



Serviço Público Federal
Ministério da Educação



Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

AMOSTRAS FECAIS COMPOSTAS:
FERRAMENTA PARA MONITORAMENTO DE
INFECÇÃO POR NEMATODAS
GASTRINTESTINAIS E DE RESISTÊNCIA ANTI-
HELMÍNTICA EM REBANHO BOVINO

Mário Henrique Conde

CAMPO GRANDE, MS
2019



Lombada

| | | |
|------|---|-------|
| 2019 | AMOSTRAS FECAIS COMPOSTAS: FERRAMENTA PARA MONITORAMENTO DE INFEÇÃO POR NEMATODAS GASTRINTESTINAIS E DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM REBANHO BOVINO | CONDE |
|------|---|-------|

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO
SUL PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA ANIMAL CURSO DE
MESTRADO/DOCTORADO**

**AMOSTRAS FECAIS COMPOSTAS: FERRAMENTA PARA
MONITORAMENTO DE INFECÇÃO POR NEMATODAS
GASTRINTESTINAIS E DE RESISTÊNCIA ANTI-
HELMÍNTICA EM REBANHO BOVINO**

Composite fecal samples: Tool for monitoring of infection by
gastrointestinal nematodes and anthelmintic resistance in herd cattle

Mário Henrique Conde

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Almeida Borges

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato
grosso do Sul, como requisito à
obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal.

CAMPO GRANDE, MS

2019

Certificado de aprovação

MÁRIO HENRIQUE CONDE

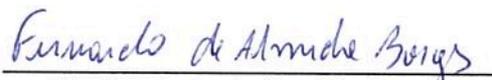
Amostras fecais compostas: ferramenta para monitoramento de infecção por nematodas
gastrintestinais e de resistência anti-helmíntica em rebanho bovino

Composite fecal samples: a tool for monitoring gastrointestinal nematodes infection and
anthelmintic resistance in bovine herds

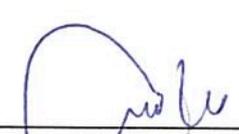
Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.

Aprovado(a) em: 27-02-2019

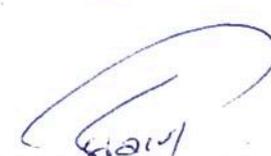
BANCA EXAMINADORA:



Dr. Fernando de Almeida Borges
Orientador (UFMS)



Dr. João Batista Catto
(EMBRAPA)



Dr. Fernando Paiva
(UFMS)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus pelo dom da vida, pela minha saúde e por todas as bênçãos derramadas a mim, durante a minha vida e minha formação profissional.

Não menos importante, aos meus pais, Mario Nelson Conde e Ivana Montagner Conde, primeiramente pelo amor, pelo carinho, pela atenção e principalmente pela educação, demonstrando valores e caráter, mas também por poder me mostrar, de maneira direta e indireta, a importância do estudo, sempre batalhando arduamente para fornecer, e nunca deixar faltar, um estudo de qualidade. Agradeço à minha família, pai, mãe e irmã, e à minha namorada, Evelyn Simões, pelo apoio, compreensão, paciência e confiança, em todas as minhas escolhas profissionais. Muito obrigado!

Agradeço o meu orientador Prof. Dr. Fernando de Almeida Borges, pela orientação e pelos ensinamentos durante esses seis anos de muito trabalho e conhecimento no Laboratório de Doenças Parasitárias (LADPAR) mas também pela confiança, pela parceria e pela amizade, e ao Dr. Dyego Gonçalves Lino Borges e Dr. Rafael Pereira Heckler, pelo incentivo e aprendizado durante esses anos. Vocês são exemplos de sucesso profissionais para mim, muito obrigado!

Meu sincero agradecimento aos meus colegas de laboratório, Mariana Green, Matheus Nakatani, Zelina Freire, Juliane Tutija, Guilherme Reckziegel, Vinícius Duarte, Dyego Borges e estagiários, sem vocês a realização deste estudo não seria possível. Agradeço também aos meus colegas e professores da pós-graduação, que foram essenciais para a conclusão de mais uma etapa da minha formação profissional.

