

Universidade Federal de Uberlândia

Vinícius Vieira de Paiva

Adaptações na execução da técnica de mini-Flotac com amostras de fezes de bovinos e ovinos para facilitar sua utilização em rotina de campo

Uberlândia- MG
2019

Vinícius Vieira de Paiva

Adaptações na execução da técnica de mini-Flotac com amostras de fezes de bovinos e ovinos para facilitar sua utilização em rotina de campo

Trabalho de Conclusão de Residência apresentado a Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para a obtenção do título de Médico Veterinário Residente especialista em Medicina Veterinária Preventiva.

Uberlândia, 27 de março de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fernanda Rosalinski Moraes
FAMEV-UFU

Prof. Fernando Cristino Barbosa
FAMEV-UFU

Msc. Lívia Mendonça de Aguiar
FAMEV-UFU

Trabalho realizado conforma as normas da revista *Veterinary Parasitology: Regional Studies and reports*.

1 **Adaptações na execução da técnica de mini-Flotac com amostras de fezes de bovinos**
2 **e ovinos para facilitar sua utilização em rotina de campo**

3 Resumo

4 Este estudo tem por objetivo, comparar as técnicas de contagem de ovos,
5 Gordon e Whitlock (GW) e mini-Flotac (MF), a fim de propor adaptações na segunda,
6 que é uma técnica atual com maior sensibilidade na contagem de ovos. Foi proposta a
7 leitura de apenas um compartimento da câmara do MF e também um modelo para
8 viabilizar a utilização do dispositivo *fill-Flotac (FF)* com fezes de ovinos. Para isto, foram
9 realizadas contagens de ovos por gramas de fezes (OPG) de *estrongilídeos*, utilizando
10 *pool* de fezes bovinas e ovinas, os resultados mostraram não existir diferença
11 significativa entre os métodos propostos, exceto pelo uso do dispositivo FF em fezes
12 ovinas sem realizar a pesagem da amostra ou o uso do fator de correção de 2,6.

13 Palavras chave: resistência anti-helmíntica; *estrongilídeos*; coproparasitológico; bovino;
14 ovino.

15

16 Abstract

17 The objective of this study was to compare two egg counting techniques, Gordon &
18 Whitlock (GW) and mini-Flotac (MF), in order to propose adaptations in the second one,
19 which is a current technique with greater sensitivity in egg counting. It was proposed to
20 read only one compartment of the MF chamber and also a model to make feasible the
21 use of the *fill-Flotac device (FF)* with sheep faeces. The results showed that there were
22 no significant difference between the methods proposed, except for the use of the FF
23 device in sheep faeces without weighing the sample or using the correction factor of 2.6.

24 Keywords: anthelmintic resistance; *strongylid*; coproparasitological; cattle; sheep.

25

26 1.Introdução

27 As endoparasitoses são causas conhecidas de perdas econômicas na produção
28 de ruminantes no mundo inteiro. Com o surgimento de relatos cada vez mais frequentes
29 de resistência aos anti-helmínticos, tanto em ovinos quanto bovinos, tem se estimulado
30 a melhoria nos testes laboratoriais de diagnóstico, com técnicas mais precisas e
31 eficientes (Holsback et al., 2015; Kenyon et al., 2016; Molento et al., 2016; Salgado
32 Santos, 2016). Assim, seria possível averiguar de forma mais acurada a eficácia dos
33 medicamentos em testes in vivo, bem como identificar quais indivíduos do rebanho
34 poderiam ser tratados seletivamente para verminoses. (Coles et al., 2006; Edith et al.,
35 2018).

36 A técnica de contagem de ovos por grama de fezes (OPG) mais utilizada
37 mundialmente é a de Gordon e Whitlock (GW),(Gordon e Whitlock, 1939). No entanto
38 observa-se muita variação na forma como esta técnica é padronizada na rotina dos
39 diferentes laboratórios de diagnóstico. A técnica também possui baixa sensibilidade
40 analítica, levando em conta que os resultados de contagem são multiplicados por 50.
41 (Cringoli et al., 2010).

