

Estudio comparativo entre las técnicas de McMaster modificada INTA y Mini Flotac para el conteo de huevos de nematodos en materia fecal de equinos

Bárbara Patricia Capello, Andrés Antonio Arce, Flavia Antonela Barbieri, Florencia Del Rio Alvarez, Laura Analía Lozina

Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional del Nordeste-Corrientes Capital, Argentina

*barbarapcapello@gmail.com

Resumen

El uso de técnicas coprológicas cuantitativas de conteo de huevos por gramo (HPG) de materia fecal permite evaluar indirectamente las cargas de parásitos intestinales y determinar la eficacia antihelmíntica, útil en investigación y práctica veterinaria. La técnica de Mc Master modificada INTA (MM), es uno de los métodos más utilizados en la práctica veterinaria, pero recientemente, la técnica Mini-FLOTAC (MF) se ha postulado como una posible alternativa. Es necesario establecer comparaciones entre ambas técnicas a fin de determinar la conveniencia entre el uso de una u otra, por lo que en este estudio se realizó el recuento de huevos de nematodos en equinos a fin de analizar las mismas en términos de precisión. Para ello se examinaron muestras fecales de 55 equinos, de ambos sexos, con edades comprendidas entre 18 meses y 17 años. Los resultados de la media del HPG del total de muestras analizadas fueron de $532,73 \pm 577$ y de $564,68 \pm 583$ para MM y MF, respectivamente. La precisión determinada para la técnica de MF (78,67%) fue superior a la de MM (66,92%). Los resultados de este estudio evidenciaron que MF exhibió mayor precisión respecto a la técnica MM. Asimismo, el tiempo requerido por muestra, para efectuar ambas técnicas desde la preparación a la lectura fue de $38 \pm 0,96$ min para MM y de $33 \pm 0,81$ min para MF. A partir de estos hallazgos, podemos concluir que MF exhibió mayor precisión y requirió menor tiempo para el análisis respecto a la técnica MM. En futuros estudios deberían incorporarse muestras con un HPG conocido, esto se logra con el enriquecimiento de muestras fecales, para que de esta manera se pudiera evaluar el parámetro exactitud para ambas metodologías y determinar la conveniencia entre una y otra.

Palabras claves: técnicas coprológicas, equinos, parásitos, nematodos.

Abstract

The use of quantitative coprological egg counting techniques can indirectly establish the burden of intestinal parasites and anthelmintic efficiency in parasitology research and in dairy veterinary practice as well. McMaster Modified INTA technique (MM), is one of the most used methods in veterinary practice, but recently, Mini Flotac technique (MF) has become as an alternative. Comparisons need to be made between these techniques to establish which one's use is more convenient, that's why equine fecal egg counts were made to analyze precision. Fifty-five random equine fecal samples from female and male horses, ages between 18 months and 17 years, were analyzed in this work. The results of fecal egg counts (FEC) were $532,73 \pm 577$ and $564,68 \pm 583$ for MM and MF, respectively. The accuracy for MF (78,67%) was above MM (66,92%).

INVESTIGACION

Capello *et al.*

Estudio comparativo [...]

The results in this study determine that MF has more precision in comparison with MM technique. The time required for each sample to be done was of 37:70 min \pm 0,96 for MM and 33:12 min \pm 0,81 for MF. From these findings we can conclude that MF exhibit more precision and required less time for the analysis in comparison with MM technique. In future studies, samples with known HPG should be incorporated, with enrichment of fecal samples, so that accuracy can be evaluated, and then determine the convenience of using one or another technique.

Key words: coprological techniques, equine, parasite, nematode

Introducción

La mayoría de los caballos adultos bajo un buen control y alimentación, toleran cargas parasitarias sin efectos de enfermedad aparente, también se ha observado que caballos adultos llegan a estar parasitados por millones de pequeños strongylus (cyatostomun) en la ausencia de una enfermedad clínicamente reconocible (Love, 2003). En efecto, parece que estos caballos adquieren una resistencia a la infección con cyatostomun con la edad (Klei *et al.*, 1999), esta resistencia le confiere protección contra la enfermedad más que contra la infección, no expresando signos clínicos, pero aun así eliminando huevos de parásitos al medio (Reinemeyer, 1986; Goncalves *et al.*, 2002).

A pesar de que los equinos pastoreen juntos y compartan la misma población de parásitos, se ha demostrado que hay grandes diferencias en los niveles de eliminación de estos huevos de nematodos. Dentro de un grupo de adultos (> 3 años), los conteos de huevos en materia fecal están altamente concentrados en algunos caballos, solo el 15-30% de los caballos adultos eliminan el 80% de los huevos (Kaplan y Nilsen, 2010).