Muito obrigado a todos!!

“Se você teve acesso à conhecimentos que foram negados a maioria, você tem uma dívida com essa maioria e não um sentimento de superioridade”

Autor Desconhecido

Resumo

CONDE, M.H. Amostras fecais compostas: ferramenta para monitoramento de infecção por nematodas gastrintestinais e de resistência anti-helmíntica em rebanho bovino. 2019. 48 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2019.

O objetivo do estudo foi avaliar o uso de *pool* de fezes para monitoramento do nível de infecção (MI) por NGIs de lotes de bovinos e teste de redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF). Adicionalmente, verificar a influência das variáveis sensibilidade analítica das técnicas de COF e tamanho do *pool*. Para MI, foram avaliados 12 lotes de bovinos (875 animais), taurinos e zebuínos, em diferentes faixas etárias. Foram coletadas individualmente amostras fecais e realizadas as contagens de ovos nas fezes (COF), pela técnica de McMaster 1:25, posteriormente foram preparados *pools* de fezes com subamostras de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50% e 100% do lote (sem repetição) e realizada a contagem de ovos dos *pools* de fezes (COF *pool*), pela técnica de McMaster 1:25. Para TRCOF, foram realizados 11 testes (222 animais), taurinos e zebuínos, de 8 a 18 meses de idade. Inicialmente, foram realizadas COF individuais, pela técnica McMaster 1:25, em seguida foram preparados *pools* de cinco amostras (*Pool 5*), dez amostras (*Pool 10*) e 13 a 25 amostras (*Pool total*) e realizadas as COFs pelas técnicas de Mini-FLOTAC 1:5 e McMaster 1:25 e 1:50, nas coletas pré e pós-tratamento. Foram realizadas análises de variância, seguido de teste de Dunnett, entre as médias das COF individuais e *pool*, para MI e TRCOF. A capacidade de predição das COFs *pools* foi verificada comparando dados preditos pelas COFs *pools* e dados observados pelas COF individuais e analisando os coeficientes de determinação (R^2) e teste de identidade dos parâmetros ($a=0$ e $b=1$) da regressão linear, coeficiente de correlação e concordância (CCC) e a raiz do quadrado médio do erro da predição (RQMEP). Adotou-se o nível de 5% de probabilidade em todas as análises estatísticas. Para MI, as COFs *pools* das subamostras de 5, 10, 20, 25, 50 e 100% diferiram significativamente ($p<0,0001$) da média das COF individuais dos lotes. Os R^2 foram de -0,52 a 0,79, houve diferença significativa nos testes de identidade dos parâmetros nas subamostras de 10 a 100% dos lotes, os CCCs variaram de 0,26 a 0,75 e os erros de predição foram de 69,9 a 181,9 OPG. Para TRCOF, apenas as eficácias obtidas de COF *pool* nas técnicas de Mini-FLOTAC e McMaster 1:50 com *pool total*, diferiram significativamente ($p<0,05$) das eficácias obtidas de COF individuais. Os R^2 e CCCs variaram de 0,36 a 0,78, houve diferença significativa nos testes de identidade dos parâmetros, exceto no *pool 5* na técnica Mini-FLOTAC. Os erros de predição variaram de 21,7 a 35,8% de eficácia. As COFs *pools* não permitiram avaliar de forma representativa o nível de infecção por nematodas gastrintestinais de lotes de bovinos, sob baixo nível de infecção e elevado nível de agregação, no entanto, COFs individuais de subamostras $\geq 20\%$ do lote permitiram monitorar o nível de infecção de lotes de bovinos. Os TRCOFs realizados por COF *pool*, não predisseram precisamente a eficácia anti-helmíntica, sendo influenciados pelo tamanho dos *pools* e sensibilidade analítica.

