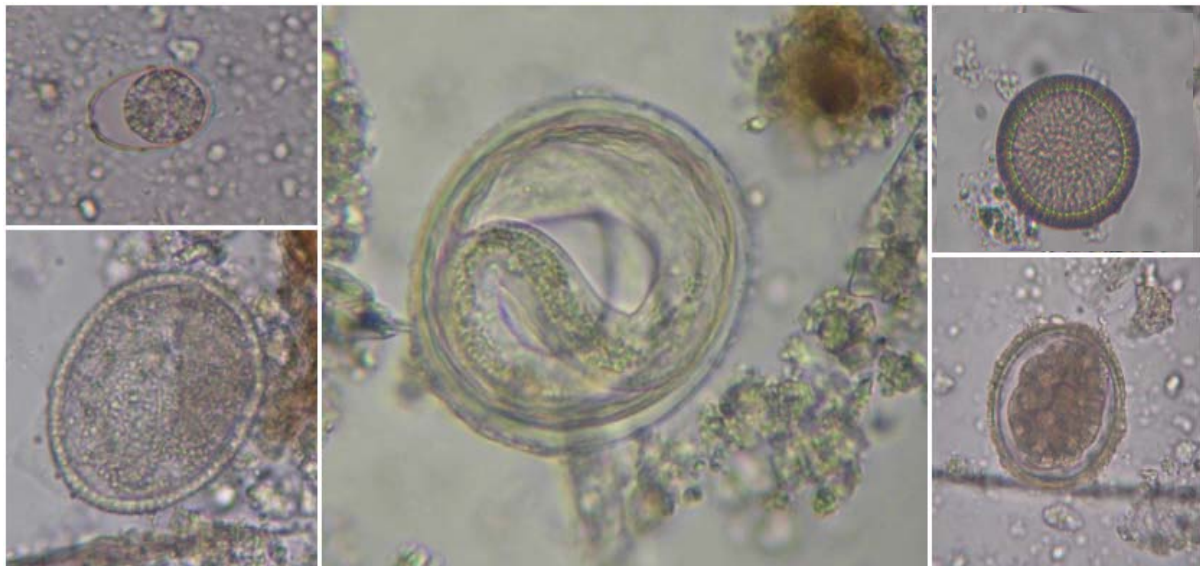


EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE TRANSPORTE Y CONCENTRACIÓN “REAL MINI[®]” PARA DETECCIÓN DE ENTEROPARÁSITOS EN *Canis familiaris*. ESTUDIO PILOTO.



Lucrecia Acosta Soto

Luis Navarro Martínez

Fernando Jorge Bornay Linares

Área de Parasitología, Departamento de
Agroquímica y Medio Ambiente.

Universidad Miguel Hernández de Elche.

04/08/2011



1. OBJETIVO DEL ESTUDIO

El objetivo del presente estudio fue evaluar el método comercial de transporte y concentración, denominado "REAL MINI[®]" (Durviz S.L.U., Valencia, España) diseñado para detección de estructuras parasitarias en muestras fecales y su posible uso para examen coproparasitológico en *Canis familiaris*.

2. PROCEDIMIENTOS/METODOLOGÍA

2.1. MUESTRAS FECALES.

Se examinaron 100 muestras fecales conservadas en formalina al 10% (v/v) pertenecientes a cánidos (*Canis familiaris*), depositadas en el banco de heces del Área de Parasitología, Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Las muestras fueron colectadas en dos centros de recogida de animales localizados en la provincia de Alicante, Comunidad Valenciana, España (Centro de Recogida de Animales de Compañía (CERECO) de Crevillente, Alicante, y la Sociedad Protectora de Animales y Plantas (SPAPV) de Villena. Las muestras analizadas pertenecían a perros que vagaban por las calles y son llevados a estos centros de recogida. La edad de los perros estudiados osciló en un rango entre 3 meses y 5 años, siendo el 49% machos y el 51% hembras. Las razas de canes que abarca el estudio comprendían; Mestizo, Pastor Belga, Galgo, Podenco, Fox Terrier, Braco, Pastor Alemán, Pointer, Bretón, York shire, Huskye, Rotweiler, Westy Terrier, Dogo Alemán, Perro de Aguas Español, Boxer y Pit-Bull. Las muestras fueron obtenidas cerciorándose de que tras la captura de los animales, éstos no hubieran sido desparasitados por las empresas de recogida y conservadas en formalina tamponada al 10% (v/v), a temperatura ambiente hasta su procesamiento.



