

CIENCIA Y TECNOLOGÍA



Publicación Semestral de la Dirección de Investigación Científica de la UNAH Julio 2004 N°14



Validación del Método de Baermann en Vaso de Sedimentación

Riña Girard de Kaminsky, M.Sc.
Dirección de Investigación Científica-UNAH

Resumen

El aparato utilizado en el método clásico de Baermann consiste de un embudo cerrado en su tallo por un tubo de hule, el cual se aprisiona por una pinza, sostenido todo en un soporte. Una variante utiliza un vaso cónico de sedimentación. El principio es el mismo: colocar la muestra sobre gasa y sumergirla en el agua del embudo o del vaso para extraer y recobrar larvas de nemátodos una o varias horas después, limpias, en el sedimento. **Objetivo.** Evaluar ambas variantes en el laboratorio utilizando babosas infectadas con larvas de *Angiostrongylus costaricensis*. **Método y Procedimientos** Se ensayaron 2 módulos. El digerido artificial de cada una de 100 babosas infectadas en el laboratorio se dividió a partes iguales en vasos de sedimentación y embudos, dejándolo sedimentar una y 8 horas (módulo 1). Cincuenta y seis babosas recogidas en el campo fueron procesadas de igual manera que las anteriores, sedimentando 28 babosas en vaso de sedimentación y 28 babosas en embudo, con examen una y 8 horas después (módulo 2). Cada sedimento fue examinado en forma independiente por 3 personas. Se analizaron los resultados por métodos estadísticos. **Resultados.** Sedimentos negativos en vaso fueron igualmente negativos en embudo, con una u 8 horas de sedimentación. Exceptuando 8 casos, la media de larvas (67.3) recobradas de vaso resultó mayor que la media (38.9) de embudo.

Tanto en infecciones leves como en altas la variante en vaso de sedimentación resultó más sensible que el embudo una hora después.

Sedimentos examinados 8 horas después fueron positivos en todas las infecciones altas y en algunas de las infecciones leves en vaso de sedimentación y embudo. En ninguna de las pruebas hubo significado estadístico. Comparando costos, el método en embudo resulta 5 veces más costoso, requiere más espacio físico y el resultado demora más que el método en vaso. **Conclusiones:** Los resultados del método de Baermann en vaso de sedimentación cuyo sedimento se examina una u 8 horas después son igualmente confiables que el método clásico en embudo.

Palabras clave: Baermann, extracción de larvas, laboratorio, Honduras.

Summaru

The classical Baermann method used to extract and concentrate nematode larvae from different substrates utilizes a glass funnel closed at its stem by a clamped rubber tube. A modification substitutes the funnel for a sedimentation glass. Samples spread on gauze and submerged in water in the funnel or the sedimentation glass allow larvae to concentrate at the bottom. Either sediment can be examined for larvae at one and 8 hours later.

Objective. Evalúate resulte comparing both methods utilizing slugs infected with *Angiostrongylus costaricensis*. **Method and Procedures.** Each of 100 experimentally infected slugs was halved, artificially digested and each half sedimented in a sedimentation glass and a funnel respectively (module 1). Fifty six slugs collected in the field were equally processed and sedimented: 28 in sedimentation glasses and 28 in funnels (module 2). Each sediment was examined independently one and 8 hours later by 3 different persons. Resulte were statistically analyzed. **Results.** Sedimente negative in sedimentation glasses were equally negative in funnels, one and 8 hours latter. Except in 8 cases, the median of larvae recovered from the sedimentation glass resulted higher (63.7) than those recovered from the funnel (38.9). Recovery of larvae from sedimentation glasses was as sensitive as that from funnels in light and more severe infections at one hour. Sedimente examined at 8 hours were equally positive in higher as in lighter infections. None of the results had statistical significance. Comparing coste, the funnel method was 5 times more expensive, required more space and results were delayed. **Conclusions.** Results obtained from the Baermann method utilizing a sedimentation glass are as reliable as those obtained using the classical funnel.

