

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO EN RUMIANTES: TÉCNICAS TRADICIONALES Y AVANCES EN BIOLOGÍA MOLECULAR

María Eugenia López Arellano. 2003. Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, SAGARPA. Cuernavaca-Cuautla, Col Progreso, Jiutepec, México.
www.produccion-animal.com.ar

[Volver a: Parasitosis](#)

El diagnóstico de las parasitosis internas en rumiantes es una herramienta indispensable de trabajo para el médico veterinario, quien necesita conocer en forma precisa la situación parasitológica del ganado a fin de poder establecer el tratamiento adecuado y poder dar sugerencias y recomendaciones al ganadero. Uno de los principales problemas parasitarios que afectan a rumiantes domésticos son los causados por nematodos gastroentéricos (NGE) pertenecientes a la familia Trichostrongylidae. El diagnóstico para este grupo de parásitos se basa en el uso tradicional de técnicas coproparasitoscópicas cualitativas como son la técnica de flotación, la cual permite identificar la presencia de huevos de NGE; así como las técnicas de Baermann y coprocultivo, que permiten obtener estadios larvales de estos parásitos para finalmente poder identificar en forma específica el género de algunos nematodos. Asimismo, se cuenta con técnicas coproparasitoscópicas cuantitativas con un rango de sensibilidad de 10 a 50 huevos por gramo de heces (hpg), como ejemplo están la técnica Universal (>10 hpg), la de Stoll (>20 hpg); así como la técnica de McMaster (> 50 hpg), siendo ésta última la más empleada debido a que es rápida y sencilla. Tanto las técnicas cualitativas como las cuantitativas son complementarias y conducen hacia un diagnóstico confiable de NGE en rumiantes. La metodología general para dichas técnicas se basa en la obtención de 2 a 10 g de muestra fresca de heces colectada directamente del recto (para evitar contaminación con nematodos del suelo), y posterior análisis del número de huevos, o bien para ser procesadas mediante un coprocultivo para la obtención e identificación de larvas infectantes de NGE, presentes en dicha muestra. La especificidad de las técnicas cualitativas es muy importante para determinar los estadios biológicos presentes, por ejemplo en la técnica de flotación se observarán huevos de NGE flotando, lo cual es debido a gradientes de densidad (1:05-1:15), quedando en el sedimento partículas de mayor peso específico. Asimismo, características de conducta como fototropismo y termotropismo son el fundamento de la técnica de Baermann, ya que las larvas son atraídas por la luz y la temperatura, ésta técnica es recomendada para el diagnóstico de nematodos pulmonares y para la colecta de larvas infectantes. Asimismo, para identificar NGE y colectar larvas se debe de proporcionar un medio que permita su desarrollo biológico, para ello se realizan coprocultivos con diferentes substratos como hule espuma y serrín, para permitir la conservación de temperatura (25-30°C) y humedad (80-100%), además de proporcionar nutrientes a las fases de desarrollo de huevo a larva infectante. El uso de substratos se realiza para obtener grandes cantidades de larvas. En cambio, para colectar pequeñas cantidades se recomienda hacer cultivos de heces en frascos de vidrio de 50-100 ml conteniendo aproximadamente 20 g de heces. Esto permitirá obtener las larvas infectantes necesarias para su caracterización taxonómica hasta género, a través del uso de claves de identificación morfométricas, ya estandarizadas universalmente. A diferencia de otros agentes infecciosos los NGE no son fáciles de controlar debido a su alto grado de adaptación inmunológica, al factor ecológico y a la presencia de poblaciones resistentes a diversos antihelmínticos. En los últimos años, con objeto de incrementar la sensibilidad y especificidad de diagnóstico en NGE, nuevos métodos de diagnóstico molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la técnica de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción en conjunto con PCR (PCR-RFLP), la técnica de hibridación y análisis de ADN, y la construcción de bibliotecas de expresión de ADN, entre otras, están siendo integradas en la identificación y cuantificación de NGE, así como para obtener genes de importancia en la interacción hospedero-parásito. Actualmente existen técnicas para procesar pequeños fragmentos de ADN con objeto de identificar las diferentes especies de un mismo género como *Haemonchus* spp y *Ostertagia* spp. Asimismo, el diseño de iniciadores específicos y la presencia repetida de una plantilla de ADN dentro del espaciador interno (ITS) de el ADN ribosomal, han sido de gran utilidad para llevar a cabo estudios filogenéticos y semi-cuantitativos de NGE. Debido a la diferencia de tamaño de los productos generados en PCR del ADN de *Ostertagia ostertagi* y ADN de otros trichostrongylidos (*Haemonchus contortus*, *Cooperia oncophora* y *Oesophagostomum radiatum*), iniciadores específicos de PCR pueden ser usados en forma semi-cuantitativa, alcanzando una sensibilidad de 0.05 huevos de *O. Ostertagi*. Esta metodología tiene la gran ventaja de poderse aplicar a otros NGE, lo cual disminuiría el tiempo invertido en estudios coproparasitoscópicos cuantitativos y cualitativos. Asimismo, la secuenciación completa del genoma del nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* ha permitido identificar genes relacionados con resistencia a antihelmínticos y productos de genes con potencial como agentes inmunizan-

tes contra *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*. Debido a la alta sensibilidad de estas pruebas es posible detectar individuos mutantes en los cuales este implicada la resistencia antihelmíntica con base en su ADN para poder determinar medidas preventivas de manejo. La técnica de alelos-específicos en conjunto con PCR ha sido de gran apoyo para estos estudios y parece indicar que grandes cantidades de muestras podrían ser procesadas y así apoyar estudios epidemiológicos. Otros estudios han podido predecir la posible función y localización de las proteínas expresadas por genes obtenidos de poblaciones resistentes a antihelmínticos en *C. elegans* transgénicos. Además, debido a la relación filogenética de este nematodo de vida libre con NGE, la secuencia de genes de *C. elegans* ha sido una importante fuente para estudiar genes relacionados con otros nematodos parásitos. Un interesante análisis molecular de nematodos parásitos y *C. elegans* fue realizado para determinar la diversidad y evolución con objeto de apoyar estudios morfológicos y filogenie . Otra importante herramienta molecular es la conducción de PCR usando uno de los iniciadores con un marcador fluorescente, esta prueba es usada en hibridación de ADN. En este sistema uno de los iniciadores es biotinilado y el resultado obtenido por PCR se deposita en placas de ELISA o en Western blot para unirse con estreptavidina y después de ser incubado con un anticuerpo-anti fluoresceína y con un conjugado se logra detectar residuos de fluoresceína acoplados al ADN. La introducción de quimioluminiscencia para detectar ADN sustituye en muchos casos el uso de pruebas radioactivas (como es el uso de ³²P radiactivo) las cuales requieren de equipo especial y personal capacitado. Si bien las nuevas técnicas sofisticadas de diagnóstico son costosas, el futuro que se observa con el uso de estas técnicas moleculares vislumbra un mejor panorama en el diagnóstico para un mejor control de los NGE en rumiantes, así como un mecanismo preventivo y no correctivo de estas parasitosis. Sin embargo, los métodos tradicionales de diagnóstico que siguen siendo sencillos, prácticos y económicos, no deben descartarse pues son excelentes herramientas de diagnóstico. La utilización de ambas metodologías deben ser consideradas como complementarias para lograr un mejor diagnóstico y sirvan de apoyo al medico veterinario y al productor.

[Volver a: Parasitosis](#)