

MÉTODOS SIMPLES Y PRÁCTICOS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE LAS PRINCIPALES PARASITOSIS INTESTINALES EN ÉQUIDOS

Melo-Franco, B.^{1*}, Alho, A. M.¹, Calero-Bernal, R.² y Madeira de Carvalho, L. M.¹. 2015. PV ARGOS 20/2015.

1. Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa), Avenida da Universidade Técnica, Pólo Universitário da Ajuda, 1300-477 Lisboa, Portugal.

2. Animal Parasitic Diseases Laboratory, United States Department of Agriculture, Beltsville Agricultural Research Center, Agricultural Research Service, Beltsville, Maryland, 20705-2350.

*bernardodemelofranco@gmail.com

www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Enfermedades y problemas clínicos del equino](#)

INTRODUCCIÓN

La creciente prevalencia de resistencias a los antihelmínticos en los équidos ha creado la necesidad de un enfoque del control parasitario basado en una reducción de la frecuencia de tratamientos helminticidas y en una vigilancia parasitológica rutinaria.

Los équidos son hospedadores de decenas de especies parásitas, especialmente los que tienen acceso al pastoreo, y están sujetos a diferentes niveles de parasitismo. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el hospedador y el parásito coexisten en equilibrio, manteniendo cargas parasitarias en niveles compatibles con un estado saludable del animal (Reinemeyer & Nielsen, 2009; 2013).

Los agentes de enfermedad parasitaria más relevantes en équidos son los nematodos de la familia Strongylidae (ciatostominos y estrongilinos), *Parascaris* spp. y *Oxyuris equi*, y los cestodos *Anoplocephala* spp. (figura 1) (Urquhart et al., 1998; Bowman et al., 2006; American Association of Equine Practicioners [AAEP], 2013; Nielsen et al., 2014b).



Figura 1. a) Alopecia difusa en la región caudal por prurito perianal y perineal, aspecto de la típica “cola de rata” en un caballo afectado por oxiúridos. b) Caballo con mala condición corporal resultante de infección por estrongilidos (fotografías cedidas por Madeira de Carvalho).

Desde la década de los 90 se viene promocionando una terapéutica antiparasitaria selectiva, que consiste en tratar sólo los animales que presentan recuentos fecales por encima de un determinado umbral (Herd et al., 1985; Gomez & Georgi, 1991; Kaplan & Nielsen, 2010; AAEP, 2013; Nielsen et al., 2014a), siendo valores discutibles entre 200 y 500 huevos por gramo de heces (HPG) (Madeira de Carvalho, 2009; Nielsen, 2012; AAEP, 2013).

COPROLOGÍA CUANTITATIVA

Para cuantificar la eliminación de huevos parasitarios en las heces se puede recurrir al método de McMaster. Adaptando la metodología de Thienpont et al., (1986), y Madeira de Carvalho (2001), se añaden dos gramos de

heces a 28 ml de solución saturada de sacarosa al 25 %, y se homogeneizan con ayuda de una varilla de vidrio. Posteriormente, se filtra la solución a través de un colador de té sobre un vaso de precipitado, seguidamente se rellenan, con ayuda de una pipeta Pasteur, los dos compartimentos de la cámara de McMaster y se contabilizan los huevos en el interior de los límites de las dos cuadrículas o rejillas (figura 2). La similitud que existe entre los huevos de nematodos de la familia Strongylidae hace que sean considerados colectivamente como del tipo estrongílicos (Hummelinck, 1946; Bowman et al., 2006). Los huevos del género *Parascaris*, fácilmente distinguibles, también deben ser cuantificados (Andersen et al., 2013; AAEP, 2013).