42 Para melhorar a acurácia e sensibilidade da contagem de ovos em amostras de
43 fezes, Cringoli et al. (2010) desenvolveram o método Flotac. Como sua execução é
44 trabalhosa e exige estrutura laboratorial, Barda et al. (2013) descreveram uma
45 adaptação deste método, o mini-Flotac (MF). Para realização da técnica, indica-se
46 preencher com fezes o dispositivo *fill-Flotac (FF)*, que tem uma cavidade que serve como
47 medida de volume. Este dispositivo foi desenvolvido de modo a dispensar o uso de
48 balança e peneiras bem como oferecer uma maior praticidade no preparo do exame,
49 sendo uma alternativa interessante para o campo. No entanto, o maior gasto de tempo
50 para leitura da câmara do MF, se comparado ao GW, pode dificultar sua utilização na
51 rotina de exames em situações que um grande número de amostras precisam ser
52 processadas.

53 Este estudo tem por objetivo realizar modificações que simplificam os processos
54 de contagem de ovos de strongilídeos, sem prejuízo na precisão das contagens
55 mantendo se igual ou até melhor que métodos amplamente utilizados na rotina destes
56 exames laboratoriais.

57 2.Material e métodos

58 Foram utilizadas amostras de fezes frescas disponíveis no laboratório para fazer
59 *pools* de aproximadamente 60g, que foram homogeneizados por 10 minutos
60 manualmente. No total foram utilizados quatro *pools* de fezes bovinas e quatro de fezes
61 ovinas em cíbalos. Para cada *pool* bovino foram realizados os exames conforme figura
62 1, e para ovinos, conforme figura 2. Para ambas as espécies, foram utilizadas amostras
63 fecais em consistência esperada para um animal saudável.

64 Na técnica de GW, foram pesados 2 g de fezes, diluídos em 28 ml de solução
65 supersaturada de NaCl (gravidade específica=1,2). As fezes foram, diluídas, filtradas, e

66 uma alíquota foi colocada na câmara de Mac Master. Após 10 minutos, realizou-se a
67 leitura em microscópio óptico no aumento de 100x, contando ovos de *Estrongilídeos*,
68 por fim multiplicando por 50, sendo este o resultado em OPG.

69 Na técnica de mini-Flotac (MF), foram seguidas as indicações do fabricante para
70 herbívoros, que também são descritas em Dias de Castro et al. (2017). O dispositivo de
71 FF possui uma concavidade para o depósito das fezes, que quando preenchido comporta
72 aproximadamente 5g e um recipiente onde se adiciona 45 ml de solução supersaturada
73 de NaCl. Após adicionar fezes e solução, foi feita homogeneização com o FF fechado e
74 depositado na câmara de mini-Flotac.

75 A fim de avaliar a precisão do dispositivo, na técnica de MF em bovinos, a
76 quantidade de fezes depositada na concavidade foi pesada para conferência da massa
77 de 5g fezes. Para ovinos, o exame MF foi realizado de duas maneiras chamadas de MFA
78 e MFB. No exame MFA, foram utilizadas 5g da amostra de fezes, aferida em balança, e
79 adicionadas ao dispositivo FF. No exame MFB, preencheu-se a concavidade do dispositivo
80 FF com fezes, que também teve registrado o valor de sua massa em balança de precisão,
81 sem correções.

82 Aguardou-se 10 minutos para realizar a leitura em microscópio óptico no
83 aumento de 100x. Foi registrado separadamente o valor de contagem obtido nos
84 compartimentos 1 e 2. Para saber o valor de OPG os valores foram multiplicados por 10,
85 sendo contado apenas ovos de *estrongilídeos*. Para obter o valor da contagem conforme
86 indicação do fabricante (contagem total), foram somados os resultados dos dois
87 compartimentos e dividido por dois. A finalidade, foi avaliar a qualidade da metodologia,
88 quando feita de uma maneira mais rápida, utilizando a leitura de apenas um
89 compartimento da câmara de MF.

90 Os dados foram obtidos através da contagem de ovos totais pelo método de GW,
91 e pela contagem dos compartimentos da câmara de MF. O experimento foi analisado
92 estatisticamente por ANOVA (Análise de Variância) utilizando um Delineamento em
93 Blocos Casualizados (DBC), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a nível de
94 5% de significância. Cada tratamento teve 5 repetições (leituras de exames) por bloco
95 (pool de fezes), sendo, totalizando 20 resultados por segmento de leitura de exame.

96 3.Resultados e discussão

97 Ao comparar a média dos resultados das contagens de ovos de *estrongilídeos*
98 (OPG) nos quatro *pool* de fezes bovinas, pelo método de Gordon e Whitlock (GW) e as
99 três diferentes variações de metodologia de leitura do mini-Flotac (MF), não ocorreu
100 diferença estatística (Tabela 1). Da mesma forma, não foi observada diferença
101 significativa na média de OPG dos *pools* de fezes ovinas em decorrência da
102 metodologia utilizada para quantificação (Tabela 2 e 3).