De esta manera el reconocimiento de la presencia y cantidad de los parásitos de los equinos depende en gran parte de los ensayos de laboratorio y de campo que sirven para establecer, confirmar o descartar los diagnósticos presuntivos realizados durante el examen clínico y/o estudios epidemiológicos y de control de poblaciones. Es así que, el diagnóstico de las enfermedades parasitarias gastrointestinales en animales vivos depende principalmente del examen de las heces (Rodríguez, 2015).

Dentro de las alternativas desarrolladas para la estimación de las cargas parasitarias, la que ofrece mayor aceptación y ventajas es el recuento de huevos por gramos de heces (HPG). Es un método cuantitativo el cual nos permite conocer la cantidad de huevos de nematodos gastrointestinales en una unidad determinada de peso (gramos). El desarrollo de métodos cuantitativos para determinar la abundancia de tales huevos constituyó un importante avance en la estimación indirecta de las cargas parasitarias. Si bien el recuento de huevos no determina con certeza la abundancia de parásitos establecidos en el aparato digestivo, constituye una herramienta de alta valoración técnica y práctica para el control de enfermedades parasitarias. Las ventajas que ofrece el HPG son su practicidad y bajo costo, la rapidez en la obtención del resultado, y que se complementan perfectamente con el resto de las técnicas parasitológicas, enriqueciendo la información aportada por las mismas (Fiel *et al.*, 2011).

Además de la confirmación diagnóstica de casos clínicos en los cuales se sospecha de parasitosis gastrointestinal, el HPG puede ser utilizado ampliamente en el control parasitario en sistemas de producción, test de reducción de conteo de huevos (TRCH), proporcionando una estimación preliminar de la eficacia antihelmíntica (Fiel *et al.*,

INVESTIGACION

Capello *et al.* (2011) y en el control de la contaminación de las pasturas y por ende, manejo de desparasitaciones selectivas (Kaplan y Nilsen, 2010). Estudio comparativo [...]

Hay varios métodos para la realización del HPG y estos difieren principalmente en sensibilidad, tiempo requerido para procesar las muestras y los conocimientos técnicos necesarios para su interpretación (Bosco *et al.*, 2014; Nielsen *et al.*, 2014).

El método de la cámara de conteo de Mc Master (TCC), se destaca por su sencillez y rapidez (Hansen y Perry, 1994). Esta técnica se basa en el principio de flotación, donde los huevos presentes en una determinada muestra de heces, expuestas a una solución sobresaturada de cloruro de sodio, se separan de la masa fecal ubicándose en la superficie de dicho líquido. En virtud de un mayor grado de sensibilidad, y con el mismo fundamento que la anterior, investigadores del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Argentina han adaptado un nuevo modelo de cámara de conteo conocido como la cámara INTA (Fiel *et al.*, 1998).

Por otro lado, la técnica Flotac se desarrolló en Italia para incrementar la sensibilidad en el conteo de HPG. La misma se basa en la centrifugación de una suspensión de materia fecal en soluciones de flotación con posterior lectura del sobrenadante (Cringoli, 2006; Cringoli *et al.*, 2010). La principal limitación del método es la necesidad de contar con un equipo de centrifugación, por lo que posteriormente se desarrolló un sistema simplificado, el Mini-Flotac. Una de las ventajas del mismo es que se puede realizar en laboratorios con instalaciones limitadas debido a que se prescinde de la etapa de centrifugación (Dias de Castro *et al.*, 2017).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de comparar dos técnicas diagnósticas de coprología cuantitativa, Mc Master modificada INTA y Mini-FLOTAC, en muestras fecales equinas y establecer la precisión de ambos métodos.

Materiales y métodos

Animales: Se utilizaron para el estudio 55 muestras fecales de equinos remitidas al laboratorio de Farmacología de la Cátedra de Farmacología y Toxicología, de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Nordeste. Las muestras provenientes de diferentes establecimientos de la provincia de Corrientes incluyeron animales sin signos o síntomas de enfermedad parasitaria, que no han sido desparasitados en un tiempo mayor a 3 meses, de ambos sexos, de entre 18 meses y 17 años de edad. Las muestras fueron seleccionadas al azar durante la primavera del año 2019.

Coprología cuantitativa: Las técnicas que se utilizaron para el recuento de huevos fecales fueron Mc Master Modificada INTA y Mini-FLOTAC. Para cada técnica fue medido el tiempo necesario para realizar el procedimiento en su totalidad.