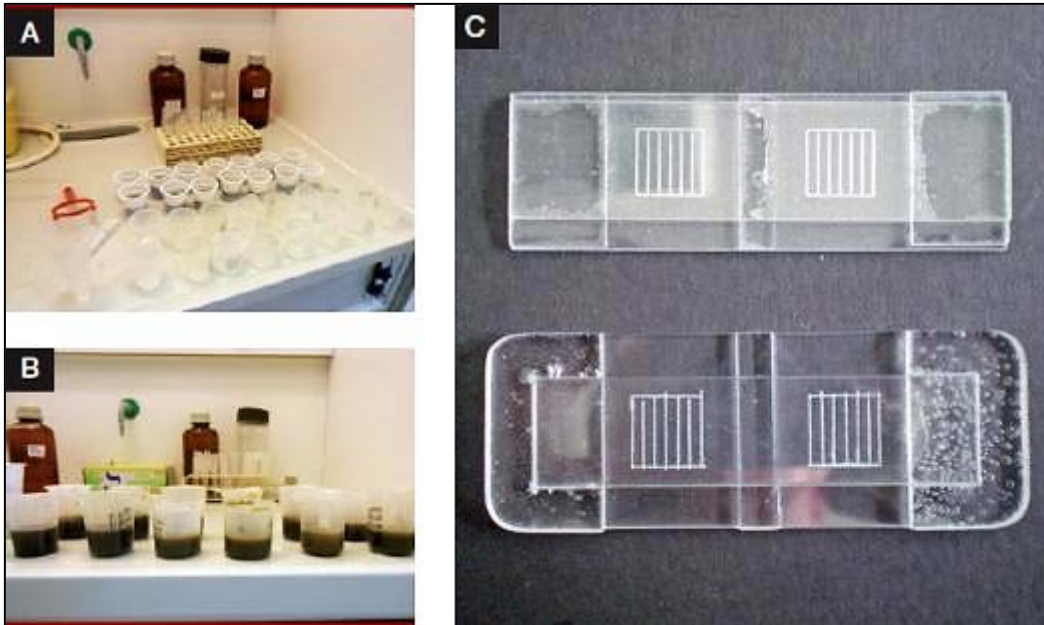


Figura 2. a) Preparación de las técnicas coprológicas. b) Vasos graduados con la solución de sacarosa y heces. c) Cámaras de McMaster no cargadas (fotografías cedidas por Bernardo Melo-Franco).

Considerando el volumen de la cámara (0,30 ml), y para obtener el valor de HPG, se multiplica el número de huevos contabilizado por el factor de corrección 50. Esta técnica presenta un límite de detección de 50 HPG (Mohan, 2000), por lo que un animal sólo será considerado negativo a estrongílicos gastrointestinales (EGI) cuando los resultados de las técnicas cuantitativas, cualitativas y de coprocultivo sean, simultáneamente, negativos (Madeira de Carvalho, 2001).

Los recuentos de huevos en heces determinados en el día de la desparasitación y 14 días después permiten, sin embargo, evaluar la eficacia de los antihelmínticos (Coles et al., 2006; AAEP, 2013).

COPROLOGÍA CUALITATIVA

FLOTACIÓN

El método de flotación es la técnica coprológica más frecuentemente utilizada en Medicina Veterinaria (Zajac & Conboy, 2012), con el propósito exclusivo de constatar la presencia o ausencia de huevos de helmintos y proceder a su identificación (Reinemeyer & Nielsen, 2013).

Los huevos de nematodos o cestodos flotan en un líquido con densidad variable entre 1,10 y 1,20 g/cm³, mientras que los huevos de trematodos (más pesados) y de algunos nematodos y cestodos requieren una densidad de 1,30-1,35 g/cm³. Por este motivo, utilizando una solución azucarada con densidad entre 1,20 y 1,30 g/cm³, podemos determinar, en una primera fase, los huevos menos densos y, posteriormente, los más densos (Kaufmann, 1996; Foreyt, 2001). Así, al transferir a un tubo de ensayo la solución restante preparada en la técnica de McMaster, los huevos se concentrarán en la parte superior de la columna líquida (Reinemeyer & Nielsen, 2013). Se coloca un cubreobjetos (18x18 mm) sobre el menisco, convexo, y se deja reposar, al menos, 15 minutos, tiempo mínimo para que los huevos asciendan a la superficie (figura 3). Seguidamente, se retira el cubreobjetos y se coloca sobre un portaobjetos para su observación al microscopio.