103 A equivalência das médias de OPG indica que é possível optar pelo método GW,
104 trazendo a vantagem da velocidade do processamento das amostras, pela rápida leitura,
105 uma vez que a área de contagem da câmara é menor. No entanto observou-se grande

106 amplitude e maior desvio padrão nos resultados quando foi utilizado esta técnica. Dias
107 de Castro et al. (2017), assim como Noel et al., (2017), encontraram um desvio padrão
108 significativamente maior da técnica GW em relação ao MF, em diferentes laboratórios.
109 Estes autores sugerem que esta diferença de amplitudes provavelmente está ligada ao
110 fator de multiplicação da contagem pelo GW ser 5 a 10 vezes maior que o MF. Esta
111 diferença de amplitude pode resultar uma maior sensibilidade e acurácia MF se
112 comparado ao GW, mas também em maior tempo de leitura, uma vez que a câmara de
113 contagem do MF é maior.

114 Mesmo realizando a leitura de apenas um compartimento da câmara de MF, e
115 trocando o fator de multiplicação para 10 ao invés de 5, para obtenção do OPG, a técnica
116 manteve seu desvio padrão abaixo do GW (Tabelas 1, 2 e 3), e permitiu maior rapidez
117 na execução. Assim, em uma situação de campo, na qual é necessário processar várias
118 amostras em um curto espaço de tempo, a técnica de MF, com esta modificação pode
119 ser mais vantajosa e acurada que a GW.

120 Quando é necessário realizar tramento seletivo baseado em contagem de ovos,
121 ou mesmo, testes *in vivo* de redução de OPG, normalmente se utiliza uma única
122 mensuração por indivíduo. Assim, é importante optar por técnicas que possuam baixa
123 amplitude nos resultados obtidos, fornecendo contagens mais próximos ao real valor de
124 OPG. Segundo Dias de Castro et al. (2017), isto é ainda mais importante em espécies
125 herbívoras de baixa eliminação de ovos nas fezes, a fim de evitar falsos negativos.

126 Observou-se que a massa obtida de fezes ovinas depositadas no coletor do
127 dispositivo *fill-Flotac* (FF) era inferior à esperada. Ao aferir a massa das 20 amostras de
128 fezes coletadas no dispositivo (FF) na metodologia MF, encontrou-se um valor médio de
129 aproximadamente 1,97g, e desvio padrão de 0,21g. Conforme exemplificado na tabela
130 4, o resultado das contagens deste método MF apresentaram diferenças estatísticas
131 significativas em comparação à técnica GW, e nas outras formas de execução do método
132 mini-Flotac. A fim de encontrar uma solução que permitisse a utilização do dispositivo,
133 foi proposto a utilização de um fator de correção 2,6, obtido através da média das
134 divisões da massa esperada de fezes (5g) pela massa obtida a cada pesagem de fezes,
135 sendo esta a técnica MFB. A execução da técnica resultou em equivalência das médias
136 de contagem de OPG (Tabela 2 e 3), sendo que a não utilização do fator de correção
137 inviabilizou a comparação da técnica com as demais por apresentar diferença
138 significativa (tabela 4).

139 Rinaldi et al., (2014) procederam a pesagem de fezes ovinas para utilização da
140 técnica de MF, visto que a obtenção desta quantidade de fezes, quando em cíbalos,
141 utilizando o coletor FF é muito complicada. No entanto, a modificação proposta de
142 realizar o preenchimento do dispositivo e utilizar o fator de correção para contagem,
143 além de dispensar o uso de balança, permitiu a execução da técnica de uma forma
144 segura e de mais simples execução em situações de campo.

145 Quando contado apenas um compartimento do dispositivo MF, o procedimento
146 se tornou ainda mais rápido e mesmo assim, apresentou menores amplitudes e desvio

147 padrão em relação ao GW (tabela 2 e 3). Deste modo, MF é uma técnica possível de
148 utilizar em rebanhos ovinos para avaliação da carga parasitária de uma forma rápida a
149 campo, desde que se use o fator de correção.

