

VALIDAÇÃO DE UMA MODIFICAÇÃO DA TÉCNICA DE CENTRÍFUGO-FLUTUAÇÃO (BEROZA et al., 1986) PARA O DIAGNÓSTICO DE CESTÓIDES EM EQUÍDEOS

ISABELLA V.F. MARTINS¹; GUILHERME G. VEROCAI²; RAQUEL M.P.S. MELO³; ISABEL F. FREITAS⁴; THAIS R. CORREIA⁵; MARIA JULIA S. PEREIRA⁶; FÁBIO B. SCOTT⁶

ABSTRACT.- MARTINS, I.V.F.; VEROCAI, G.G.; MELO R.M.P.S.; FREITAS, I.F.; CORREIA, T.R.; PEREIRA, M.J.S.; SCOTT, F.B. [Validation of a centrifugal floatation technique modification (Beroza et al., 1986) for tapeworms diagnosis in equines.] Validação de uma modificação da técnica de centrífugo-flutuação (Beroza et al., 1986) para o diagnóstico de cestóides em eqüídeos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 12, n. 3, p. 99-102, 2003. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 7 da BR 465, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail: isabella@ufrj.br

The purposes of this study were to suggest a modification of Beroza's et al. (1986) technique and test its validity and reproductibility in the diagnosis of equine cestodiasis. Feces samples of 82 equines were used and 33 (40.1%) were positive for the modified technique and 28 (34.1%) for Beroza's technique. The validity was tested by the sensibility (96%) and specificity (88%). The reproductibility, calculated by the Kappa agreement was 0.80 and the Chi-square showed differences between the tests ($p < 0.001$).

KEY WORDS: Tapeworms, diagnosis, equine, validity and reproductibility.

RESUMO

Os objetivos do presente trabalho foram propor uma modificação para a técnica de Beroza et al. (1986) e testar sua validade e reprodutibilidade no diagnóstico de cestóides de eqüídeos. Foram usadas amostras de fezes de 82 animais, das quais 33 (40,1%) foram positivas para a técnica modificada e 28 (34,1%) pela técnica padrão. A validade foi avaliada através do cálculo da sensibilidade e especificidade, que foram respectivamente de 96% e 88%, e a reprodutibilidade pelo indicador de concordância de Kappa que foi de 0,80. A constatação da associação entre as técnicas e os resultados dos exames foi realizada através da aplicação do teste qui-quadrado, obtendo-se diferenças significativas ($p < 0,001$).

PALAVRAS-CHAVE: Cestóides, diagnóstico, eqüídeos, validade e reprodutibilidade.

INTRODUÇÃO

A infecção por cestóides em eqüídeos começou a ser reconhecida importante na última década, quando houve um aumento no número de quadros clínicos causados principalmente por *Anoplocephala perfoliata* (BARONI; SIEVERS, 1997). Alguns estudos, realizados na Austrália, têm demonstrado que altas infecções por cestóides em eqüídeos levam a sérios riscos de doença clínica como consequência dos danos causados à mucosa intestinal (WILLIAMSON et al., 1998b).

No Brasil, as três espécies de cestóides de eqüídeos já foram relatadas (COSTA et al., 1986). No Estado do Rio de Janeiro, a presença destes cestóides foi registrada em 16,9% e 80% dos animais necropsiados por Dacorso Filho et al. (1961) e Martins et al. (2002), respectivamente. Estes resultados demonstram que o problema é persistente em nosso meio e precisa ser melhor investigado. Para tanto, torna-se cada vez mais necessária a implementação de técnicas de diagnóstico mais sensíveis.

¹Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 7 da BR 465, Seropédica, RJ 23890-000 e bolsista da CAPES. E-mail:isabella@ufrj.br

²Curso de Graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ e bolsista da FAPERJ.

³Curso de Graduação em Zootecnia da UFRRJ e bolsista do PIBIC/CNPq.

