Tolerancia de muestras de heces fecales a diferentes tiempos de refrigeración para la recuperación de larvas infectantes de *Haemochus contortus* en bioensayos coproparasitológicos con ovinos

Javier Munguía-Xóchihua, Javier Reyna-Granados, José Leyva-Corona, Marcela Morales-Pablos*

Instituto Tecnológico de Sonora, Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinaria, 5 de febrero 818 sur. Colonia Centro CP 85000 Ciudad Obregón, Sonora, México. 016444109000 ext. 117

Artículo recibido el 16 de noviembre y aceptado el 25 de noviembre.

Tolerance of fecal samples to different refrigeration times for the recovery of infective Haemonchus contortus larvae in coproparasitologic bioassays with sheeps

Abstract

The collection of viable infective larvae is essential for identification of genera and species in research or parasitological diagnosis. The objective of this study was to determine the tolerance time for the preservation of fresh feces for the recovery of third stage infective larvae (L3) of *Haemonchus contortus*. Three trials were performed on parasite-positive sheep feces at different refrigeration times (5°C): 4d (RFG4d), 21d (RFG21d) and 42d (RFG42d). In each trial at day zero (unrefrigerated) samples were processed and was the control group (CTRL). The number of eggs per gram of feces (HGH) was determined by the McMaster technique. Subsequently, coproculture and Baerman technique were performed. The number of L3 of *H. contortus* per milliliter was identified. Larval emergence (Em) was calculated as Em= L3/HGH. The percentage recovery ($P<0.05$) of L3 and final EM was 19.99, 0.62, 0% and 36.62, 0.46, 0% in RFG4d, RFG21d and RFG42d respectively ($P<0.05$). A higher percentage of L3 emergence of *H. contortus* was obtained by stool culture with non-refrigerated feces. If the sample was not processed on the same day, it could be refrigerated for up to seven days with sufficient emergence (16.73%) to identify the genus and species of larvae.

Key words: larvae, *Haemonchus contortus, abomasum, in vitro* culture.

Resumen

La obtención de larvas infectantes viables es sustancial para identificación de género y especie en investigación o diagnóstico parasitológico. El objetivo del estudio fue determinar el tiempo tolerable de conservación de heces frescas para la recuperación de larvas infestantes de tercer estadio (L3) de *Haemonchus contortus*. A partir de heces de ovino positivas al parásito, se realizaron tres ensayos en diferentes tiempos de refrigeración (5°C): 4d (RFG4d), 21d (RFG21d) y 42d (RFG42d). En cada ensayo al día cero (sin refrigerar) se procesaron muestras y fue el grupo control (CTRL). Se determinó el número de huevos por gramo de heces (HGH), por la técnica de McMaster. Posteriormente se realizó coprocultivo y técnica Baerman. Se identificó el número de L3 de *H. contortus* por mililitro. La emergencia de larvas (Em), se calculó Em= L3/HGH. El porcentaje de recuperación ($P<0.05$) de L3 y la EM final fue 19.99, 0.62, 0% y 36.62, 0.46, 0% en RFG4d, RFG21d y RFG42d respectivamente ($P<0.05$). Se obtuvo mayor porcentaje de emergencia de L3 de *H. contortus* por coprocultivo con heces sin refrigerar. Si la muestra no se procesara el mismo día puede refrigerarse hasta siete días teniendo emergencia suficiente (16.73%) para identificar el género y especie de la larva.

*Autor de correspondencia
Email: marcela.morales@itson.edu.mx
ISSN 2594-0384 (Electrónica)

Palabras claves: Larvas, *Haemonchus contortus*, abomaso, cultivo *in vitro*.

Introducción

El complejo de parásitos gastroentéricos amenazan constantemente la eficiencia productiva en ovinos, comprometiendo la rentabilidad de los rebaños. Dentro del grupo de parásitos gastroentéricos se encuentran *Haemonchus contortus*, *Oesophagostomum* spp., *Ostertagia* spp., *Nematodirus* spp., *Tichuris* spp., *Moniezia expasa* y *Fasciola hepatica*, de los cuales *Haemonchus contortus* es el más importante por disminuir los parámetros productivos, incluso ocasionar la muerte en pequeños rumiantes (Kamal *et al*., 2019).

