

AVALIAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE *Fasciola hepatica* – RESULTADOS PRELIMINARES

Modalidade: () Ensino (X) Pesquisa () Extensão

Nível: () Médio (X) Superior () Pós-graduação

Área: () Química () Informática (X) Ciências Agrárias () Educação () Multidisciplinar

Autores: Franciele P. PISETTA^{1*}; Alberto G. EVANGELISTA¹; Isabelle C. THOMSEN¹; Juliano S. GUERETZ²; Viviane MILCZEWSKI²; Antônio P. de SOUZA³.

Identificação autores: ¹Acadêmicos de Medicina Veterinária, IFC-Araquari; ²Docentes IFC - Araquari; ³Professor Orientador, *Bolsista IFC - Araquari/CNPq.

Introdução

A fasciolose é uma doença parasitária com potencial zoonótico, causada pelo trematódeo *Fasciola hepatica*. Esse parasito possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrado no fígado e ductos biliares de animais de sangue quente (OLIVEIRA, 2009). Dentre todos os animais possivelmente afetados, destacam-se os bovinos. Na bovinocultura, gera prejuízos econômicos pela rejeição do fígado nos abatedouros, na redução da produção e da qualidade do leite, redução do ganho de peso e atraso no crescimento, além das despesas referentes aos custos do tratamento da doença primária e de infecções secundárias decorrentes da fasciolose (ABIDU et al, 1996; COSTA, 2010).

Ovos produzidos pelo parasito nos ductos biliares acumulam-se na vesícula biliar e, através do ducto colédoco, chegam até os intestinos delgado e grosso. Então, estes são eliminados ao ambiente, juntamente com as fezes (ECHEVARRIA, 2004). A fasciolose crônica pode ser diagnosticada pela presença de ovos nas fezes, utilizando-se para isto técnicas baseadas no princípio de sedimentação ou no de tamisagem progressiva. Esta última consiste na utilização de quatro peneiras de diferentes aberturas que permitem a retenção progressiva da maior parte das fibras presentes no material fecal, deixando na última um sedimento com os ovos da *F. hepatica* (GIRÃO e UENO, 1985). Hoffmann (1987) e Foreyt (2005) descreveram métodos para identificação de ovos de *F. hepatica* e outros cestódeos tais como técnica de sedimentação fecal e método de sedimentação simples para cestódeos e trematódeos.

DORCHIES (2007) comparou cinco métodos de identificação de infecção por *F. hepatica*: técnicas de flutuação, sedimentação, peneiramento de ovos em fezes, ELISA para anticorpos do sangue e inspeção de rotina foram feitos em 1331 bovinos em dois matadouros, onde a prevalência global foi de 18,2%. A sensibilidade foi de 69% com uma contagem de EPG, 86,1% com dois e 91,9% com três contagens. Na técnica de ELISA obteve-se 91,7% de sensibilidade e apenas 63,2 % para inspeção de rotina de fígado em um matadouro.

A fasciolose é uma doença de grande importância para a produção de bovinos em várias regiões do país, em especial em áreas litorâneas como a região de Araquari/SC. Devido às dificuldades encontradas nas técnicas disponíveis em relação à quantificação dos ovos de *F. hepatica*, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia e acurácia de uma técnica que utiliza métodos de filtração e sedimentação associados para os diagnósticos qualitativos e quantitativos da presença de ovos de *F. hepatica* em fezes bovinas.

Material e Métodos

O estudo foi realizado no Instituto Federal Catarinense, *Campus Araquari* - SC. As amostras de fezes foram colhidas do rebanho da Unidade de Ensino e Aprendizagem (UEA) Bovinocultura da instituição, diretamente do reto dos animais, que foram escolhidos sob o critério de serem livres de *F. hepatica*. As amostras foram levadas ao Laboratório de Ensino e Diagnóstico Veterinário, divisão de Parasitologia, onde foram avaliadas para se confirmar a ausência de infecção natural de *F. hepatica* nesses animais.