Palavras-chave: Agregação, McMaster, Mini-FLOTAC, *Pool*, Resistência

Abstract

CONDE, M.H. Composite fecal samples: Tool for monitoring of infection by gastrointestinal nematodes and anthelmintic resistance in herd cattle. 2019. 48 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2019.

The aim of the study was to evaluate the use of composite fecal sample (pooled fecal) to monitoring the level of infection (MI) by GINs of bovine herd and fecal egg count reduction test (FECRT). Additionally, verify the influence of the variables analytical sensitivity of FEC techniques and pool size. For MI, 12 herd of cattle (875 animals), taurine and zebu were evaluated in different age groups. Fecal samples were collected individually and the fecal egg counts (FEC) were performed using the McMaster 1:25 technique. Pooled fecal were then prepared with 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50% % and 100% of the herd (without repetition) and fecal pooled egg count (FEC pool) was performed using the McMaster 1:25 technique. For FECRT, 11 tests (222 animals), taurine and zebu were performed, from 8 to 18 months of age. Initially, individual FECs were performed by the McMaster 1:25 technique, then were prepared pool of five samples (pool 5), ten samples (pool 10) and 13 to 25 samples (pool total) and FECs performed by Mini-FLOTAC 1:5 and McMaster 1:25 and 1:50, in pre and post-treatment collections. We performed analyzes of variance, followed by Dunnett test, between the means of the individual and pool FECs, for MI and FECRT. The predictive capacity of the FECs pools was verified by comparing data predicted by the FECs pools and data observed by the FEC individual and analyzing the coefficients of determination (R^2) and identity test of the parameters ($a=0$ and $b=1$) of the linear regression, coefficient of correlation and agreement (CCC) and root mean square error prediction (RMSEP). The 5% probability level was adopted for all statistical analyzes. For MI, FECs pools of the 5, 10, 20, 25, 50 and 100% subsamples differed significantly ($p < 0.0001$) from the mean of the individual COFs of the herd. The R^2 were -0.52 to 0.79, there was a significant difference in the identity tests of the parameters in the subsamples from 10 to 100% of the herd, the CCC ranged from 0.26 to 0.75 and the prediction errors were 69.9 to 181.9 EPG. For FECRT, only the efficacy obtained from FEC pool in the techniques of Mini-FLOTAC and McMaster 1:50 with total pool, differed significantly ($p < 0.05$) from the efficacy obtained from individual FECs. The R^2 and CCCs ranged from 0.36 to 0.78, there was a significant difference in the identity tests of the parameters, except in pool 5 in the Mini-FLOTAC technique. Prediction errors ranged from 21.7 to 35.8% efficacy. The FECs pools did not allow a representative evaluation of the level of infection by gastrointestinal nematodes of bovine herds, with a low level of infection and a high level of aggregation, however, individual FECs of subsamples $\geq 20\%$ of the herd allowed to monitoring the level of infection of bovine herd. The FECRT performed by COF pool did not predict precisely the anthelmintic efficacy and were influenced by pool size and analytical sensitivity.

Keywords: Aggregation, McMaster, Mini-FLOTAC, *Pool*, Resistance.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 10 |
| 2. Metodologias de preparação de amostras fecais compostas | 11 |
| 3. Tamanho da amostra | 13 |
| 4. Técnicas Coproparasitológicas e Sensibilidade Analítica | 14 |
| 4.1. Influência da SA sobre amostras fecais compostas | 15 |
| 4.2. Influência da SA sobre amostras fecais individuais | 15 |
| 5. Nível de agregação | 16 |
| 6. Referências..... | 18 |
| Amostra fecal composta para monitoramento de infecção e eficácia anti-helmíntica em rebanhos bovinos naturalmente infectados por nematodas gastrintestinais | 21 |
| Introdução..... | 22 |
| Materiais e Métodos | 24 |
| Resultados | 29 |
| Discussão | 32 |
| Conclusão | 35 |
| Referências | 35 |
| Tabelas | 40 |
| Figuras | 45 |
| Considerações finais..... | 49 |