Haemonchus contortus, es el nematodo abomasal más patógeno en ovinos en zonas tropicales y subtropicales, que por su alta fecundidad conduce a la rápida diseminación de huevos y larvas infectantes en pastizales y altos niveles de ingestión posterior a la contaminación. Dentro de sus efectos patógenos, se estima que la acción hematófaga de cada verme equivale a un consumo de 0.05 ml de sangre al día (Qamar y Maqbool, 2012). Lo anterior explica parcialmente los signos de anemia en animales infestados; además de la pérdida por sangrado en los sitios de alimentación que quedan siguen sangrando (Qamar y Maqbool, 2012). Los animales jóvenes son más susceptibles y presentan la enfermedad en forma clínica y subclínica. Así mismo, en este grupo de animales se presenta diarrea, anemia, hipoproteinemia, edema, debilidad, anorexia, reducción de peso, crecimiento y de lana y en casos severos la muerte aguda (Nabi *et al*., 2014).

Para entender el comportamiento de *Haemonchus contortus*, es necesario estudiarlo para avanzar en el conocimiento epidemiológico. Frecuentemente se realizan estudios *in vitro* de rutina, siendo necesario disponer continuamente de larvas infectantes del nematodo. La refrigeración de heces con huevos de nematodos gastroentéricos es la forma ideal de conservación de muestras. Sin embargo, los días de almacenamiento pueden tener un efecto detrimental en la viabilidad de los huevos, afectando negativamente el porcentaje de eclosión en el coprocultivo y el desarrollo a larva de tercer estadio (L3). Con base en lo anterior, el tiempo de conservación de las muestras puede modificar el porcentaje de eclosión por coprocultivo de L3 de *Haemonchus contortus*. De esta manera, se pueden asegurar mayor cantidad de L3 para su posterior identificación de género, especie o ser utilizados en diferentes pruebas *in vivo* e *in vitro.* Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue identificar el tiempo tolerable de conservación de heces de ovino para la recuperación de larvas de tercer estadio de *Haemonchus contortus*.

Material y métodos

Ubicación del estudio

El estudio fue de tipo descriptivo, prospectivo y longitudinal (Thrusfield, 2018), realizado en el Laboratorio de Parasitología del Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias del Instituto del Tecnológico de Sonora, en Ciudad Obregón, Sonora.

Material biológico

Se utilizaron dos borregos machos de raza Pelibuey (37 kg y 10 meses de edad en promedio), los cuales recibieron una semana de aclimatación en condiciones ambientales naturales en alojamiento individual de $3m^2$ por animal donde recibían alfalfa henificada y agua a libre acceso (Rodríguez et al., 2015).

Infestación artificial

Previo a la infestación artificial, se realizó la comprobación de parásitos gastrointestinales con la prueba de flotación y se desparasitó con clorhidrato de levamisol a una dosis única de 7.5mg/kg (Figura 1), y se confirmó la desparasitación mediante flotación a los 15 días posteriores. A los 20 días posterior a la desparasitación los borregos fueron infestados artificialmente (vía oral), con 4,800 L3 de H. contortus.

Colecta de muestras de heces

Con la presencia de huevos en heces se colectaron muestras tres veces por semana los días -4, 0, 7, 14, 21 y 28d (Figura 1). De la semana cinco post-infección hasta la semana ocho se colectaron (con calzón recolector de manta), por animal, 50g de heces por las mañanas (8:00 a 11:00h), tres veces por semana. Cada muestra fue identificada por fecha de colecta. Las muestras se dividieron en heces conservadas en refrigeración a 5°C (Sonibare *et al.*, 2011; Mushonga *et al.*, 2018), y sin refrigeración. En todo momento, los animales fueron manejados sin poner en riesgo su vida y al

