

DIAGNÓSTICO DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN BÚFALOS DE AGUA (*Bubalus bubalis*) avance preliminar

Jiménez Cortez H. I.^{1,2*}, Villegas Bello L. de la N.^{1,2}, Utrera Quintana F.¹, Covarrubias Balderas A.^{1,2}, Campos-García H.¹, Cruz-Aviña J. R.^{1,2*}

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Carr. Tecamachalco-Cañada Morelos Km. 7.5, El Salado, CP 75460 Tecamachalco, Puebla, México. ²Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 4 Sur 304 Col. Centro Tecamachalco, Puebla, México.

*Autor de correspondencia: juan.cruzavina@correo.buap.mx

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue comparar tres técnicas diagnósticas para nemátodos gastrointestinales (NGI) en hembras de búfala (*Bubalus bubalis*), en una unidad de producción de Veracruz, México. Se realizó un muestreo al azar (N=41), las muestras fecales se dividieron en dos partes iguales y cada una se comparó utilizando las técnicas de Flotación, Kato Katz y Lumbrera, por triplicado y a doble ciego. Los resultados mostraron que la técnica por Flotación fue la más sensible con 56.47%, sin diferencias significativas entre el observador A y B (p=0.0728); seguido de la técnica Lumbrera con 21.98% (p=0.096) y finalmente la técnica Kato Katz con una sensibilidad de 21.55% (p=0.0153). Conforme los resultados obtenidos, se concluye que la técnica por Flotación fue la más sensible, para la identificación de (NGI), entre los métodos evaluados de diagnóstico en laboratorio para hembras de (*Bubalus bubalis*) en Veracruz, México.

Palabras clave: Búfalos, Parásitos NGI, Producción Animal Sostenible.

ABSTRACT

The objective of this work was to compare three diagnostic techniques for gastrointestinal nematodes (GIN) in female buffaloes (*Bubalus bubalis*), in a production unit in Veracruz, Mexico. A random sampling was carried out (N=41), the fecal samples were divided into two equal parts and each one was compared using the Flotation, Kato Katz and Lumbrera techniques, in triplicate and double blind. The results showed that the flotation technique was the most sensitive with 56.47%, without significant differences between observer A and B ($p=0.0728$); followed by the Lumbrera technique with 21.98% ($p=0.096$) and finally the Kato Katz technique with a sensitivity of 21.55% ($p=0.0153$). According to the results obtained, it is concluded that the flotation technique was the most sensitive, for the identification of (GIN), among the laboratory diagnostic methods evaluated for females of (*Bubalus bubalis*) in Veracruz, Mexico.

Keywords: Buffaloes, GIN, parasites, Sustainable Animal Production.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones por (NGI) en los rumiantes son comunes en todo el mundo, teniendo un impacto considerable en la ganadería. Sin embargo, la epidemiología de la transmisión está siendo investigada en torno a la variación climática, ciclo de vida, geografía y períodos de transmisión (Beck et al. 2015). Los huéspedes son infectados cuando se encuentran en vida silvestre o en condiciones naturales de transmisión con más de una especie de parásitos. Los parásitos co-infectantes pueden interactuar, y las evidencias sugieren que estas interacciones son