⁴Curso de Graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ e bolsista do PIBIC/CNPq.

⁵CPGCV/UFRRJ e bolsista da CNPq.

⁶UFRRJ/ IV/ Departamento de Parasitologia Animal.

A falta de técnicas de diagnóstico de alta sensibilidade tem sido o maior obstáculo para o estudo da epidemiologia de cestóides em eqüídeos (PROUDMAN; EDWARDS, 1992). O comportamento da eliminação das proglotes que saem nas fezes dos animais interfere nos resultados das técnicas de diagnóstico pois até o momento se desconhece se essa eliminação é contínua, intermitente ou ainda se há variações estacionais (BARONI; SIEVERS, 1997). A técnica de centrifugo-flutuação é mais acurada do que a de flutuação simples, pois se consegue sensibilidade e especificidade superiores (PROUDMAN; EDWARDS, 1992) e isto a torna um teste de maior validade.

A validade de um teste de diagnóstico refere-se à sua capacidade de refletir a realidade e a confiabilidade à consistência ou concordância dos resultados quando a mensuração ou exame é repetido (PEREIRA, 2000). A validade de um teste pode ser obtida pela comparação de seus resultados com os de um padrão apropriado, embora a necropsia possa ser considerada como um teste confirmatório definitivo (SMITH, 1994).

Os objetivos do presente trabalho foram propor uma modificação para a técnica de Beroza et al. (1986) e testar sua validade e reprodutibilidade no diagnóstico de cestóides em eqüídeos.

MATERIAL E MÉTODOS

Oitenta e duas amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de eqüídeos provenientes do curral de apreensão e do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Foram utilizadas duas técnicas para cada amostra: a técnica de centrifugo-flutuação descrita por Beroza et al. (1986), considerada padrão, e uma modificação desta técnica utilizando um processo de sedimentação inicial.

Na técnica modificada, 30 g de fezes foram pesadas e misturadas vigorosamente com 200 ml de água. A mistura resultante foi passada numa peneira de malha de metal com 0,59mm e 20cm de diâmetro, tomando-se o cuidado de espalhar a mistura por toda extensão da peneira facilitando a passagem dos ovos. O líquido recolhido foi colocado num cálice de Hoffman e aguardou-se 2h para que o processo de sedimentação ocorresse. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi colocado em um tubo cônico de 12 ml e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em solução saturada de açúcar de densidade 1,28g/ml e centrifugado novamente a 3000 rpm por 10 minutos. Acrescentou-se solução saturada até a formação do menisco que foi recoberto por uma lamínula. Após 2h a lamínula foi removida e colocada sobre uma lâmina para visualização dos ovos ao microscópio.

A diferença entre a técnica de Beroza et al. (1986) e a modificada consiste na utilização de um maior volume de água para a homogeneização das fezes e um tamiz com diâmetro maior, além da inclusão do processo de sedimentação, ausente na técnica padrão.

Os indicadores de sensibilidade e especificidade foram calculados para estimar a validade do teste, e o indicador Kappa para reprodutibilidade (PEREIRA, 2000). O teste χ^2 foi utilizado para verificar a associação entre as técnicas e os resultados dos exames (SAMPALIO, 2002).

Tabela 1. Resultados dos exames de fezes segundo a técnica de Beroza et al. (1986) e a técnica modificada para o diagnóstico de cestóides em eqüídeos.

Técnica modificada	Técnica de Beroza et al. (1986)		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	27	6	33
Negativo	1	48	49
Total	28	54	82

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 82 amostras de fezes de eqüídeos analisadas, 34 (41,4%) foram positivas para pelo menos uma das técnicas, sendo 33 (40,1%) positivos pela técnica modificada e 28 (34,1%) positivos pela técnica de Beroza et al. (1986). Seis animais foram positivos exclusivamente através da técnica modificada, enquanto somente 1 animal foi positivo apenas usando a técnica de Beroza et al. (1986) (Tabela 1).

