

209  
2ci

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



COMPARACION DE CUATRO TECNICAS PARA LA  
CONCENTRACION DE OOCISTOS DE Eimeria spp  
DE AVES.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A :  
ROSALES BARRIOS HORTENSIA ILIAN

Asesor. MVZ. Ramón Meza Beltrán



MEXICO, D. F.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1989



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

	Páginas
RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	3
MATERIAL Y METODOS .....	6
RESULTADOS .....	10
DISCUSION .....	12
LITERATURA CITADA .....	14

## RESUMEN

MOSALES BARRIOS HORTENSIA ILLIAN. Comparación de cuatro técnicas para la concentración de ooquistes de Eimeria spp de aves (bajo la dirección de: Ramón Meza Beltrán). El trabajo de tesis fue realizado en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Con el objeto de conocer la mejor técnica para la concentración de ooquistes de Eimeria spp, se compararon cuatro técnicas: la técnica de Sedimentación; la de 1% con bicarbonato de sodio éter y centrifugación; la de Sedimentación Flotación y la del Tamizado Fraccionado. Se inocularon 10 pollitos recién nacidos con una cepa de campo, el excremento de estos pollos se colectó durante siete días, al término de los siete días se hizo la mezcla total de las heces y se le llamó muestra piloto. Con esta muestra piloto se trabajaron treinta muestras para cada técnica. Los mejores resultados en cuanto a concentración fueron en orden decreciente: la técnica de Tamizado Fraccionado con 574 ooquistes por mililitro (esta técnica proporciono además suspensiones con una menor cantidad de partículas fecales), la de Sedimentación Flotación con 534 ooquistes por mililitro, la de 1% de bicarbonato de sodio éter y centrifugación con 387 ooquistes por mililitro y la de Sedimentación con 110 ooquistes por mililitro. No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados de la técnica de Tamizado Fraccionado que fue la mejor y la de

Sedimentación Flotación, en cambio sí se encontró diferencia entre los resultados de las técnicas de Sedimentación y la de bicarbonato de sodio éter y centrifugación.

## INTRODUCCION

La coccidiosis es una enfermedad parasitaria de las aves y algunos animales domésticos, considerada por los productores de aves como la que mayores pérdidas económicas produce (1,4,6).

En relación con los estudios de los coccidios, es necesario mencionar que no se conocen bien aspectos importantes, tales como: su ultraestructura, histoquímica e histofisiología y para que sean realizados dichos estudios en el laboratorio se requiere de la obtención de suspensiones puras que contengan un gran número de ooquistes (2,9).

A continuación se describen algunas de las técnicas que se utilizan comúnmente para concentrar ooquistes de Eimeria spp. de aves.

Edgar (3) describió una técnica para separar los ooquistes de una gran cantidad de materia fecal, sin embargo, esta técnica genera grandes volúmenes de agua sobrante y por lo tanto se pierde un gran número de ooquistes durante el lavado de los mismos.

Asimismo, se han utilizado otras técnicas las cuales, son rápidas para obtener ooquistes de coccidios libres de partículas fecales pero requieren de una notable destreza manual como son: flotación con cubreobjetos, declive lineal, declive zonal y flotación por gravedad. La experiencia ha demostrado que cada uno de estos métodos es limitado en la cantidad de partículas fecales que pueden ser separadas eficientemente (8).

El método flujo continuo diferencial densidad flotación (CFDDF), separa ooquistes de una gran cantidad de

partículas fecales, para lo cual es necesario una centrífuga de flujo continuo, con este método el 85% del total de ooquistes es recuperado y los resultados que se obtienen, son idóneos ya que se manejan volúmenes grandes de materia fecal y el porcentaje de ooquistes recuperados es superior al de otras técnicas en las que sólo se obtiene de un 40 a 65% del total de ooquistes (8); sin embargo, en México no se cuenta con la centrífuga necesaria para el método CFDDP.