fundamentales para la comprensión de la dinámica del huésped-parasito, inmunidad del huésped y el desarrollo de la resistencia a los medicamentos; así como descifrar las diferencias biológicas entre estos organismos similares (Gorsich et al. 2014, Heizer et al. 2013). El tratamiento del ganado infectado con nematodos comúnmente involucra medicamentos antihelmínticos (Heizer et al. 2013), pero el uso de estos compuestos ha causado el desarrollo de resistencia en algunos sistemas de producción (Kim et al. 2015), debido a que los productores los han utilizado de forma intensiva y sin un enfoque estratégico, lo que lleva a una resistencia antihelmíntica y residuos en productos cárnicos (Seo et al. 2015). Además, las diferentes condiciones agroclimáticas, las prácticas ganaderas y el manejo de los pastos determinan en gran medida la incidencia y severidad de diversas enfermedades parasitarias en ciertas regiones (Marskole et al. 2016). Con base a las opiniones para la selección de las técnicas que permiten la identificación de huevos de los parásitos gastrointestinales, se determinó realizar la presente investigación aplicando un estudio doble ciego, con el objetivo de comparar la eficacia de las técnicas coprológicas para la determinación de NGI, y se comparen estadísticamente de los resultados obtenidos de las tres diferentes técnicas de diagnóstico, a fin de identificar la técnica más eficaz en los búfalos de agua en Veracruz, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de Estudio. Esta investigación fue realizada de abril del 2020-a abril del 2022, en el rancho productor de búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) El Palmar, en la comunidad Adrián Castrejón Viejo, perteneciente al municipio del Jesús Carranza, Veracruz, México (17° 33' 03'' N y 94° 53' 22'' W con 30 m s.n.m.). **Figura 1.**

Figura 1. A) Ubicación geográfica de Adrián Castrejón Viejo. B) Imagen de 2 ejemplares de *Bubalus bubalis*.



Fuente figura A: Google Earth 2023; figura B: Wiki, 2023.

Método de estudio. - Se realizó un estudio descriptivo, longitudinal, a doble ciego, para señalar la frecuencia de huevos por parásitos gastrointestinales (NGI), en donde se incluyó un lote de 41 búfalas de dos años, tomando 200 g de materia fecal, las cuales se dividieron en dos porciones iguales. 1.-100 g para el observador A y 2.-100 g para el observador B, cada observador procesó la técnica de Kato-Katz modificada, técnica de Flotación en Salmuera y técnica de Sedimentación Rápida modificada por Lumbreras. La *técnica de Kato-Katz* se utiliza para el recuento de huevos de helmintos, pero es poco sensible para infecciones leves. Se coloca 1 gramo de heces sobre un trozo de papel de aluminio. Sobre la muestra se dispone una malla metálica o plástica fina, y se raspa sobre el tamiz con una jeringa de tuberculina sin punta hasta que la deposición llegue a una marca hecha previamente y que corresponde a un volumen de 35 mm³ (aproximadamente 50 gramos de heces) Para esto existen medidas en el comercio. La deposición se coloca sobre un portaobjeto y se cubre con papel celofán empapado en solución de verde de malaquita (1 mL de verde de malaquita al 3% en solución acuosa en 100 mL de agua destilada y 10 ml de glicerina pura 50 mL). El portaobjeto se invierte y sobre una superficie dura se presiona suavemente para extender la muestra. Posteriormente se deja clarificar la preparación durante una hora a temperatura ambiente. Se cuentan los huevos. El número de

huevos se calcula con la siguiente fórmula: Huevos/ g de heces = Número huevos contados (20x) / factor de consistencia. El factor de consistencia es 1 para deposición sólida, 2 para semisólida y 3 para la líquida (Rosales et al. 2020). *Técnica de Flotación en Salmuera*. -Esta técnica es especialmente útil para quistes, huevos de *Enterobius vermicularis* y huevos de *Hymenolepis nana*. Todos los elementos parasitarios, con excepción de los huevos más pesados que el medio de flotación, se recuperan en altas concentraciones y en condición viable. La concentración de sulfato de zinc más útil para hacer flotar los elementos parasitarios más comunes tiene un peso específico de 1:180. Phillipson usó sulfato de magnesio ($MgSO_4$) en lugar de sulfato de zinc obteniendo la flotación de huevos de *Clonorchis* y *Opisthorchis* en heces. 1. Mezclar 10 g de heces con 50 mL de solución fisiológica, o agua de la canilla. 2. Tamizar a través de un colador metálico. 3. Filtrar sobre gasa en un embudo. 4. Recoger 10 mL del filtrado sobre un tubo de centrifuga. 5. Centrifugar 5 minutos a 1500 r.p.m. Descartar el sobrenadante. 6. Repetir esta operación 3 veces o hasta que el sobrenadante quede limpio. *Método de Lumbreras* modificado Se utiliza para el hallazgo de huevos de *Fasciola hepática* en materia fecal o bilis. Para estos huevos no se puede utilizar un método de centrifugación pues se rompen ni uno de flotación porque son muy pesados. 1. Colocar 2 mL de la muestra (heces o bilis) en una copa de Lumbreras o tubo de centrifuga. 2. Agregar 5 mL de solución detergente al 10% para emulsionar las grasas. 3. Agregar 0,5 mL de alumbre férrico al 1% para favorecer el gradiente de densidad. 4. Homogeneizar suavemente. 5. Dejar en reposo 30 minutos. 6. Sacar con pipeta Pasteur una gota del fondo de la copa. 7. Observar microscópicamente. Se analizaron un total 246 muestras de materia fecal. Los exámenes directos con solución salina y Lugol se procesaron y analizaron antes de las pruebas de concentración. El tiempo transcurrido entre la recolección y la recepción en el laboratorio,