A) Mc Master Modificada INTA: para el procesamiento de cada muestra, se utilizaron 3 gramos de materia fecal (MF) y 57 ml de solución sobresaturada de Cloruro de sodio (Solución de Willis). Esto fue mezclado en vasos descartables y homogenizado con la ayuda de una varilla de plástico, luego se procedió a su filtración utilizando un colador de malla fina y con una pipeta Pasteur se cargaron las cámaras con el líquido filtrado (Figura 1. A). Transcurridos 10 minutos, se realizó la lectura en el microscopio óptico observando al aumento de 100x.

INVESTIGACION

Capello *et al.*

Estudio comparativo [...]

B) Mini-FLOTAC: se colocaron 5 gr de cada muestra de MF en el homogeneizador de Fill- FLOTAC y se adicionaron 45 ml de la solución sobresaturada de Cloruro de sodio (Solución de Willis). El Fill-FLOTAC tiene una tapa que contiene una pequeña pieza de plástico que se extiende hacia la cámara con un extremo en forma de cono que se puede girar y mover, hacia arriba y hacia abajo, para homogeneizar la MF y la solución sobresaturada de Willis. La mezcla así obtenida fue filtrada, a través de un filtro incorporado a la parte posterior de la tapa, y el líquido se transfirió a las dos cámaras del Mini-FLOTAC mediante un pico incorporado en la parte superior de la tapa (Figura 1.B). Después de 10 minutos, se giró el disco de lectura para permitir el recuento de los huevos flotantes al microscopio óptico observando a aumento de 100X.

La cantidad de huevos detectados con cada técnica se multiplicó por su correspondiente factor de multiplicación. Para Mc Master INTA modificada el factor es de 10, y para Mini-FLOTAC el factor es de 5.

Los recuentos de huevos por gramo de materia fecal fueron realizados por un mismo operador, por duplicado para cada técnica, obteniendo un total de cuatro conteos para cada muestra (dos para Mc Master modificada INTA y dos para Mini-FLOTAC).

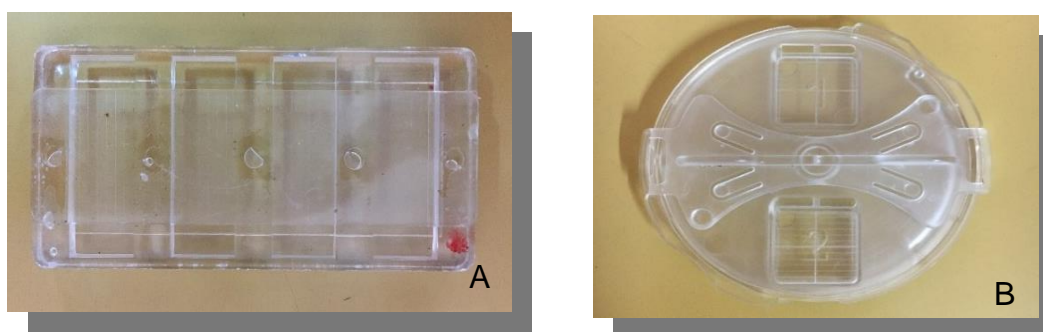


Figura 1: Cámaras de conteo de Huevos por Gramo. A) Cámara McMaster Modificada INTA se observan 4 celdillas de conteo. B) Cámara Fill-Flotac se observa el disco con 2 celdillas de conteo.

Análisis Estadístico: Los resultados de los HPG obtenidos con cada técnica se cargaron en planillas ad-hoc. Para determinar las diferencias entre las dos técnicas se analizaron las medias, el desvío estándar y el coeficiente de variación para las 55 muestras analizadas, utilizando el programa estadístico INFOSAT-2006. Asimismo, se realizó una regresión lineal para determinar la dispersión de los resultados obtenidos. El coeficiente de variación fue calculado para cada grupo de muestras analizadas por duplicado. La media de los coeficientes de variación con un 95 % de intervalo de confianza fue calculada para ambas técnicas. El porcentaje de precisión fue calculado para cada técnica por sustracción de los coeficientes de variación a 100. Fueron analizados los valores del conteo de huevos para cada técnica sin la multiplicación del factor y con el mismo a fin de analizar el desvío estándar de estos valores obtenidos. La correlación lineal fue calculada para obtener el valor del R^2 .

