

# PROPUESTA METODOLÓGICA PARA LA DETECCIÓN DE ZONOSIS EN *Syncerus caffer nanus* DE LA SELVA DE MAYOMBE EN CABINDA, ANGOLA

Data de aceite: 01/12/2023

### Fernando Abel Mavungo

Instituto Superior de Ciências da  
Educação de Cabinda (ISCED- Cabinda),  
Angola. <https://orcid.org/0000-0002-4821-3764>

### Rubén Cabrera

Gabinete de Arqueología, Oficina del  
Historiador de la Ciudad, Habana Vieja,  
Cuba. <https://orcid.org/0000-0003-0089-1125>

### Jhoana Diaz-Larrea

Universidad Autónoma Metropolitana  
Unidad Iztapalapa. División de Ciencias  
Biológicas y de la Salud, Departamento de  
Hidrobiología. Ciudad de México, México.  
<https://orcid.org/0000-0003-4290-0835>

### Juan Ricardo Cruz-Aviña

Facultad de Medicina Veterinaria y  
Zootecnia de la Benemérita Universidad  
Autónoma de Puebla (BUAP)  
Tecamachalco, Puebla, México. <https://orcid.org/0000-0002-0905-9370>

**RESUMEN:** Las poblaciones de búfalos africanos han sufrido una grave reducción en tamaño y distribución geográfica desde el siglo XIX, como resultado de los efectos combinados de impactos antropogénicos

como la conversión de tierras, la caza furtiva, los brotes de enfermedades y eventos climáticos como las sequías. Aquí se propone realizar un estudio poblacional de la especie *Syncerus caffer nanus*, teniendo en cuenta su densidad en dos municipios de Cabinda, Angola. Para ello se pretende aislar el género *Brusella* de las heces y correlacionarlo con variables ecológicas de la especie.

## METHODOLOGICAL PROPOSAL FOR THE DETECTION OF ZONOSIS IN *Syncerus caffer nanus* FROM THE MAYOMBE FOREST IN CABINDA, ANGOLA

**ABSTRACT:** African buffalo populations have undergone a severe reduction in size and geographical distribution since the nineteenth century, as a result of the combined effects of anthropogenic impacts such as land conversion, poaching, disease outbreaks and climatic events such as droughts. Here it is proposed to carry out a population study of species *Syncerus caffer nanus*, taking into account its density in two municipalities of Cabinda, Angola. For this purpose, the aim is to isolate the genus *Brusella* from the feces and correlate it with

ecological variables in the species.

**KEYWORDS:** Brucellosis, Jungle buffalo.

## 1 | INTRODUCCIÓN

El Búfalo de la selva (*Syncerus caffer nanus*) (**Figura 1**), tal y como su nombre lo indica, habita en las selvas densas donde abundan ríos y quebradas. La especie tiene una movilidad muy limitada, pues su radio de acción no sobrepasa los 5 Km de desplazamiento diario (Cornélis *et al.*, 2014), lo que acentúa su vulnerabilidad, dada la fidelidad de su hábitat. No menos significativo es su amplia diversidad genética, lo que hace que sus miembros reflejen numerosas variaciones que van desde genéticas hasta conductuales Smitz *et al.* (2013).

