

Implementación de un método de flotación para detectar *Eimeria* spp en aves de corral

Rodrigo Miguel Portillo Alarcón

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2020

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Implementación de un método de flotación para detectar *Eimeria* spp en aves de corral

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Rodrigo Miguel Portillo Alarcón

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2020

Implementación de un método de flotación para detectar *Eimeria* spp en aves de corral

Rodrigo Miguel Portillo Alarcón

Resumen. *Eimeria* spp es un patógeno altamente difundido alrededor del mundo causante de la coccidiosis y es comúnmente encontrado en explotaciones avícolas. El diagnóstico oportuno de la coccidiosis puede mejorar la producción y reduce pérdidas. Una metodología fácil y confiable para el recuento de ooquistes es a través del método de flotación, además, se pueden utilizar diferentes soluciones de flotación. Los objetivos de este estudio son seleccionar un procedimiento adecuado para detección de *Eimeria* spp y estimar los costos para el Laboratorio de Microbiología de Zamorano. El diseño experimental usado fue Bloques Completos al Azar (BCA), las variables estudiadas fueron dos tipos de muestra (heces frescas y de cama) y dos soluciones de flotación (sacarosa y salina). Se establecieron cuatro tratamientos y tres repeticiones que fueron los bloques. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos, interacciones y bloques. Hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tipos de muestra siendo las heces frescas la mejor opción para recuperar ooquistes. También hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las soluciones de flotación siendo la solución de sacarosa con formalina la que lograba recuperar la mayor cantidad de ooquistes. Hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las repeticiones (bloques) y el mejor tratamiento según la separación de medias fue la solución de sacarosa con Formalina en conjunto con las heces frescas. El Laboratorio de Microbiología de Alimentos cuenta con todo el equipo y utensilios para poder realizar la metodología para detección de *Eimeria* spp.

Palabras clave: Coccidiosis, ooquistes, producción avícola.

Abstract. *Eimeria* spp is a highly widespread pathogen around the world that causes coccidiosis. Is commonly founded in poultry farms. Timely diagnosis of coccidiosis can improve production and reduce losses. An easy and reliable methodology for counting oocysts is through the flotation method; in addition, different flotation solutions can be used. The objectives of this study are to select a suitable procedure for the detection of *Eimeria* spp and estimate costs for the Zamorano Microbiology Laboratory. The experimental design used was a Complete Randomized Blocks (BCA), two variables were studied which were two types of sample (fresh and litter feces) and two flotation solutions (sucrose and saline). Four treatments and three replicates (blocks) were established. Statistical significance ($P < 0.05$) was observed between the treatments, interactions, and blocks. There was statistical significance ($P < 0.05$) between the sample types, with fresh feces being the best option to recover oocysts. There was also statistical significance ($P < 0.05$) between the flotation solutions, with the sucrose solution with formalin being the one that managed to recover the largest number of oocysts. There was statistical significance ($P < 0.05$) between the replicates (blocks). The best treatment according to the means separation was the sucrose solution with formalin in conjunction with fresh feces. The Food Microbiology Laboratory has all the equipment and utensils to carry out the methodology for the detection of *Eimeria* spp.

Key words: Coccidiosis, oocytes, poultry.

ÍNDICE GENERAL

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Índice general.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4. CONCLUSIONES.....	11
5. RECOMENDACIONES.....	12
6. LITERATURA CITADA.....	13
7. ANEXOS.....	15

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Diseño Bloques Completos al Azar (BCA)	3
2. Promedio de ooquistes de <i>Eimeria</i> spp según matriz analizada.....	7
3. Promedio de ooquistes de <i>Eimeria</i> spp según solución analizada.	7
4. Promedio de ooquistes de <i>Eimeria</i> spp según matriz y solución de flotación.	8
5. Análisis de varianza para ooquistes por gramo	8
6. Costos de elaboración de un litro de solución.	9
7. Costo de elaboración del método de flotación.	9

Figuras	Página
1. Ilustración de toma de muestras de heces dentro de un galpón.	4
2. Estimación de la demanda de pruebas de coccidiosis.	10

Anexos	Página
1. Microcentrifuga con tubos Eppendorf.	15
2. Manual de procedimientos para el LMAZ.	16
3. Cámara de Neubauer con <i>Eimeria</i> spp.	19
4. Soluciones de flotación (salina y sacarosa).....	19
5. Especies de <i>Eimeria</i> spp en aves (a) <i>E. maxima</i> , (b) <i>E. brunetti</i> , (c) <i>E. tenella</i> , (d) <i>E. necatrix</i> ,(e) <i>E. praecox</i> , (f) <i>E. acervulina</i> , and (g) <i>E. mitis</i>	20

1. INTRODUCCIÓN

La industria avícola a nivel mundial representa uno de los rubros más crecientes en la agricultura anualmente con un crecimiento promedio del 5% (Mottet and Tempio 2017). Los pollos son las aves más producidas dentro de la industria avícola, contribuyen fuertemente en la producción agrícola supliendo huevos y carne a la población mundial siendo una importante fuente de proteínas para los humanos (Fatoba and Adeleke 2018). Uno de los mayores problemas de la industria avícola es que las aves y principalmente los pollos son hospederos de muchas enfermedades. Una de las enfermedades más comunes de encontrar en la industria avícola es la coccidiosis y genera muchas pérdidas anualmente en las producciones (Blake and Tomley 2014).

La coccidiosis es una enfermedad causada por parásitos del género *Eimeria* spp es común encontrarlo en aves, sin embargo, puede encontrarse en bovinos y ovinos. Existen siete diferentes especies del género *Eimeria* las cuales son: *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. paecox*, *E. tenella*, *E. necatrix* y *E. mitis* (Cacho 2014). Sin embargo, las más patógenas son *E. tenella* y *E. necatrix*, el resto de ellas presenta una patogenicidad moderada (Price 2012). Este parásito causa daños económicos a los productores, estas incluyen pérdidas por muerte, disminución en ganancias diarias de peso (GDP) y medidas profilácticas en contra del patógeno (Lee *et al.* 2012). Las pérdidas económicas a causa del parásito se estiman llegan a 3 billones de dólares anualmente en todo el mundo (Kadykalo *et al.* 2018). Se cree que el parásito está presente en todo el mundo y se estima la prevalencia global de coccidiosis clínica en 5% y subclínica 20% (Kadykalo *et al.* 2018).