osciló entre seis y nueve horas. Por las complejas condiciones logísticas hubo variación en la duración del periodo comprendido entre la llegada de la muestra y su montaje para la lectura, que osciló entre uno y tres días. Las muestras fueron identificadas con un código único. El montaje de las muestras fue hecho en todas las ocasiones por la misma persona y su lectura la hicieron dos profesionales expertos que no conocían la procedencia de los animales de donde se obtuvieron las muestras. Posteriormente las muestras fueron procesadas por grupos y se alternó sistemáticamente el montaje y su lectura. En ese sentido, las tres pruebas, (Kato-Katz, Flotación y Sedimentación), se procesaron primero en igual número de veces, siguiendo las recomendaciones de los fabricantes (Rosales et al. 2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 246 muestras fecales fueron analizadas, encontrando una prevalencia de 91.87% de huevos de nematodo, cestodos y ooquistes de coccidios, por ambos observadores, tratando la técnica de Kato-Katz Modificada por los dos observadores, se encontró una frecuencia de 21.55%, con la técnica de Flotación en Salmuera un 56.47% y 21.98% mediante la técnica por Lumbreras **Cuadro 1.**

Cuadro 1. Comparación de los resultados obtenidos por las técnicas realizadas, mediante un método doble ciego.

UNIVERSO			
N= 41, (♀)	Técnica	Muestras (+) sensibilidad (%)	P
Hembras de 2 años	Flotación en Salmuera	56.5	0.728
	Kato-Katz	22	0.096
	Lumbreras	21.5	0.153
	Total	100	

Fuente: elaboración propia

A lo largo del tiempo se han desarrollado diversas técnicas para el diagnóstico de NGI. Éstas han mejorado por investigaciones sobre los ciclos de vida y la patogenia de los parásitos; además, la aparición de nuevas tecnologías ha permitido la implementación de métodos con mayor sensibilidad y especificidad. Algunas técnicas abarcan la detección de varios parásitos; otras son específicas para un parásito o una fase parasitaria en particular. Sin embargo, no existe una técnica 100 % eficaz que además sea de bajo costo y fácil realización, por tal razón, el diseño y experimentación de nuevas técnicas no ha llegado a su término por lo que existe una búsqueda continua de nuevas metodologías que sean más eficaces, rápidas, sencillas y económicas. La técnica de Sedimentación se basa en la concentración de elementos parasitarios por la acción de la gravedad, y se lleva a cabo suspendiendo las heces en agua corriente, agua destilada o solución salina y dejando que se verifique un asentamiento natural, o bien se puede acelerar el proceso mecánicamente por medio de la centrifugación. Estos métodos son principalmente útiles para la concentración de quistes, ooquistes y huevos, es decir que son aplicables para casi todos los parásitos fecales y son recomendados de uso general cuando el diagnóstico no está orientado a ningún parásito en particular. La desventaja que tienen con respecto a los de flotación es que a veces la observación microscópica puede dificultarse por la presencia de la concentración de restos no parasitarios (Rosales et al, 2020). En contraste la técnica de Flotación, al contrario que en la sedimentación, en la cual los parásitos microscópicos, que son más pesados que las bacterias, y las partículas de alimentos no digeridas van al fondo del recipiente, la flotación utiliza un medio líquido de suspensión más pesado que los parásitos y éstos suben a la superficie y pueden ser recogidos de la película superficial. El primer método de concentración por flotación fue introducido por Bass (1906) para concentrar huevos de uncinarias en escaso número en las

