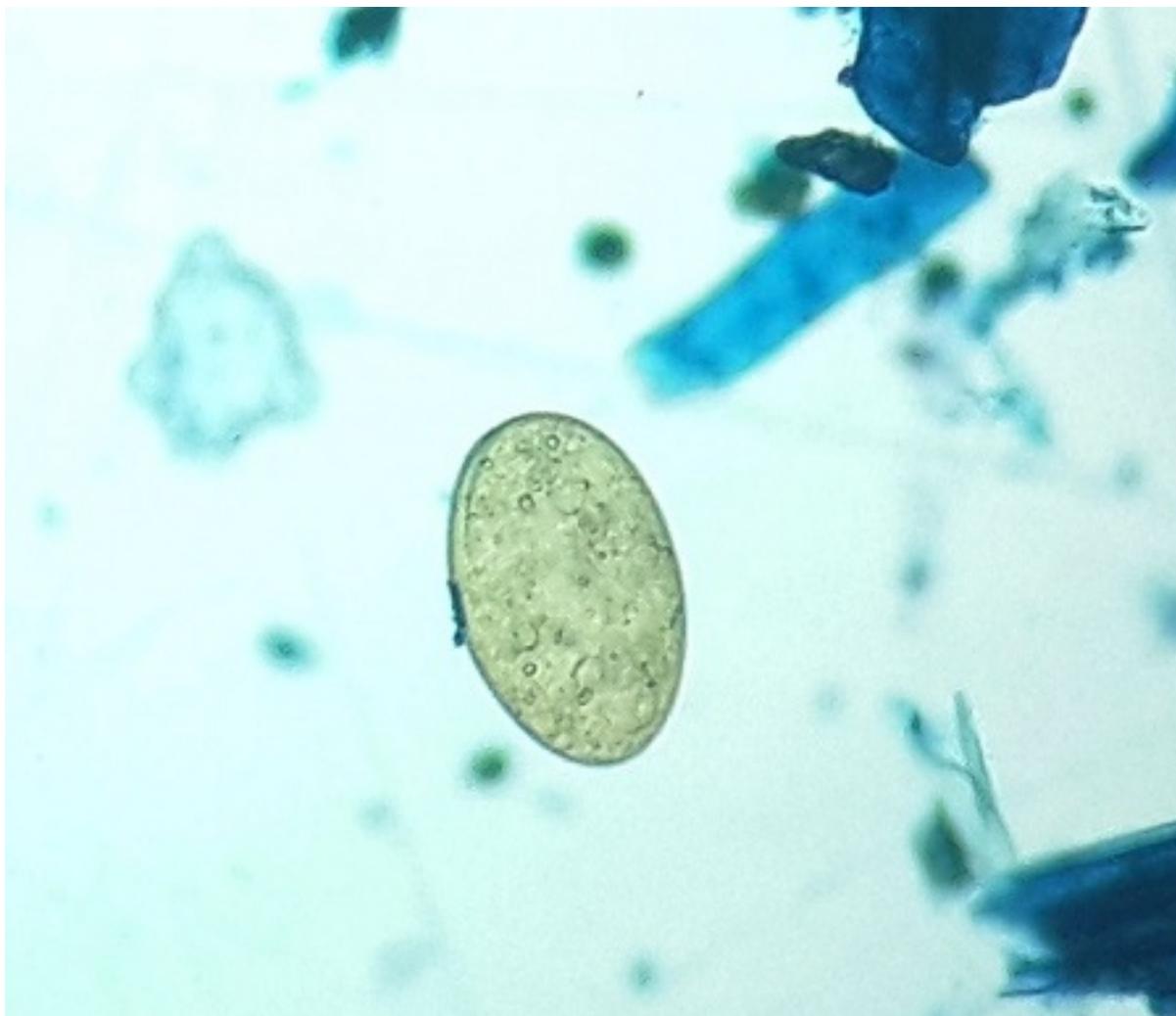
**Cuadro 2:** Valores obtenidos a partir del análisis de los resultados para dos técnicas diagnósticas, expresados como número medio de huevos de *Fasciola hepatica* por gramo de heces. En resumen, los resultados evidenciaron la buena sensibilidad de la técnica propuesta de SAM y de su variante RMM, sin hallazgo de falsos negativos, aunque esto no puede ser probado por dificultades de diseño. Por otra parte, el tiempo medio que insumió la técnica SAM fue de alrededor de 15 min de preparación y 6 min de lectura por cada muestra procesada. Los breves tiempos de lectura de la SAM, se explican sobre todo por la más rápida identificación de los huevos de *F. hepatica*, resultante de su marcado contraste con los restos vegetales teñidos de azul.



Una ventaja adicional de la técnica de RMM es que tras el lavado de la sal (CINa) empleada para el diagnóstico de nematodos (hpg) permite aprovechar el material sobrante para el diagnóstico de *F. hepatica*, conservando la sensibilidad dado que no hubo diferencias con la técnica SAM (Cuadro 1). Esto es particularmente útil para la coprología de pequeños rumiantes, en los que no siempre el volumen de heces disponible resulta suficiente para realizar ambos diagnósticos en forma separada, sin contar la necesidad de material adicional para preparar coprocultivos.