150 4.Conclusão

151 O método mini-Flotac, lendo apenas um compartimento do dispositivo,
152 utilizando o dispositivo *fill-Flotac* para execução do exame traz maior eficiência na
153 contagem de ovos por gramas de fezes, se comparado ao método de Gordon e Whitlock.
154 Ao utilizar o dispositivo FF para processar fezes de ovinos na constituição de cíbalos, ao
155 realizar o mini-Flotac, é necessário utilizar o fator de correção de 2,6.

156 5.Agradecimentos

157 O Autor gostaria de agradecer ao MEC, a Universidade Federal de Uberlândia e
158 seus colaboradores por amparar a execução deste trabalho.

159

160 REFERÊNCIAS

- 161 Barda, B.D., Rinaldi, L., Ianniello, D., Zepherine, H., Salvo, F., Sadutshang, T., Cringoli,
162 G., Clementi, M., Albonico, M., 2013. Mini-FLOTAC, an Innovative Direct
163 Diagnostic Technique for Intestinal Parasitic Infections: Experience from the Field.
164 PLoS Negl. Trop. Dis. 7, e2344. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002344>
- 165 Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., Von Samson-Himmelstjerna, G.,
166 Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruyse, J., 2006. The detection of anthelmintic
167 resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 136, 167–185.
168 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.11.019>
- 169 Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Utzinger, J., 2010. FLOTAC: New multivalent
170 techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of
171 parasites in animals and humans. *Nat. Protoc.* 5, 503–515.
172 <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.235>
- 173 Dias de Castro, L.L., Abrahão, C.L.H., Buzatti, A., Molento, M.B., Bastianetto, E.,
174 Rodrigues, D.S., Lopes, L.B., Silva, M.X., de Freitas, M.G., Conde, M.H., Borges, F.
175 de A., 2017. Comparison of McMaster and Mini-FLOTAC fecal egg counting
176 techniques in cattle and horses. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* 10, 132–135.
177 <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.10.003>
- 178 Edith, R., Harikrishnan, T.J., Balagangatharathilagar, M., 2018. Targeted selective
179 treatment (TST): A promising approach to combat anthelmintic resistance in
180 farm animals 6, 844–847.
- 181 Gordon, H.McL., Whitlock, H.V., 1939. A New Technique for Counting Nematode Eggs
182 in Sheep Faeces. *J. Counc. Sci. Ind. Res.* 12, 50–52.
- 183 Holsback, L., Silva, M.A. da, Patelli, T.H.C., Jesus, A.P. De, Sanches, J.R., Sanches, J.R.,
184 2015. Resistance of *Haemonchus*, *Cooperia*, *Trichostrongylus*, and
185 *Oesophagostomum* to ivermectin in dairy cattle in Paraná. *Semin. Ciências*

- 186 Agrárias 36, 2031. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n3Supl1p2031>
- 187 Kenyon, F., Rinaldi, L., McBean, D., Pepe, P., Bosco, A., Melville, L., Devin, L., Mitchell,
188 G., Ianniello, D., Charlier, J., Vercruyse, J., Cringoli, G., Levecke, B., 2016. Pooling
189 sheep faecal samples for the assessment of anthelmintic drug efficacy using
190 McMaster and Mini-FLOTAC in gastrointestinal strongyle and Nematodirus
191 infection. *Vet. Parasitol.* 225, 53–60.
192 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.03.022>
- 193 Molento, M.B., Buzatti, A., Sprenger, L.K., 2016. Pasture larval count as a supporting
194 method for parasite epidemiology, population dynamic and control in ruminants.
195 *Livest. Sci.* 192, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.08.013>
- 196 Noel, M.L., Scare, J.A., Bellaw, J.L., Nielsen, M.K., 2017. Accuracy and Precision of Mini-
197 FLOTAC and McMaster Techniques for Determining Equine Strongyle Egg Counts.
198 *J. Equine Vet. Sci.* 48, 182–187.e1. <https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2016.09.006>
- 199 Rinaldi, L., Levecke, B., Bosco, A., Ianniello, D., Pepe, P., Charlier, J., Cringoli, G.,
200 Vercruyse, J., 2014. Comparison of individual and pooled faecal samples in sheep
201 for the assessment of gastrointestinal strongyle infection intensity and
202 anthelmintic drug efficacy using McMaster and Mini-FLOTAC. *Vet. Parasitol.* 205,
203 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.06.011>
- 204 Salgado, J.A., Santos, C. de P., 2016. Panorama da resistência anti-helmíntica em
205 nematoides gastrointestinais de pequenos ruminantes no Brasil. *Rev. Bras.*
206 *Parasitol. Vet.* 25, 3–17. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016008>
- 207

ANEXO 1

FIGURAS

Figura 1.