Figura 3. Preparación de la técnica de flotación de Willis (fotografía cedidas por Bernardo Melo-Franco).

SEDIMENTACIÓN

A continuación se procede al método de sedimentación natural. Éste consiste en decantar el volumen sobrenadante del tubo de ensayo y, con ayuda de una pipeta Pasteur, homogeneizar y recoger dos o tres gotas del sedimento, que serán colocadas en un portaobjetos. Se añade una gota de azul de metileno, se homogeneiza directamente sobre el portaobjetos y se coloca un cubreobjetos (24x50 mm). Así, los detritos orgánicos aparecen coloreados de azul, mientras que los huevos íntegros permanecen con coloración marronácea o dorada, ya que el colorante es incapaz de penetrar la pared (Kaufmann, 1996).

La identificación de los huevos observados en la coprología cuantitativa y cualitativa (figura 4) debe basarse en claves dicotómicas, como por ejemplo las de Thienpont et al., (1986).



Figura 4. a) Huevo de *Parascaris* spp. (izquierda) y huevo de tipo estrombílido (derecha), 280x.
b) Huevo de *Anoplocephala* spp., 300x (fotografías cedidas por Bernardo Melo-Franco).

COPROCULTIVO

La gran semejanza entre los huevos de EGI hace impracticable su identificación en cuanto a especie y género (Lichtenfels et al., 2008; AAEP, 2013; Reinemeyer & Nielsen, 2013). Para solventar esta limitación es esencial proceder a la realización de coprocultivos, a partir de los cuales se obtienen larvas de tercer estadio (L3) con características morfológicas bien distintas (Russell, 1948; Bevilaqua et al., 1993). Con este objetivo es indispensable reunir tres condiciones claves para la eclosión y adecuado desarrollo larvario, es decir, humedad, oxigenación y temperatura (Madeira de Carvalho, 2001).

Adoptando la metodología implementada por Madeira de Carvalho (2001), se colocan heces frescas en un vaso de plástico hasta hacer un 75 a 85 % de su volumen, nunca comprimiendo las heces. Con ayuda de una varilla de vidrio se crea una columna de aire en el centro de la muestra. Se sella el vaso con papel de aluminio, que debe ser perforado posteriormente, y se humedece con agua fría. Los vasos se disponen en una bandeja que contiene

agua fría y que es colocada en una estufa a una temperatura próxima a los 27 °C y una humedad relativa en torno al 75 %, durante 14 días.

Durante este periodo las muestras deben ser monitorizadas regularmente para evitar la desecación, corrigiéndola, si es necesario, con la adición de agua fría a la bandeja. Cuando termina dicho intervalo de tiempo, se retira el papel de aluminio de cada vaso procedente de la estufa, siendo previamente rellenado de agua y vertido sobre una placa de Petri, a la que posteriormente se le añaden 15-20 ml de agua.

El hidro y fototropismo mostrado por las larvas de los estrombúlidos nos permiten recogerlas del líquido existente en la placa de Petri que circunda el borde del vaso, lo que es realizado con la ayuda de un embudo colocado sobre un tubo de ensayo. Para maximizar el rendimiento del coprocultivo, los vasos se mantienen invertidos durante 24 h. Los tubos de ensayo se sellan con un trocito de Parafilm para reducir la concentración de oxígeno (figura 5) y, por consiguiente, el metabolismo larvario (Madeira de Carvalho, 2001).