Con el propósito de conocer cuál es la técnica que da mejores resultados para concentrar ooquistes de Pimeria spp, se llevó a cabo la comparación de dos técnicas comúnmente utilizadas con las dos técnicas propuestas <sup>1</sup> en este estudio;

- La técnica de sedimentación se basa en la diferencia del peso específico del líquido empleado y el peso de los ooquistes, éstos tienden a concentrarse en el fondo del recipiente empleado (5).

- Con la técnica de 1% de bicarbonato de sodio éter y centrifugación se puede recuperar un gran número de ooquistes en un período corto. Este método es una modificación de la técnica de sedimentación (3) comúnmente usada en muchos laboratorios.

- La técnica de tamizado fraccionado consiste en filtrar la muestra fecal a través de cedazos de diferentes diámetros con el propósito de concentrar los ooquistes y eliminar las grandes partículas fecales. <sup>1</sup>

- La técnica de sedimentación flotación puede dar buenos resultados ya que se emplean sustancias de bajo costo y el método es fácil de realizar. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ramón Meza Beltrán. Comunicación Personal. 1989.

## HIPOTESIS

Por el procedimiento que se emplea en las técnicas antes mencionadas, la concentración de ooquistes es variable en cada una de ellas.

## OBJETIVO

El objetivo de esta evaluación fue conocer cuál es la mejor técnica para concentrar ooquistes de Eimeria spp.

## MATERIAL Y METODOS

A partir de una cepa de campo de Eimeria spp que se obtuvo mediante la recolección de ciegos hemorrágicos de diferentes expendios de pollo, estos se maceraron para obtener el contenido cecal. Se tomó una gota de este contenido cecal con una varilla de vidrio, colocándose en un portaobjeto y cubriéndola con un cubreobjeto se observó al microscopio compuesto con el objetivo seco débil (10 x), con el fin de buscar los ooquistes de Eimeria spp. Una vez que se encontraron los ooquistes en los contenidos cecales, éstos se colocaron en dicromato de potasio al 2% para la esporulación de los ooquistes por 72 h. Posteriormente se lavaron los ooquistes por medio de centrifugación con agua a 1,000 rpm durante 3' varias veces y se inocularon 10 pollitos recién nacidos por vía oral, con 3,000 ooquistes esporulados de Eimeria spp, durante tres días.

Las heces se recogieron diariamente durante siete días, en este lapso se refrigeraron las muestras, posteriormente se hizo una mezcla de todas ellas, esta muestra única, se le denominó muestra piloto. Se utilizó para cada una de las técnicas a desarrollar, efectuándose treinta determinaciones de cada técnica, las cuales posteriormente se mencionan.

Para conocer cuál método fue más efectivo para concentrar ooquistes de Eimeria spp, todas las técnicas se valoraron por el conteo de ooquistes utilizando un gotero estándar, se tomaron tres gotas (calibradas) de cada una de las muestras, cada vez que se tomó una gota se agitó la muestra, se procuró tomar la gota del centro del mililitro

y se colocaron las tres gotas en un portaobjetos. A cada una de las gotas se les realizó el conteo total de coquistes, se sumaron y el conteo se multiplicó por el número de gotas del gotero estándar (15 gotas) para saber la cantidad de coquistes por mililitro.

Para el análisis de los resultados se efectuó el Análisis de Variancia con un diseño completamente al azar, posteriormente se empleó la Prueba de Tukey para comparar los promedios de los diferentes grupos (7).

#### Técnica con 1% de bicarbonato de sodio, éster y centrifugación (3)

Diez gramos de heces de la muestra piloto se colocaron en un vaso de plástico, se agregó agua hasta obtener una pasta uniforme y mezclando constantemente con un agitador de vidrio se aforo a 250 ml, filtrándose a través de una coladera de malla fina, se repitió el proceso dos veces. El filtrado se colocó en la centrifuga durante 5' a 1,500 rpm, el sobrenadante se decantó.

El sedimento se suspendió en 35 ml de una solución de bicarbonato de sodio al 1%, se le adicionaron 4 ml de éster y se agitó fuertemente la mezcla. La mezcla se centrifugó por 5' a 1,500 rpm el sobrenadante se decantó.