1. INTRODUÇÃO

As infecções por nematodas gastrintestinais (NGIs) em bovinos normalmente se apresentam de forma subclínica, com perdas produtivas impactantes à bovinocultura e potencializadas pela resistência anti-helmíntica (Borges et al., 2013; Heckler et al., 2016; Höglund et al., 2018), o que torna necessário um controle dos NGIs eficiente e fundamentado em evidências científicas. No entanto, de acordo com dados do Serviço de Inspeção de Saúde Vegetal e Animal dos Estados Unidos, de 2007/2008, há um número ínfimo de propriedades (4,7%) que submetem amostras de fezes para realização de exames coproparasitológicos, além disso, dentre as propriedades que realizam algum tratamento anti-helmíntico, apenas 0,6% utilizam exames coproparasitológicos para determinar quando os animais serão tratados e 82,3% avaliam a eficácia do anti-helmíntico pela aparência dos animais (USDA, 2009). Apesar de no Brasil ainda não haver dados sobre a conduta dos produtores acerca do controle de verminose em âmbito nacional, um estudo realizado com produtores rurais de Minas Gerais aponta dados que corroboram com os dados apresentados nos Estados Unidos (Delgado et al., 2009).

As justificativas apontadas para a ausência de realização de exames coproparasitológicos, seja para contagem de ovos nas fezes (COF) ou para Teste de Redução da Contagem de Ovos nas Fezes (TRCOF), estão relacionadas à falta de percepção dos responsáveis pela atividade quanto ao problema dessa parasitose (Gasbarre et al., 2015), embora, nos EUA 66% das propriedades realizam tratamento anti-helmíntico ao menos uma vez ao ano (USDA, 2009), e no Brasil 80% dos produtores realizam ao menos duas dosificações anti-helmíntica por ano (Soutello, 2007). Também são apontados como possível justificativa, os gastos financeiros necessários para realização dos exames coproparasitológicos. (Morgan et al., 2005; Rinaldi et al., 2014), podendo ser este um dos principais motivos, uma vez que, esses custos em propriedades com baixa lucratividade ou com grande número de animais podem ser significativos. Além disso, fatores operacionais, seja na coleta e no envio das amostras, ou no processamento dos exames em laboratório, devem ser considerados, logo, estratégias que levem à redução da operacionalidade e dos custos, tanto para os laboratórios quanto para as propriedades de criação, são necessárias e desejáveis.

O uso de amostras fecais compostas tem-se mostrado uma ferramenta que atende a esses parâmetros (George et al., 2017). Entende-se por amostra fecal composta, ou *pool* de fezes, o

1 agrupamento de igual quantidade de fezes de diversos animais, do qual pressupõe-se que COF
2 deverá ser igual ou semelhante à média das COFs individuais (Baldock et al., 1990).

3 Com isso, o objetivo desta revisão foi compilar informações sobre o uso de amostras fecais
4 compostas, principalmente em ruminantes, abordando variações de amostragem,
5 metodologias de preparação de *pool* de fezes e as variáveis interferentes, como sensibilidade
6 analítica e padrão de distribuição de parasitas na população hospedeira.

7

8 **2. Metodologias de preparação de amostras fecais compostas**

9 A preparação dos *pools* de fezes é determinada por variáveis como: volume de fezes
10 utilizado de cada amostra individual, métodos de homogeneização, quantidade de amostras
11 individuais utilizadas nos *pools* de fezes e sensibilidade analítica.

12 O princípio da igualdade do volume de fezes das amostras individuais nas preparações dos
13 *pools* de fezes foi respeitado em todos os estudos sobre o uso de amostras fecais compostas,
14 porem houve diferenças no volume utilizado para cada espécie animal (bovina, ovina e
15 equina) e também, uma variação no volume utilizado (0,5 a 3,0 g) entre os estudos com a
16 espécie ovina. Ambos os estudos com bovinos utilizaram 1g de fezes de cada amostra (Tabela
17 1).