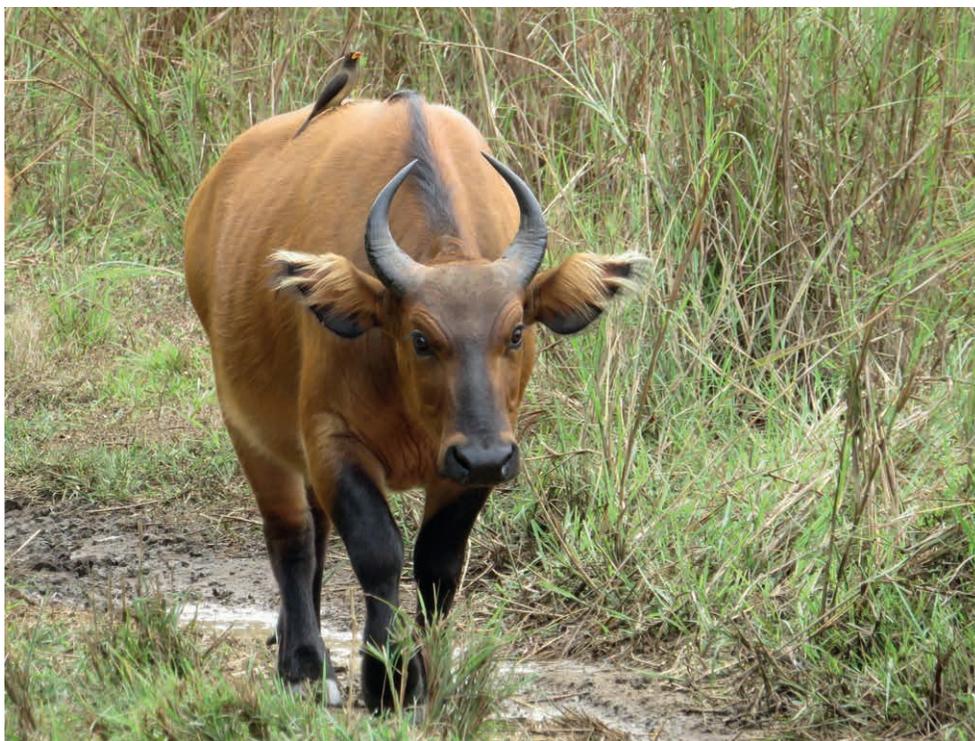


Figura 1. Búfalo de selva (*Syncerus caffer nanus*).

Fuente: (IUCN Red List, 2019).

Si bien el león africano, se considera su depredador natural. Los factores causales de su declinación actual son precisamente la destrucción de su hábitat, debido a: la explotación maderera, la explotación minera, las prácticas agrícolas irresponsables como la quema, y parcelación de la selva (Butynski *et al.*, 1997).

Por si fuera poco, a la falta de un Plan de Manejo para la explotación maderera se

une, la ausencia de regulaciones en la inclusión de ganado bovinos, caprinos, ovinos en la selva, trayendo consigo un enemigo silente. La concesión más generalizada es que los búfalos suelen ser inmunes a infecciones parasitarias y bacterianas, lo que no es totalmente cierto (Freitas *et al.*, 2001; Paulin & Neto, 2008; Silva *et al.*, 2013; Destro *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta esos preceptos se propone investigar el tema: *Zoonosis en Syncerus caffer nanus de la Selva de Mayombe en Cabinda, Angola y sus implicaciones en su densidad poblacional.*

## 1.1 Problema de investigación

La narrativa de que los búfalos no se enferman, hoy carece de validez científica. Pues, zoonosis como la brucelosis, toxoplasmosis, cryptosporidiosis, tuberculosis, leptospirosis por citar algunas, constituyen una parte de la extensa lista de enfermedades encontradas en poblaciones de búfalos (Paulin & Neto, 2008; Destro *et al.*, 2014).

## 1.2 Interrogantes a sobre el problema

En correspondencia con la literatura especializada admite que, "... *la densidad de mamíferos como el Búfalo, puede ser afectada tanto por factores antrópicos cuanto natural, en particular, los zoonóticos...*" (Bienen & Tabor (2006: 322 p).

En conformidad con lo planteado se propone responder la siguiente pregunta científica:

- *¿Cuál es el diagnóstico del Syncerus caffer nanus de la Selva de Mayombe a respecto del brucelosis, cryptosporidiosis y toxoplasmosis?, y ¿Cómo esas enfermedades pueden repercutir en la densidad de ese mamífero en las aldeas de Npeni Ncacata y Sanga Mongo del municipio de Buco Zau, y de Quissoqui, en el municipio de Belize en Cabinda, Angola?*

El desarrollo de este estudio esta norteado por el siguiente objetivo:

## 2 | OBJETIVO GENERAL

- Diagnosticar la presencia de *Brucella* spp., en heces fecales de *Syncerus caffer nanus* localizado en la Selva de Mayombe en los municipios de Buco Zau y Belize en Cabinda, Angola.

## 3 | JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El conocimiento sobre el Búfalo de la selva es muy escaso y limitado. Según la investigación de Molloy (1997), varios son los aspectos que ameritan su estudio a nivel regional.

3.1 Tienen limitada distribución geográfica (solo se encuentran en selvas tropicales densas).

3.2 Su etología se describe como una especie escurridiza en su interacción con otras especies, así como su movilidad es referida como “*sedentaria...*” (Melletti, 2007: 1314 p).

