

## Avaliação do kit “TF-Test” para o diagnóstico das infecções por parasitas gastrintestinais em ovinos

Giuliano LUMINA<sup>1</sup>  
 Patrícia Ana BRICARELLO<sup>1</sup>  
 Jancarlo Ferreira GOMES<sup>2</sup>  
 Alessandro Francisco  
 Talamini do AMARANTE<sup>1</sup>

1 - Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP.

2 - Centro de Pesquisa em Biotecnologia Orion, São Paulo – SP

### Correspondência para:

GIULIANO LUMINA  
 Departamento de Parasitologia  
 Instituto de Biologia  
 Universidade Estadual Paulista  
 Caixa Postal 510  
 18618-000 - Botucatu - SP  
 giulimina@hotmail.com

Recebido para publicação: 26/08/2004

Aprovado para publicação: 05/06/2005

### Resumo

Este estudo teve como objetivos padronizar o kit TF-Test para a quantificação de ovos de parasitas gastrintestinais de ovinos e compará-lo ao método de Gordon & Whitlock modificado (G&W). Vinte quatro cordeiros confinados foram infectados artificialmente com *Haemonchus contortus*, durante 12 semanas, até o abate, quando foram colhidas amostras fecais e realizada a identificação e contagem dos parasitas abomasais. Nestes animais, ovos de *H. contortus* foram detectados em 95,8% das amostras fecais por ambos os testes ( $P > 0,05$ ). Os coeficientes de correlação ( $r$ ) entre a carga parasitária (CP) e os valores de OPG obtidos pelos métodos de G&W e TF-Test foram, respectivamente, de  $r = 0,52$  e  $r = 0,51$  (dados não transformados) e  $r = 0,85$  e  $r = 0,87$  (dados transformados em log). Outras 100 amostras fecais foram colhidas de ovinos naturalmente infectados. Nas amostras destes animais, os testes G&W e TF-Test propiciaram o diagnóstico de ovos de estrongilídeos em 85% e 86% das amostras, respectivamente ( $P > 0,05$ ). Pelo TF-Test e pelo G&W, oocistos de *Eimeria* foram detectados em 33% e em 12% das amostras ( $P < 0,001$ ) e ovos de *Strongyloides* spp. em 15% e 5% das amostras, respectivamente ( $P < 0,05$ ). Ambos os testes foram precisos para o diagnóstico de estrongilídeos gastrintestinais, porém, o TF-Test foi superior para o diagnóstico de oocistos de *Eimeria* spp. e de ovos de *Strongyloides* spp., mas, por outro lado, subestimou o número de ovos de estrongilídeos presente nas amostras.

### Palavras-chave:

Diagnóstico.  
*Haemonchus contortus*.  
 OPG.  
 Ovinos.  
 TF-Test.

### Introdução

A quantificação de ovos de nematódeos nas fezes é utilizada para determinar a carga parasitária dos ruminantes, individualmente ou do rebanho<sup>1</sup>. O método modificado de Gordon & Whitlock (G&W), descrito por Ueno & Gonçalves<sup>1</sup>, é o mais utilizado. Este método tem com vantagens a simplicidade, a rapidez e o baixo custo para a realização do exame. Porém, possui como inconveniente subestimar o número de ovos presente na amostra<sup>2</sup>. Além disso, requer amostras fecais frescas refrigeradas para a realização do exame, o que é problema nos casos de propriedades distantes dos laboratórios.

O TF-Test<sup>®</sup> (Produto da Immu-

noassay Indústria e Comércio) foi desenvolvido recentemente para diagnóstico de parasitoses gastrintestinais de humanos e tem apresentado excelentes resultados quando comparado a outras técnicas<sup>3</sup>. Este trabalho teve por objetivos modificar e adaptar o TF-Test para o diagnóstico quantitativo de parasitas gastrintestinais de ovinos. Este método foi avaliado em dois experimentos e comparado com a técnica de G&W.