Resultados y discusión

De las 55 muestras analizadas, 3 resultaron negativas para los dos métodos (5,45%). Solo en 7/55 (12,72 %) muestras del total de analizadas se observaron discrepancias en los duplicados de cada técnica, en la que una resulta negativa y el duplicado evidencio conteo positivo con baja carga. Para definir la precisión se analizaron los resultados del recuento medio de huevos, desvío estándar, y coeficientes de variación obtenidos en las muestras para ambos métodos utilizados. La media y las desviaciones estándar de los métodos, antes y después de aplicar los factores de multiplicación se presentan en la Tabla 1, junto con coeficientes de variación y estimaciones de precisión .La Figura 2 muestra el diagrama de dispersión de los datos y la regresión lineal de los recuentos de HPG entre el Mini-FLOTAC y McMaster modificada INTA. La pendiente de la línea de tendencia presento un valor de 0,8967. La correlación lineal no fue estadísticamente significativa ($p < 0.00001$).

Tabla 1. Análisis de los parámetros evaluados para definir precisión. CV: coeficiente de variación; $X \pm DE$ (media±desvío estándar).

Método	CV	$X \pm DE$ (media±desvío estándar)		Precisión
		Conteo de huevos	HPG	
Mc Master	33,08	13,32±14,43	532,73±577,17	66,92%
Mini FLOTAC	21,33	112,94±116,79	564,68±583,96	78,67%

En cuanto al tiempo necesario para procesar las muestras para ambos procedimientos por duplicado se presentan en Tabla 2. Se observó menor tiempo para la técnica de MF.

Tabla 2. Tiempo requerido para cada etapa del procesamiento de las muestras (M1, M2, M3, M4 y M5) medido en minutos.

Técnica	Etapas	M1	M2	M3	M4	M5
Mc Master	Preparación	4:42	4:21	4:55	5:01	4:35
	Flotación	10:00	10:00	10:00	10:00	10:00
	Lectura	23:13	22:55	23:30	24:00	22:20
	Total	37:55	37:16	38:25	39:01	36:55
$37:70 \pm 0,96$						
Mini-FLOTAC	Preparación	3:03	3:25	3:58	4	3:38
	Flotación	10	10	10	10	10
	Lectura	19:08	19:30	20:00	20:15	19:44
	Total	32:11	32:55	33:58	34:15	33:22
$33:12 \pm 0,81$						

INVESTIGACION

En la Tabla 3 se observa un análisis comparativo entre las características de las cámaras Mc Master, Mc Master INTA y Mini-Flotac, disponibles para el recuento de HPG. En cuanto a la técnica de Mc Master clásica y la modificada INTA se logró la optimización del procedimiento al aumentar el número de celdillas y volumen de muestra para conteo de huevos fecales (Fiel *et al.*, 1998). En este sentido si comparamos, Mc Master modificada INTA y Mini-Flotac presentan similitudes en cuanto al volumen final de muestra analizada, con la diferencia que en la primera es necesario contar cuatro celdillas y en la segunda solo dos.

Tabla 3. Número de celdillas de conteo y volumen total de carga de cámaras de conteo de huevos por gramo.

	Mc Master clásica	Mc Master modificada INTA	Mini-Flotac
Número de celdillas	2	4	2
Volumen de las celdas (ml)	0,15	0,5	1
Volumen total de carga (ml)	0,30	2	2

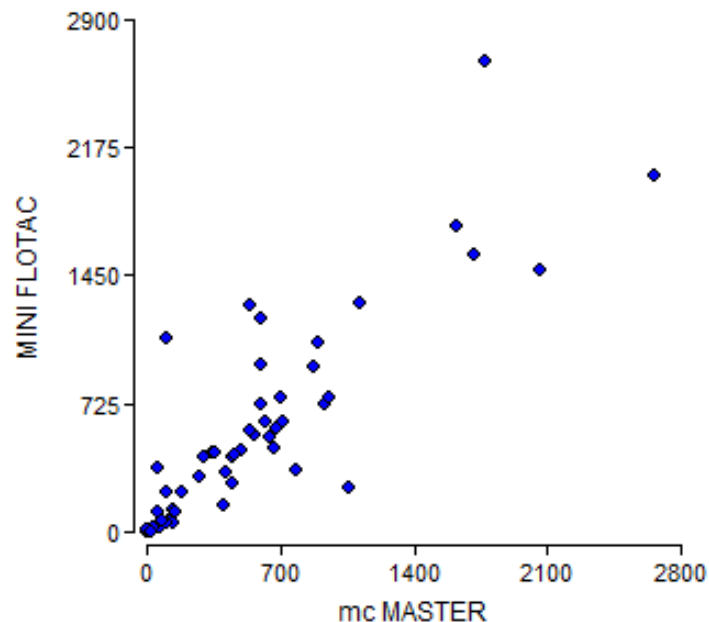


Figura 2. Diagrama de dispersión del conteo de huevos por gramos de materia fecal de muestras de equinos naturalmente infestados determinado mediante las técnicas de Mc Master Modificada INTA y Mini-Flotac.