2.2. MÉTODOS DE EXAMEN COPROPARASITOLÓGICO

2.2.1. MÉTODO DE RITCHIE MODIFICADO (Técnica de referencia “gold standard” para el análisis de los resultados).

Se empleó la modificación propuesta por Maldonado, Acosta-Matienzo y Veliz-Herrera del procedimiento en el método original, descrito por Teleman y Ritchie en 1948, en el que recomiendan añadir un detergente no iónico (acetato de etilo o éter etílico). Este método puede ser usado empleando heces frescas o conservadas en formalina al 10% o APV.

Se partió de 5 ml de muestra fecal fijada en formalina al 10%, a la que se añaden 5 ml de formalina al 10%.

Procedimiento:

1. Tomar 5 ml de muestra fecal fijada en formalina al 10%, y añadir 5 ml de formalina al 10%.
2. Filtrar la suspensión a través de una gasa quirúrgica, doblada dos veces y levemente humedecida en agua corriente. Recibir la suspensión en un tubo de centrifuga de 15 mL con fondo cónico.
3. Completar hasta un volumen de 10 mL con formalina al 10%. Centrifugar a 500 x g/2min (2000-2500 rpm).
4. Decantar el sobrenadante y repetir el punto 3 hasta obtener un sobrenadante limpio y claro.
5. Añadir 3 mL de éter etílico (o acetato de etilo). Tapar el tubo y agitar vigorosamente, en posición invertida, durante 30 segundos. Quitar el tapón cuidadosamente.
6. Centrifugar a 500 x g/2min (2000-2500 rpm). Se formarán cuatro capas: 1. En el fondo del tubo se encuentra el sedimento, 2. Una capa de formalina, 3. Una capa de restos fecales adheridos al tubo, 4. una capa de éter.



7. Aflojar y separar con cuidado el tapón que forman los detritos adheridos a las paredes del tubo, con un estilete fino, desechando las tres capas superiores de un golpe seco. Limpiar con una torunda de algodón las paredes del tubo, quitando los restos fecales remanentes.
8. Una pequeña cantidad de líquido que permanece en las paredes se desliza para el fondo junto al sedimento. Mezclar éste líquido con el sedimento y preparar las láminas para su posterior observación o guardar en cámara a 4°C.

2.2.2. SISTEMA “REAL MINI®” (Método a evaluar): Se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante. El fijador usado en este caso fue formalina al 10% (4mL).

Procedimiento: Se toma la cantidad permitida por el tapón-cuchara, sin que sobrepase la capacidad del tubo y se introduce en la solución conservante. Se cierra bien el tubo.

1. Agitar vigorosamente el tubo de recolección con la muestra durante 30 segundos.
2. Cambiar el tapón inferior del tubo por el cono de sedimentación.
3. Centrifugar 3 minutos a 700 xg (2000 r.p.m.)
4. Recoger el sedimento con una pipeta pasteur, colocar tres gotas en un porta y observar al microscopio.

2.3. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

Los sedimentos obtenidos tras procesamiento de las muestras, por ambas técnicas, fueron observados primero en fresco, y seguidamente teñidos con lugol. Se realizó un barrido completo de la preparación en el microscopio óptico a 100 y a 400 aumentos. El examen fue realizado por dos observadores, independientemente y los resultados registrados por ambos, cotejados. Las muestras con resultados discordantes (n= 8), fueron nuevamente procesadas y examinadas para obtener la confirmación diagnóstica tras consenso.

2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se confeccionó una base de datos en el programa Excel (Microsoft Office). Para la realización del análisis estadístico se usó el programa Epidat 3.1 para el cálculo de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, concordancia y prevalencia. El cálculo del índice Kappa se realizó mediante el programa estadístico SPSS 19.0.