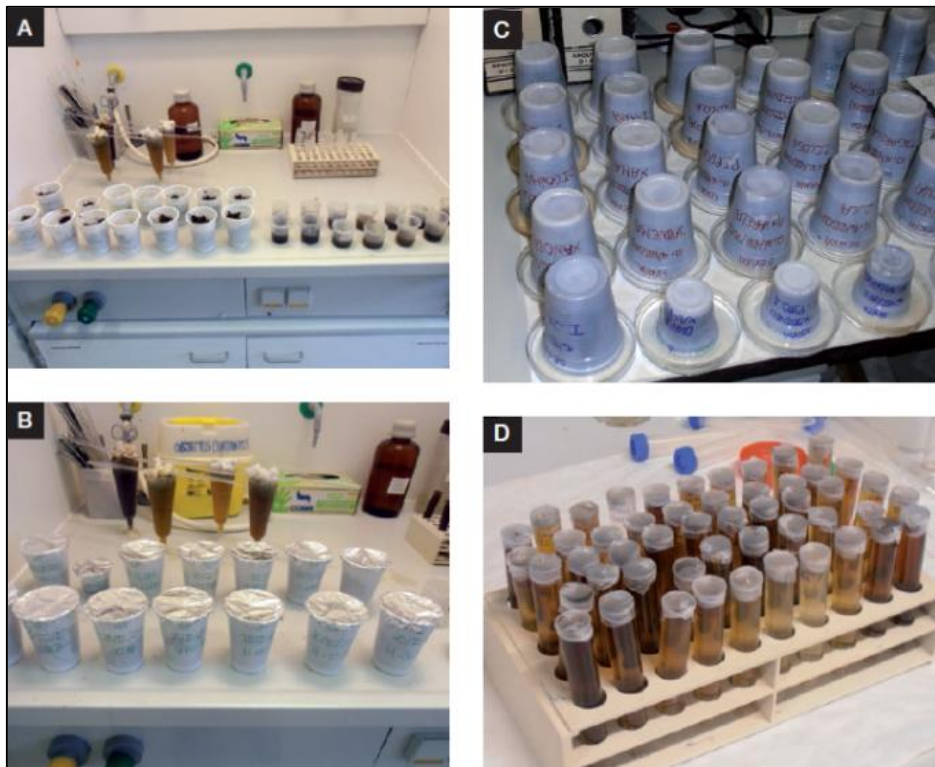


Figura 5. a) Preparación de los coprocultivos simultáneamente con las técnicas cuantitativas y cualitativas. b) Vasos de coprocultivo con papel de aluminio. c) Vasos de coprocultivo invertidos sobre placas de Petri. d) Tubos de ensayo con el líquido resultante del coprocultivo, sellados con Parafilm (fotografías cedidas por Bernardo Melo-Franco).

Las muestras con L3 se pueden conservar a temperatura de refrigeración (4-5 °C) durante un periodo de hasta 4 meses; una buena conservación de las larvas facilita su posterior identificación. Antes de la observación, se debe agitar el tubo para dispersar las L3 en el sobrenadante y, con ayuda de una micropipeta, se recoge una alícuota de 100 µl y se coloca entre porta y cubreobjetos (24x50 mm) (figura 6).



Figura 6. a) Detalle del soporte de tubos de ensayo sobre acumulador de frío (en azul). b) Poyata de trabajo con el material necesario para la identificación de larvas (fotografías cedidas por Bernardo Melo-Franco).

La identificación de las L3 obtenidas en el coprocultivo debe basarse en claves dicotómicas, como las propuestas por Madeira de Carvalho et al. (2004, 2007 y 2008), que las diferencian según caracteres morfométricos tales como, la presencia o ausencia de vaina, número, forma y organización de las células intestinales, longitud total de la larva, de la cola, y de la vaina, entre otros (figura 7). Como la identificación de las diferentes especies de la subfamilia Cyathostominae a partir de las L3 es difícil, se hace distinción de 8 morfotipos larvarios, de A a H, del género *Cyathostomum*, tal como es propuesto e implementado por Madeira de Carvalho (2001). En relación a otros morfotipos larvarios se destacan los del género *Strongylus*, con especial interés en *Strongylus vulgaris*, debido a su elevado poder patógeno, cuyas L3 presentan 28-32 células intestinales (Madeira de Carvalho et al., 2007).



Figura 7. a) L3 de *Cyathostomum* spp. tipo A. b) L3 de *Cyathostomum* spp. tipo C. c) L3 de *Triodontophorus serratus*. La escala corresponde a 100 μ m (fotografías cedidas por Bernardo Melo-Franco).