Los huevos de *F. hepatica* no sufren deterioro cuando son procesados por las técnicas SAM y RMM, lo cual es ventajoso respecto de otras empleadas previamente como la técnica de sedimentación-flotación (Viñabal y Aguirre, 1992) que, a pesar de su buena sensibilidad, presenta el inconveniente de que la alta densidad (1500 g/cm<sup>3</sup>) de las sales de ClZn utilizadas dañan los huevos de *F.*

*hepatica* en un breve lapso, dificultando la lectura de las muestras. Por otra parte, la técnica de la EEA Bariloche exhibió resultados similares a la SAM, pero con la desventaja de los tiempos más prolongados que implican la preparación y lectura de las muestras.



Otras ventajas de la técnica SAM: a) que es cuantitativa, posibilitando estimar la intensidad de la infestación por *F. hepatica* en los hatos; b) que tiene muy bajo costo en drogas, sólo el colorante, aparte de la inversión inicial de los materiales tales como tamices, recipientes, etc. y el microscopio; c) que permite recuperar y determinar la presencia de otros huevos más pequeños como los de *Trichuris*, *Nematodirus*, *Lamanema*, etc.; d) que el tamizado con malla de 150  $\mu$  de apertura no interfiere en el pasaje de los huevos de *F. hepatica*, que miden 130-140  $\mu$  de largo por 70-90 de ancho, pero impediría parcialmente el pasaje de huevos de *Paramphistomum* (trematode del rumen de los rumiantes), similares a los de *F. hepatica*, pero de mayor tamaño (155-162 x 75-90  $\mu$ ). Los resultados obtenidos muestran una muy buena sensibilidad de la técnica propuesta y se su variante además de ventajas adicionales sobre las otras técnicas evaluadas.

## Bibliografía

Aguirre, D.H.; Cafrune, M.M.; Salatin, A.O.; Abeyá, A.A.(2005). Fasciolosis clínica en cabras de Metán, Salta, Argentina. Rev. FAVE ?Ciencias Veterinarias 4 (1-2): 17-21.

Anónimo (1972). Instrucciones y técnicas diagnósticas a utilizarse en relevamientos endoparasitológicos a cargo del Servicio de Luchas Sanitarias. Ed. SELSA, Buenos Aires, 10-12.

Anónimo (1982). Técnicas de necropsia y de laboratorios aplicadas en el Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. Ed. CICV INTA Castelar, Bs. As., p. 37

Benedek, L. (1943). Untersuchungen auf Leberegeleierdurch Sedimentation. Magyar AllatorvosokLapja 66, 139-141.

Cafrune, M.M; Rebuffi, G.E.; Gaido, A.B.; Aguirre, D.H. (1996a). *Fasciola hepatica* in semicaptive vicuñas (*Vicugna vicugna*) in northwest Argentina. Vet. Rec. 139: 97

Cafrune, M.M.; Rebuffi, G.E.; Cabrera, R.H.; Aguirre, D.H. (1996b). *Fasciolahepatica* en llamas (*Lamaglama*) de la Puna argentina. Vet. Arg. 13: 570-574.

Dennis, W.R.; Stone, W.M.; Swanson, L. E.(1954).A new laboratory and field diagnostic test for fluke ova in faeces. J. Am.Vet.Med.Assoc. 124: 47-50.

Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.;Balzarini, M.G.;Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Dwinger, R.H.; Le Riche, P.D.; Kühne, G.I.(1982). Fasciolosis in beef cattle in northwest Argentina. Trop. Anim. Health Prod. 14: 167-171.

Euzeby, J. (1981). Diagnostic Experimental des HelminthosesAnimales.Tomo 1, Edition de Informations techniques des Services Vétérinaires- Ministère de Agriculture, Paris, 344 p.

Fiel, C.A.; Steffan, P.E.;Ferreyra, D.A.(2011).Técnicas de sedimentación para el diagnóstico coprológico de *Fasciolahepática*. En: Diagnóstico de las parasitosis más frecuentes de los rumiantes. F. Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil, 113-119 pp.

Grossberger, G.; Viñabal, A.E.; Cafrune, M.M.; Suárez, V.H.; Aguirre, D.H. (2013). Evaluación coprológica de nematodiasis gastrointestinales y fasciolosis en pequeños rumiantes de la Quebrada del Toro, Salta. 36º Cong. Arg. Prod. Anim., Corrientes, octubre 2013, p. 36.

Mera y Sierra, R., Agramunt, V.H., Cuervo, P., Mas-Coma, S. (2011). Human fascioliasis in Argentina: retrospective overview, critical analysis and baseline for future research. *Parasites & Vectors*, 4: 104.

Roberts, F.H.S.; O'Sullivan, P.J. (1949). Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Aust. J. Agric. Res.* 1: 99-102.

Suárez, V.H.; Fondraz, M.; Viñabal, A.E.; Martínez, G.M.; Salatin, A.O. (2013). Epidemiología de los nematodos gastrointestinales en caprinos lecheros en los valles templados del NOA, Argentina. *RIA*, 39, 2: 191-197.

*Telemann, W. (1908). Eine Methode zur Erleichterung der Auffindung der Parasiten-eier in den Faeces. Dtsch. med. Wochenschr. Jg. 34, Bd. 2, S. 1510-1511.*

Viñabal, A.E.; Aguirre, D.H. (1992). Modificación de una técnica coprológica para el diagnóstico de *Fasciola hepatica*. Mem. 8va Reun. Anu. Asoc. Arg. Vet. Lab. Diag. Corrientes, Argentina, p. 64.

Willmott, S.; Pester., F. R. N. (1952). Variations in faecal egg-counts in paramphistome infections as determined by a new technique. *J. Helminth*, 26: 147-156.

---