

Diagnóstico da infecção por *Toxocara vitulorum* em búfalos jovens através de técnica de flutuação simples



ISSN 1677-8618
Setembro, 2009

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 63

Diagnóstico da infecção por *Toxocara vitulorum* em búfalos jovens através de técnica de flutuação simples

Fábio da Silva Barbieri
Rodrigo Barros Rocha
Luciana Gatto Brito
Francelino Goulart da Silva Netto
Marivaldo Rodrigues Figueiró

Porto Velho, RO
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Rondônia

BR 364 km 5,5, Caixa Postal 406, CEP 76815-800, Porto Velho, RO

Telefones: (69) 3901-2510, 3225-9387, Fax: (69) 3222-0409

www.cpafrro.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Cléber de Freitas Fernandes*

Secretária: *Marly de Souza Medeiros*

Membros:

Abadio Hermes Vieira

André Rostand Ramalho

Luciana Gatto Brito

Michelliny de Matos Bentes-Gama

Vânia Beatriz Vasconcelos de Oliveira

Normalização: *Daniela Maciel*

Editoração eletrônica: *Marly de Souza Medeiros*

Revisão gramatical: *Wilma Inês de França Araújo*

1ª edição

1ª impressão (2009): 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Rondônia.

Diagnóstico da infecção por *Toxocara vitulorum* em búfalos jovens através de técnica de flutuação simples / Fábio da Silva Barbieri ... [et al].-- Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2009.
13 p. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Rondônia, 1677-8618; 63)

1. Sanidade Animal. 2. Parasitologia. 3. Helminto. 4. *Toxocara vitulorum*. 5. Búfalo. I. Barbieri, Fábio da Silva. II. Rocha, Rodrigo Barros. III. Brito, Luciana Gatto. IV. Silva Netto, Francelino Goulart da. V. Figueiró, Marivaldo Rodrigues. VI. Título. VII. Série.

CDD (21.ed.) 595.429

© Embrapa – 2009

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Material e métodos	8
Resultados	11
Conclusão	12
Referências	12

Diagnóstico da infecção por *Toxocara vitulorum* em búfalos jovens através de técnica de flutuação simples

Fábio da Silva Barbieri¹

Rodrigo Barros Rocha²

Luciana Gatto Brito³

Francelino Goulart da Silva Netto⁴

Marivaldo Rodrigues Figueiró⁵

Resumo

A técnica de flutuação simples de ovos de helmintos para o diagnóstico de *Toxocara vitulorum* em amostras de fezes foi adaptada para ser utilizada em búfalos jovens devido a baixa quantidade de fezes coletada nestes animais. A validação da metodologia foi feita com a técnica de contagem de ovos por grama - OPG de Gordon & Whitlock modificada. Amostras fecais foram coletadas diretamente da ampola retal em bezerros bubalinos com idade entre 15 e 60 dias criados no campo experimental da Embrapa Rondônia, no Município de Presidente Médici, RO. As amostras foram analisadas no Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Rondônia, onde foram processadas pela técnica de Gordon & Whitlock modificada e pela técnica de flutuação simples adaptada para a utilização de cerca de 0.05 g de fezes. As validações dos resultados entre as duas técnicas mostraram uma similaridade de 90 %, onde o erro do tipo falso positivo foi de 2 % e falso negativo de 8 %. Essa taxa de erro ocorrida na flutuação simples adaptada foi proveniente de amostras com quantidades baixas de ovos, resultando também a ocorrência de erros de detecção do método de Gordon & Whitlock. Os resultados entre as duas técnicas mostraram que é possível realizar o diagnóstico qualitativo da infecção por *T. vitulorum* e outras helmintoses através da técnica de flutuação simples utilizando-se pequenas quantidades de fezes.

Termos para indexação: sanidade animal, diagnóstico de helmintos, flutuação simples, *Toxocara vitulorum*.