Key words: Baermann method, Honduras larval extraction, laboratory, Honduras.

Introducción

Durante un trabajo epidemiológico sobre la positividad de babosas con

larvas de *Angiostrongylus costaricensis* realizado en Honduras en colaboración con la Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, la positividad promedio de babosas infectadas fue de 10.5% (1). Resultados posteriores de recolecciones realizadas en otros sitios geográficos del país mostraron una disminución en la positividad a 1% (2).

Se expresó la duda de que talvez había fallado la técnica de Baermann en vaso de sedimentación, ya que en Costa Rica, donde se utilizaba el método de Baermann clásico en embudo con lectura a las 8 horas, la positividad de las babosas alcanza un promedio de 50% en algunas regiones de aquel país (Morera, comunicación personal).

Como la única manera de demostrar que el método de sedimentación en vaso era adecuada era probándolo en el laboratorio, se realizó una investigación cuyos resultados se presentan a continuación.

Métodos y Procedimientos

El vaso de sedimentación, llamado también "copa" o "de cerveza", es un vaso cónico de vidrio de 20 cm de altura y 250 ml de capacidad. La muestra a examinar se coloca sobre una gasa en varios dobleces y se introduce en el vaso que contiene agua a 37 C°. Esto se deja reposar una hora.

Para recoger el sedimento que contiene las larvas, se succiona este con ayuda de una pipeta Pasteur de tallo largo y se observa bajo microscopio en caja de Petri en vez de porta-objetos, que permite examinar más sedimento.

El embudo, tal como es descrito para el método clásico de Baermann, es de vidrio, de 15 cm de diámetro en el

borde superior, de 500 mL de capacidad, cerrado en su tallo por un tubo de hule con una pinza tipo Hoffman.

Para sostenerlo se usa soporte de metal o de madera, cuya abertura es menor que el diámetro superior del embudo. Para recoger el sedimento, se abre la pinza con cuidado y se obtiene el líquido con las larvas directamente en una caja de Petri o en tubos de ensayo.

Estos últimos se centrifugan para sedimentar las larvas, recobrarlas del fondo con una pipeta Pasteur y observarlas al microscopio en porta-objetos para su identificación específica (3,4).

Se diseñaron 2 módulos diferentes utilizando un total de 156 babosas, de las cuales 100 habían sido infectadas en el laboratorio con otro propósito y 60 (4 se escaparon de la caja) provenían de una recolección de campo. Los ensayos, que duraron 2 meses, se llevaron a cabo en el laboratorio de diagnóstico del Departamento de Protección Vegetal de la Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano.

El módulo 1 (Figura 1) comparaba directamente la capacidad de concentración del vaso vrs. embudo en una misma babosa. Para este módulo se utilizaron 100 babosas; cada una era pesada y picada finamente con un bisturí, dividiendo el picado en 2 mitades iguales. Cada mitad fue digerida artificialmente (pepsina 0.5% y ácido clorhídrico 0.7% en agua destilada) en frascos separados debidamente identificados. Estos se incubaron a 37 C° hasta digestión completa (4).

Para recobrar las larvas, se vertió el contenido de uno de los frascos a través de 6 dobleces de gasa en un vaso de sedimentación y el del otro frasco de igual manera en un embudo, colocado sobre un soporte de madera.

La recolección de las larvas del sedimento tanto de los vasos como de los embudos se hizo exactamente una hora y 8 horas después.

El sedimento de cada vaso fue succionado con una pipeta Pasteur nueva y examinado en caja de Petri. Para cada sedimento de los embudos se abrió la pinza y se recogió el sedimento igualmente en caja de Petri. Las cajas tenían el fondo cuadrillado, lo que permitió una búsqueda y cuenta más fácil de las larvas.