### Materiais e Métodos

#### Experimento 1:

24 cordeiros foram mantidos confinados desde o nascimento, livres de infecções por helmintos (12 Santa Inês e 12 Ile de France), em baias com capacidade para

seis animais. Aos três meses de idade, os animais foram infectados artificialmente três vezes por semana, com 300 larvas de *Haemonchus contortus*, ao longo de 12 semanas. O isolado de *H. contortus*, sensível à ação de anti-helmínticos<sup>4</sup>, foi gentilmente cedido pelo Dr. F. A. M. Echevarria (EMBRAPA – Bagé). Inicialmente, foram infectados dois cordeiros doadores. Desses animais, foram colhidas fezes para cultura e obtenção de novas larvas infectantes, as quais foram utilizadas para infectar os animais experimentais. Ao final do experimento, amostras fecais foram colhidas de todos os animais para a quantificação de ovos pelos métodos de G&W<sup>1</sup> e pelo TF-Test® (Imunoassay, Ind. Ltda). No mesmo dia, os animais foram abatidos para a contagem e identificação dos nematódeos presentes no abomaso<sup>1</sup>, o que permitiu estimar a carga parasitária de *H. contortus*.

#### **Experimento 2:**

Foram colhidas 100 amostras fecais de animais de diferentes raças e idades, de quatro propriedades da região de Botucatu-SP, mantidos em pastagem e infectados naturalmente por parasitas gastrintestinais. As amostras de fezes foram processadas pelos métodos de G&W e TF-Test.

#### **Determinação da carga parasitária (CP) de *H. contortus*:**

O abomaso de cada animal do experimento 1 foi removido e seu conteúdo colhido em balde graduado. Posteriormente, submetido à digestão artificial<sup>1</sup> para a recuperação de nematódeos imaturos presentes na mucosa. Alíquotas de 5% do conteúdo do abomaso e de 10% do material da digestão foram colhidas, acondicionadas em frascos plásticos e preservadas em formol (5%). Todos os helmintos presentes no material foram identificados e contados de acordo com os diferentes estágios de desenvolvimento. Na análise dos resultados foram utilizados os dados referentes à carga parasitária total que incluiu parasitas imaturos e adultos.

Contagem de ovos por grama de fezes (OPG) pelo "TF-Test":

Ao invés de três coletas em dias alternados (indicado pelo fabricante para aumentar a sensibilidade diagnóstica em humanos), foi realizada apenas uma coleta, para simplificar e viabilizar o uso do kit em animais de produção. Foi utilizado 1 g de fezes por tubo coletor (total de 3 g/kit).

O seguinte protocolo foi adotado no processamento das amostras fecais: a) triturar as fezes dos tubos com a colher coletora do kit. Fechar a tampa e homogeneizar o material; b) acrescentar uma gota de detergente neutro incolor e 3 mL de acetato de etila p.a. por tubo coletor. Fechar os tubos e homogeneizar o material; c) encaixar os tubos coletores no conjunto de filtros e centrifugar por 1 minuto a 350 g; d) desprender o conjunto trio filtro mais os tubos coletores-usuário do tubo de centrifugação; e) descartar o material sobrenadante com a utilização de um sifão, deixando o sedimento e mais a quantidade sobrenadante na graduação de 1 mL; f) transferir 10 µL do material homogeneizado para lâmina riscada para quantificação; g) adicionar a quantidade de uma gota de solução fisiológica para a leitura microscópica e cobrir o material com uma lamínula de 22x22 mm; h) contar os ovos de helmintos e oocistos de protozoários em aumento de 100x. Os ovos contidos nos 3 g de fezes foram concentrados em 1 mL de líquido, que foi homogeneizado e dele retirado 10 µL. Assim, cada ovo equivaleu a 100. O valor obtido foi dividido por 3, para obtenção de ovos por grama de fezes.

#### **Análise estatística:**

Para comparar a sensibilidade das técnicas, os dados referentes às contagens de ovos de nematódeos foram analisados pelo método Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ). Também foi realizada a análise de regressão<sup>3</sup>, com os dados não transformados e transformados em  $\log_{10}(x + 1)$ . Os dados transformados referentes às contagens de OPG foram submetidos à análise de variância (One way

analysis of variance) e as médias obtidas pelas duas técnicas foram comparadas pelo teste de Tukey. Para as análises citadas, foi utilizado o programa Minitab, versão 11. Para avaliar os resultados concordantes entre as técnicas, foi aplicado o teste de McNemar<sup>5</sup>.