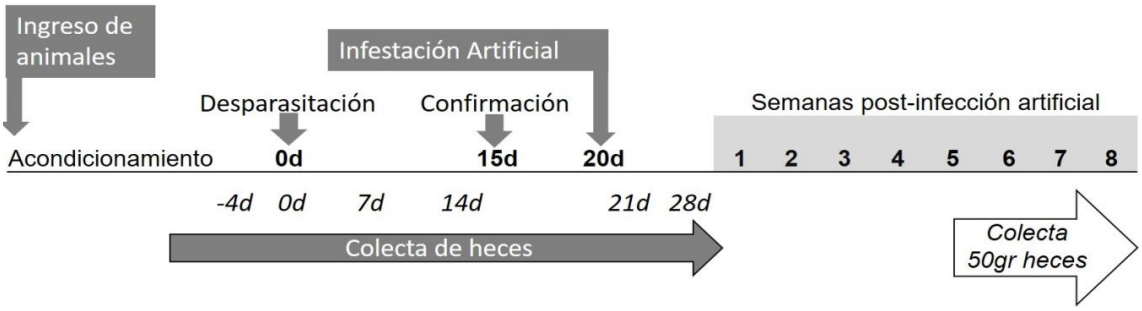


Figura 1. Diseño del estudio previo y posterior a la infestación artificial con L3 de *H. contortus*.

final del experimento fueron desparasitados y donados.

Análisis parasitológico

De cada muestra colectada a lo largo de cada ensayo se utilizó la técnica cuantitativa de McMaster (Liebano *et al*., 2011; González *et al*., 2013; Mohammed *et al*., 2016), para determinar cantidad de huevos por gramo de heces (HGH), del parásito, y de la carga de huevos por cada 50g de heces (H50H). El número de larvas de *H. contortus* en etapa tres (L3), se determinó por conteo (recuperadas del coprocultivo), con la técnica de Baerman a partir de una alícuota en un volumen final de 5ml (Liebano *et al*., 2011). La emergencia (Em), se calculó mediante Em= L3/HGH en cada una de las muestras.

Ensayos experimentales

De acuerdo a los días de conservación, las muestras refrigeradas se evaluaron y clasificaron en tres ensayos independientes: RFG4d (2 y 4d), RFG21d (7, 14 y 21d), y RFG42d (28, 35 y 42d). Las muestras de heces sin refrigerar colectadas el día cero (0d), se consideraron como grupo control (CTRL), para observar los cambios semanales en la viabilidad de la muestra.

Análisis estadístico

Los registros originales de HGH, H50H y L3 fueron normalizados (Log+0.5), en hoja electrónica de Excel, previa evaluación de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Barlett. Con los datos transformados de cada ensayo se procedió al análisis de varianza mediante el procedimiento GLM (SAS, 2014). Los días de refrigeración entre ensayos de las variables HGH, H50H y L3 fueron utilizados como efectos fijos en el modelo intra-ensayos. En un análisis intra-ensayo, las mediciones repetidas de estas variables fueron analizadas bajo la estructura de un diseño cruzado en el cual la fecha de colecta fue considerada como efecto fijo en el modelo. Dentro de cada ensayo se utilizó un diseño cruzado para observar los cambios de las variables de estudio a través de los días de refrigeración. Se realizó comparación de medias (LSMEANS), para determinar cambios ($P<0.05$), en las medias de HGH y L3 en cada tiempo de evaluación en función al d0 (CTRL), de cada ensayo. La Em acumulada al final del cada ensayo fue analizada estadísticamente bajo la estructura de un diseño completo al azar considerando el efecto del tiempo de conservación como efecto fijo. Para su presentación, los datos fueron transformados en sus unidades originales (HGH). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SAS (2014; versión 9.4; SAS Institute Inc., USA).

Resultados y discusión

Para RFG4d y RFG21d no hubo cambios ($P>0.05$), en el HGH a través del tiempo, pero sí en RFG42d ($P<0.05$), respecto a su CTRL (Tabla 1). Para L3 en RFG4d se observó una reducción de -722 a -1037 larvas del 2d al 4d ($P<0.05$). Debido a que la realización y cuidados de los coprocultivos (Sonibare *et al*., 2011), la recolección de larvas infestantes por medio del aparato de Baerman y su conservación fueron realizados como indican otros autores (Mahmoud *et al*., 2017; Mushonga *et al*., 2018). Por lo cual los procedimientos no afectaron el desarrollo y la obtención de las larvas.

El éxito de un examen coprológico depende fundamentalmente de una correcta extracción de las heces y el procedimiento de la técnica, pero además la conservación es un elemento clave para el diagnóstico cualitativo y cuantitativo (Mehlhorn *et al*., 1993). La conservación en refrigeración de las muestras de heces es importante para evitar la eclosión de las larvas, sin embargo, en la

Tabla 1. Número de HGH y de larvas infestantes de *Haemonchus contortus* identificados durante los diferentes períodos de conservación de muestras.

