

## **DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN OVINA POR *F. hepatica* MEDIANTE PCR Y DE LA RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA EN REBAÑOS INFECTADOS DE FORMA NATURAL**

Robles-Pérez, D.<sup>1</sup>, Martínez-Pérez, J.M., Rojo-Vázquez, F.A., Martínez-Valladares, M.

<sup>1</sup>Dpto. de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de León, 24071-León. mmarva@unileon.es

### **INTRODUCCIÓN**

La fasciolosis es una parasitosis de distribución mundial, que limita la producción ovina y bovina con consecuencias tales como pérdida de peso, disminución en el índice de conversión o reducción en la producción láctea.

El método tradicional para confirmar el diagnóstico de la fasciolosis es la demostración de huevos en heces mediante la técnica de sedimentación que es muy específica pero tiene el inconveniente de ser muy poco sensible. Por su parte, las técnicas basadas en la biología molecular son muy sensibles lo que constituye una gran ventaja. Recientemente, Martínez-Pérez *et al.* (2012) han desarrollado una PCR que permite detectar la infección por *Fasciola hepatica* a partir de la tercera semana post-infección (pi) y, mediante PCR anidada, a partir de la segunda semana, utilizando muestras de heces.

Para la detección de resistencias a los antihelmínticos (RA), se han descrito diferentes métodos *in vivo* e *in vitro*. Entre los primeros, destaca el test de reducción fecal de huevos (FECRT), basado en la reducción de huevos en heces después de un tratamiento antihelmíntico (Coles *et al.*, 1992). Respecto a los métodos *in vitro*, existe un test de reducción de coproantígeno (CRT), mediante un ELISA sandwich para la detección de antígenos de *F. hepatica* en heces antes y después de la administración del fármaco antihelmíntico.

Nuestro objetivo ha sido, en primer lugar, desarrollar una PCR basada en la detección del gen ribosomal "internal transcribed spacer 2" (ITS2) para el diagnóstico de la fasciolosis ovina; y, en segundo término, emplear esa técnica para detectar RA en rebaños infectados de forma natural a la vez que comparamos estos resultados con el FECRT y el CRT.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

En este estudio, hemos empleado muestras de ADN fecal procedente de heces de ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica*. Se recogieron heces desde el inicio de la infección hasta la octava semana pi. Así mismo, se emplearon animales infectados de forma natural seleccionados al azar, procedentes de dos rebaños con un historial conocido de fasciolosis, localizados en Santillán de la Vega (SV) (Palencia), y Corullón (CR) (León).

Para el FECRT, las ovejas seleccionadas se dividieron en tres grupos de 7- 9 animales cada uno, que se trataron con albendazol (ABZ), clorsulón (CL) y triclabendazol (TCBZ). Las heces se recogieron de forma individual los días 0, 7, 15 y 30 post-tratamiento (pt) y se analizaron mediante sedimentación. El nivel de resistencia de cada grupo y del rebaño se calculó con la siguiente fórmula: % = [(media hpg día 0 - media hpg día pt)/media hpg día 0] x 100; hpg (huevos por gramo).

De acuerdo con las directrices de la WAAVP para tricostrongídeos (Coles *et al.*, 1992), hay RA cuando el porcentaje de reducción tras el tratamiento es < 90%; cuando está entre 90-95%, se sospecha la resistencia; y, si es > 95% la explotación sería susceptible.

Para la extracción del ADN fecal se emplearon 0,5 g de heces de cada oveja infectada de forma natural en los días 0, 7, 15 y 30 pt, mediante un kit comercial, "SpeedTools Tissue DNA Extraction Kit" (Biotools).

Para llevar a cabo la PCR se utilizó 12,5 µl de Taq DNA polimerasa Master Mix (2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM dNTPs y 0,05 unidades/µl de Taq polimerasa), 0,5 mM de primers y 4 µl de ADN diluido 1/10. Los cebadores se diseñaron en base a la secuencia GQ231547.1 de *F. hepatica* que codifica para la subunidad ITS2. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% TBE.