Existen diferentes métodos para evaluar la presencia de *Eimeria* spp así como la observación de ooquistes en excrementos, revisión *post mortem* de intestinos, métodos moleculares y frotis de la mucosa intestinal (Alcaino *et al.* 2002). El método de flotación es uno de los más utilizados en la examinación de heces fecales para detección de parásitos, cuantificando la cantidad de huevos en un gramo de heces fecales. Este método es rápido y efectivo, este separa los ooquistes debido a que la solución de flotación tiene una gravedad específica de 1.2 y los ooquistes de 1.05 a 1.10 (Serrano 2010). Para los productores es de utilidad conocer la presencia y la gravedad de la coccidiosis, sin embargo, para un análisis más profundo como conocer las especies presentes se debe hacer uso de métodos moleculares y con esto poder hacer un control específico más efectivo.

Hay diferentes maneras de poder controlar la coccidiosis en industrias avícolas como el uso de vacunas recombinantes, medidas quimioprofilácticas haciendo uso de anticoccidiales en alimentos o agua y algunos métodos naturales como probióticos utilizando bacterias del género *Lactobacillus* o plantas en la dieta (Borgonovo *et al.* 2020). Algunas plantas comúnmente utilizadas para el control de coccidiosis son *Aloe vera*, *Moringa oleifera*, *Bidens pilosa* y *Musa paradisiaca*. (Fatoba and Adeleke 2018). El método más común para control es usando anticoccidiales en el balanceado, sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos genera resistencia de *Eimeria* hacia los anticoccidiales (Ola-Fadunsin *et al.* 2019). A causa de la presión pública buscando disminuir la cantidad de fármacos utilizados para la producción de alimentos a nivel mundial, ha habido una creciente tendencia a hacer uso de opciones más naturales como son las plantas (Peek and Landman, 2011). El protozoo *Eimeria* spp es uno de los parásitos en aves más difundidos alrededor del mundo, se cree que es el parásito más cosmopolita en aves (Kadykalo *et al.* 2018). Su reproducción es rápida y puede afectar en pocos días a una producción. Su ciclo vital es continuo

y más del 70 % ocurre en el intestino delgado. (Rossanigo *et al.* 2007) Una vez ingerido los ooquistes (día uno) se reproducen rápidamente en el yeyuno e íleon. Luego de 16 días los coccidios se desarrollan e invaden el intestino delgado. En ese momento la exposición a los ooquistes es constante, produciendo coccidiosis subclínica y clínicas. A los 21-28 días un gran número de ooquistes es depuesto con las heces, que al ser ingeridos por otros animales comienza otro ciclo (Rossanigo *et al.* 2007).

La coccidiosis al ser la principal enfermedad parasitaria en aves y generar grandes pérdidas anualmente, es de vital importancia que productores de aves lleven control de esta enfermedad. Al llevar un control riguroso de la enfermedad pueden tomar medidas más eficientes y disminuir costos que implica tener esta enfermedad dentro de la explotación. Para los análisis parasitarios existen diferentes metodologías y soluciones de flotación que pueden ser utilizadas para poder detectar la presencia de *Eimeria* spp. Al ser un parásito tan frecuentemente encontrado en aves es muy importante realizar análisis para conocer el impacto que este pueda tener en las instalaciones avícolas. Zamorano se encuentra en cercanías con varias producciones avícolas por lo que contar con el análisis podría ser favorable para las producciones aledañas a la universidad. En Honduras muy pocos laboratorios realizan este examen para cuantificación de *Eimeria* spp por lo que para el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano representaría una excelente oportunidad y nueva fuente de ingresos contar con este análisis. Los objetivos de esta investigación fueron:

- Determinar el procedimiento más adecuado para detección de *Eimeria* spp.
- Estimar los costos del procedimiento con cada una de las soluciones de flotación.
- Realizar un protocolo para el Laboratorio de Microbiología de Alimentos en Zamorano.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Revisión bibliográfica

Para comenzar con el estudio se realizó una revisión bibliográfica a cerca de los diferentes métodos para detección de *Eimeria* spp y los diferentes tipos de soluciones que se podían utilizar. Se seleccionó el método y las soluciones a utilizar, se hicieron pruebas preliminares y al no funcionar, se buscó nuevamente otra metodología, nuevamente pruebas preliminares y al ver que fue funcional se adaptó a la cámara de Neubauer. A causa de la situación actual no se podía obtener una cámara de McMaster que es comúnmente utilizada para estos estudios.

Diseño experimental

Se realizó un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA), donde los bloques fueron las repeticiones y se evaluó (heces frescas y camas) y tipo de solución a utilizada (solución salina saturada y sacarosa con formalina) se realizaron cinco muestras de cada uno de los tratamientos y tres repeticiones por tratamiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diseño Bloques Completos al Azar (BCA)

Bloques	Tratamientos			
Repetición 1	HF×SS	CM×SS	HF×SF	CM×SF
Repetición 2	HF×SF	CM×SF	HF×SS	CM×SS
Repetición 3	CM×SF	HF×SS	CM×SS	HF×SF

HF×SS: Heces frescas y solución salina saturada CM×SS: Heces de cama y solución salina saturada

HF×SF: Heces frescas y solución de sacarosa CM×SF: Heces de cama y solución de sacarosa

Localización del estudio

La investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de Alimentos en Zamorano, las muestras fueron recolectadas en la aldea El Jicarito, San Antonio de Oriente, Honduras. La Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano está ubicada en el kilómetro 30 de la carretera de Tegucigalpa a Danlí, Valle del Yegüare, San Antonio de Oriente, Francisco Morazán.