A sensibilidade da técnica modificada foi de 96% e a especificidade de 88%. O coeficiente Kappa foi 0,80, demonstrando uma boa concordância entre os testes, segundo Pereira (2000). A comparação das técnicas pelo teste qui-quadrado revelou que há diferença significativa na detecção de animais positivos ($p < 0,001$).

Lyons et al. (1983) necropsiaram 353 eqüinos no Kentucky, EUA, e dos 191 positivos para cestóides, apenas 11 foram positivos ao exame de fezes através de uma técnica de flutuação usando solução saturada de sal. Em outros estudos Lyons et al. (1984) encontraram apenas 7% de animais positivos em 380 eqüinos submetidos ao exame de flutuação utilizando sulfato de zinco. Beroza et al. (1986) testaram os exames de flutuação e centrifugo-flutuação e afirmaram que este último é 10 vezes mais sensível tendo demonstrado sensibilidade de 50%. Proudman e Edwards (1992) descreveram uma versão modificada das técnicas de centrifugo-flutuação de Beroza et al. (1986) e de Carmel (1988) obtendo sensibilidade de 61%. Williamson et al. (1998a), na Austrália, compararam 3 técnicas de diagnóstico, sendo uma de sedimentação e duas de flutuação, encontrando sensibilidade de 22,5%, 25% e 37,5% respectivamente. Meana et al. (1998) também

avaliaram 3 técnicas para o diagnóstico de *A. perfoliata* encontrando sensibilidade de 8% para a técnica MacMaster, 42% para a técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco, baseada em Proudman e Edwards (1992) e Nillson et al. (1995), e 38% para técnica de centrífugo-flutuação com solução saturada de açúcar.

No Brasil, poucos estudos vêm sendo conduzidos sobre o diagnóstico de cestóides de eqüídeos. Sangioni et al. (2000) avaliaram 310 amostras de fezes de eqüinos abatidos no matadouro de Apucarana no Paraná, encontrando 66 animais comprovadamente positivos durante a necrópsia, apenas 15 foram positivos (22,7%) pelo exame de fezes através da técnica de centrífugo-flutuação de Proudman e Edwards (1992), cuja sensibilidade foi de 23%.

Todos os estudos demonstraram baixa sensibilidade das técnicas de diagnóstico coprológico, porém a sensibilidade aumenta quando se utilizam grandes quantidades de fezes (30 ou 40g) ou quando se realiza a concentração dos ovos com o uso da sedimentação. Algumas hipóteses são levantadas na tentativa de justificar a baixa sensibilidade das técnicas, como a limitação de encontrar ovos em fezes de eqüídeos com baixa intensidade de infecção (menos de 100 cestóides) ou ainda a esporádica saída das proglotes grávidas nas fezes com desigual distribuição dos ovos dos cestóides.