También se detectó la presencia de coproantígeno en heces en el rebaño SV los días 0, 7, 15 y 30 pt mediante el kit comercial "Bio-X bovine *F. hepatica* antigenic ELISA kit". Se consideraron positivas las muestras con una densidad óptica (DO) con un valor superior a 0,150 medidas a 450 nm.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En nuestro estudio, hemos desarrollado una PCR para determinar la presencia de *F. hepatica* mediante la amplificación de un fragmento de 292 pb del gen ITS2. Mediante esta técnica, hemos podido detectar la infección por *F. hepatica* (infección experimental) a partir de la 2ª semana pi. Estos resultados están en concordancia con los de Martínez-Pérez *et al.* (2012), que también detectaron la infección en heces a la 2ª semana pi, aunque por medio de una PCR-anidada amplificando un fragmento de 423 pb de la oxidasa citocromo C1 (Cox1). En nuestro caso, el tiempo necesario es menor que el de la PCR-anidada. Una vez desarrollada la PCR para el diagnóstico de la infección, empleamos la técnica para detectar RA en animales infectados de forma natural. La PCR se llevó a cabo en rebaños tratados con ABZ, CLOR y TCBZ los días 0, 7, 15 y 30 pt. Para ambas cepas se confirmó una reducción en el número de animales positivos durante todo el estudio para cada fármaco, siendo todas las muestras negativas en el día 30 pt con TCBZ.

Los resultados obtenidos por PCR se compararon con el FECRT y el CRT. El número total de ovejas positivas por PCR respecto al número total de ovejas analizadas, así como el porcentaje de animales positivos para cada día pt, se recogen en la Tabla 1.

Hay que tener en cuenta que el ABZ y CLOR son eficaces frente a las fasciolas adultas pero no frente a los vermes inmaduros, y que el TCBZ elimina tanto inmaduros como adultos (Boray *et al.*, 1983). Tras realizar el FECRT, en ambos rebaños la resistencia al ABZ y CLOR frente a trematodos adultos se confirmó el día 7 pt con porcentajes de 50,1 y 74,9% en SV y 66,6 y 88,8% en CR, respectivamente. Los huevos presentes en las heces los días 15 y 30 pt podrían proceder de adultos resistentes y/o de fasciolas inmaduras que alcanzaron la madurez posteriormente. En cuanto al TCBZ, en el rebaño SV se confirmó la susceptibilidad frente a formas maduras e inmaduras, ya que la reducción de huevos fue mayor del 95% todos los días pt analizados. Sin embargo, en el rebaño CR, el día 7 pt la eficacia del TCBZ fue del 86,6% (frente a los adultos) haciendo sospechar resistencia a ese antihelmíntico, aunque los días 15 y 30 pt, la reducción fecal de huevos fue del 100% en ambos análisis. En los dos rebaños, el porcentaje de ovejas positivas fue mayor por PCR que por sedimentación, lo que confirma que la PCR es un método más sensible para el diagnóstico de la infección y por lo tanto para detectar la RA en los animales infectados.

Los resultados por PCR y FECRT se compararon con los obtenidos mediante un ELISA tipo sandwich en el rebaño SV. El número de ovejas positivas cada día de muestreo aparece en la Tabla 1. El valor medio de DO el día de tratamiento fue superior a 0,150 en todos los grupos y animales, confirmando que todos estaban infectados. Únicamente en los días 7, 15 y 30 pt con TCBZ, la media fue inferior a 0,150, considerándolas negativas. Comparando el porcentaje de animales positivos mediante PCR y ELISA sandwich, se observó que en el rebaño SV, después del tratamiento con ABZ, el porcentaje de animales positivos fue mayor el día 30 pt por PCR. Después de la administración de CLOR, todos los valores de animales positivos fueron semejantes (42,9%) por ambas técnicas. En cuanto al tratamiento con TCBZ, los porcentajes de ovejas positivas fueron mayores por PCR los días 7 y 15 pt (62,5 y 12,5%, respectivamente). Por lo tanto, se confirmó que la PCR desarrollada es más sensible que el ELISA tipo sandwich comercial para detectar la presencia de RA.

Se dio el caso que tras el tratamiento con TCBZ, en el día 7 pt uno de los animales fue positivo por sedimentación pero negativo por ELISA. La razón podría ser que los huevos del parásito también se pueden detectar en las heces como falsos positivos, debido a su presencia en la vesícula biliar hasta algunos días después de un tratamiento eficaz (Flanagan *et al.*, 2011).