	Ensayos										
	RFG4d			RFG21d				RFG42d			
Variable	0d	2d	4d	0d	7d	14d	21d	0d	28d	35d	42d
HGH	200[a]	175[a]	150[a]	400[a]	391[a]	408[a]	300[a]	50[a]	716[b]	575[b]	641[b]
L3	1,371[a]	649[ab]	274[b]	1,137[a]	327[ab]	92[bc]	7.0[c]	583[a]	17[ab]	66[bc]	0.0[c]

bibliografía no se indica un tiempo límite de conservación, solo se menciona que para su procesamiento debe llegar al laboratorio en no más de 24 horas posterior a la colecta (Mehlhorn *et al*., 1993). Lo anterior coincide con el presente estudio, en el que efectivamente las muestras en las que se observó mayor cantidad de HGH fueron en el RFG4d y como era de esperar en los CTRL ($P<0.05$).

En el RFG21d, al 7d se perdió ($P<0.05$), el 71.2% (-810 larvas), de las L3, acumulando una pérdida del 99.38% (-1130 larvas), a los 21d ($P<0.05$). En el RFG42d, no quedaron L3 al final del ensayo ($P<0.05$). La exposición de las heces a la temperatura ambiental causa diferencias en la eclosión de las larvas de *Haemonchus contortus* (Stankiewiez *et al*., 1996). Así en clima tropical cálido la eclosión y formación de L3 es de 4 a 5 días y en clima templado es de 7 a 10 días (Liebano, 2011).

En este estudio la temperatura ambiente en la toma de muestra de heces no tuvo influencia en la obtención de larvas infestantes. Pero en los estudios no se indica el efecto de los días de conservación en refrigeración en la eclosión de los huevos y formación de L3 en el coprocultivo. Se reporta que hay diferencia en la velocidad de desarrollo de L3 en huevos de *H. contortus* cultivados en incubadoras que controlan la humedad y la temperatura, si la velocidad del desarrollo de las larvas difiere, entonces es posible que la mortalidad de la L3 o la pérdida de la vitalidad en condiciones ambientales de calor puede suceder en condiciones templadas, incluso cuando se mantienen en condiciones de refrigeración de 4-5°C (Bahuaud *et al*., 2006). Lo cual puede explicar la disminución de obtención de larvas a medida que aumentaban los días de conservación de las heces en refrigeración. Además de considerar el tiempo de refrigeración en la obtención de L3 de *H. contortus*, se menciona que la edad de las larvas afecta la evaluación *in vitro* de antihelmínticos de extractos de plantas, lo ideal es que sean entre dos y cinco semanas de edad para mejorar la repetitividad y reducir la variación en los resultados del bioensayo (Castañeda *et al*., 2017).

La figura 2, muestra el porcentaje de Em a través del tiempo de refrigeración de los diferentes ensayos. En los CTRL (d0), se observó una Em del 100, 64.72 y 64.51% para los tiempos RFG4d, RFG21d y RFG42 respectivamente. El RFG4d fue el ensayo en el que se obtuvo mayor emergencia (36.62%), respecto al resto de los ensayos ($P>0.05$), en el que al final de los ensayos, prácticamente no hubo emergencia a los 21d (0.46%), o 42d (0%).