Lo antes expuesto ha sido referido por Cornélis *et al.* (2014) en base a los estudios de Bekhuis *et al.* (2008) quienes afirman que: “... *no ha sido posible estimar el número de ese mamífero en los ecosistemas naturales, salvo únicamente, los que se localizan en los parques nacionales, ejemplo, Parque Nacional de Odzala (República de Congo), Parque Nacional de Lopé (Gabón), donde se estima su presencia más significativa, oscilando entre 500 y 300 individuos, respectivamente*” (Bekhuis *et al.* (2008: 672 p).

La zoonosis en el Búfalo de selva de Mayombe aún no es conocida en la literatura. Por lo tanto, esta investigación permitirá conocer, la situación actual de *Syncerus caffer nanus* de la Selva de Mayombe en cuanto a su zoonosis existente, lo que permitirá implementar protocolos de manejo para las especies domesticas en cuanto a su modo de introducción, y permitirá fomentar nuevas políticas ambientales.

O sea, tratase de un estudio que se justifica por su contextualidad y relevancia frente a los grandes desafíos ambientales que la humanidad enfrenta, cuyas respuestas presuponen enfoques científicos sólidos.

## 4 | METODOLOGÍA A CONSIDERAR PARA EL CUMPLIMIENTO DE OBJETIVO

### 4.1 Materiales y Métodos

La investigación se desarrollará en tres poblados. Dos aldeas (Npeni Ncacata y Sango Mongo) correspondientes al municipio de Buco Zau, y una tercera aldea Quissoqui del municipio de Belize. Ambos, sitios propuestos constituirán los espacios del muestreo, donde son avistados con cierta frecuencia este mamífero, o donde sus vestigios en este caso, heces son frecuentes. Las zonas propuestas se observan en la **Figura 2**.

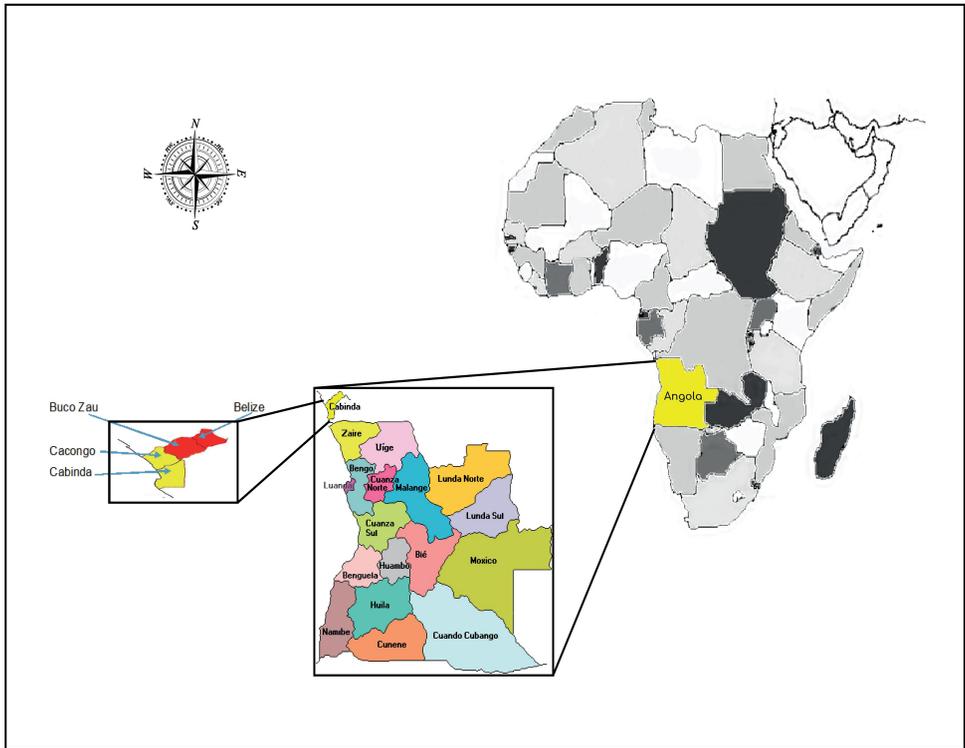


Figura 2. Zona propuesta para estudio. Sitios propuestos para la toma de muestras: ■ Belize, ■ Buco Zau.

Fuente: elaboración propia.

Sus temperaturas medias anuales de la región superan los 20°C y las precipitaciones están correlacionadas con la altitud, Buco Zau 1350 mm / año<sup>-1</sup>, mientras que Belize 1800 mm / año<sup>-1</sup> (Howard & Washington, 2018). Poseen dos estaciones climáticas muy diferenciadas, lluviosa (septiembre hasta mayo) y seca (junio hasta septiembre) con temperaturas bajas.