El módulo 2 (Figura 2), que utilizó 56 babosas, medía la capacidad de concentración del vaso vrs. embudo en babosas diferentes. Cada babosa fue enumerada, pesada y picada en forma individual, digerida en 2 porciones iguales, siguiendo un proceso similar al módulo 1. La diferencia consistió en que las dos mitades de babosas de número par eran sedimentadas en 2 vasos de sedimentación y las dos mitades de babosas de número impar en 2 embudos.

Los sedimentos se examinaron a la hora y 8 horas después. Tres personas diferentes examinaron los sedimentos en microscopio estereoscópico, llevando un registro individual y separado de cada cuenta.

La sumatoria de resultados se hizo en forma manual; para la interpretación de los datos obtenidos se utilizó análisis de varianza ANOVA.

Resultados y Comentarios

Módulo 1. De las 100 babosas utilizadas, 50 sedimentos resultaron negativos tanto en vaso como en embudo, con una hora y 8 horas de sedimentación. De las 50 babosas restantes, todos los sedimentos fueron positivos con las variaciones siguientes: Una hora después siete vasos (14%) eran negativos; 36 vasos sedimentaron mayor número de larvas que sus embudos pareja (72%); solo 7 vasos tenían menos larvas que los embudos correspondientes. Para ofrecer un ejemplo: 7,16,10,64,20,244,2 larvas (media 51.8), se recobraron del sedimento de 7 vasos, comparado con 1,5,20,4,0,110,0 larvas (media 20.0), de los embudos respectivos. Siete embudos eran negativos a la hora. Aunque en 8 de 43 embudos restantes se encontraron más larvas en una hora que en los vasos pareja (73, 4, 5, 10, 8, 16,31,5 larvas, media 19, vrs. 60,3,4,6,3,14,10,0 larvas, media 12.5), en ambos hubo positividad. Al revisar el sedimento a las 8 horas, 23 vasos y 19 embudos no tenían larvas, posiblemente porque todas habían sido retiradas en la primera hora.

Veinte de 26 vasos (77%) tenían más larvas que los embudos; un embudo y su vaso respectivo tenían igual número de larvas. Al comparar la media de larvas recobradas en vaso vrs. embudo durante el tiempo de observación, la media en vaso fue de 67.3 larvas vrs. la media en embudo de 38.9 larvas. Es decir, aunque de ambos se recobraron larvas, el número recobrado de vaso fue mayor.

Módulo 2. De las 56 babosas utilizadas, 29 sedimentos resultaron negativos en vaso y en embudo una y 8 horas después. De las 27 restantes, 27

(100%) sedimentos eran positivos en el grupo de los vasos (números pares); 9 (33.3%) sedimentos eran positivos en el grupo de embudos (números impares).

Al comparar el tiempo, solo en 3 vasos no hubo positividad a la hora, pero sí a las 8 horas; de 3 vasos se recogió igual cantidad de larvas que de 3 embudos durante el mismo tiempo.

En 12 de 18 vasos positivos restantes hubo mayor recolección a la hora que a las 8 horas (67%). De 9 embudos positivos, en 8 (89%) hubo mayor rendimiento de larvas a las 8 horas que en una hora después.

El análisis estadístico de varianza indicó que estos resultados no eran significativos al 5% del poder de detección; en otras palabras, cualquiera de los dos métodos era adecuado para recobrar larvas.

El método de Baermann original permite a las larvas de migrar activamente al agua, por efecto de varios y diferentes tropismos positivos (5). Ha sido modificado y ampliamente investigado, utilizado en el pasado por investigadores durante las campañas de control de uncinariasis humana y posteriormente para mejorar el diagnóstico de la estrongiloidiasis (6,7).

Las larvas vivas se extraían del suelo y/o de las heces, limpias y concentradas; permitía estudiar la actividad de larvas infectantes en el suelo, así como determinar con exactitud las fuentes de infección humana en cualquier región.