Para a averiguação da eficácia e acurácia da metodologia proposta, amostras de fezes bovinas foram contaminadas com um número conhecido de ovos do parasito, de forma que pudesse ser comparada à quantidade de ovos recuperados após sua realização. Os ovos de *F. hepatica* foram obtidos em abatedouro através da bile de animais naturalmente infectados, transportados sob-refrigeração e concentrados por sedimentações sucessivas em água até a completa eliminação da bile. Após foram acondicionados e conservados em formol a 5%.

Foram constituídos três grupos amostrais utilizando-se quantidade de fezes diferentes, sendo: i) grupo 1 com 2 g de fezes; ii) grupo 2 com 5 g de fezes e iii) grupo 3 com 10 g de fezes. Cada um desses grupos foi contaminado com três quantidades de ovos, sendo 20, 10 e 5 ovos/g, totalizando nove subgrupos. Foram realizadas 10 repetições por subgrupo, resultando em um total de 90 amostras.

As amostras padronizadas de acordo com a quantidade de ovos foram diluídas em 600 mL de água e filtradas em peneira plástica, com o intuito de reter as maiores fibras. O líquido resultante foi filtrado em três tamises com as malhas de 300 µm (1º tamis), 160 µm (2º tamis) e 70 µm (3º tamis) dispostos consecutivamente. A lavagem dos tamises foi realizada com aproximadamente 600 mL de água. Após a lavagem o último tamis foi invertido e lavado com 100 mL de água. O líquido obtido foi depositado em cálice de sedimentação por 30 minutos. O sedimento resultante foi transferido para placas de Petri contendo linhas para

leitura, corado com azul de metileno e analisado no microscópio estereoscópico no aumento de 50x. Depois de identificados, os ovos foram quantificados em cada amostra avaliada.

Com o objetivo de se avaliar a possibilidade de passagem ou retenção dos ovos nos tamises, foram mensurados pelo Microscópio *Olympus* com uso do programa *Image Analysis Software®*, 200 ovos do parasito (largura e comprimento) obtidos a partir de vesículas biliares bovinas em abatedouro. Os resultados foram submetidos à análise de variância e ao teste t de *student* considerando um nível de significância 1%. A estatística foi realizada comparando os grupos 2g, 5g e 10g de fezes com 5 ovos/g, 10 ovos/g e 20 ovos/g. Utilizou-se a ANOVA com nível de significância de 1%. Os grupos que apresentaram diferença significativa foram submetidos ao teste t de *student* com nível de significância de 1%.

Resultados e discussão

Foram analisadas 90 amostras de fezes contaminadas com número conhecido de ovos. Observou-se que a porcentagem média de ovos recuperados nas amostras com 2, 5 e 10 gramas de fezes, independente da quantidade de ovos/g, foi de 21,44%; 20,57% e 14,78% respectivamente, não havendo diferença significativa ($p > 0,01$). Com relação à quantidade de ovos presentes na amostra, verificou-se que o grupo contendo 10 ovos/g de fezes apresentou maior taxa de recuperação (26,95%) ($p < 0,01$) em relação aos grupos contendo 5 ovos/g (14,90%) e 20 ovos/g (14,73%). A porcentagem de recuperação de ovos após a realização da técnica contendo quantidade de fezes e de ovos diferentes está demonstrada na tabela 1.

Com a metodologia proposta foi possível recuperar no máximo 35,49% dos ovos totais contidos na amostra (2g de fezes com 10 ovos/g) e apenas 4,79% quando se utilizou 5 ovos/g em 10 g de fezes (Tabela 1). O desempenho na acurácia da técnica foi abaixo do esperado. O fato de o método ter sido realizado por três pesquisadores diferentes pode ter influenciado nesse resultado. Parte dos ovos não recuperados pode ter ficado retida nas duas primeiras malhas dos tamises, provavelmente devido à quantidade de fibras obstruindo os orifícios das malhas. Outra pequena parte dos ovos pode ter ficado aderida ao cálice de sedimentação ou à pipeta Pasteur utilizada para transferir o sedimento para a placa de Petri. Um fator a ser ponderado também é a quantidade e pressão da água exercida sobre os tamises durante o processo, porque ao se utilizar pouca pressão ou quantidade de água, haveria maior retenção de ovos nos primeiros tamises, porém, o excesso de água ou pressão faria um maior número de ovos atravessarem o último tamis, sendo então eliminados.