Recolección de muestra

Se utilizaron espátulas de laboratorio para recolectar las heces fecales frescas y heces de cama. Posteriormente, estas fueron colocadas dentro de bolsas para muestras. Las muestras fueron colocadas dentro de una hielera y transportadas al Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano. Se mantuvo la temperatura de refrigeración para evitar la alteración de formas parasitarias (Fabían *et al.* 2003). Para la recolección de muestras dentro de un galpón se deben recolectar 25 heces frescas en cinco diferentes ubicaciones (Figura 1) para poder tener una muestra representativa.

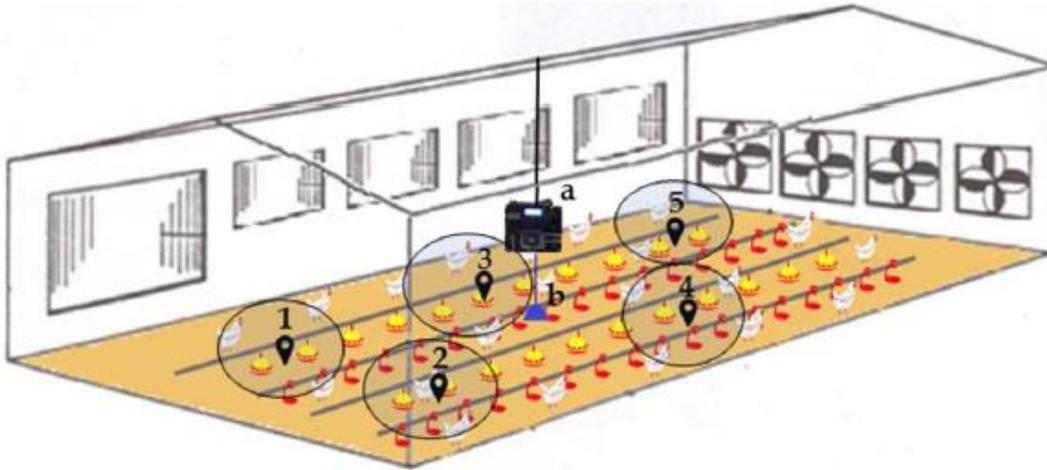


Figura 1. Ilustración de toma de muestras de heces dentro de un galpón.
Fuente: Borgonovo *et al.* 2020.

Preparación de soluciones

En las técnicas de flotación los ooquistes poseen una gravedad específica inferior comparada con la solución a utilizar (Gijón 2013) una de las ventajas de esta técnica es que se reduce el tamaño de la muestra al concentrar la cantidad de ooquistes separándolos de las heces.

Solución salina saturada

Una solución común es la salina saturada, esta posee una gravedad específica de 1.18 mientras que los ooquistes poseen en un rango de 1.05 a 1.10 g/mL (Serrano 2010). Las ventajas de esta solución es su bajo costo, su gravedad específica permite que únicamente floten los ooquistes y no floten los restos de heces. Su método de elaboración es hervir agua destilada y agregar 40 gramos de sal por cada 100 mL de agua destilada, dejar enfriar y filtrar el exceso de sal.

Solución de sacarosa con formalina

Otra solución comúnmente utilizada para la determinación de *Eimeria* spp es la solución de sacarosa con formalina, esta tiene una gravedad específica de 1.2 (Serrano 2010). Su método de elaboración es hervir agua destilada y agregar 128 gramos de sacarosa por cada 100 mL de agua, después, se deja reposar hasta que enfríe y se agrega 1 mL de formalina al 10% por cada 100 mL de agua.

Pesado y homogenizado de la muestra

Haciendo uso de una balanza digital se pesó 6.5 gramos de muestra en un vaso de precipitado. El tamaño de la muestra es importante para lograr concentrar la mayor cantidad de ooquistes. Después se agregó la muestra dentro de una bolsa y añadió 100 mL de agua destilada, se colocó en el Stomacher durante 2 minutos para homogenizar. Es de mucha importancia tener control de la cantidad de muestra para el estudio debido a que cantidades de muestra muy grandes pueden sobreestimar los resultados y tamaños de muestra pequeños pueden subestimar los resultados.

Filtrado y centrifugado

Luego se filtró la muestra homogeneizada haciendo uso de un colador y así evitando la mayor cantidad de sólidos en suspensión innecesarios. Luego se agregó 1 mL de solución a diez tubos Eppendorf respectivamente. Se centrifugaron a 1700 rpm por 10 minutos (Dorney 1964) después de haber sido centrifugados se vació el sobrenadante de los tubos Eppendorf cuidadosamente y se agregó 2 mL de solución de flotación.

Después de haber sido agregados los 2 mL de solución de flotación se agito los sólidos junto con la solución de flotación y se llevó nuevamente a la centrifuga por 10 minutos a 1250 rpm. Al terminar de centrifugar se agitó nuevamente los tubos Eppendorf y se dejó reposar durante dos minutos. Con uso de una micropipeta se recolectó una muestra de 10 μ l de la superficie del tubo Eppendorf y se agregó sobre la cuadrícula de la cámara de Neubauer.