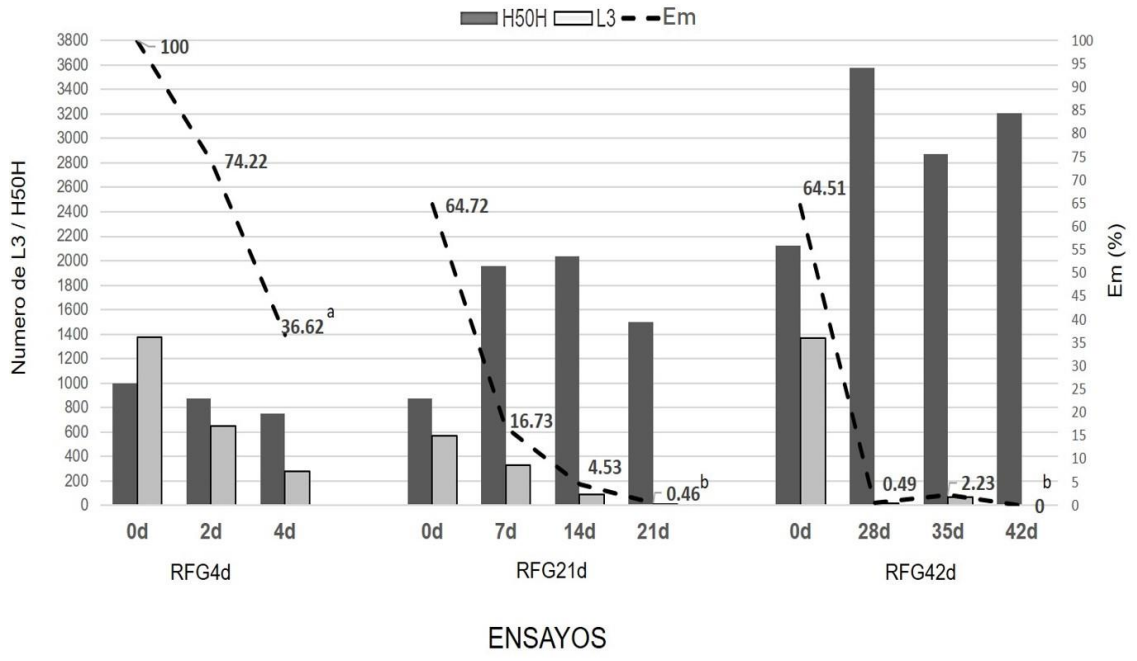
En el caso del RFG4d, la Em se perdió -25.78% en las primeras 48h, lográndose solo el 36.62% de emergencia a las 96h de conservación. El RFG21d, muestra que a los 7d aún es posible una Em= 16.73%. Por otro lado, a partir de los 28d la Em es insignificante en el RFG42.

Es evidente que en los estudios que se realicen *in vitro* o *in vivo*, el protocolo a utilizar requiere ser estandarizado a las necesidades de uso de cada laboratorio, es relevante recordar que los parásitos son materiales biológicos que pueden mostrar variación en su respuesta (Chan *et al*., 2016).

Los ensayos con el uso de larvas se han utilizado durante muchos años para medir la sensibilidad y resistencia de las larvas de nematodos trichostrongilidos a antihelmínticos *in vitro* e *in vivo* (Ruffell *et al*., 2018). Por ello, la importancia del tiempo de refrigeración de las muestras para la obtención de L3 en cantidad y viabilidad adecuada para los diferentes experimentos que se realizan para seguir aumentando el conocimiento parasitológico de *Haemonchus contortus*.

Conclusiones

Las muestras de heces frescas sin refrigeración son las ideales para obtener la emergencia de larvas de *Haemonchus contortus* en mayor cantidad y viabilidad. Las muestras de heces conservadas en refrigeración por periodos mayores a una semana afectan considerablemente la emergencia de larvas de *Haemonchus contortus*. Sin embargo, si hay necesidad de refrigeración, se puede obtener un porcentaje de emergencia satisfactorio en las primeras 48h de refrigeración. incluso hasta por



[ab] Indican diferencia estadística entre el porcentaje final de Emergencia de L3.

Figura 2. Efecto del tiempo de conservación sobre el porcentaje de emergencia de Larvas infestantes de *Haemonchus contortus*.

siete días con una emergencia suficiente para identificar el género y especie de la larva.

Referencias

Bahuaud D, Martínez-Ortíz de Montellano C, Chaveau S, Prevot F, Torres AF, Hoste H. 2006. Effects of four tanniferous plant extracts on the in vitro exsheathment of third stage larvae of parasitic nematodes. Parasitology. 132:545-554. https://doi-org/10.1017/S0031182005009509

Castañeda RGS, Mathieuc C, Vilarem G, Hoste H, Mendoza de Gives P, González-Peach P, Torres AJ, Sandoval CC. 2017 Age of *Haemomchus contortus* third stage infective larvae is a factor influencing the in vitro assessment of anthelmintic properties of tannin containing plant extracts. Vet Parasit. 243:130-13. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.06.019

Chan PJI, Torres AJFJ, Sandoval CAC, Hoste H, Castañeda RGS, Vilarem G, Mathieu C. 2016. In vitro susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone: water extracts of two tannin rich plants. Vet Parasitol. 217:53-60. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.11.001

González GR, Mendoza de Gives P, Torres HG. 2013. Variability in the fecal egg count and the parasitic burden of hair sheep after grazing in nematode infected paddocks. Pesq. Vet Bras. 33(4):469-475.