## Resultados

### Experimento 1:

Todos os animais apresentaram-se infectados com *H. contortus*. A carga parasitária variou de 220 a 3620 exemplares

Tabela 1 - Correlação de Pearson (r) e análise de regressão linear entre a carga parasitária (CP) de *H. contortus* e os valores de OPG pela técnica de Gordon & Whitlock modificada (G&W) e TF-Test (TFT), em cordeiros artificialmente infectados (Experimento 1; n=24). Botucatu, 2002

Dados analisados	Log transf.*	r	Equação da regressão	Nível de significância
G&W X TFT	sim	0,975	G&W = 0,305 + 1,09TFT	P < 0,001
	não	0,968	G&W = 238 + 3,86TFT	P < 0,001
CP X G&W	sim	0,854	CP = 2,08 + 0,308G&W	P < 0,001
	não	0,516	CP = 1362 + 0,0486G&W	P = 0,01
CP X TFT	sim	0,867	CP = 2,14 + 0,350TFT	P < 0,001
	não	0,513	CP = 1363 + 0,193TFT	P = 0,01

\*Dados transformados:  $\log_{10}(x+1)$

Tabela 2 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) e análise de regressão linear entre os resultados obtidos pelos métodos de Gordon & Whitlock, modificado (G&W) e TF-Test (TFT) referentes às contagens de ovos de *Estrongilídeos*, de ovos de *Strongyloides* e de oocistos de *Eimeria* spp., em ovinos naturalmente infectados (Experimento 2; n = 100). Botucatu, SP, 2002

Parasitas	Log transf.	r	Equação da regressão	Nível de significância
Estrongilídeos	Sim	0,584	G&W = 1,15 + 0,676LTFT	P < 0,001
	Não	0,936	G&W = 344 + 2,35 TFT	P < 0,001
<i>Eimeria</i> spp.	Sim	0,084	G&W = 1,51 - 0,468LTFT	P = 0,637
	Não	0,167	G&W = 28,0 + 0,385TFT	P = 0,351
<i>Strongyloides</i> spp.	Sim	0,387	G&W = 2,06 - 0,897LTFT	P = 0,134
	Não	0,205	G&W = 86,7 - 0,505TFT	P = 0,449

\*Dados transformados:  $\log_{10}(x+1)$

Tabela 3 - Concordância entre os resultados positivos e negativos obtidos pelos métodos de Gordon & Whitlock modificado (G&W) e TF-Test para diagnóstico de endoparasitas em ovinos naturalmente infectados (Experimento 2; n = 100). Botucatu, SP, 2002

PARASITA	TF-TEST	G&W		Teste estatístico	
		Positivas	Negativas	$\chi^2$	Nível de significância
Estrongilídeos	Positivas	79	7	(B/C) 0,00	P > 0,05
	Negativas	6	8		
<i>Eimeria</i> spp.	Positivas	12	21	(B/C) 19,05	P < 0,0001
	Negativas	0	67		
<i>Strongyloides</i> spp.	Positivas	4	11	(B/C) 6,75	P < 0,01
	Negativas	1	84		

$c^2$  = Teste Qui-quadrado de concordância (McNemar)