3. RESULTADOS

De las 100 muestras estudiadas 30 (30%) fueron positivas por la técnica de Ritchie modificada, siendo que 20 perros (66,7%) presentaban monoparasitismo y los 10 restantes (33,3%) estaban poliparasitados (9 con dos especies y 1 con tres especies de parásitos). El número total de parásitos observados, fue de 41. El método “REAL MINI[®]” permitió la detección de estructuras parasitarias en el 27% de los perros estudiados, siendo en este caso 38 las especies observadas. Considerando a la técnica de Ritchie modificada como “gold standard”, la validez del método “REAL MINI[®]” para distinguir entre los perros que está parasitados o no demostró una sensibilidad del 86,7% (Ver tabla 1), quedando un 13,3% de animales parasitados no identificados por el método (falsos negativos). La especificidad del método, definida por el porcentaje de individuos no parasitados que son correctamente identificados por el mismo es del 100%.

Tabla 1. Índices de exactitud diagnóstica

	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	86,67	72,84	100
Especificidad (%)	100	99,29	100
Valor predictivo positivo	96	91,66	100
Valor predictivo negativo	100	98,08	100
Concordancia (%)	94,59	88,77	100
Prevalencia	30	20,52	39,48

La seguridad del método “REAL MINI[®]”, definida por sus valores predictivos, calcula la probabilidad de presentar o no parásitos dado el resultado del método

diagnóstico. En este caso, la probabilidad de que un individuo dado como positivo con el método “REAL MINI[®]” esté realmente parasitado, es del 100%. Mientras que la probabilidad de que un individuo dado como negativo por el método “REAL MINI[®]” no esté parasitado alcanza el 96%. La concordancia entre ambas pruebas es del 94,6% con un índice Kappa de 0,90 IC 95% (0,72-0,86).

Las tres muestras discordantes presentaban baja carga parasitaria. Uno de las muestras examinadas, presentaba un único paquete de huevos de *Dipylidium caninum*, en la preparación obtenida por el método de Ritchie modificado y fue negativo por el método evaluado. Las otras dos muestras negativas por el método “REAL MINI[®]”, ambas conteniendo huevos de *Ancylostoma* sp., contenían menos de 5 huevos en la preparación examinada obtenida mediante el método de referencia.

En la tabla 2 se muestran las especies encontrados por ambos métodos.

Tabla 2. Parásitos observados por método

ESPECIE	RITCHIE	REAL MINI [®]
<i>Cystoisospora</i> sp.	7	7
<i>Entamoeba</i> sp.	8	8
<i>Giardia intestinalis</i>	7	7
<i>Ancylostoma</i> sp.	2	0
<i>Dipylidium caninum</i>	1	0
Taeniidae gen. sp.	2	2
<i>Toxascaris leonina</i>	6	6
<i>Toxocara canis</i>	7	7
<i>Trichuris vulpis</i>	1	1

4. CONCLUSIONES

- El método de transporte y concentración “REAL MINI[®]”, es un método mucho más rápido de procesar, limpio y de fácil manejo, que el método de Ritchie modificado y no necesita emplear reactivos adicionales.
- El método evaluado permitió la detección tanto de helmintos (*Toxocara canis*, *Toxascaris leonina*, *Trichuris vulpis*, y Taeniidae gen. sp.), como de protozoos (*Cystoisospora* sp, *Giardia* sp., *Entamoeba* sp.) enteroparásitos frecuentes en *Canis familiaris*.

- El método evaluado presenta menor sensibilidad respecto al método de referencia. Esto parece deberse a la menor cantidad de muestra que se procesa, pues solo se observa en aquellas que presentan baja carga parasitaria. Por el contrario, no se han observado discordancias en especies parasitarias dominantes.

5. RECOMENDACIONES

- Ampliar el estudio, analizando un mayor número de muestras parasitadas.
- Utilizar muestras frescas, para ajustarse estrictamente al procedimiento indicado por el fabricante.
- Cuantificar la carga parasitaria, en el caso de helmintos, mediante el método de Kato-Katz para evaluar de manera más precisa el nivel de detección del método "REAL MINI[®]",.
- Examinar 3 muestras por animal, obtenidas en días alternos y emplear el resultado de un correcto examen coproparasitológico para estimar los índices de exactitud diagnóstica.

6. CONFLICTO DE INTERESES

Este informe ha sido elaborado de manera desinteresada, Los autores declaran que no existe conflicto de intereses en la elaboración del mismo, análisis o interpretación de resultados.



Fdo.: Lucrecia Acosta Soto / Luis Navarro Martínez Ph D



Fernando J. Bornay Linares MD Ph D