Kamal B, Taoufik H, Khadija E, Driss B. 2019. A survey of *Haemonchus contortus* parasite of sheep from Gharb plain, Morocco. Paras Epidem Control. https://doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00094

Liebano HE, López AME, Mendoza de Gives P, Aguilar ML. 2011. Manual de Diagnóstico para la identificación de larvas de nematodos gastrointestinales en rumiantes. Manual Especial no. 2. pp. 1 - 48. Ciudad de Jiutepec, Morelos, México, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias ISBN: 978-607-425-694-9

Liebano HE. 2011. Ecología de larvas de los nematodos gastrointestinales de bovinos ovinos y caprinos. Epidemiologia de enfermedades parasitarias en animales domésticos, pp. 254-272. Primera edición ISBN:978-607-00-4015-3.

Mahmoud MAM, Elfadil AAM, Yagoup EA, Adam IA, Mohamed EGS, Bushara SB, Shuaib YA. 2017. Epidemiological study of *Haemonchus contortus* among sheep in North Kordufan State, Sudan. Inter J of Veter Sci. 64(4): 209-215. P-ISSN: 2304-3075; E-ISSN: 2305-4360

Mehlhorn, H., Düwel, D., Raether, W. (1993). *Manual de Parasitología veterinaria* (GRASS Ediciones Trad). Hohenheim, Sturrgart, Alemania: Grass-Iatros. 1. ISBN 8477140219, 9799477140214

Mohammed IB, Abdelhamid AME, Fayza AO, Yassir AS. 2016. Prevalence and risk factors of *Haemonchus contortus* in sheep in Khartoum State, the Sudan. J of Agri and Vet Sci. 9(2):77-83. e-ISSN: 2319-2380, p-ISSN: 2319-2372.

Mushonga B, Habumugisha D, Kandiwa E, Madzingira O. 2018. Prevalence of *Haemonchus contortus* infections in sheep and goats in Nyagatere District, Rwanda. J of Vet Med. 9 pages. ID 3602081. https://doi.org/10.1155/2018/3602081

Nabi H, Saeed K, Rahimullah SS, Imran MR, Akbar H, Shehzad

W. 2014. Epidemiological study of gastrointestinal nematodes of goats in District Swat, Khyer Pakhtunkhwa. Pakistan Sci Int (Lahore). 26(1):283-286. ISSN: 1013-5316; CODEN: SINTE 8

Qamar MF, Maqbool A. 2012. Biochemical studies and serodiagnosis of haemonchosis in sheep and goats. J Anim Plant Sci. 22(1): 32-38. ISSN: 1018-7081.

Rodríguez AV, Golderg V, Viotti H, Ciappesoni G. 2015. Early detection of *Haemonchus contortus* infection in sheep using three different faecael occult blood test. Open Vet Jour. (2): 90-97. ISSN: 2226-448 (Print), ISSN:2218-600 (Online).

Ruffell A, Razaa A, Elliott TP, Kotzea AC. 2018. The use of the larval development assay predicting the in vivo of Levamisole against *Haemonchus contortus* and Trichostrongylus colubriformis. Veterinary Parasitology. 260:6-11. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.07.013

SAS Institute Inc., 2014. User's Guide: Statistic, Version 9.4th Edition. SAS Inst. Inc., Cary. N.C. USA. SAS Institute Inc. Disponible https://support.sas.com/documentation/cdl/en/procstat/66703/PDF/default/procstat.pdf

Sonibare AO, Kumse HA, Okewole EA, Talabi AO, Alaka O, Otesile EB, Joshua RA. 2011. Survival and infectivity studies of in vitro cultivated larvae of *Haemonchus contortus* in sheep and goats in Nigeria. Vet World. 4(12): 533-536. DOI: 10.5455/vetworld.2011.533-536

Stankiewiez M, Cabal W, Pernthaner W, Jonas W. 1996. Drug abbreviated infection and infection of develop innunity against Trichostrongylus colubriformis in sheep. Inter J Parasitol. 26:97-103. https://doi.org/10.1016/0020-7519(95)00088-7

Thrusfield, M. 2018. Veterinary Epidemiology. Wiley-Blackwell Publishing. USA. Fourth Edition. 219-251 p. ISBN: 978-111828027.