#### 4.2 Metodología para toma de datos ecológicos

El método de censo visual, y la estimación de los puntos de intersecciones son los más utilizados como opción cuando el muestreo poblacional contempla organismos no fijados al sustrato. Estos prevén el avistamiento tanto de animales, heces o carcasas (resto de huesos) (García-Charton *et al.*, 2000). Por la naturaleza de la especie objeto de estudio, la utilización de métodos visuales, particularmente los indirectos son los más recomendados (Romanowski *et al.*, 2019).

Cabrera *et al.* (2021) defiende que, el método de observación visual que presupone caminadas multidireccionales en la parcela objeto de estudio, es una condición esencial

para el desarrollo de esta investigación.

En ese sentido, como sugieren Sabino & Villaça (1999), las estrategias de muestreo jugarán un importante al permitir dar respuestas a las cuestiones relacionadas con la distribución y abundancia de los organismos/objetos en estudios que se realizará.

### 4.3 Metodología para los análisis microbiológicos

Las muestras de excretas secas (10 g) se colocarán en matraces que contenían 100 mL de caldo pre-enriquecido con soya tripticasa (Difco, EUA) y se incubaran por 24 h a 37 °C en una estufa de cultivo (ECOSHEL HI-162, EUA). Este caldo que contendría 5 % de suero de bovino estéril (SBE) y un suplemento selectivo de *Brucella* (Oxoid, EUA) se mezclarán con polimixina B, bacitracina, natamicina, ácido nalidíxico, nistatina y vancomicina según las recomendaciones de Díaz *et al.* (2000).

De cada matraz se tomará una muestra del cultivo, el cual se sembrará en placas de Agar Tripticasa (TSA), adicionándole un 5 % de SBE y el suplemento selectivo de *Brucella*. Las placas se incubaran por un período de 5 a 12 días a 37 °C. Las colonias con morfología sugestiva de *Brucella* spp., se seleccionarán, y habrán de ser tratadas con Agar *Brucella* (Difco, EUA). Lo que resulte de esto, habrán de identificarse por pruebas bioquímicas con base en la producción de H<sub>2</sub>S, ureasa, Agar TSI, así como su sensibilidad a fucsina y tionina (Alton *et al.*, 1976).

### Extracción de ADN

El ADN obtenido de las muestras se realizará mediante el método de extracción fenol-agua modificado según Rezania *et al.* (2011). Diez gramos de heces deben ser macerados junto a 10 mL de solución salina fisiológica. Las muestras maceradas (aproximadamente 1500 g) se centrifugan para obtener un pellet al cual se adicionarán 15 mL de lisozima.

Esta mezcla se colocará en hielo por 45 minutos, y se agregarán 100 mL de solución STEMP (SDS 10 %, Tris-HCl 1M, EDTA 0.5M, H<sub>2</sub>O estéril) y 15 mL de proteinasa K. Se mantendrá por 1 h a 60 °C de temperatura, luego se mezclará en un vórtex cada 10 min. Posteriormente, se agregará una solución de fenol bufferado (PBS) 1:1, la que se centrifugará por 15 min. Para separar la fase acuosa deben añadirse 750 mL de acetato de potasio y etanol absoluto en una proporción 1:2. Se agitará, decantará y evaporará hasta que el pellet que completamente seco.

El ADN será resuspendido en una solución TE (Tris-HCl 1M, EDTA 0.5M, H<sub>2</sub>O estéril) 10:1 y se congelará a (-20 °C) hasta su procesamiento. La identificación por PCR punto final y la reacción de PCR se realizará con los oligonucleótidos F4 (5'-TCGAGCGCCCGCAAGGGG-3') y R2 (5'-AACCATAG-TGTCTCCACTAA-3') dirigidos