TEST DE LA CINTA ADHESIVA

Debido al peculiar comportamiento de oviposición de *Oxyuris equi*, caracterizado por la migración de las hembras hacia el recto y ano, los huevos depositados se acumulan en la zona perianal y perineal. Así, generalmente, éstos no se encuentran en el método de flotación, pudiendo aparecer cuando la muestra fecal es recogida directamente del recto mediante guante obstétrico lubricado (Reinemeyer & Nielsen, 2013).

Así, la técnica más frecuentemente empleada para el diagnóstico de esta parasitosis es la de la cinta adhesiva. Dicha metodología consiste en la aplicación de un fragmento de cinta adhesiva en la piel de la región perianal y perineal de los equinos, hasta que se pierda su adherencia. Seguidamente, con otro pedazo de cinta, se pega el primero sobre un portaobjetos y se observa al microscopio (figura 8).

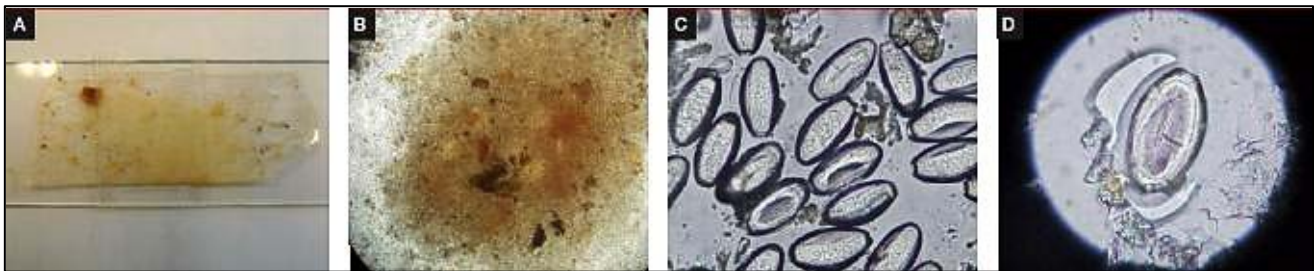


Figura 8. a) Cinta adhesiva con detritos de las regiones perianal y perineal, fijada en un portaobjetos con ayuda de otro pedazo de cinta. b) Masa amarillenta de huevos de *Oxyuris equi*, 10x. c) y d) Huevos de *Oxyuris equi* con larvas, aumentos de 110x y 300x, respectivamente (fotografías cedidas por Bernardo Melo-Franco).

PARTICULARIDADES DE LAS TÉCNICAS DE OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO

En un primer abordaje, la observación de la cámara de McMaster al microscopio óptico compuesto debe realizarse con el objetivo menor (4x) y sólo después con objetivos mayores (10 y 20x). La misma lógica y las mismas consideraciones son extensibles a la observación de las láminas de cinta adhesiva conteniendo los huevos de oxiúridos, así como en la técnica de flotación, de sedimentación natural y en el coprocultivo. En las dos últimas se usa un cubreobjetos de mayores dimensiones y un mayor volumen de solución, en la medida en que se buscan parásitos poco comunes o de distribución irregular en la masa fecal (Kaufmann, 1996; Zajac & Conboy, 2012).

Para facilitar la visualización de los caracteres morfométricos utilizados en la identificación larvaria, principalmente de las células intestinales, puede usarse solución de lugol. No obstante, ha de hacerse rápido, puesto que 5 minutos pueden ser suficientes para que el lugol mate las larvas y cause su deterioro, haciéndose indistinguibles las células intestinales. Otra forma de disminuir la motilidad de las larvas pasa por colocar los portaobjetos y los tubos de ensayo sobre un acumulador de frío, recientemente retirado del congelador (Reinemeyer & Nielsen, 2013).

Los huevos de oxiúridos pueden estar presentes en cantidad reducida, lo que implica un examen minucioso (Reinemeyer & Nielsen, 2013). Cuando la técnica de la cinta adhesiva se realiza en campo y a varios animales (sin posibilidades de lavarse las manos o cambiar de guantes entre muestreos), los huevos contenidos en el interior de las impresiones digitales no deben ser considerados durante el examen, pues las formas parasitarias pueden pertenecer a animales testados con anterioridad.