El sedimento se lavó por resuspensión en agua, se centrifugó por 5' a 1,500 rpm y el sobrenadante se decantó, el sedimento se resuspendió en 1 ml de agua y se homogeneizó.

## Técnica de Sedimentación (5)

Se tomaron 10 g de heces de la muestra piloto, se colocaron en un vaso de plástico, se agregó agua hasta obtener una pasta uniforme y mezclando constantemente con un agitador de vidrio se aforo a 250 ml, filtrándose a través de una coladera de malla fina, se repitió el proceso dos veces. El filtrado se colocó en un matraz Erlenmeyer, cuando las partículas densas formaron un anillo cerca del fondo del matraz, el sobrenadante se decantó, se repitió el proceso nuevamente.

El sobrenadante se dejó sedimentar 24 h, después se decantó el sobrenadante, el sedimento final se resuspendió en 1 ml de agua y se homogeneizó.

Técnica de Sedimentación  
Flotación<sup>1</sup>

Se homogenizaron 10 g de heces de la muestra piloto con 50 ml de agua y se filtraron a través de una coladera de malla fina. La muestra se centrifugó a 1,000 rpm durante 3' el sobrenadante se decantó. El sedimento se volvió a homogeneizar con 50 ml de agua y se centrifugó, como ya se mencionó, el sobrenadante se decantó, al sedimento se le adicionó una solución glucosada, con densidad de 1,200, se procedió a centrifugar a 2,500 rpm durante 3'. Con una varilla de vidrio, se tomaron cuatro muestras de la superficie de tal manera, que se tomó completamente la superficie del tubo, esta muestra se suspendió en 1 ml de

<sup>1</sup> Ramón Meza Beltrán. Comunicación Personal. 1989.

agua y se homogeneizó.

Técnica del Tamizado  
Fraccionado<sup>1</sup>

Diez gramos de heces de la muestra piloto se homogeneizaron con 50 ml de agua y se hicieron pasar a través de cedazos cuyas mallas miden 177 micras, 149 micras y 53 micras.

El filtrado del último tamiz se centrifugó a 1,000 revoluciones durante 3', el sobrenadante se decantó; al sedimento se le adicionó solución glucosada con una densidad de 1,200 y se procedió a centrifugarlo a 2,500 rpm durante 3'. Con una varilla de vidrio se tomaron de la superficie cuatro muestras de tal manera, que se abarcara completamente la superficie del tubo de centrifuga, las muestras se suspendieron en 1 ml de agua y se homogenizaron.

<sup>1</sup> Ramón Meza Beltrán. Comunicación Personal. 1989

## RESULTADOS

La media obtenida del conteo de ooquistes por mililitro para cada técnica fue diferente. El menor número de ooquistes correspondió a la técnica de Sedimentación con un promedio de 110 ooquistes por mililitro, seguida por la técnica de 1% de bicarbonato de sodio éter y centrifugación con un promedio de 387 ooquistes por mililitro.

Las técnicas que demostraron mejores resultados para la concentración de ooquistes de Eimeria spp, fueron la técnica de Sedimentación Flotación con un promedio de 534 ooquistes por mililitro y el Tamizado Fraccionado con 574 ooquistes por mililitro.

Mediante la Prueba de Tukey se encontraron diferencias estadísticas entre los promedios de la técnica de Sedimentación y la técnica de 1% de bicarbonato de sodio éter y centrifugación de 277 ooquistes por mililitro. Asimismo, con esta última técnica se obtuvo una diferencia estadística de 147 ooquistes por mililitro con respecto a la técnica de Sedimentación Flotación. (Ver Cuadro 1)

En cambio, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de la técnica de Sedimentación Flotación y el Tamizado Fraccionado por lo que ambos promedios son iguales. (Ver Cuadro 1)

La mayor dispersión de los valores con respecto a su media se encontró en la técnica de 1% de bicarbonato de sodio éter y centrifugación, seguida por la técnica de Sedimentación Flotación y el Tamizado Fraccionado. Con la técnica de Sedimentación la variación fue menor. (Ver Cuadro 1)