al gen 16S rRNA, según Padilla *et al.* (2003), la amplificación se realizará a 900 pb. El volumen final recomendado es 25 mL y contendrá 13 mL de RedTaq ReadyMix PCR Reaction Mix (Sigma, EUA), 7 mL de agua grado ABM libre de RNasas (Thermo Scientific, EUA), 1 mL de cada oligonucleótido (dNTPs) y 3 mL de ADN de la muestra. Los ciclos de reacción para la identificación de *Brucella* spp., serán: un ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C por 10 min, 30 ciclos a 95 °C por 30 segundos (s), 30 ciclos a 54 °C por 90 s, 30 ciclos a 72 °C por 90 s y una extensión final a 72 °C por 10 min. La identificación por PCR multiplexLa identificación se realizó con la amplificación de *Brusella* (cepa vacunal RB51) y los siguientes iniciadores: RB51-1 (5'-TTA AGC GCT GAT GCC ATT TCC TTC AC- 3') y RB51-2 (5'-GCC AAC CAA CCC AAA TGC TCA CAA- 3'), según Vemulapalli *et al.* (1999), que amplifica un producto de 1298 pb a partir del gen wboA. Para la amplificación de la cepa vacunal S19 se utilizarán los iniciadores ERY-I (5'TTG GCG GCA AGT CCG TCG GT 3') y ERY-II (5'CCC AGA AGC GAG ACG AAA CG 3'), de acuerdo con Sangari *et al.* (2007), cuyo producto de amplificación es de 361 pb y se corresponde a los genes eryC-eryD.

Los ciclos de reacción para la identificación de *Brucella* spp., a esperar serán: un ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min, 30 ciclos a 94 °C por 1 min, un ciclo de 59 °C por 30 s, un ciclo de 72 °C por 1.5 min y una extensión final por 5 min a 72 °C. Los productos de amplificación se observarán en geles de agarosa al 1% en TAE 0.5X y teñidos con bromuro de etidio (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) con un marcador molecular de 1000 a 3000 pb (Plus ADN Ladder Thermo Scientific). La cámara de electroforesis se colocará en una fuente de poder a 1000 V durante 60 min para observar los productos amplificado

#### 4.4 Metodologías para los análisis estadístico propuestos

Para el análisis y tratamiento de los datos de este estudio se utilizarán varias pruebas estadísticas, en primer orden:

**4.4.1** El test de Shapiro-Wilk ( $p \leq 0.05$ ) para contrastar si en todos los casos se cumple con los supuestos de normalidad de los datos.

En segundo lugar:

**4.4.2** La prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, para conocer si existen diferencias significativas entre las medias de los experimentos.

Por último:

**4.4.3** El método de Tukey para determinar los intervalos de comparación múltiple y así poder evaluar cuáles parejas de datos serán significativamente diferentes y por tanto controlar la tasa de error.

Todas las comparaciones de datos se realizarán adoptando un nivel de significación ( $p \leq 0.05$ ).

## REFERENCIAS

- Alton, G.G., Jones L.M., & Pietz, D. (1976). Técnicas de laboratorio en la brucelosis. Organización Mundial de la Salud, O.M.S., 2 da ed, Ginebra, 175 pp.
- Bekhuis, P. D. B. M., de Jong, C. B., & Prins, H. H. T. (2008). Diet selection and density estimates of forest buffalo in Campo-Ma'an National Park, Cameroon. *African Journal of Ecology* 46, 668–675.
- Bienen, L., & Tabor, G. (2006). Aplicación de un enfoque ecosistémico al control de la brucelosis: ¿puede gestionarse con éxito un antiguo conflicto entre la fauna salvaje y la agricultura? *Fronteras de la Ecología y el Medio Ambiente* 4, 319-327.
- Butynski, T., Schaaf, C., & Hearn, G. (1997). African buffalo *Syncerus caffer* extirpated on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Journal of African Zoology*, 111, 57–61.
- Cabrera, R., Díaz-Larrea, J., & Cruz-Aviña, J. R. (2021). *Nociones sobre muestreo ecológico de poblaciones y comunidades. Con énfasis en organismos marinos*. Editorial Académica Española.
- Cornélis D., Melletti, M., Korte, L., Ryan, S. J., Mirabile, M., Prin, T. & Prins, H. H. (2014). African buffalo *Syncerus caffer* (Sparrman, 1779). (326–372 pp) En: Melletti, M & Burton, J. [Eds.] *Ecology, evolution and behaviour of wild cattle: implications for conservation*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Destro, K.C., Viana, R.B., Benigno, R.N.M., Chaves, L.C.S., & Pereira, W.L.A. (2014). Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em bezerros bubalinos no estado do Pará. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, 81, (4), 368-371.
- Díaz Aparicio, E., Hernández, L. A., Valero, G. E., Arellano, B. R., Aguilar, F. R., Alfonseca, E. S., Batalla, D.C., Bautista, M. O., Betancourt, X. M., Blasco, J. M., Castillo, A. M. G., Cobos, L. M., Díaz, R. G., Dorronsoro, I. P., Elizalde C., Hernández, L. A., Leal, M. H., Leiva J.I., López-Goñi, J. E., Luna M., Mancera, M. A., Marín C. A., Martínez, O. L.M., Mateos, A. P., Mejía, P. S., Morales, J. A., Moriyón, I. U., Núñez, A. L., Núñez, E. D. T., Ochoa D., Ontiveros, M. L. C., Paredes, J. C. M., Peña, G. P. F., Ramírez, P., C. Romero R., Reséndiz, R. M., Rubio, M. A., Sahagún, R., Salas, E.T., Suárez, F. G., Tenorio, G., Valero, G. E., Vázquez, J. N., Velázquez, F. Q., Velázquez, M. M., Vicencio, M. A., & Villa, J. S. (2000). *Diagnóstico de Brucelosis Animal*. 2a. ed. INIFAP. México, D.F. 210 pp.
- Freitas, J.A., Guerra, J. L., & Panetta, J. C. (2001). Características da tuberculose observada em búfalos abatidos para consumo: aspectos patológicos e identificação de micobactérias. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 38, (4), 170-176.
- García-Charton, J. A., Pérez Ruzafa, A., & Marcos-Diego, C. (2000). Fish visual census methods for detecting gradients of abundance and biomass across boundaries of MPAs. (29–34 pp.). En: R. Goñi, M. Harmelin-Vivien, F. Badalamenti, L. Le Diréach, & G. Bernard [Eds.] *Introductory Guide to Methods for Selected Ecological Studies in Marine Reserves, USA*.
- Howard, E., & Washington, R. (2018). Characterizing the synoptic expression of the Angola low. *Journal of Climate*, 31(17), 7147–7165.
- IUCN. (2019). *The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2*. [en línea]. <https://www.iucnredlist.org>. Acceso: 6/09/2023.