El sistema original requería que una porción de suelo o de heces fuese colocada sobre un redondel de gasa en

varios dobleces, soportada sobre una rejilla metálica y todo esto introducido hasta cierto nivel en un embudo lleno de agua tibia, a modo de cubrir la muestra con el agua. Varios investigadores ensayaron el método en vaso de sedimentación con resultados paralelos o superiores al embudo (8,9).

El método de Baermann usado para recobrar larvas después de una digestión artificial de tejido, en este caso babosas infectadas experimentalmente o recogidas de campo, no sería el nombre correcto, puesto que las larvas presentes, vivas o muertas, caen al fondo del aparato por gravedad y no por migración activa de las mismas.

Se concluyó en este estudio, que tanto en infecciones leves como en infecciones altas, la variante en vaso de sedimentación resultó más sensible que en embudo con una hora y 8 horas de sedimentación. Cuando las larvas se recogían de embudos, la recuperación resultaba mejor a las 8 horas. Babosas que resultaron negativas en vaso fueron igualmente negativas en embudo, con una u 8 horas de sedimentación. La media de larvas recobradas en vaso (67.3) resultó mayor que en embudo (38.9), excepto en 8 ocasiones.

Comparando costos, el método en embudo resultó 5 veces más caro, requirió más espacio físico y demoró más tiempo en ofrecer resultados. Los resultados obtenidos de nuestra investigación epidemiológica sobre infección de babosas utilizando el método de Baermann en vaso de sedimentación son confiables. Las diferencias de positividad de babosas entre los países se deben probablemente a condiciones ecológicas distintas y no a la variante de Baermann utilizada en el laboratorio.

Agradecimientos

Se agradece al Dr. Keith Andrews, ex Director de la Escuela Agrícola Panamericana por haber costeado y estimulado este trabajo técnico que validó nuestros resultados de angiostrongilosis abdominal en el campo, así como al personal del Departamento de Protección Vegetal de dicha Escuela. A la Lic. Marlene Medina y a la Dra. Jackeline Alger por su participación en el laboratorio.

Referencias

1. Kaminsky RG, Morales R, y Andrews K. *Angiostrongylus costaricensis* en babosas en Honduras. Resultados preliminares. Revista Médica Hondureña 1987, 55:4-8.
2. Kaminsky RG, Caballero R, y Andrews K. Presencia de *Angiostrongylus costaricensis* en Honduras y sus relaciones agro-ecológicas y humanas. Parasitología al Día 1995, 19:81-90.
3. Beaver PC, and Jung R. Animal Agents and Vectors of Human Disease. 5th Edition, Lea and Febiger, 1984.
4. Ash L. and Orihel T. Parasites. A guide to laboratory procedures and identification. ASCP Press, American Society of Clinical Pathologists, Chicago, 1987.
5. Fulleborn F. Über die Taxen und das sonstige Verhalten der infektionsfaehigen Larven von *Strongyloides* und *Ancylostoma*. II. Mitteilung. Zentralblat für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten 1932, Abt. Orig. 126:162-180.

6. Beaver PC. Persistence of hookworm larvae in soil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1953, 2:102-108.
7. Lumbreras H. Evaluación de la técnica de Baermann modificada en copa en el estudio de la estrogiloidosis. Revista Médica Peruana 1967, 22:119-126.
8. Lima JP, and Delgado FG. Diagnosis of strongyloidiasis:

importance of Baermann 's method. American Journal of Digestive Diseases 1961, 899-904. 9. Coutinho JO, Croce J, Campos R et al. Estudio comparativo entre a pesquisa de larvas de *Strongyloides stercoralis* no suco duodenal e ñas fezes: valor diagnostico. Folia Clínica Biológica de Sao Paulo 1952, 18:125-131.