¹ Médico Veterinário, D.Sc. em Ciências Veterinárias – Parasitologia, pesquisador da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, fabio@cpafro.embrapa.br

² Biólogo, D.Sc. em Genética e Melhoramento, Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, rodrigo@cpafro.embrapa.br

³ Médica Veterinária, D.Sc. em Ciências Veterinárias – Parasitologia, pesquisadora da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, luciana@cpafro.embrapa.br

⁴ Médico Veterinário, M.Sc. em Doenças Parasitárias de Ruminantes, pesquisador aposentado da Embrapa Rondônia, francelinogoulart@uol.com.br

⁵ Médico Veterinário, M.Sc. em Medicina Veterinária, Analista da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, figueiro@cpafro.embrapa.br

Diagnosis of *Toxocara vitulorum* infection in young buffaloes by simple flotation technique

Abstract

The simple flotation technique of helminths eggs for the diagnosis of *Toxocara vitulorum* was adapted for young buffaloes due to the low quantify of feces collected from these animals. The validation of the methodology was done with basis on OPG technique wich was modified for Gordon & Whitlock. Faecal samples were collected directly from rectal ampoule in calves with age from 15 to 60 days reared in experimental field of Embrapa Rondônia in Presidente Medici county, RO. In the Animal Health Laboratory of Embrapa Rondônia the samples were analyzed by modified Gordon & Whitlock technique and helminthes eggs fluctuation adapted for utilization 0,05 g of faeces. By analysis for result comparisons these techniques showed similarity of 90 % between them, being the false error positive of 2 % and the false negative error of 8 %. This error rate occurred in fluctuation adapted were from sample with low quantities of eggs of helminthes, resulting also to errors of detection method of modified Gordon & Whitlock. The results between the two techniques showed that it is possible to realize the qualitative diagnosis for *T. vitulorum* and other helminthiasis through the technique of simple flotation using a small amounts of feces.

Index terms: animal health, helminths diagnostic, simple flotation, *Toxocara vitulorum*.

Introdução

Embora sejam reconhecidamente mais resistentes a determinadas enfermidades, os bubalinos são acometidos basicamente pelos mesmos parasitos que os bovinos. Dentre as doenças que atingem os bubalinos, helmintos gastrintestinais constituem-se em agentes etiológicos de significativa importância para a diminuição da produtividade, afetando principalmente a saúde dos animais jovens, criados em pastagens. As perdas econômicas estão associadas a sinais clínicos severos e ainda mais importante, com as infecções subclínicas, que reduz o ganho de peso, crescimento e fertilidade. Os principais danos causados por helmintos gastrintestinais, relacionados com as perdas no ganho de peso, são: anorexia e a redução da ingestão de alimentos, perda de sangue e proteínas plasmáticas no trato gastrointestinal, alteração no metabolismo protéico, decréscimo nos níveis de minerais, enzimas e diarreia (SOULSBY, 1987). Todos estes fatores contribuem para a diminuição da resistência para várias doenças, podendo causar, secundariamente, alta mortalidade (IRFAN, 1984).

Vários autores relataram a presença de infecções mistas por helmintos no trato gastrointestinal dos búfalos (BARBOSA et al., 1992). Entretanto, *Toxocara vitulorum*, parasito do intestino delgado de ruminantes, apresenta prevalência e intensidade de infecção maiores nos bubalinos quando comparados aos bovinos, particularmente em bezerros de um a três meses de idade, sendo responsável por elevadas taxas de morbidade e mortalidade (GUPTA et al., 1976), resultando em graves prejuízos econômicos. A precocidade no aparecimento dos ovos nas fezes está diretamente relacionada com a forma de infecção, transplacentária e mamária (STARKE et al., 1992; BARBOSA; CORRÊA, 1989).