de *H. contortus*. A contagem de ovos pelo método de G&W variou de 0 a 49500 OPG, enquanto pelo TF-Test variou de 0 a 11567 OPG. Em média os animais apresentaram 9296 OPG e 2344 OPG pelas técnicas de G&W e TF-Test, respectivamente ( $P < 0,05$ ). Quanto à sensibilidade, as técnicas TF-Test e G&W foram coincidentes, detectando ovos de *H. contortus* em 95,8% dos animais. Apenas um animal não apresentou ovos nas fezes, coincidentemente, este foi o animal que apresentou a menor carga parasitária ( $n=220$ ). Os coeficientes de correlação ( $r$ ) entre os valores de OPG pelos testes TF-Test e G&W foram semelhantes (Tabela 1), tanto com os dados transformados ( $r=0,98$ ;  $P < 0,001$ ) como com os dados não transformados ( $r=0,97$ ;  $P < 0,001$ ). O coeficiente de correlação obtido entre os valores de OPG pelo TF-Test e a Carga Parasitária (CP) foi mais elevado para os dados transformados ( $r=0,87$ ;  $P < 0,001$ ) do que para os não transformados ( $r=0,51$ ;  $P < 0,001$ ). Resultado similar foi observado entre os valores de OPG pelo G&W x CP (Tabela 1).

#### Experimento 2:

Em média, os 100 animais apresentaram 2733 OPG e 1029 OPG pelos métodos de G&W e TF-Test, respectivamente ( $P > 0,05$ ). No entanto, quando foram eliminados da análise os nove animais com OPG=0, as médias de OPG pelo G&W e TF-Test (2971 OPG e 1118 OPG, respectivamente) diferiram estatisticamente ( $P < 0,05$ ). Nos animais infectados naturalmente, foram detectados ovos de estrongilídeos em 85% e 86% das amostras analisadas pelo G&W e TF-Test, respectivamente ( $\chi^2=0,04$ ;  $P=0,841$ ).

Para *Eimeria* spp. houve diferença entre as técnicas ( $\chi^2=12,6$ ;  $P < 0,001$ ), com 33% das amostras positivas para oocistos no TF-Test e 12% no G&W. O mesmo ocorreu no diagnóstico de ovos de *Strongyloides* spp., com 15% das amostras positivas no TF-Test e 5% no G&W ( $\chi^2=5,56$ ;  $P < 0,02$ ).

Coefficientes de correlação elevados entre TF-Test e G&W ocorreram apenas nas análises realizadas entre a contagem de ovos de estrongilídeos (Tabela 2). Porém, ao contrário do que ocorreu no Experimento 1, o coeficiente de correlação com os dados transformados ( $r=0,58$ ;  $P < 0,001$ ) foi menor do que com os dados não transformados ( $r=0,94$ ;  $P < 0,001$ ). A concordância entre os resultados positivos e negativos obtidos pelo G&W e TF-Test estão apresentados na tabela 3. Os resultados obtidos entre TF-Test e G&W para o diagnóstico de estrongilídeos demonstrou que a discordância entre as técnicas não foi significativa ( $P=1,0$ ). No entanto, houve discordância significativa entre os testes em relação ao diagnóstico de oocistos de *Eimeria* spp. e os ovos de *Strongyloides* spp. Neste caso o TF-Test apresentou maior sensibilidade.

## Discussão

A avaliação qualitativa comprovou a eficiência de ambos os testes para o diagnóstico de estrongilídeos gastrintestinais. Estes resultados estão de acordo com Hoshino-Shimizu et al.<sup>3</sup> que relataram semelhança entre o TF-Test e outras técnicas utilizadas em humanos. Entretanto, estes autores observaram que o TF-Test foi significativamente superior às demais técnicas, nos casos de baixa carga parasitária (OPG < 100).

Os resultados da tabela 1 indicam uma estreita relação dos resultados obtidos com as duas técnicas com o resultado da carga parasitária ( $r=0,87$  para TF-Test X CP e  $r=0,85$  para G&W X CP). Esses resultados concordam com os de Roberts e Swan<sup>6</sup> e Amarante<sup>7</sup>, que obtiveram um alto coeficiente de correlação (0,83 e 0,91, respectivamente), quando relacionaram a técnica de G&W com a carga parasitária, confirmando a estreita associação entre o OPG e o número de exemplares de *H. contortus*. No estudo de concordância entre os resultados do Experimento 1, pôde-se observar que as duas técnicas foram 100% coincidentes para

a detecção de ovos de *H. contortus*. Assim, ficou claro que contagens de OPG podem ser utilizadas com segurança para estimar o grau da infecção de um rebanho ovino.