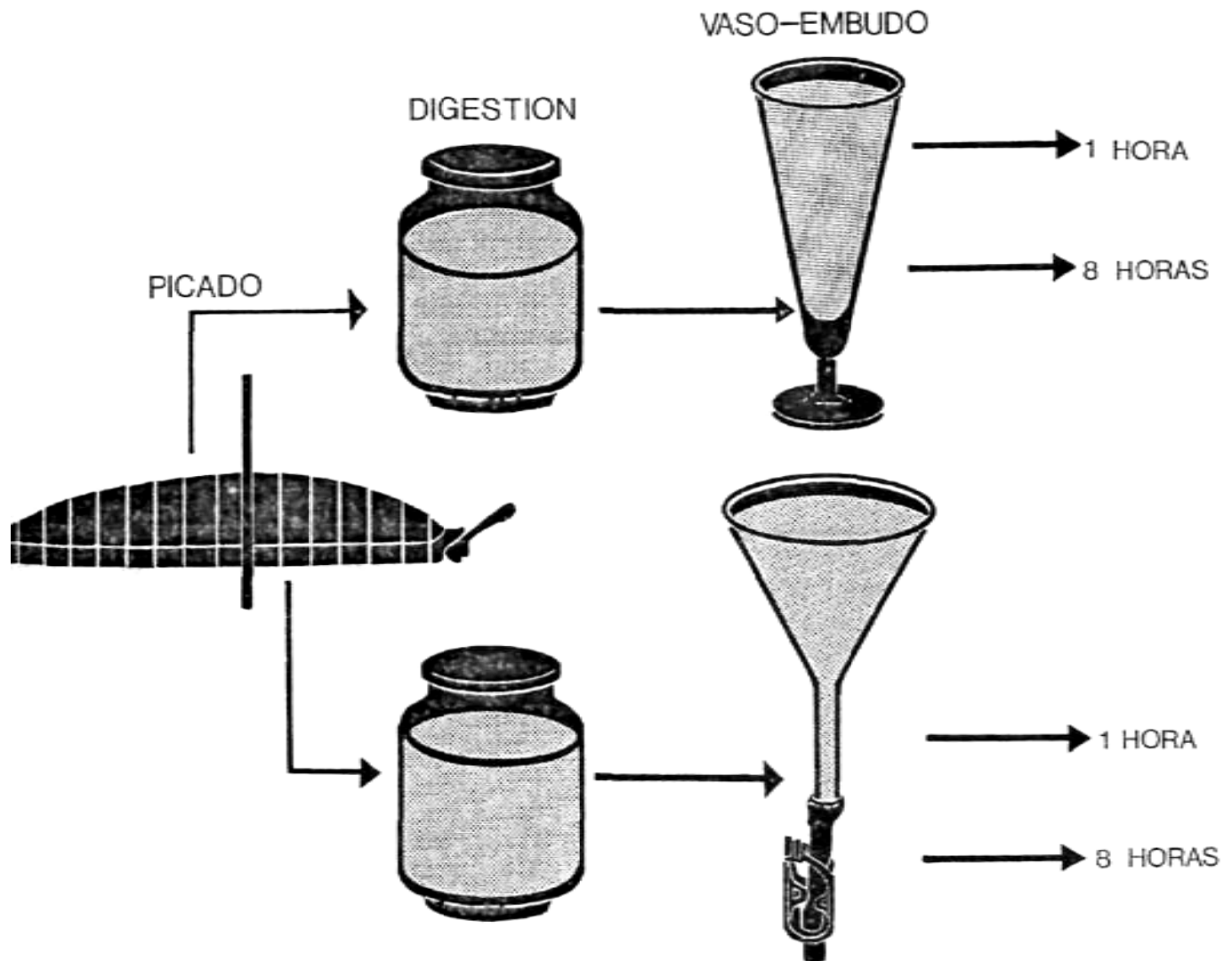


Figura 1. Ilustración que demuestra como se preparó y leyó el Módulo 1. Los embudos se colocaban sobre un soporte de manera, no mostrado en el dibujo.