A motivação para realização do presente estudo não foi somente uma tentativa de aumentar a sensibilidade da técnica de Beroza et al. (1986), mas também torná-la mais fácil quanto a sua operacionalização. A técnica original gera quatro lâminas de cada amostra a ser examinada. Na técnica proposta, tem-se ao final do processo apenas uma lâmina para ser efetuado o diagnóstico. Este fato ocorre em função da sedimentação inicial efetuada no início da técnica modificada. A maior sensibilidade observada na técnica modificada poderá ter sido em função da utilização de um volume maior de água no início do processo (200ml x 60ml), promovendo uma melhor homogeneização das fezes e conseqüentemente um carregamento maior de ovos para o líquido a ser examinado. A posterior sedimentação concentrou estes ovos em um volume menor de líquido o que possibilitou um diagnóstico mais acurado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARONI, E.; SIEVERS, G. Cestodosis del equino y las posibilidades de su control. *Parasitologia al dia*, v. 21, n. 3-4, p. 40-47, 1997.
- BEROZA, G.A.; MARCUS, L.C.; WILLIAMS, R.; BAUER, S.M. Laboratory diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection in horses. In: CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 32, 1986, Nashville. *Proceedings...* Nashville: The American Association of Equine Practitioners, 1986. p. 435-439.
- CARMEL, D.K. Tapeworm infection in horses. *Equine Practice*, v. 8, n. 1, p. 343, 1988.
- COSTA, H.M.A.; GUIMARÃES, M.P.; LEITE, A.C.R.; LIMA, W. S. Distribuição de helmintos parasitos de animais domésticos no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 38, n. 4, p. 465-579, 1986.
- DACORSO FILHO, P.; LANGENEGGER, J.; GUIMARÃES, J.H. Ocorrência de cestódios em eqüídeos necropsiados na Escola Nacional de Veterinária. *Arquivos do Instituto de Biologia Animal*, v. 4, p. 65-76, 1961.
- LYONS, E.T.; DRUDGE, J.H.; TOLLIVER, S.C.; SWERCZEK, T.W.; CROWE, M.W. Prevalence of *Anoplocephala perfoliata* and lesions of *Draschia megastoma* in Thoroughbreds in Kentucky at necropsy. *American Journal of Veterinary Research*, v. 45, n. 5, p. 996-999, 1984.
- LYONS, E.T.; TOLLIVER, S.C.; DRUDGE, J.H.; SWERCZEK, T.W.; CROWE, M.W. Parasites in Kentucky Thoroughbreds at necropsy: Emphasis on stomach worms and tapeworms. *American Journal of Veterinary Research*, v. 44, n. 5, p. 839-884, 1983.
- MARTINS, I.V.F.; SANT'ANNA, F.B.; CORREIA, T.R.; SOUZA, C.P.; SCOTT, F.B. Prevalência de cestóides em eqüídeos do estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v. 9, n. 3, p. 172-174, 2002.
- MEANA, A.; LUZON, M.; CORCHERO, J.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. Reliability of coprological diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection. *Veterinary Parasitology*, v. 74, n. 1, p. 79-83, 1998.
- NILLSON, O.; LJUNGSTROM, B.L.; HOGLUN, J.; LUNDQUIST, H.; UGGLA, A. *Anoplocephala perfoliata* in horses in Sweden: prevalence, infection levels and intestinal lesions. *Acta Veterinaria Scandinavia*, v. 36, n. 3, p. 319-328, 1995.
- PEREIRA, M.G. *Epidemiologia Teoria e prática*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 596 p.
- PROUDMAN, C.J.; EDWARDS, G.B. Validation of a centrifugal / flotation technique for the diagnosis of equine cestodiasis. *Veterinary Record*, v. 131, n. 4, p. 71-72, 1992.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265 p.
- SANGIONI, L.A.; VIDOTTO, O.; PEREIRA, B.L.; BONEZI, G.L. Study of the prevalence and characteristics of anatomo-histopatological lesions associated with *Anoplocephala perfoliata* (Goeze, 1782) in abated equines from a refrigerated slaughter house in Apucarana - PR. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 9, n. 2, p. 129-133, 2000.
- SMITH, R.D. *Veterinary Clinical Epidemiology*. Boca Raton: CRC Press, 1994. 234 p.

WILLIAMSON, R.M.C.; BEVERIDGE, I.; GASSER, R.B.
Coprological methods for the diagnosis of *Anoplocephala*
perfoliata infection of the horse. *Australian Veterinary*
Journal, v. 76, n. 9, p. 618-621, 1998a.

WILLIAMSON, R.M.C.; GASSER, R.B.; MIDDLETON, D.;
BEVERIDGE, I. The distribution of *Anoplocephala perfoliata*
in the intestine of the horse and associated pathological chan-
ges. *Veterinary Parasitology*, v. 73, n. 3-4, p. 225-241, 1998b.

Recebido em 03 de setembro de 2003.

Aceito para publicação em 31 de outubro de 2003.