A via transplacentária é considerada a forma mais usual de contaminação, como foi constatado por Barbosa e Corrêa (1989) que verificaram a presença de ovos de *T. vitulorum* nas fezes de bezerros búfalos nos primeiros dias de vida. É comum encontrar bezerros bubalinos altamente infectados entre 15 e 90 dias de idade, com pico de produção de ovos ocorrendo 31 a 45 dias pós infecção (ROBERTS, 1990). O *T. vitulorum* pode causar pneumonia verminótica durante a migração, além de provocar, eventualmente, perfuração e obstrução intestinal (LEVINE, 1980). Búfalos jovens parasitados apresentam sintomatologia típica de inapetência, fraqueza, pelagem áspera, abdome flácido e dilatado, podendo apresentar diarreia com coloração escura e odor butírico (SATIJA et al., 1973; GRIFFITHS, 1974; LEVINE, 1980; BHATIA, 1992; LAU, 1999).

Para diagnóstico preciso das helmintoses gastrintestinais, devem ser considerados o histórico clínico, estado nutricional, manejo sanitário e observação de lesões na necropsia. Entretanto, muitas vezes há dificuldade em se realizar a necropsia, podendo o diagnóstico ser baseado em técnicas coprológicas, a partir de amostras de fezes coletadas diretamente da ampola retal dos animais. Técnicas coprológicas também são comumente utilizadas em estudos epidemiológicos e em exames de rotina. As principais técnicas coprológicas utilizadas para o diagnóstico dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes são as de flutuação e sedimentação (qualitativas) e a de contagem de ovos (quantitativa), sendo esta a mais empregada, pois, permite uma estimativa da carga parasitária do animal.

Embora a quantidade de fezes a serem coletadas seja pequena, entre cinco e dez gramas, para a realização da maioria das técnicas coprológicas, há casos onde não se consegue obter essa quantidade. Isso ocorre em animais jovens e de pequeno porte devido a dificuldade de remoção das fezes e, principalmente, quando esses animais defecaram momentos antes da coleta.

Este estudo foi realizado com o objetivo de verificar a possibilidade de se realizar o diagnóstico qualitativo para o *T. vitulorum* em bezerros bubalinos, nos primeiros dias de vida, com quantidades de fezes inferiores a 0,5 g a partir de uma adaptação na técnica de flutuação simples.

Material e Métodos

O estudo foi conduzido a partir de amostras de fezes coletadas de bezerros bubalinos, da raça Murrah, com idade variando entre 15 e 60 dias, criados no campo experimental de Presidente Médici da Embrapa Rondônia, em maio e junho de 2009. As amostras foram coletadas diretamente da ampola retal em 50 animais e acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificados, mantidos em caixa térmica sob refrigeração e encaminhados para o Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Rondônia, onde foram processadas por técnicas coprológicas para a observação dos ovos dos helmintos.

Para cada amostra foram realizados dois exames coprológicos, sendo o primeiro com a técnica de Gordon e Whitlock (1939), utilizando-se 4 gramas de fezes. O segundo exame, foi realizado com a técnica de flutuação simples utilizando-se uma alíquota da amostra, com cerca de 0,05 g, pesadas em balança eletrônica analítica (Bel Engineering A 42455GC), acondicionadas em sacos plásticos e devidamente identificadas.

Para a observação dos ovos do *T. vitulorum* em amostras com pouca quantidade de fezes foi necessário fazer uma adaptação da técnica de flutuação simples. Para este fim, foram utilizados tubo tipo Falcon de 15 mL, becker de 100 mL, solução hipersaturada de NaCl, lâmina e lamínula 18 x 18 mm (Fig. 1-9).

Adicionou-se no becker, 16 mL de solução hipersaturada de NaCl, sendo 15 mL a capacidade do tubo Falcon e mais 1 mL de volume extra. Colocou-se a solução no saco plástico contendo a amostra, e realizou-se a homogeneização da amostra. O homogeneizado foi colocado novamente no becker, e em seguida no tubo Falcon até formar o menisco nas bordas do tubo. Com cuidado a lamínula foi posicionada sobre o tubo para que esta pudesse entrar em contato com menisco, sem permitir a formação de bolhas. O sistema ficou em repouso por 10 a 20 minutos, e após este período retirou-se a lamínula levemente, colocando-a sobre a lâmina (Fig. 1-9). A pesquisa de ovos foi verificada no microscópio, com aumento de 10X, fazendo-se a leitura em movimentos de ziguezague de uma borda a outra da lamínula.