Recuento de ooquistes

Para el conteo de ooquistes se realizó en los 9 mm de la cámara de Neubauer incluyendo el centro y los demás cuadrantes. El resultado fue multiplicado por un factor de 1111.1 debido a que la cámara tiene una profundidad de 0.1 mm y un área de 9mm² haciendo un total de 0.0009 mL de suspensión contabilizados en la cámara. Con el factor básicamente es llevado a 1 mL los 0.0009 mL de suspensión y así tener un valor equivalente. Por último, el resultado fue multiplicado por 10 ya que la suspensión inicial era una solución de 10⁻¹ y así ser llevado el resultado a ooquistes por gramo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron estudios preliminares para poder encontrar una metodología que se acomodará al estudio. Inicialmente se utilizó la metodología de McMaster utilizando 4 gramos de muestra y 56 mL de solución de flotación, sin embargo, esta metodología no se alcanzó a adaptar a la cámara de Neubauer debido a que se necesitaba un volumen muy grande para encontrar los ooquistes y este volumen no era aplicable para la cámara de Neubauer. Al no tener buenos resultados con la metodología anterior se hizo una modificación aumentando el tamaño de muestra y disminuyendo el volumen de solución de flotación. Sin embargo, tampoco se alcanzaba a recolectar una cantidad considerable de ooquistes y se presentaban muchas partículas indeseadas en la superficie haciendo que fuera muy difícil el recuento. Finalmente, se utilizó la metodología de Dorney haciendo leves modificaciones para poder adaptar exitosamente para el Laboratorio de Microbiología de Zamorano. Las modificaciones realizadas fueron disminuir el tiempo de homogenización utilizando el Stomacher y disminuyendo el volumen de solución de flotación para que pudieran llegar los ooquistes a la superficie más rápido.

Haciendo uso del programa SAS 9.6 ® se realizó un análisis estadístico para poder encontrar diferencias entre los tratamientos y así determinar con cual se logra obtener la mayor cantidad de ooquistes de *Eimeria* spp. Los análisis estadísticos realizados fueron análisis de varianza (ANDEVA) y univariado con un nivel de confianza de 0.05, para poder analizar por separado cada una de las variables estadísticas, además, se realizó una prueba Duncan y LSMeans para separación de medias.

Se encontraron diferencias significativas entre las matrices (heces de cama y frescas), en las soluciones de flotación (solución sacarosa y salina), las interacciones de las matrices y soluciones, además, también se encontraron diferencias significativas entre las repeticiones de cada tratamiento. Las diferencias entre las repeticiones son debido a que a pesar de que sea la misma población de gallinas no se puede asegurar que la muestra siempre corresponda a las mismas gallinas teniendo diferentes cargas de ooquistes.

Según el Cuadro 2, se logra observar que los valores obtenidos de los tipos de muestra son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) recuperando una mayor cantidad de ooquistes las heces frescas y una menor cantidad las heces de cama. Esto se debe a que la composta dentro del gallinero o galón al estar húmedo produce amoníaco en cantidades suficientes para reducir la carga de *Eimeria* spp en las muestras de heces de cama (Rebuly 2013). Para realizar estudios parasitarios las heces frescas son la mejor opción para obtener mejores resultados, además, las heces frescas tienen un menor coeficiente de variación logrando tener una menor variación en nuestros resultados. En las heces de cama, las formas parasitarias se han visto afectadas por el tiempo y la temperatura a la que se encuentran, por lo que es importante utilizar las heces más frescas posibles y mantener una temperatura de refrigeración de 4 °C (Gijón 2013).

Cuadro 2. Promedio de ooquistes de *Eimeria* spp según matriz analizada.

Matriz	Media (OPG)	Desv. Estándar	Coef. Variación	Separación de medias
Heces Frescas	187,000	42,000	22.44%	A
Heces de Cama	67,000	22,300	33.28%	B

Letras diferentes son estadísticamente diferentes (P < 0.05)

OPG: Ooquistes por gramo.

En el Cuadro 3 se puede observar que existen diferencias significativas entre las soluciones (P < 0.05) siendo la solución de sacarosa con formalina la que logra recuperar una mayor cantidad y la solución salina saturada una cantidad menor. La formalina al 10% en la solución de sacarosa es útil para poder recuperar una mayor cantidad de ooquistes en métodos de flotación o sedimentación (Kaminsky 2003). La solución de sacarosa presenta una mayor gravedad específica que la solución salina saturada dándole una mayor eficacia para diagnósticos parasitarios (Jara *et al.* 2010). Los elevados coeficientes de variación en las soluciones corresponden a que estas fueron utilizadas en las heces frescas y de cama, al encontrar diferencias significativas entre los tipos de muestra los coeficientes de variación se elevan. A pesar de esto la solución de sacarosa cuenta con un coeficiente de variación inferior respecto a la solución salina saturada.

Cuadro 3. Promedio de ooquistes de *Eimeria* spp según solución analizada.

Solución	Media (OPG)	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Separación de medias
Solución de sacarosa	145,000	72,500	49.85%	A
Solución salina	108,000	61,600	56.61%	B

Letras diferentes son estadísticamente diferentes (P < 0.05)

OPG: Ooquistes por gramo.

De acuerdo con el Cuadro 4, se puede observar diferencias significativas entre los tratamientos (P < 0.05) siendo el tratamiento HF × SF el que logro recuperar la mayor cantidad de ooquistes. El tratamiento con menor recuperación fue CM × SS obteniendo la menor cantidad de ooquistes. Los métodos para detección de parásitos que utilizan centrifuga son más precisos comparados de los que no lo centrifugan (Pereckiene *et al.* 2007). La solución de sacarosa con formalina al tener una gravedad específica oscilante de 1.2 a 1.35 permite a que floten más elementos parasitarios (Vadlejch *et al.* 2013). Factores importantes para poder tener resultados con menores coeficientes de variación son el tamaño de la muestra y la solución a utilizar. Las mejores relaciones para diluir la muestra son 1:10 y 1:15 logrando recuperar una mayor cantidad de ooquistes y con una menor variación (Cringoli *et al.* 2004). La solución salina es la más fácil de preparar, sin embargo, tiene una desventaja que cristaliza rápidamente.