Como conclusión, nuestros resultados permiten señalar que la técnica más sensible para detectar rebaños resistentes es la PCR, ya que el número de animales infectados por *F. hepatica* fue mayor por esta técnica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boray, J. et al., 1983. Vet. Rec. 113:315-317.
- Coles, G.C. et al., 1992. Vet. Parasitol. 44:35-44.
- Flanagan, A. et al., 2011. Vet. Parasitol. 176:170-176.
- Martínez-Pérez, J.M. et al., 2012. Vet. Parasitol. 190:80-86.

**Agradecimientos:** Este estudio ha sido financiado el proyecto RTA 2010-00094-C03-02 (INIA). Martínez-Valladares disfruta de un contrato post-doctoral JAE-Doc del CSIC co-financiado por el Fondo Social Europeo.

**Tabla 1.** Número de animales positivos respecto al total para cada rebaño, fármaco y técnica y % de animales positivos. SED: Sedimentación.

Rebaños	Fármaco	Técnica	Día pt				% Animales positivos		
			0	7	15	30	7	15	30
SV	ABZ	SED.	7/7	4/7	6/7	3/7	57.1%	85.7%	42.9%
		PCR	7/7	7/7	6/7	6/7	100%	85.7%	85.7%
		ELISA	7/7	7/7	6/7	5/7	100%	85.7%	71.4%
	CL	SED.	7/7	3/7	2/7	2/7	42.9%	28.6%	28.6%
		PCR	7/7	3/7	3/7	3/7	42.9%	42.9%	42.9%
		ELISA	7/7	3/7	3/7	3/7	42.9%	42.9%	42.9%
	TCBZ	SED.	8/8	1/8	0/8	0/8	12.5%	0%	0%
		PCR	8/8	5/8	1/8	0/8	62.5%	12.5%	0%
		ELISA	8/8	0/8	0/8	0/8	0%	0%	0%
CR	ABZ	SED.	9/9	4/9	5/9	2/9	44.4%	55.6%	22.2%
		PCR	9/9	8/9	9/9	6/9	88.9%	100%	66.7%
	CL	SED.	8/8	2/7	4/8	1/6	28.6%	50%	16.7%
		PCR	8/8	5/7	7/8	4/6	71.4%	87.5%	66.7%
	TCBZ	SED.	8/8	2/8	0/5	0/6	25%	0%	0%
		PCR	7/7	8/8	2/5	0/6	100%	40%	0%

### THE DIAGNOSIS OF OVINE FASCIOLOSIS BY MEANS OF A PCR AND ITS APPLICATION TO THE DETECTION OF ANTHELMINTIC RESISTANCE IN SHEEP FLOCKS NATURALLY INFECTED

**ABSTRACT:** The aim of this study was to develop a PCR based on the ribosomal internal transcribed spacer for the diagnosis of the infection by *Fasciola hepatica* in faeces of sheep. The infection could be detected from the second week post-infection in experimentally infected sheep after the amplification of a 292 bp fragment. On the other hand, this PCR was used to detect the anthelmintic resistance (AR) in sheep flocks naturally infected; these results were compared with other techniques such as the faecal egg count reduction test (FECRT) and the coproantigen reduction test (CRT). The FECRT was carried out in two flocks, Santillán de la Vega (SV) and Corullón (CR) in which the sheep were divided into three groups to be treated with albendazole (ABZ), clorsulon (CL) and triclabendazole (TCBZ). Faeces were individually collected on days 0, 7, 15 and 30 post-treatment (pt) for the detection of the number of eggs per gram (epg) in faeces, coproantigen measurement and DNA extraction. According to the FECRT, both flocks resulted resistant to ABZ and CL against adult flukes; in relation to the treatment with TCBZ, the flock SV was susceptible against all stages although the flock CR resulted resistant against adult flukes and susceptible against immature forms. To compare the FECRT and the PCR results, we calculated the percentage of positive animals each sampled day after treatment. For both flocks, the percentage of positive sheep was always higher by PCR than by sedimentation, thus confirming that the PCR is a more sensitive method to diagnose the infection and therefore to detect the resistance. On the other hand, the CRT was carried out by means of a sandwich ELISA kit in the flock SV. When comparing the percentage of positive animals between PCR and this ELISA we observed that, after the treatment with ABZ, the percentages of positive animals was higher on day 30 pt by PCR although after the administration of CLOR all percentages were the same by both techniques. Regarding the treatment with TCBZ, the percentages of positive sheep were higher by PCR on days 7 and 15 pt.

**Keywords:** *Fasciola hepatica*, PCR; FECRT; CRT.