(Fotos: Fabio da Silva Barbieri)



Fig. 1–9. Técnica de Flutuação Simples Adaptada. (1. Material para pesagem de amostras; 2. Balança eletrônica analítica; 3. Amostras acondicionadas em sacos plásticos; 4. Material para o preparo da técnica; 5. Tubo Falcon com solução hipersaturada de NaCl; 6. Saco plástico com amostra e solução hipersaturada; 7. Homogeneização; 8. Tubo Falcon com o menisco; 9. Tubo Falcon com as lamínulas).

Na técnica de flutuação simples adaptada foram consideradas positivas as amostras que apresentaram pelo menos um ovo de *T. vitulorum*, e na de Gordon & Whitlock modificada foi considerada a contagem de ovos por grama (OPG).

Para interpretação dos resultados obtidos pela técnica de flutuação simples adaptada, foi obtida a matriz de erros contendo a proporção de erros falsos positivos e erros falsos negativos, em comparação com a técnica de Contagem de Ovos por Grama (Tabela 1). A partir da matriz de erros foram consideradas as seguintes estimativas para quantificação da exatidão e da taxa de erro do método proposto:

$$1- \text{Exatidão total do método alternativo: } E_{Total} = \frac{a+d}{n}$$

$$2- \text{Prevalência: } P = \frac{a+c}{n}$$

$$3- \text{Taxa de falso positivo: } F_{pos} = \frac{b}{b+d}$$

$$4- \text{Taxa de falso negativo: } F_{neg} = \frac{c}{c+a}$$

$$5- \text{Taxa de erro: } T_{erro} = \frac{(b+c)}{n}$$

$$6- \text{Odds-ratio: } OD = \frac{(a.b)}{(c.d)}$$

Para quantificar a coincidência entre as duas metodologias foi também considerado o teste de McNemar, o qual é um teste de χ^2 com ajustamento para a dependência das amostras causada pela avaliação dos dois métodos a partir de amostras provenientes de mesmo bubalino. O teste da hipótese nula (H_0) de que os dois métodos são igualmente eficientes para a detecção do parasita é realizado pela comparação da frequência de erros entre os métodos em relação a distribuição de χ^2 com um grau de liberdade, utilizando-se da correção de Yates (CALLEGARI-JAQUES, 2003).

$$\chi^2_{McNemar} = \frac{[|b-c|-0,5]^2}{b+c}$$

Tabela 1. Matriz de erro contendo os resultados de concordância e discordância entre a Contagem de Ovos por Grama e a Flutuação Simples Adaptada

Flutuação Simples Adaptada (FSA)	Contagem de Ovos por Grama (OPG)		Total
	OPG positivo	OPG negativo	
FSA positivo	a	b	a + b
FSA Negativo	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	n

a: Ocorrência de positivos verdadeiros; d: Ocorrência de negativos verdadeiros; b: Ocorrência de falso positivos; c: Ocorrência de falso negativos.
Fonte: Callegari-Jaques (2003).

Resultados

Uma das formas de se monitorar a infecção por helmintos gastrintestinais em animais de produção é através de técnicas coprológicas, principalmente aquelas em que se pode estimar a carga parasitária do animal. Em animais jovens e/ou de pequeno porte, a coleta de fezes diretamente da ampola retal torna-se dificultosa por causa da menor proporção do aparelho digestivo, a dieta à base de leite e a baixa quantidade de fezes na ampola retal, levando a um aumento no tempo de coleta, o que não necessariamente permite a remoção de quantidades de fezes adequadas. Além disso, pode haver necessidade de se repetir a coleta em diferentes horários, o que em termos práticos impossibilita a realização dos exames coprológicos de rotina.