La separación de medias nos brinda un perfil de cual tratamiento fue el mejor dentro del experimento. El mejor tratamiento fue las heces frescas con la solución de sacarosa con formalina al 10%. Esto es debido a que las heces frescas cuentan con una mayor cantidad de ooquistes, la solución de sacarosa tiene una mayor gravedad específica comparada con la solución salina saturada. La recuperación más baja de ooquistes fue con las heces de cama con solución salina saturada, esto fue debido a que la solución salina saturada tiene una gravedad específica inferior a la solución de sacarosa, además, las heces de cama tienen una baja carga de ooquistes a causa del amoníaco liberado.

Cuadro 4. Promedio de ooquistes de *Eimeria* spp según matriz y solución de flotación.

Matriz	Solución	Media (OPG)	Separación de medias
Heces frescas	Solución de sacarosa	213,000	A
Heces de cama	Solución salina	161,000	B
Heces frescas	Solución de sacarosa	77,700	C
Heces de cama	Solución salina	56,300	D

Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

OPG: Ooquistes por gramo

En el Cuadro 5 se puede observar que la Matriz y la Solución tienen la misma probabilidad presentando diferencias significativas, sin embargo, ambas fuentes de variación tuvieron el mismo efecto en la cantidad de ooquistes contabilizado. Los bloques fueron una fuente de variación, esto corresponde a que las muestras provienen de diferentes aves y cada ave tiene una carga diferente de ooquistes. También se encontró diferencias significativas en la interacción de la matriz y solución. Dorney en 1964 presentó un coeficiente de variación del 29% exponiendo que los recuentos con la Cámara de Neubauer son factibles, sin embargo, el pequeño volumen de suspensión para examinarse aumenta el coeficiente de variación comparado con otros métodos (Dorney 1964). Juárez en el 2001 reportó un coeficiente de variación del 35% utilizando la misma metodología de Dorney exponiendo que el método puede ser utilizado para recuentos de ooquistes después de ser validado (Juárez *et al.* 2001).

Cuadro 5. Análisis de varianza para ooquistes por gramo

Fuente de Variación	Probabilidad
Matriz	<0.0001
Solución	<0.0001
Repetición	0.0344
Matriz*Solución	0.0291
Coeficiente de Variación	20.62%
R ²	0.87

Como se puede observar en el (Cuadro 6) la solución salina tiene un costo de preparación de HNL. 35.80 y la solución de sacarosa con formalina tiene un costo de preparación de HNL. 62.49. La solución salina presenta un costo de elaboración 43% inferior que la solución de sacarosa con formalina, sin embargo, la solución de sacarosa con formalina tiene mejores resultados para la recuperación de ooquistes. El aumento de costos en la elaboración de la solución de sacarosa con formalina es debido al precio del azúcar tradicional y la formalina. No hay diferencias entre soluciones que puedan llegar a dificultar el conteo de ooquistes, como puede ser el color de la solución de flotación. En el (Cuadro 7) se puede observar que la solución salina saturada tiene los menores costos de elaboración siendo de HNL. 297.77, sin embargo, las diferencias en el costo no son mayores, debido al volumen utilizado en el método.

Cuadro 6. Costos de elaboración de un litro de solución.

Solución Salina Saturada		Solución de Sacarosa con Formalina	
Sal (400 gramos)	HNL 5.80	Azúcar (1250 gramos)	HNL 31.12
Agua Destilada (1000 mL)	HNL 30.00	Formalina 10% (10 mL)	HNL 1.37
		Agua Destilada (1000 mL)	HNL 30.00
Total	HNL 35.80	Total	HNL 62.49

Tasa de cambio: Un dólar = HNL24.55.

Cuadro 7. Costo de elaboración del método de flotación.

Materiales y equipo	Solución Salina Saturada HNL	Solución de Sacarosa con Formalina HNL
Costo de Uso de Equipos	242.66	242.66
Costo de Personal	45.83	45.83
Cubreobjetos	4.37	4.37
Tubos Eppendorf	4.20	4.20
Costo de Solución (20 mL)	0.72	1.25
Total	297.77	298.30

Tasa de cambio: Un dólar = HNL 24.55.

Para el Laboratorio de Microbiología de Alimentos el precio de venta deberá ser de HNL350. El precio es calculado a través de la fórmula de sobrepeso considerando un margen de ganancias del 15%. Actualmente muy pocas empresas prestan el servicio de detección y recuento de *Eimeria* spp en Honduras. SENASA es la única institución que presta este servicio a un precio de HNL150, debido a que esta subsidiado por el estado, sin embargo, el análisis es limitado debido a que realizan un único recuento mientras que Zamorano realizará diez réplicas de cada muestra. Los análisis de heces fecales es laboratorios clínicos privados rondan desde los HNL215 hasta los HNL400. Algunos de estos análisis se realizan tres repeticiones debido a que algunos parásitos tienen un comportamiento de ciclo.

Para evaluar la presencia y cuantificar la cantidad de *Eimeria* spp se debe recolectar una muestra representativa de heces, además, de realizar 10 réplicas de las mismas heces fecales. Esto se realiza con la intención de obtener un valor más cercano al real y con ello disminuir los coeficientes de variación en el estudio. En la zona de San Antonio de Oriente se encuentran algunas explotaciones avícolas con una producción como podemos resaltar Avícola Di Palma con una producción semanal de 3,000 aves, al igual que la Unidad de Aves de Zamorano, contando con tres galpones en funcionamiento. Como se puede observar en la Figura 2, considerando una participación de Zamorano en análisis de este tipo del 50% y un crecimiento del 5% anual se estima que el promedio de muestras anuales es de 65 pruebas anualmente y se espera un acumulado de 900 pruebas dentro de los próximos 10 años.