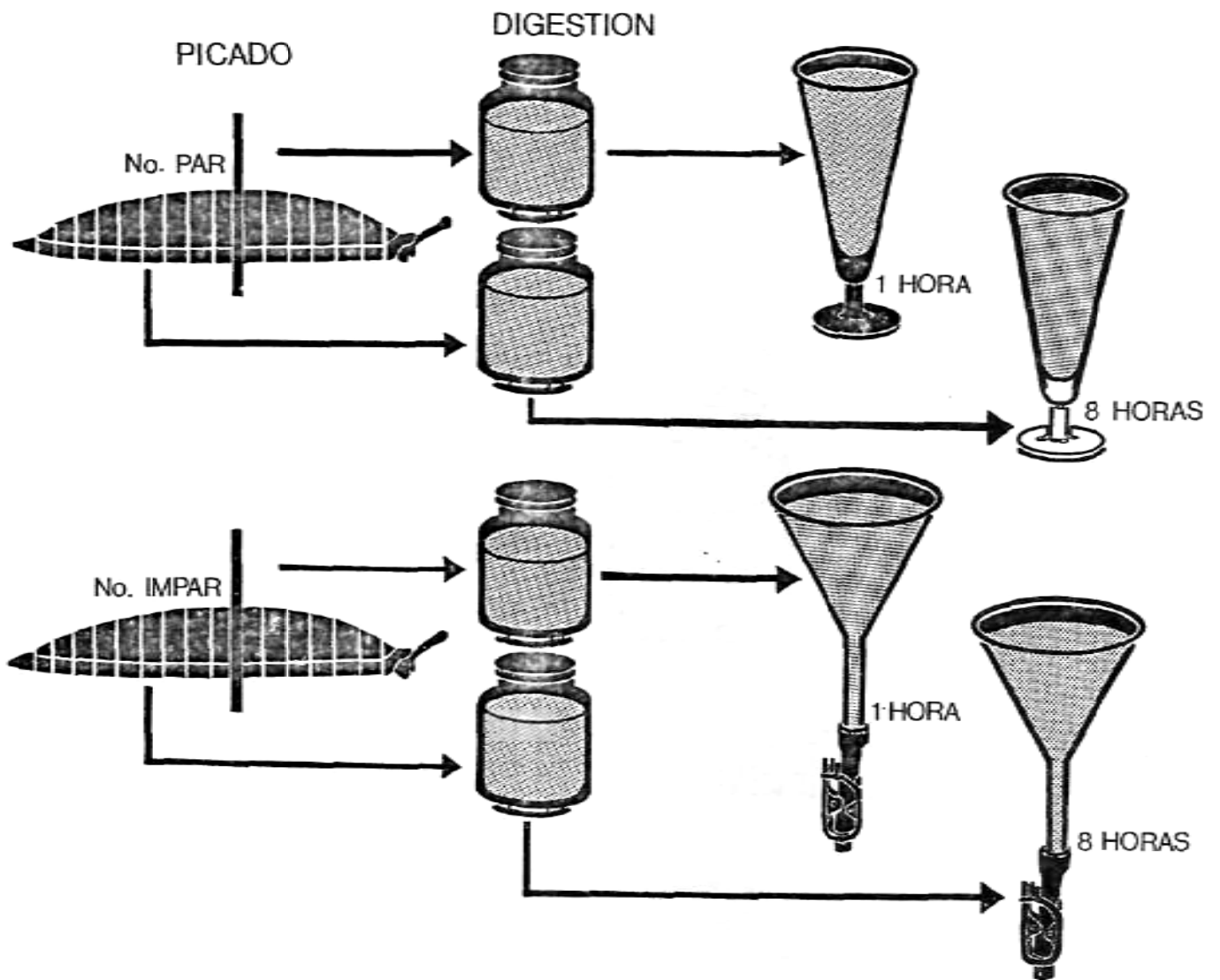


Figura 2. Ilustración que esquematiza la preparación del método de Baermann según el Módulo 2, con 56 babosas recolectadas en el campo.