## CUADRO 1

NÚMERO DE OOQUISTES DE Eimeria spp  
OBTENIDOS EN LAS CUATRO TÉCNICAS  
PROBADAS EN ESTE ESTUDIO

Técnica	Número de muestras	Promedio de ooquistes por mililitro	Desviación Estándar S	Diferencias encontradas en el promedio de cada técnica, mediante la Prueba de Tukey
Sedimentación 1/2 de bicarbonato de sodio éter y centrifugación	30	110	14.85	277
Sedimentación Flotación	30	387	66.85	147
Tamizado Fraccionado	30	534	61.72	40
	30	574	51.21	40

## DISCUSION

Las diferencias que existen entre los promedios de las cuatro técnicas realizadas en este trabajo, indican que se obtienen concentraciones de ooquistes diferentes.

La técnica de Sedimentación fue la que tuvo una menor concentración de ooquistes de Eimeria spp por mililitro ya que un gran número de ellos se pierde en el sobrenadante que se decanta. Los sobrenadantes de las muestras de la técnica de Sedimentación se conservaron para llevar a cabo el conteo de ooquistes, encontrando que se pierden en 100 ml un promedio de 4,600 ooquistes disminuyendo así la concentración. Asimismo, se coincide con Smith (3) de que con la técnica de Sedimentación se generan grandes volúmenes de agua, perdiéndose un gran número de ooquistes en el sobrenadante que se decanta.

En comparación con la técnica de Sedimentación, la técnica de 1% de bicarbonato de sodio éter y centrifugación tuvo una concentración mayor de ooquistes por mililitro, el inconveniente de esta técnica es que las sustancias empleadas no son de bajo costo.

No se encontró, diferencia estadísticamente significativa en los promedios de las técnicas de Sedimentación Flotación y el Tamizado Fraccionado, con ambas se obtienen grandes cantidades de ooquistes de Eimeria spp por mililitro. Las sustancias que se emplean en ambas técnicas son de bajo costo y fáciles de realizar, aunque con la técnica de Tamizado Fraccionado las suspensiones resultaron tener menos partículas fecales. Esto se debe al tamizado que se llevó a cabo para cada una de las muestras.

Con cualquiera de estas dos técnicas se obtienen grandes cantidades de ooquistes de Eimeria spp por mililitro, el criterio para elegir una de ellas, sería el obtener suspensiones con una cantidad menor de partículas fecales, dando por resultado la elección de la técnica de Tamizado Fraccionado.

De esta forma se concluye que las mejores técnicas para concentrar ooquistes de Eimeria spp de aves son la técnica del Tamizado Fraccionado y la técnica de Sedimentación Flotación propuestas en este trabajo.

## LITERATURA CITADA

1. Borchet, A.: Parasitología Veterinaria. Acríbia, Zaragoza, España, 1975.
2. Dorney, R.S.: Evaluation of a microquantitative method for counting coccidial oocysts. J. Parasitol., 50: 518 - 522 (1964).
3. Edgar, S.A.: Coccidiosis. U.S. Pat., 1: 147 (1964). Citado por: Smith, R.R.: A rapid technique for the cleaning and concentration of Eimeria oocysts. Poult. Sci., 54: 2081 - 2086 (1975).
4. Lapage, G.: Parasitología Veterinaria. C.E.C.S.A., México, D.F., 1981.
5. Levine, N.D., Meara, K.N., Clark, D.T. and Aves, I.J.: A comparison of nematode egg counting techniques for cattle and sheep feces. Am. J. Res., 21: 511 - 515 (1960).
6. Moning, H.O.: Helminología y Entomología Veterinarias. Labor, Barcelona, España, 1947.
7. Snedecor, G.W., Cochran, W. G.: Métodos Estadísticos. C.E.C.S.A., México, D.F., 1970.
8. Vetterling, J.M.: Continuous-flow differential density flotation of coccidial oocysts and a comparison with other methods. J. Parasitol., 55: 412 - 417 (1969).
9. Wagenbach, G.E., Casley, J.R. and Burns, W.C.: A method for purifying coccidian oocysts employing clorox and sulfuric acid-dichromate solution. J. Parasitol., 52: 1222 (1966).