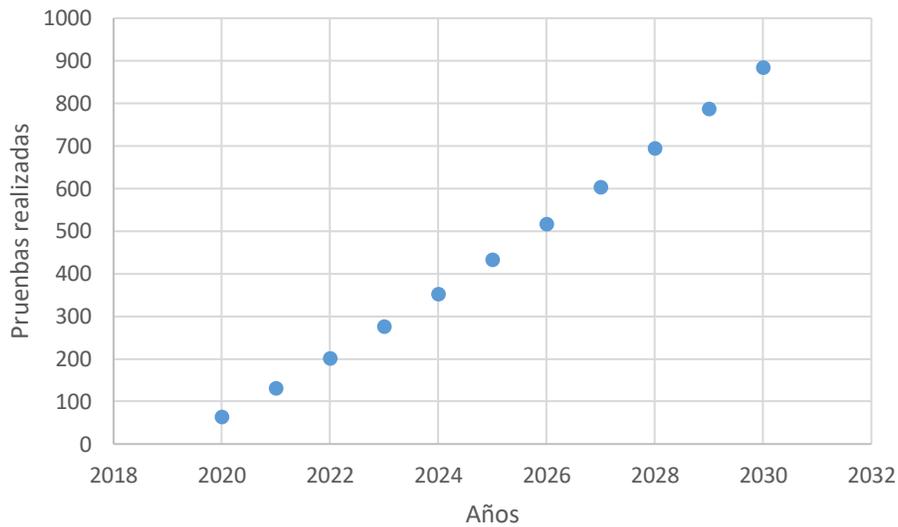


Figura 2. Estimación de la demanda de pruebas de coccidiosis.

4. CONCLUSIONES

- La mejor solución para la detección de *Eimeria* spp es la solución de sacarosa con Formalina al 10% comparada con la solución salina saturada, recolectando la mayor cantidad de ooquistes.
- Es importante utilizar muestra fresca y evitar las muestras de cama debido a que tienen una cantidad inferior de ooquistes a causa del amoníaco que se libera y causa muerte de los parásitos en la cama.
- La solución salina saturada es la solución más barata, además de ser la que tiene la preparación más sencilla de todas.
- El Laboratorio de Microbiología de Alimentos cuenta con todo el equipo y utensilios para poder realizar la metodología para detección de *Eimeria* spp.

5. RECOMENDACIONES

- Comparar la metodología utilizando la Cámara de Neubauer y la Cámara de McMaster para observar con cual se puede recuperar la mayor cantidad de ooquistes y disminuir con esto el sesgo de la prueba.
- Realizar una comparación entre los resultados obtenidos con la Cámara de Neubauer y los conteos reales realizando un conteo de *Eimeria* spp a través de los intestinos.
- Investigar más a cerca de parasitología para el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano debido a que representa una potencial fuente de ingresos y hace más competitivo al laboratorio.
- Equipar al Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano con más cámaras de Neubauer y tubos de Microcentrífuga.

6. LITERATURA CITADA

- Alcaíno H, González P, Fredes F, Gorman T. 2002. Parasitología para Latinoamérica: Coccidias aviarias de gallineros industriales de Chile. 34–39. ISSN 0717-7712
- Blake DP, Tomley FM. 2014. Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. Trends in parasitology. 30(1):12–19. eng. doi:10.1016/j.pt.2013.10.003.
- Borgonovo F, Ferrante V, Grilli G, Pascuzzo R, Vantini S, Guarino M. 2020. A data-driven prediction method for an early warning of coccidiosis in intensive livestock systems: a preliminary study. Animals: an open access journal from MDPI. 10(4). eng. doi:10.3390/ani10040747.
- Cacho E. 2014. Coccidiosis: La enfermedad, consecuencias y tratamiento. Zaragoza, España: Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. 7 p. Memorias del congreso científico de avicultura.
- Castañón CAB, Fraga JS, Fernandez S, Gruber A, da F. Costa L. 2007. Biological shape characterization for automatic image recognition and diagnosis of protozoan parasites of the genus *Eimeria*. Pattern Recognition. 40(7):1899–1910. doi:10.1016/j.patcog.2006.12.006.
- Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V, Capelli G, Scala A. 2004. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. Veterinary parasitology. 123(1-2):121–131. eng. doi:10.1016/j.vetpar.2004.05.021.
- Dorney R. 1964. Evaluation of a Microquantitative method for counting coccidial oocysts. The journal of parasitology. 50:518–522.
- Fabían M, Tello R, Náquira. 2003. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre. 37ª ed. Lima, Perú.: Ministerio de Salud. 101 p. ISBN: 9972 - 857 - 35 - 2.
- Fatoba AJ, Adeleke MA. 2018. Diagnosis and control of chicken coccidiosis: a recent update. Journal of parasitic diseases: official organ of the Indian Society for Parasitology. 42(4):483–493. eng. doi:10.1007/s12639-018-1048-1.
- Gijón P. 2013. Diagnóstico de parásitos en heces: Comparación de dos técnicas de concentración. España: Universidad de Granada, Facultad de Farmacia. 265 p
- Jara C, Minchón C, Zárate C. 2010. Comparación de las técnicas de Willis y de Sheather para el diagnóstico coproparasitológico. Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Perú.
- Kadykalo S, Roberts T, Thompson M, Wilson J, Lang M, Espeisse O. 2018. The value of anticoccidials for sustainable global poultry production. International Journal of Antimicrobial Agents. 51(3):304–310. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.09.004.
- Kaminsky R. 2003. Manual de parasitología: Métodos para laboratorios de atención primaria de salud. 2da. Honduras: UNAH. 124 p.