A adaptação de técnicas comumente utilizadas para o diagnóstico de enfermidades que acometem os animais domésticos, e em alguns casos, o desenvolvimento de novos métodos faz parte da rotina do Laboratório de Sanidade Animal no atendimento de novas demandas. Contudo, além das questões práticas, como facilidade de execução e rapidez no resultado, a adoção de novos métodos de análise devem considerar a exatidão do teste e as taxas de ocorrência de erros do tipo falso positivo e falso negativo.

A coincidência observada entre os resultados obtidos das técnicas de Gordon & Whitlock modificada e de Flutuação Simples Adaptada foi de 90 % (Tabela 2), sendo encontrado 2 % de erros do tipo falso positivo e 8 % de erros do tipo falso negativo.

Tabela 2. Matriz dos erros observados entre a metodologia proposta e a metodologia tradicional de OPG para detecção de *Toxocara vitulorum*.

Flutuação simples adaptada (FSA)	Contagem de ovos por grama (OPG)		Total
	OPG positivo	OPG negativo	
FSA positivo	35	1	36
FSA Negativo	4	10	14
Total	39	11	50

Fonte: Dados de pesquisa.

Por definição, o erro do tipo falso negativo é aquele que foi positivo no método de Gordon & Whitlock e negativo no método de Flutuação Simples Adaptado. Observou-se que este tipo de erro ocorreu somente nas amostras que apresentaram OPG inferior a 200 ovos por grama, as quais, segundo Ueno e Gonçalves (1998), contagens inferiores a 200 ovos por grama são consideradas infecções leves que não justificam o tratamento.

A baixa infecção que se reflete na baixa contagem de ovos pelo método de Gordon & Whitlock também pode ocasionar o erro do tipo falso positivo, que caracteriza-se pelo resultado negativo neste método, e positivo na técnica de Flutuação Simples Adaptada, uma vez que o número reduzido de ovos também resulta na ocorrência de erros de detecção do método de Gordon & Whitlock.

Tendo em vista que a decisão para o tratamento baseia-se no resultado de amostragem aleatória dos rebanhos, o erro associado a uma única análise seja pelo método tradicional ou pela técnica de Flutuação Simples Adaptada diminui expressivamente. Ueno e Gonçalves (1998) relatam que para determinar a ocorrência de parasitas em propriedades com numerosa lotação devem ser amostrados, no mínimo, 20 a 30 animais por grupos etários no rebanho.

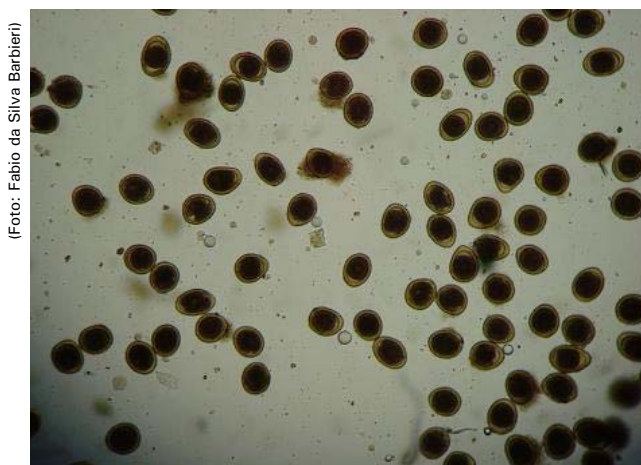
Considerando que a comparação entre os métodos depende do número de amostras avaliadas, observou-se que não houve diferença significativa entre as duas técnicas segundo o Teste McNemar (Tabela 3).

Tabela 3. Estimativas de exatidão do método, e taxa de erros do tipo “falso positivo” e “falso negativo”, e valor calculado do teste de McNemar.

Exatidão do método	0,90
Taxa de falso positivos	0,02
Taxa de falso negativos	0,08
McNemar	1,56 ^{ns}

Fonte: Dados de pesquisa.