Para una correcta observación al microscopio es necesario entender la importancia de una iluminación adecuada del campo de visualización. Más allá del regulador de intensidad luminosa, el diafragma y el condensador son dos componentes indispensables en esta tarea. El diafragma permite regular la cantidad de luz incidente en el campo de visión, y el condensador distribuye regularmente y orienta la luz emitida por la fuente luminosa sobre el campo de visión. Así, en la técnica McMaster, en la que la cámara tiene un gran volumen, generalmente oscuro, el condensador debe estar lo más subido posible y el diafragma bien abierto. Para las restantes técnicas, dado el reducido espesor del portaobjetos y la claridad de las muestras, el condensador debe estar más alejado de la pletina y el diafragma más cerrado, con objeto de mejorar el contraste y la definición de las estructuras.

La complicación más frecuente en la identificación de las larvas obtenidas en el coprocultivo consiste en la contaminación de las muestras por nematodos de vida libre, que tienden a aparecer en las muestras recogidas del suelo, aun siendo frescas. Son fáciles de distinguir de las L3 de estrongílidos, en la medida en que no tienen vaina ni cola en forma de látigo, no tienen células intestinales definidas, poseen esófago de tipo rabbitiforme (“reloj de arena”, con bulbo, istmo y válvula) y aparecen con tamaños diferentes por ser capaces de completar todo su ciclo en el ambiente (Reinemeyer & Nielsen, 2013).

CONCLUSIÓN

Los análisis coprológicos referidos son eficaces, de fácil ejecución y de bajo coste. Además proporcionan información importante y exhaustiva como el tipo de parásito existente o su estacionalidad, la magnitud de la infección, el momento oportuno para la desparasitación y la eficacia del antihelmíntico administrado. De esta forma, es posible esbozar planes de control parasitario adecuados y coherentes con la realidad parasitológica de cada individuo y explotación, reduciéndose así el número de tratamientos antiparasitarios y potenciales resistencias farmacológicas.

BIBLIOGRAFÍA

- American Association of Equine Practicioners (2013). AAEP parasite control guidelines. Lexington: American Association of Equine Practicioners.
- Andersen, U.V., Howe, D.K., Olsen, S.N. & Nielsen, M.K. (2013). Recent advances in diagnosing pathogenic equine gastrointestinal helminths: The challenge of prepatent detection. *Veterinary Parasitology*, 192, 1-9.
- Bevilaqua, C.M.L., Rodrigues M. de L. & Concordet, D. (1993). Identification of infective larvae of some common nematode strongylids of horses. *Veterinary Medical Review*, 144, 989-995.
- Bowman, D.D., Lynn, R.C., Eberhard, M.L. & Alcaraz, A. (2006). *Parasitologia veterinária de Georgis*. (8ª edição). São Paulo, Brasil: Editora Manole Ltda. ISBN: 85-204-2334-5.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A. & Ver-cruysse, J. (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 136, 167-185.
- Foreyt, W.J. (2001). *Veterinary Parasitology: reference manual* (5th ed.). Iowa: Blackwell Publishing. ISBN 0-8138-2419-2.
- Gomez, H.H. & Georgi, J.R. (1991). Equine helminth infections: control by selective chemotherapy. *Equine Veterinary Journal*, 23(3), 198-200.
- Herd, R.P., Williardson, K.L. & Gabel, A.A. (1985). Epidemiological approach to the control of horse strongyles. *Equine Veterinary Journal*, 17(3), 202-207.
- Hummelinck, P.W. (1946). Investigation of the eggs of horse strongyles. *Tijdschr Diergeneeskd Journal*, 71, 411-427.
- Kaplan, R.M. & Nielsen, M.K. (2010). An evidence-based approach to equine parasite control: it ain't the 60s anymore. *Equine Veterinary Education*, 22, 306-316.
- Kaufmann, J. (1996). *Parasitic infections of domestic animals: a diagnostic manual*. Schweiz: Birkhäuser Verlag. ISBN 3-7643-5115-2.
- Lichtenfels, J.R., Kharchenko, V.A. & Dvojnjos, G.M. (2008). Illustrated identification keys to strongylid parasites (strongylidae: Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae). *Veterinary Parasitology*, 156, 4-161.
- Madeira de Carvalho, L. M., Fazendeiro, M. I., & Afonso-Roque, M. M. (2004). Estudo morfológico das larvas infectantes (L3) dos estrongilídeos (Nematoda: Strongyloidea) dos equídeos - 1. Género *Cyathostomum* s.l.. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 11, 23-32.
- Madeira de Carvalho, L. M., Fazendeiro, M. I., & Afonso-Roque, M. M. (2007). Estudo morfológico das larvas infectantes (L3) dos estrongilídeos (Nematoda: Strongylidae) dos equídeos - 2. Géneros *Gyalocephalus*, *Poteriostomum*, *Craterostomum*, *Oesophagodontus*, *Triodontophorus*, *Strongylus* e *Trichostrongylus*. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 14, 23-34.
- Madeira de Carvalho, L. M., Fazendeiro, M. I., & Afonso-Roque, M. M. (2008). Estudo morfológico das larvas infectantes (L3) dos estrongilídeos (Nematoda: Strongylidae) dos equídeos - 3. Conclusões, perspectivas futuras e proposta de chave