- Lee H-A, Hong S, Chung Y-H, Song K-D, Kim O. 2012. Anticoccidial effects of *Galla rhois* extract on *Eimeria tenella*-infected chicken. *Lab Anim Res.* 28(3):193–197. eng. doi:10.5625/lar.2012.28.3.193.
- Juárez MA, Cabriales JJ, Petrone VM, Téllez G. 2001. Evaluación del conteo total de ooquistes de *Eimeria tenella* a partir del ciego o heces, efectuado con la cámara de McMaster y el hemocitómetro de Neubauer. *Medigraphic.* 33.
- Mottet A, Tempio G. 2017. Global poultry production: current state and future outlook and challenges. FAO.
- Ola-Fadunsin SD, Uwabujo PI, Sanda IM, Hussain K, Ganiyu IA, Rabi M, Balogun RB. 2019. Cross-sectional study of *Eimeria* species of poultry in Kwara State, North-Central Nigeria. *Journal of parasitic diseases: official organ of the Indian Society for Parasitology.* 43(1):87–95. eng. doi:10.1007/s12639-018-1062-3.
- Peek HW, Landman WJM. 2011. Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *The veterinary quarterly.* 31(3):143–161. eng. doi:10.1080/01652176.2011.605247.
- Pereckiene A, Kaziūnaite V, Vysniauskas A, Petkevicius S, Malakauskas A, Sarkūnas M, Taylor MA. 2007. A comparison of modifications of the McMaster method for the enumeration of *Ascaris suum* eggs in pig faecal samples. *Veterinary parasitology.* 149(1-2):111–116. eng. doi:10.1016/j.vetpar.2007.04.014.
- Price KR. 2012. Use of live vaccines for coccidiosis control in replacement layer pullets. *Journal of Applied Poultry Research.* 21(3):679–692. doi:10.3382/japr.2011-00486.
- Rebuly G. oct. 2013. Evaluación de esporulación de ooquistes de *Eimeria* spp en cama de una granja avícola de aves de reemplazo en la aldea Agua Dulce, Zaragoza, Chimaltenango. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. 64 p.
- Rossanigo C, Suárez V, Romero J. 2007. Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes menores en el cono sur de América. Argentina: INTA. 297 p. ISBN: 0325-2132.
- Serrano F. 2010. Manual práctico de parasitología veterinaria. 1ª ed. España: Universidad de Extremadura. 116 p. ISBN: 978-84-7723-910-9.
- Vadlejch J, Petrtýl M, Lukesová D, Cadková Z, Kudrnáčová M, Jankovská I, Langrozá I. 2013. The concentration McMaster technique is suitable for quantification of coccidia oocysts in bird droppings. *Pak Vet.* 33(2074-7764)

7. ANEXOS

Anexo 1. Microcentrifuga con tubos Eppendorf.



ESCUELA AGRÍCOLA PANAMERICANA
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS
**CUANTIFICACIÓN DE *EIMERIA* SPP EN HECES FECALES DE AVES A TRAVÉS DEL MÉTODO DE FLOTACIÓN
UTILIZANDO LA CÁMARA DE NEUBAUER.**

Anexo 2. Manual de procedimientos para el LMAZ.

1. Objetivos y alcance

Describir el método para la detección de *Eimeria* spp en heces fecales de aves a través del método de flotación utilizando la cámara de Neubauer.

Alcance: Aplica para muestras de heces frescas con menos de 24 horas.

2. Materiales y equipos

- Tubos Eppendorf
- Balanza
- Frasco de Precipitado
- Stomacher
- Solución de Sacarosa / Solución Salina Saturada
- Cámara de Neubauer
- Micropipeta
- Cubreobjetos
- Microscopio Óptico
- Colador
- Hielera
- Gel Congelado

3. Medios de Cultivo y Reactivos

- Solución de Sacarosa con Formalina al 10%

4. Procedimiento

- a) Preparar los reactivos de acuerdo al Anexo 1 y Anexo 2. Procedimiento para la preparación de solución salina saturada y solución de sacarosa con formalina al 10%.
- b) Recolectar muestra de heces frescas haciendo uso de bolsas y cucharas desechables. Importante mantener la cadena de frío para evitar alteración de las formas parasitarias.
- c) Pesar 6.5 gramos de heces fecales frescas dentro de una bolsa y agregar 100 mL de agua destilada.
- d) Introducir dentro del Stomacher por 2 minutos para poder homogeneizar la muestra, asegurar de romper todos los sólidos y liberar los ooquistes.

ESCUELA AGRÍCOLA PANAMERICANA
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS
**CUANTIFICACIÓN DE *EIMERIA* SPP EN HECES FECALES DE AVES A TRAVÉS DEL MÉTODO DE FLOTACIÓN
UTILIZANDO LA CÁMARA DE NEUBAUER.**

- e) Filtrar la suspensión para separar los sólidos indeseados. Agregar 1 mL de suspensión dentro de tubos Eppendorf.
- f) Luego llevar a una micro centrifuga los tubos y centrifugarlos durante 10 minutos a 1700 rpm.
- g) Cuidadosamente vaciar el sobrenadante del tubo Eppendorf sin botar los sólidos acumulados en la parte inferior.
- h) Llevar el tubo Eppendorf a la línea de 2 mL con la solución de flotación y agitar vigorosamente hasta que el sedimento este esparcido.
- i) Introducir nuevamente los tubos Eppendorf a la centrifuga durante 10 minutos a 1200 rpm.
- j) Agitar vigorosamente los tubos Eppendorf y dejar reposar durante 2 minutos sin tocarlo. Al finalizar con uso de una micropipeta agregar 10 micro litros y colocarlos sobre un cuadrante de la cámara de Neubauer y cubrirlo con un portaobjetos.
- k) Después con uso de un microscopio óptico en el objetivo 20X contabilizar los ooquistes en todos los cuadrantes. Importante utilizar la iluminación del diafragma en el número 10.
- l) El resultado final multiplicarlo por 1111.11 y ese mismo resultado luego multiplicarlo por 10 para poder llevarlo a la solución 10⁰.

ANEXO

Anexo 1. Preparación de Solución Salina Saturada

Gravedad especifica: 1.18

Forma de preparación: Calentar a 60°C agua destilada dentro de un Erlenmeyer cuando este llegue a la temperatura adecuada agregar 128 gramos de sacarosa por cada 100 mL de agua destilada. Este deberá ser agitada constantemente hasta que la sacarosa se disuelva completamente, dejar reposar durante 30 minutos hasta que se enfríe. Enfriada la solución agregar 1 mL de formalina al 10% por cada 100 mL de agua destilada utilizada. Importante mantener en refrigeración la solución después de su preparación.