heces. Para que el método sea útil, no basta con que el medio de suspensión sea más pesado que los objetos que han de flotar, sino que además no ha de producir retracciones en el parásito que impidan el reconocimiento (Rosales et al. 2020) Por su parte la técnica de concentración da oportunidad para la recuperación eficaz e identificación precisa de la mayoría de los parásitos intestinales, aunque no deja de reconocerse la necesidad de técnicas que permitan calcular la intensidad de la infección del paciente por ciertos helmintos, es decir, si ésta es leve, moderada o masiva. Se usan principalmente en ascariasis, tricocefalosis y uncinariasis y se basan en la cuantificación del número de huevos por g o mg de heces. Es importante considerar que si bien los niveles de producción de huevos se denominan recuentos de huevos, en realidad son estimaciones que tienen probabilidades estadísticas de error y variación. Incluso la media de varios recuentos hechos en la misma muestra tiene unos márgenes predecibles de variación. Así, un solo recuento de huevos efectuado por el método más preciso y el personal más competente sólo indica de forma aproximada la cuantía de la carga de gusanos. El hecho de que los recuentos de huevos no constituyan realmente más que una estimación aproximada de su producción no significa que estas estimaciones no sean útiles o incluso esenciales para determinadas interpretaciones (Rosales et al. 2020). Estos resultados son muy similares a los de un trabajo realizado en Argentina por (Racciopi et al. 2005), en donde un total de 180 muestras analizadas se detectaron en (178) con cargas parasitarias NGI con forme a la Técnica de Flotación en salmuera. En contraste en un estudio por (Salvador et al. 2014) para el diagnóstico de parásitos gastrointestinales en búfalos de agua en Filipinas, encontrando una prevalencia de 71.21% mediante el empleo de técnicas de Flotación, encontraron una sensibilidad de 49.55% mediante la técnica de 33.63% mediante la técnica de flotación, estos resultados son semejantes a los

reportados por (Marskele et al. 2016), quienes reportan el 73.33%, sin embargo, en este estudio se obtuvo una sensibilidad del 56.47% para la técnica de Flotación, resultado que es más alto que los reportados por (Salvador et al., 2014). Utilizando la técnica de concentración por Flotación, por lo que las diferencias encontradas en los estudios mencionados por diversos autores podrían deberse a la diferencia en el número de muestras fecales examinadas, un período de estudio y condiciones geo climáticas (temperatura, humedad y radiación solar) que favorecen la supervivencia de la etapa infecciosa de los parásitos y prácticas de desparasitación. *Técnica de Kato-Katz*: Con esta técnica, el observador A encontró parásitos gastrointestinales con una frecuencia del 13,36 %, en comparación con el 8,19 % del observador B, y al analizar estadísticamente el número de muestras positivas entre los observadores, el valor medio del observador A fue de $0,75 \pm 1,06$, para el observador B. $0,46 \pm 0,74$, sin diferencia estadística entre los observadores ($p = 0.153$), se detectaron 16 muestras positivas de 41 muestras analizadas por observadores, la sensibilidad fue del 56 %, la especificidad del 54 % y la precisión del 55 % para esta técnica.

CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que la técnica por Flotación fue la más sensible con 56.47%, sin diferencias significativas entre el observador A y B ($p=0.0728$); seguido de la técnica Lumbrera con 21.98% ($p=0.096$) y finalmente la técnica Kato Katz con una sensibilidad de 21.55% ($p=0.0153$). Conforme los resultados obtenidos, se concluye que la técnica por Flotación fue la más sensible, para la identificación de (NGI), entre los métodos evaluados de diagnóstico en laboratorio para hembras de (*Bubalus bubalis*) en Veracruz, México. Se recomienda mayor

investigación para determinar la sensibilidad, especificidad y precisión de las técnicas evaluadas, así como los géneros y especies parasitarias que afectan a los búfalos en el estado de Veracruz, México.

REFERENCIAS

Beck, M. A., Colwell, D. D., Goater, C. P., & Kienzle, S. W. (2015). Where's the risk? Landscape epidemiology of gastrointestinal parasitism in Alberta beef cattle. *Parasites & Vectors*, 8(1), 1-13.

Dicker, A. J., Inglis, N. F., Manson, E. D., Subhadra, S., Illangopathy, M., Muthusamy, R., & Knox, D. P. (2014). Proteomic analysis of *Mecistocirrus digitatus* and *Haemonchus contortus* intestinal protein extracts and subsequent efficacy testing in a vaccine trial. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(6), e2909.

Fernández-Figueroa, A., Arieta-Román, R., Graillet-Juárez, E., Romero-Salas, D., Romero-Figueroa, M., & Felipe-Ángel, I. (2015). Prevalencia de nematodos gastroentericos en bovinos doble proposito en 10 ranchos de Hidalgotitlan Veracruz, México. *Abanico veterinario*, 5(2), 13-18.

Flórez, J. L., Villamizar, R., & Becerra, R. (2014). Estudio de sobrevivencia y migración de larvas infestantes de nematodos gastrointestinales de bovinos en el municipio de Pamplona, Norte de Santander. *Bistua Revista de la Facultad de Ciencias Basicas*, 11(1).

Gorsich, E. E., Ezenwa, V. O., & Jolles, A. E. (2014). Nematode–coccidia parasite co-infections in African buffalo: Epidemiology and associations with host condition and pregnancy. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(2), 124-134.

Heizer, E., Zarlenga, D. S., Rosa, B., Gao, X., Gasser, R. B., De Graef, J., ... & Mitreva, M. (2013). Transcriptome analyses reveal protein and domain families that delineate stage-related development in the economically important parasitic nematodes, *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora*. *BMC genomics*, 14, 1-14.

Kim, E. S., Sonstegard, T. S., da Silva, M. V., Gasbarre, L. C., & Van Tassel, C. P. (2015). Genome-wide scan of gastrointestinal nematode resistance in closed Angus population selected for minimized influence of MHC. *PLoS One*, 10(3), e0119380.

Marskole, P., Verma, Y., Dixit, A. K., & Swamy, M. (2016). Prevalence and burden of gastrointestinal parasites in cattle and buffaloes in Jabalpur, India. *Veterinary World*, 9(11), 1214.

Racioppi, O., Álvarez, J. D., Moriena, R. A., & Pintos, L. A. (2009). *Fasciola hepatica* en búfalos de la Provincia de Corrientes, Argentina. *Rev. Vet.* 20: 2, 128–129

Rosales Rimache, Jaime, & Bautista Manchego, Karla Mercedes. (2020). Comparación de tres métodos de concentración de enteroparásitos en muestras fecales humanas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 72(2), e494.

Salvador, R. T., Abalos, R. P., Ruba, A. M., & Mingala, C. N. (2014). A comparison of FLOTAC and CFF techniques in detecting gastrointestinal parasites in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Annals of parasitology*, 60(2).g

Seó, H. L. S., Pinheiro Machado Filho, L. C., Honorato, L. A., da Silva, B. F., do Amarante, A. F. T., & Bricarello, P. A. (2015). The effect of gastrointestinal nematode infection level on grazing distance from dung. *PloS one*, 10(6), e0126340.