- Melletti, M., Penteriani, V., Mirabile, M., & Boitano, L. (2007). Some behavioral aspects of forest buffalo (*Syncerus caffer nanus*): from herd to individual. *Journal of Mammalogy*, 88 (5), 1312–1318.
- Molloy, L. M. (1997). Forest buffalo, *Syncerus caffer nanus*, and burning of savannas at Lope´ Reserve, Gabon. MSc thesis. University of Florida, 120 pp.
- Padilla, C., Montoya Y., & Carrillo. C. (2003). Estandarización de una prueba de PCR para la detección de *Brucella* sp. *Revista Peruana Medicina Salud Publica*, 20, 102-104.
- Paulin, I.M.S., & Neto, F.J.S. (2008). Bruceloses em búfalos. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, 75, 3, 389-401.
- Rezania, S., Amirmozaffari, N., Tabarraei, B., Jeddi-Tehrani, M., Zarei, O., Alizadeh, R., Masjedian, F., & Hassan Zarnani, A. (2011). Extraction, purification and characterization of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 3, 3-9.
- Romanowski, F. N., Neris, de A., Castro, M. B., & Neris, N. W. (2019). Manual de Tipos de Estudo. Centro Universitário de Anápolis, Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa, Extensão e Ação Comunitária. *Anápolis*, 1- 38.
- Sabino, C.M., & Villaça, R. (1999). Estudo comparativo de métodos de amostragem de comunidades de costão. *Revista Brasileira de Biologia*, 59 (3), 407-419.
- Sangari, F.J., Seoane, A., Rodríguez, M.C., Agüero, J., & Lobo, J.M. (2007). Characterization of the urease operon of *Brucella abortus* and evaluation of its role in the virulence of the bacterium. *Infectar. Immune*, 75 (2), 774–780.
- Silva, J.B., Lopes, C.T.A., Pinheiro, C. P., Lima, D.H., Silva, R.S. L., Fonseca, A. H., Araújo, F.R., Neto, J., & Barbosa, D. (2013). Prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em búfalos (*Bubalus bubalis*) na Ilha de Marajó. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 33 (7), 847-850.
- Smits, N., Berthouly, C., Cornelis, D., Heller, R., Van Hooft, P., Chardonnet, P., Caron, A., Prons, H., Jansen van Vuuren, B., De longh, H., Michaux, J. (2013). Pan-African genetic structure in the African buffalo (*Syncerus caffer*): investigating intraspecific divergence. *PLoS ONE*, 8 (2), e56235.
- Vemulapalli, R., McQuiston, J., Schurig, G., Sriranganathan, N., Halling, S., & Bole, S. (1999). Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6, 760-764.