- de identificação de alguns nemátodes gastrintestinais mais comuns nos equídeos em Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 15, 59-65.
- Madeira de Carvalho, L.M. (2001). Epidemiologia e controlo da estrogilidose em diferentes sistemas de produção equina em Portugal. Tese de doutoramento em Sanidade Animal. (pp. 128-373). Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Madeira de Carvalho, L.M. (2009). Desparasitação Racional de Poldros, Éguas à Reprodução e Cavalos Adultos – Ênfase especial nas parasitoses gastrintestinais. 1^{as} Jornadas do Hospital Veterinário da Muralha de Évora, Fórum Eugénio de Almeida, 6 de Março 2009, 10 pp. PDF disponível no site http://www.hvetmuralha.pt/uploads/cms/20090331074449_Desparasitacao_racional_de_equideos-Prof._Luis_Carvalho.pdf.
- Monahan, C.M. (2000) – Anthelmintic control strategies for horses. 13 pp. In Bowman, D.D. (Ed.) *Companion and Exotic Animal Parasitology*, Publisher: International Veterinary Information Service (livro electrónico em www.ivos.org, documento N° A0309.0500).
- Nielsen, M.K., Reinemeyer, C.R., Donecker, J.M., Leathwick, D.M., Marchiondo, A.A. & Kaplan, R.M. (2014a). Anthelmintic resistance in equine parasites – current evidence and knowledge gaps. *Veterinary Parasitology*, 204 (1-2), 55-63.
- Nielsen, M.K., Wang, J., Davis, R., Bellaw, J.L., Lyons, E.T., Lear, T.L. & Goday, C. (2014b). *Parascaris univalens* – a victim of large-scale misidentification? *Parasitology Research*, 113 (12), 4485-4490.
- Reinemeyer, C.R. & Nielsen, M.K. (2009). Parasitism and colic. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 25, 233-245.
- Reinemeyer, C.R. & Nielsen, M.K. (2013). *Handbook of equine parasite control*. West Sussex: Wiley-Blackwell. ISBN: 978-0-470-65871-0.
- Russell, A.F. (1948). The development of helminthiasis in Thoroughbred foals. *Journal of Comparative Pathology*, 58, 107-127.
- Thienpont, D., Rochette, F. & Vanparijs, O.F.J. (1986). Diagnóstico de las helminthiasis por médio del examen coprológico. (2^a edição). (pp. 69-89). Beerse, Belgium: Janssen Research Foundation.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M. & Jennings, F.W. (1998). *Parasitologia veterinária*. (2^a edição). São Paulo, Brasil: Editora Guanabara Koogan S.A. ISBN-10: 8527704560.
- Zajac, A.M. & Conboy, G.A. (2012). *Veterinary clinical parasitology* (8th ed.). West Sussex: Wiley-Blackwell. ISBN-13: 978-0-8138-2053-8.

Volver a: [Enfermedades y problemas clínicos del equino](#)