INVESTIGACION

Capello *et al.*

Estudio comparativo [...]

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, el método Mini-FLOTAC obtuvo mayor precisión en el recuento de huevos fecales de nematodos equinos que el método McMaster Modificada INTA.

El Mini-FLOTAC podría tener aplicaciones para su uso en la clínica veterinaria, así como en los laboratorios. La mayor precisión de una técnica de conteo de huevo toma mayor importancia para la evaluación de resistencia antihelmíntica mediante el TCRH (test de conteo de reducción de huevos) o el PRH (periodo de reaparición de huevos) donde la mayor precisión del Mini-FLOTAC podría ser beneficioso (Barda *et al.*, 2013).

Conclusión

Ambas técnicas presentan sensibilidad suficiente para distinguir cargas parasitarias relevantes utilizadas en el manejo del control parasitario estratégico. Este estudio encontró que MF exhibió mayor precisión y menor tiempo requerido para el análisis respecto a la técnica MM lo que se la propone como una alternativa válida. Sin embargo, es necesario establecer la exactitud de los métodos realizando enriquecimiento de muestras fecales con una cantidad conocida de huevos a fin de determinar este parámetro que también es importante a los fines de la comparación y la determinación del método más apropiado para el conteo de huevos fecales en equinos.

Bibliografía

Barda BD, Rinaldi L, Ianniello D, Zepherine H, Salvo F, Sadutshang T, Cringoli G, Clementi M, Albonico M. (2013). Mini-FLOTAC, an innovative direct diagnostic technique for intestinal parasitic infections: experience from the field. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7:8.

Bosco A, Rinaldi L, Maurelli MP, Musella V, Coles GC, Cringoli G (2014). The comparison of FLOTAC, FECPAK and McMaster techniques for nematode egg counts in cattle. *Veterinary Parasitology*, 59, 625–628.

Cringoli G. (2006). FLOTAC, a novel apparatus for a multivalent fecal egg count technique. *Veterinary Parasitology*, 48, 381–384.

Cringoli G, Rinaldi L, Maurelli MP, Utzinger J. (2010). FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nature Protocols*, 5, 503–551.

Dias de Castro LL, Abrahão CLH, Buzatti A, Molento MB, Bastianetto E, Rodrigues DS, Lopes LB, Silva MX, Green de Freitas M, Conde MH, De Almeida Borges F. (2017). Comparison of McMaster and Mini-FLOTAC fecal egg counting techniques in cattle and horses. *Parasitology: Regional Studies and Reports*, 10, 132–135.

Fiel C, Steffan P, Ferreira D. (1998). Manual para el diagnóstico de nematodos en bovinos. Técnicas de frecuente utilización en la práctica veterinaria: su interpretación. División de Sanidad Animal de Bayer, Argentina. 57p.

INVESTIGACION

Capello *et al.* Estudio comparativo [...] Fiel CA, Steffan PE, Ferreyra DA. (2011). Diagnóstico de las parasitosis más frecuentes de los rumiantes: técnicas de diagnóstico e interpretación de resultados. Pag. 16-28. Primera edición. Tandil. Abad Benjamin.

Goncalves S, Julliard V, Leblond A. (2002). Risk factors associated with colic in horses. *Veterinary Research*, 33(6), 641–52.

Hansen J, Perry B. (1994). The epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of ruminants. *International Laboratory for Research on Animal Diseases*, 171 p.

Kaplan RM, Nielsen MK. (2010). An evidence-based approach to equine parasite control: It ain't the 60's anymore. *Equine Veterinary Education*, 22, 306-316.

Klei TR, Chapman MR. (1999). Immunity in equine cyathostome infections. *Veterinary Parasitology*, 85(2–3), 123–33.

Love S. (2003). Treatment and prevention of intestinal parasite-associated disease. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 19(3), 791–806.

Nielsen MK, Pfister K, von Samson-Himmelstjerna G. (2014). Selective therapy in equine parasite control-application and limitations. *Veterinary Parasitology*, 202, 95-103.

Reinemeyer CR. (1986). Small strongyles. Recent advances. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 2(2), 281–312.

Rodríguez R. (2015). Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria. Pag. 79-120. Mexico. AMPAVE-CONASA.