Pelo “TF-Test” o número de ovos de estrongilídeos foi subestimado em comparação com a técnica de G&W, mas por outro lado foi superior para o diagnóstico de oocistos de *Eimeria* spp. e ovos de *Strongyloides* spp.. Essas diferenças, entre os resultados obtidos com as duas técnicas, talvez se devam ao tamanho das estruturas pesquisadas. Os ovos de estrongilídeos são maiores e talvez tenham ficado retidos nas malhas do kit, ou talvez muitos deles não tenham sedimentado com a centrifugação empregada. Esse problema não ocorreu com os ovos de *Strongyloides* spp. e com os oocistos de *Eimeria* spp. que são bem menores<sup>1</sup>. Portanto, outros estudos serão necessários para aprimorar o TF-Test para o diagnóstico quantitativo de ovos de estrongilídeos.

Rossanigo e Gruner<sup>2</sup> demonstraram que pela técnica de G&W modificada por Raynald<sup>8</sup>, utilizando sulfato de magnésio no lugar de cloreto de sódio, apenas 16,5% dos ovos presentes nas amostras eram detectados em comparação com a técnica de extração de ovos e contagem, depois de três centrifugações. Esses autores perceberam a necessidade da centrifugação das amostras para detecção mais acurada dos ovos dos parasitas; entretanto, mesmo após esta falha ter sido detectada, a técnica de G&W continuou sendo a mais utilizada, por ser de execução mais fácil e mais rápida que o método ao qual foi comparada. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que esse problema é ainda mais acentuado na técnica TF-Test.

A avaliação do TF-Test poderia ter sido mais satisfatória se o método de enriquecimento parasitário (três coletas em dias alternados), como indica o fabricante, fosse utilizado nesse estudo; pois é sabido que apenas uma coleta de fezes não é suficiente para a detecção dos parasitas no caso de infecções leves<sup>9</sup>. As três coletas em dias alternados constituem uma opção para minimizar as variações do número de ovos nas fezes<sup>9,10</sup>. Segundo Ward, Lyndal-Murphy e Baldock et al.<sup>10</sup>, a contagem de ovos por grama

de fezes também pode ser influenciada pela produção fecal, idade e espécie do parasita, variação biológica na fecundidade dos helmintos, estado imune do hospedeiro, além dos fatores sazonais. Em animais de produção, a prática de uma coleta de fezes é a maneira mais simples para a realização de um exame parasitológico e como o objetivo principal desse trabalho foi adaptar o TF-Test para utilização rotineira em ovinos, optou-se por apenas uma coleta.

O método G&W é realizado com amostras fecais refrigeradas<sup>11</sup>. Isto constitui um fator limitante para as propriedades distantes dos laboratórios e que necessitam desse exame rotineiramente. Essa limitação, entretanto, não ocorre com o uso do TF-Test que apresenta uma solução neutra de formalina a 10%; a solução mais empregada na conservação de materiais biológicos.

Deve-se lembrar que o emprego do TF-Test no diagnóstico de parasitas gastrintestinais de ovinos exige um laboratório com centrífuga e outros suprimentos básicos que a técnica requer, além da aquisição dos kits pelos produtores. Em condições de campo, há necessidade ainda de se avaliar o custo/benefício da utilização desta técnica.

Como conclusão, foi possível adaptar e utilizar o TF-Test para o diagnóstico dos parasitas gastrintestinais de ovinos. Para o diagnóstico de estrongilídeos, o TF-Test foi qualitativamente semelhante ao G&W, mas quantitativamente, o TF-Test subestimou o número de ovos nas amostras. Entretanto, para detecção de oocistos de *Eimeria* spp. e ovos de *Strongyloides* spp., o TF-Test foi superior. O TF-Test pode ser indicado para amostras fecais colhidas em localidades distantes dos laboratórios onde serão realizados os testes, pois as mantêm preservadas por longo período.