Esquema explicativo dos exames realizados em cada um dos quatro pool de fezes bovinas

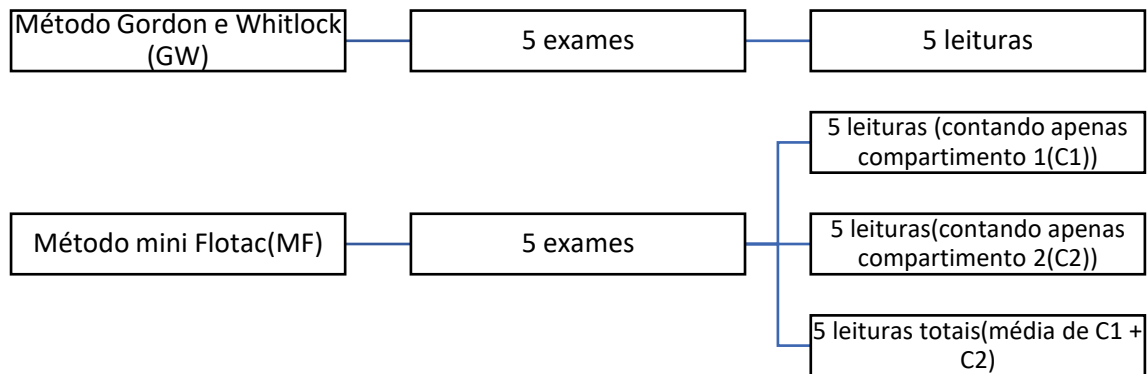
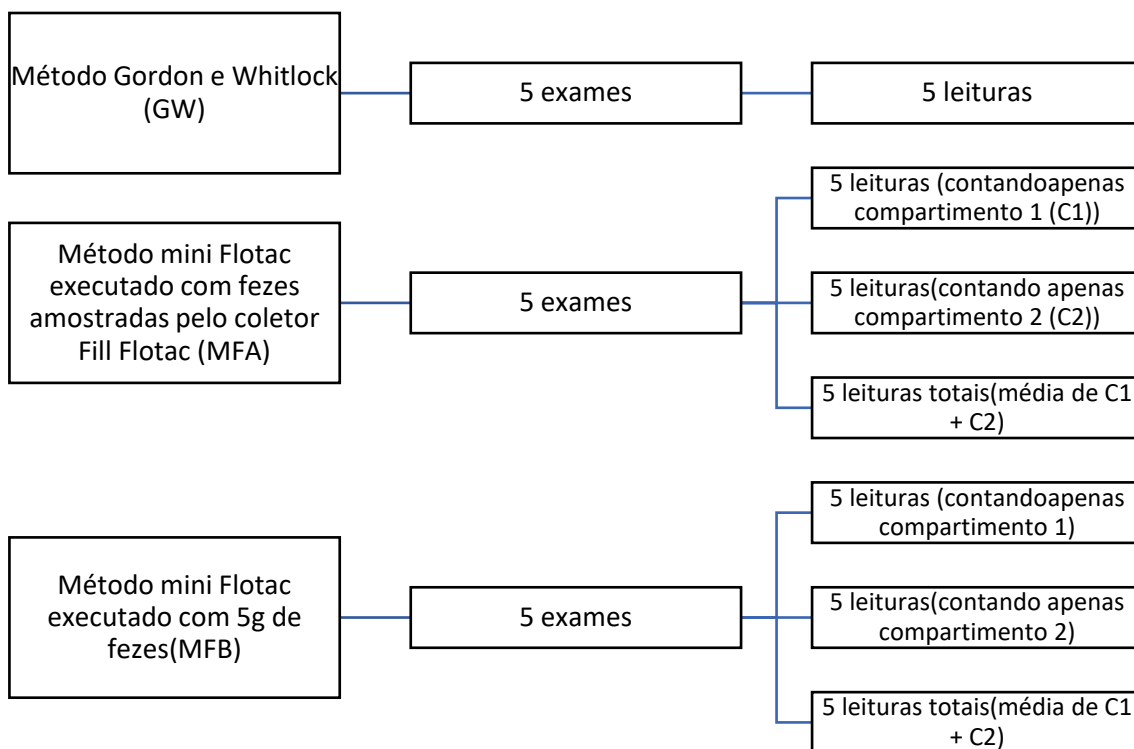


Figura 2.