Anexo 2. Recolección de muestra

Haciendo uso de cucharas desechables tomar las heces frescas del suelo e introducir las dentro de una bolsa para muestras. Una vez colectada la muestra introducir dentro de una hielera y transportar hacia el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano. Es importante mantener la refrigeración para evitar la alteración de las formas parasitarias (Fabián *et al.* 2003).

ESCUELA AGRÍCOLA PANAMERICANA
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS
**CUANTIFICACIÓN DE *EIMERIA* SPP EN HECES FECALES DE AVES A TRAVÉS DEL MÉTODO DE FLOTACIÓN
UTILIZANDO LA CÁMARA DE NEUBAUER.**

5. Referencias

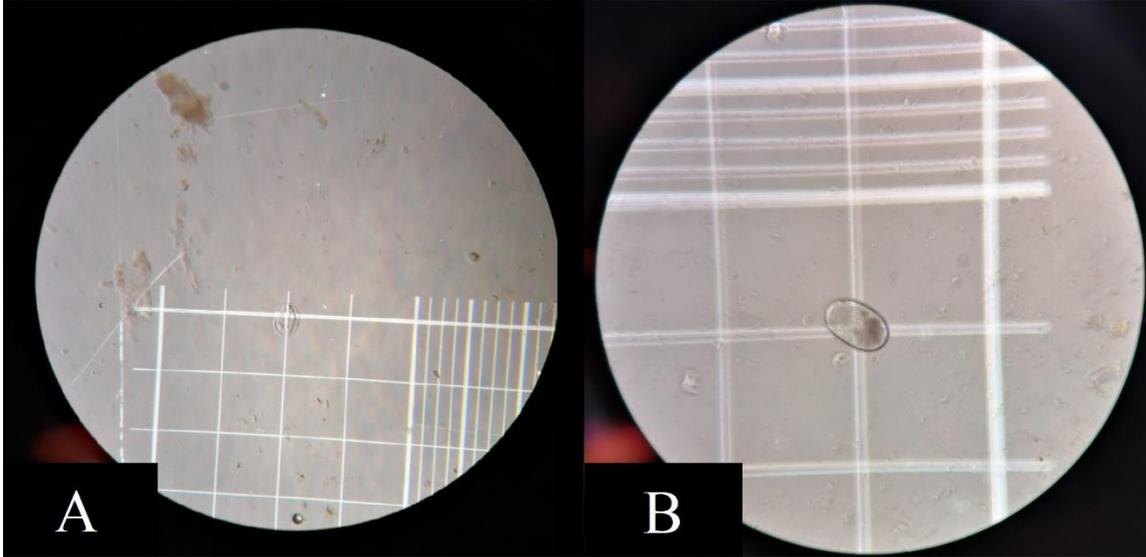
- Fabián M, Tello R, Náquira. 2003. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre. 37^a ed. Lima, Perú.: Ministerio de Salud. 101 p. ISBN: 9972 - 857 - 35 - 2.
- Portillo R. 2020. Implementación de un método para detectar *Eimeria* spp en aves de corral a través del método de flotación. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

6. Control de cambios

Versión I

- I. No se han realizado cambios.

Anexo 3. Cámara de Neubauer con *Eimeria* spp.



A: Parasito *Eimeria* spp en solución salina saturada observado a 10X.

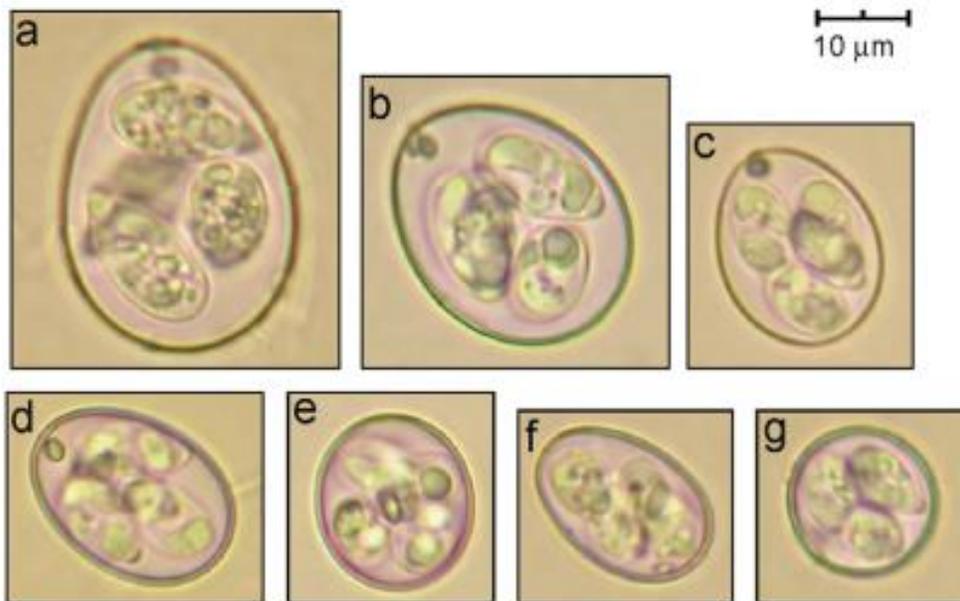
B: Parasito *Eimeria* spp en solución de sacarosa con formalina observado a 20X.

Anexo 4. Soluciones de flotación (salina y sacarosa)



Solución Salina Saturada (izquierda) y Solución de Sacarosa con Formalina (derecha)

Anexo 5. Especies de *Eimeria* spp en aves (a) *E. maxima*, (b) *E. brunetti*, (c) *E. tenella*, (d) *E. necatrix*, (e) *E. praecox*, (f) *E. acervulina*, and (g) *E. mitis*.



Fuente: (Castañón *et al.* 2007)