Tabela 1. Porcentagem de ovos de *F. hepatica* recuperados em relação à quantidade de fezes utilizadas e grau de contaminação, após realização de metodologia qualitativa experimental.

N de ovos/g fezes	Média de recuperação de ovos (%)			Média total (%)
	2 g de fezes	5 g de fezes	10 g de fezes	
5	15,80 ^a	23,42 ^a	4,79 ^a	14,90 ^a
10	35,49 ^b	21,64 ^a	23,72 ^b	26,95 ^b
20	13,75 ^a	16,22 ^a	15,84 ^c	14,73 ^a
Média total (%)	21,44 ^A	20,57 ^A	14,78 ^A	

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,01$).

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,01$).

Com relação à possível passagem de ovos no último tamis, verificou-se que a média do comprimento e da largura dos ovos mensurados foi de 129,5 e 76,3 μm . O menor comprimento e largura encontrados foram 92,6 e 57 μm . Sendo que 22,5% dos ovos de *F. hepatica* mensurados apresentaram largura inferior aos 70 μm de diâmetro malha do último tamis, portanto poderiam ser eliminados dependendo do seu ângulo de inserção nos espaços da malha. Parfitt e Banks (1970) observaram uma perda de ovos estimada em 31,6% durante os estágios de técnica semelhante.

No que diz respeito à avaliação qualitativa da metodologia proposta verificou-se que apenas em uma amostra (0,37%) não foi possível visualizar ovos (dados não apresentados), o que demonstra uma boa eficácia do método em detectar a presença de ovos em amostras positivas.

Conclusão

O percentual de recuperação de ovos utilizando a técnica proposta foi inferior a 36%. De uma maneira geral, na medida em que se aumentou a quantidade de fezes utilizada para a realização da técnica, diminuiu a eficiência na recuperação de ovos de *F. hepatica*. O método proposto apresentou boa eficácia como avaliação qualitativa de ovos do parasito.

É necessário dar continuidade à pesquisa para a confirmação dos resultados.

Agradecimentos

Ao CNPq, fornecedor da bolsa de pesquisa e fomento. Ao IFC, por dispor a estrutura física necessária para a realização do trabalho.

Referências

ABIDU, M.; SCHERER, P. O.; CARNEIRO, V. S.; BARBOSA, P. S.; LESSA, C. S. S.; FREIRE, N. M. S. Estudo comparativo entre técnicas coproparasitológicas para diagnóstico de *Fasciola hepatica* em bovinos. Revista Brasileira de Ciência Veterinária. v. 3, n. 1, p. 1-3, 1996.

COSTA, A. M. C. B. *Fasciolose Bovina: Aspectos clínicos e epidemiológicos no Alentejo*. 2010.91p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 2010.

DORCHIES, P. Comparison of methods for the veterinary diagnosis of liver flukes (*Fasciola hepatica*) in cattle. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine, v. 64, n. 1-2, 2007.

ECHEVARRIA, F.A.M. Fasciolose. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.13, n.1, p.100-102, 2004.

FOREYT, W. J. 2005. Parasitologia veterinária: manual de referência. São Paulo: Roca, p. 4.

GIRÃO, E. S.; UENO, H. Técnica de quatro tamises para o diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose dos ruminantes. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 20, n. 8, p. 905-912, 1985.

HOFFMANN, R. P. Diagnóstico de parasitismo veterinário. Porto Alegre: Sulina, 1987, p. 39-42.

OLIVEIRA, S. M.; SPÓSITO, E. F. Fasciolose Hepática. Divulgação Técnica. v. 71, n. 1, p. 5-7, 2009.

PARFITT, J. W.; BANKS, A. W. A method for counting *Fasciola* eggs in cattle faeces in the field. Veterinary Record, v. 87, n. 7, 1970.