Esquema explicativo dos exames realizados em cada um dos quatro pool de fezes ovinas.



ANEXO 2

TABELAS

Tabela 1.

Média, desvio padrão(DP) e Amplitudes(Amp) dos resultados de contagem de ovos de estrongilídeos por grama de fezes, em quatro pool de fezes de bovinos, determinados pelo método de Gordon e Whitlock(GW), e método mini Flotac (MF): contando apenas compartimento 1(C1) e apenas compartimento 2(C2) e a média de ambos compartimentos(T).

	GW			MF-C1			MF-C2			MF-T		
	Média	DP	Amp	Média	DP	Amp	Média	DP	Amp	Média	DP	Amp
Pool1	160	129	250	110	56	130	96	17	40	103	28	75
Pool2	1340	338	850	1480	90	220	1552	78	190	1516	79	205
Pool3	600	262	700	800	110	240	800	96	230	800	87	230
Pool4	890	343	950	794	63	160	886	87	240	840	52	130
Total	2990	1072	2750	3184	319	750	3334	278	700	3259	247	640
Média*	747,5a	268	687,5	796a	80	187	833a	70	175	814,5a	62	160

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Tabela 2.

Média, desvio padrão(DP) e Amplitudes(Amp) dos resultados de contagem de ovos de estrongilídeos por grama de fezes, em quatro pool de fezes de ovinos, determinados pelo método Gordon e Whitlock (GW), e método mini Flotac utilizando 5g de fezes (MFA): contando apenas compartimento 1(C1) e apenas compartimento 2(C2) e a média de ambos compartimentos(T).

	GW			MFA-C1			MFA-C2			MFA-T		
	Média	DP	Amp	Média	DP	Amp	Média	DP	Amp	Média	DP	Amp
Pool1	670	189	450	708	127	330	683	165	420	695,5	139	245
Pool2	240	108	250	428	76	190	416	83	210	422	75	200
Poo3	1180	404	950	774	88	260	748	78	180	761	85	195
Pool4	1820	732	1850	1298	128	290	1278	152	360	1288	138	215
Total	3910	1433	3500	3208	419	1070	3125	478	1170	3166,5	437	855
Média*	977a	358	875	802a	104	267	781a	119	292	791a	109	213

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey

Tabela 3.

Média, desvio padrão(DP) e Amplitudes(Amp) dos resultados de contagem de ovos de estrongilídeos por grama de fezes, em quatro pool de fezes de ovinos, determinados pelo método Gordon e Whitlock (GW), e método mini Flotac , utilizando coletor de fezes fill Flotac e empregando o fator de correção de 2,6 no resultado final(MFB): contando apenas compartimento 1(C1) e apenas compartimento 2(C2) e a média de ambos compartimentos(T).

	GW			MFB-C1			MFB-C2			MFB-T		
	Média	DP	Amp	Média	DP	Amp	Média	DP	Amp	Média	DP	Amp
Pool1	670	189	450	811	210	468	821	429	702	816,4	239	484
Pool2	240	108	250	540	109	286	514	85,8	208	527,8	93	131
Poo3	1180	404	950	97	533	1248	1014	351	806	995,8	426	934
Pool4	1820	732	1850	1383	241	572	1450	335,4	910	1417	278	620
Total	3910	1433	3500	3712	1094	257	3801	1201	2626	3757	1037	2169
Média*	977a	358	875	928a	273	643	950a	300	656	939a	259	542

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Tabela 4.

Média dos resultados de contagem de ovos de strongilídeos por grama de fezes(OPG), em quatro pool de fezes de ovinos, determinados pelos métodos Gordon e Whitlock (GW), e mini Flotac utilizando coletor de fezes fill Flotac (MF), utilizando balança de precisão(MFA), utilizando coletor de fezes fill Flotac e empregando o fator de correção de 2,6 no resultado final(MFB): contando apenas compartimento 1(C1) da câmara de contagem e apenas compartimento 2(C2) e a média de ambos compartimentos(T).

	GW	MF C1	MF C2	MF T	MFA C1	MFA C2	MFA T	MFB C1	MFB C2	MFB T
Média(OPG)*	977a	357b	365b	361b	802a	781a	791a	928a	950a	939a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.