## Agradecimentos

Aos técnicos Maria Ângela B. Gomes e Valdir A. Paniguel e a pós-graduanda Raquel A. da Rocha pelo auxílio nas atividades de campo e laboratório. O primeiro autor foi bolsista da CAPES.

## The evaluation of "TF-Test" kit for diagnosis of gastrointestinal parasite infections in sheep

### Abstract

This study was performed to standardize parasite egg counting in feces of sheep by TF-Test, in addition to compare this test to the Gordon & Whitlock technique (G&W). Twenty-four lambs were artificially infected with *Haemonchus contortus* throughout 12 weeks. At the end of this time, faecal samples were taken and animals were slaughtered for worm identification and counting. G&W and TF-Test methods were carried out on each fecal sample. Both tests showed *Haemonchus* eggs in 95.8% of the samples ( $P>0.05$ ). The correlation coefficients ( $r$ ) between fecal egg counts (FEC) using G&W x Total Worm Count (TWC) were  $r=0.52$  (not transformed data) and  $r=0.85$  (transformed data); between FEC by TF-Test x TWC were  $r=0.51$  (not transformed data) and  $r=0.87$  (transformed data). Other 100 fecal samples were taken from naturally infected sheep. In these animals, the G&W and TF-Test methods showed 85% and 86% of fecal samples positive for Strongylidae eggs, respectively ( $P>0.05$ ). Also in those animals, *Eimeria* oocysts were found in 33% of fecal samples by TF-Test, whereas in the G&W only 12% were positive ( $P<0.001$ ). For *Strongyloides* spp., TF-Test showed 15% of positive fecal samples, whereas G&W showed 5% ( $P<0.05$ ). In conclusion, both methods were efficient to diagnose gastrointestinal nematodes and TF-Test was superior to diagnose oocysts of *Eimeria* spp. and eggs of *Strongyloides* spp; conversely, Strongylidae eggs counting using TF-Test was underestimated.

### Key words:

Diagnostic.  
FEC.  
*Haemonchus contortus*  
Sheep.  
TF-Test.

### Referências

- 1 UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4. ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1998. 143 p.
- 2 ROSSANIGO, C. E.; GRUNER, L. Accuracy of two methods for counting eggs of sheep nematode parasites. **Vet. Parasitol.**, v. 39, p. 115-121, 1991.
- 3 HOSHINO-SHIMIZU, S.; GOMES, J.F.; DIAS, L.C.S. Parasitos intestinais: técnicas tradicionais e conjuntos comerciais. **J. Bras. Patol.**, v. 37, p. 21, 2001. Suplemento.
- 4 ECHEVARRIA, F. A. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L. Efficacy of some anthelmintics on an ivermectin-resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. **Vet. Parasitol.**, v. 39, p. 279-284, 1991.
- 5 CURI, P. R. **Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas**. Botucatu: Gráfica e Editora Tipomic, 1997. 263 p.
- 6 ROBERTS, J. L.; SWAN, R. A. Quantitative studies of ovine haemonchosis. I. Relationship between faecal egg counts and total worm counts. **Vet. Parasitol.**, v. 8, p.165-171, 1981.
- 7 AMARANTE, A. F. T. Relationship between faecal egg counts and total worm counts in sheep infected with gastrointestinal nematodes. **Brazil. J. Vet. Parasitol.**, v. 9, n. 1, p. 45-50, 2000.
- 8 RAYNALD, J. P. Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le contrôle des infestations parasitaires des bovins, ovins, équins et porcins. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, v. 45, p. 321-342, 1970.
- 9 ARAÚJO, A. J. U. S.; KANAMURA, H. Y.; DIAS, L. C. S.; GOMES, J. F.; ARAÚJO, S. M. Coprotest Quantitativo: Quantificação de ovos de helmintos em amostras fecais utilizando sistema de diagnóstico comercial. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, n. 2, p. 115-124, 2003.
- 10 WARD, M. P.; Lyndal Murphy, M.; Baldock, Evaluation of a composite method for counting helminth eggs in cattle faeces. **Vet. Parasitol.**, v.73, p.181-187, 1997.
- 11 URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitol. Vet.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. 306 p.