Ressalta-se ainda, que os resultados obtidos no presente estudo foram para ovos de *T. vitulorum* (Fig. 10), por serem os helmintos mais prevalentes nestes animais e devido as amostras estarem negativas para outras helmintoses. Entretanto, a técnica proposta pode ser utilizada para o diagnóstico qualitativo de outros helmintos, visto que, os ovos de *Toxocara* são maiores e mais pesados do que os ovos de *Strongyloides*, o segundo mais prevalente em búfalos (BARBOSA et al., 1992), e dos gêneros da super família *Strongyloidea*, comuns em diferentes espécies animais.



(Foto: Fabio da Silva Barbieri)

Fig. 10. Ovos de *Toxocara vitulorum* observados pela técnica de Flutuação Simples Adaptada.

Conclusão

Estes resultados mostraram que é possível realizar o diagnóstico qualitativo de helmintoses gastrintestinais de bubalinos com baixas quantidades de fezes, visto que, em 90 % das amostras ocorreu coincidência com os resultados obtidos no OPG, e que a discordância entre as metodologias ocorreu somente nas amostras de baixa contagem de ovos por grama.

Referências

BARBOSA, M.A.; CORRÊA, F.M.A. Parasitismo natural de búfalinos em Botucatu, SP, Brasil. I. Observações sobre *Toxocara vitulorum* Goeze, 1782. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Juiz de Fora, v. 41, p. 511-525, 1989.

BARBOSA, M.A.; BLASI, A.C.; OLIVEIRA, M.R.; CORRÊA, F.M.A. Parasitismo natural de búfalinos em Botucatu, SP, Brasil – III. Dinâmica do parasitismo gastro-intestinal em vacas e suas crias. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 87, p. 37-41, 1992.

BHATIA, B.B. Parasites of river buffaloes In: TULLOH, N.M.; HOLMES, J.H.G. *Buffalo production*. Amsterdam: FAO, 1992. Cap. 15, p. 305-322.

CALLEGARI-JAQUES, S.M. **Bioestatística princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003. 255 p.

GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep feces. **J. Coun. Sci. Ind. Res. Anst.**, v.12, p.50-52, 1939.

GRIFFITHS, R. B. Parasites and parasitic diseases In: COCKRILL W, R. **The husbandry and health of domestic buffalo**. Roma: FAO, 1974. Cap. 10, p 236-275.

GUPTA, G.C.; JOSUL, B.P.; RAI, P. Some aspects of biochemical studies in calf disease ascariasis and scour. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 53, p. 438-441, 1976.

IRFAN, M. Key note address on effects of parasitism in lowering livestock production. **Pakistan Veterinay Journal**, Faisalabad, v.4, p. 25-27, 1984.

LAU, H.D. **Doenças em búfalos no Brasil: diagnóstico, epidemiologia e controle**. Belém: Embrapa-CPATU, 1999. 43p.

LEVINE, N.D. **Nematode parasites of domestic animals and of man**. Mineapolis: Burgess Publishing, 1980. Cap. 8.

ROBERTS, J.A. The egg production of *Toxocara vitulorum* in Asian buffalo (*Bubalus bubalis*) **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 37, n.1, p.113-120, 1990.

SATIJA, K.C.; GERA, K.I.; SHARMA, S.S. Ascariidiosis in Buffalo calves. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 80, n. 9, p. 868-871, 1973.

SOULSBY, E.J.L. **Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos**. 7. ed. México: Interamericana, 1987. 823p.

STARKE, W.A.; MACHADO, R.Z.; ZOCOLLER, M.C. Transmammary passage of gastrointestinal nematode larvae to buffalo calves. II. *Toxocara vitulorum* larvae. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Juiz de Fora, v. 44, p. 97-103, 1992.

UENO, H.; GUTIERREZ, V.C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4. Ed. Tokio: Japan International Cooperation Agency, 1998. 143p.

Embrapa

Rondônia

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