18 Tabela 1. Variáveis metodológicas da preparação de amostral fecal composta (*pool* de
19 fezes) para as espécies ovina, bovina e equina.

| Espécie | Número de amostras por <i>pool</i> | Volume de fezes por amostra | Homogeneização do <i>pool</i> | SA | Autores |
|----------------|---|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Ovina | 3 a 5 | 0,5 g | Manual à seco | 20 (MM) 25 (MM) 33 (MM) | Baldock et al. (1990) |
| | 10 | 2,0 g | Manual aquosa | 15 (MM) | Nicholls e Obendorf (1994) |
| | 10 | 3,0 g | Mecânica à seco | 50 (MM) | Morgan et al. (2005) |
| | 5,10 e 20 | 2,0 g | Manual à seco | 10 (MF) 15 (MM) 50 (MM) | Rinaldi et al. (2014) |
| | 5, 10 e 20 | 2,0g | Manual à seco | 10 (MF) 15 (MM) 50 (MM) | Kenyon et al. (2016) |
| Bovina | 5 | 1,0 g | Manual à seco | 20 (MM) | Ward et al. (1997) |
| | 15 | 1,0 g | Manual à seco | 5 (MF) 5 (W) 12,5 (MM) | George et al. (2017) |

| | | | | | |
|---------------|--------|-------|---------------|---------|----------------------|
| Equina | 3 a 10 | 3,0 g | Manual aquosa | 50 (MM) | Eysker et al. (2008) |
|---------------|--------|-------|---------------|---------|----------------------|

1 SA: Sensibilidade Analítica; MM: McMaster; MF: Mini-FLOTAC; W: Wisconsin-
2 Modificado

3
4 O processo de homogeneização dos *pools* de fezes tem sido realizado por três métodos:
5 manual a seco, manual aquosa e mecânica a seco. A homogeneização manual a seco consiste
6 na simples mistura do material fecal manualmente com auxílio de espátula, sendo este o
7 método descrito no primeiro estudo sobre uso de *pool* de fezes e o mais utilizado nos estudos
8 sobre *pool* de fezes e com resultados satisfatórios (Baldock et al., 1990; Ward et al., 1997;
9 Rinaldi et al., 2014; Kenyon et al., 2016; George et al., 2017). A homogeneização aquosa
10 consistia na adição de um determinado volume de água no conjunto de amostras fecais e
11 homogeneização do conteúdo fezes+água. A homogeneização em meio líquido poderia vir a
12 melhorar a distribuição de ovos no conteúdo, minimizando a influência de uma possível fonte
13 de variação para as contagens de ovos do *pool* de fezes (COF *pool*), no entanto, os resultados
14 apresentados foram equivalentes ao método manual a seco e permitiram conclusões
15 semelhantes (Nicholls e Obendorf, 1994). A homogeneização mecânica a seco foi realizada
16 com a mistura do material fecal em um liquidificador e sem adição de líquidos (Morgan et al.,
17 2005).

18 A segunda etapa após a homogeneização do *pool* de fezes é a COF *pool*. Divergências
19 foram observadas, quanto a origem da amostra que seria realizada a COF. Nos estudos com
20 *pools* de tamanho reduzido (3 a 5 amostras), as COFs foram realizadas da massa fecal total do
21 *pool* de fezes (Baldock et al., 1990; Ward et al., 1997). Quando no *pool* de fezes havia mais
22 de cinco amostras, ocorria a impossibilidade de utilizar a massa fecal total, logo, retirava-se
23 uma alíquota de fezes do *pool* e a partir dessa alíquota conduziam as técnicas de COF
24 (Morgan et al., 2005; Eysker et al., 2008; Kenyon et al., 2016). Essa estratégia apresenta uma
25 certa desvantagem pois, em virtude do padrão de distribuição aleatória (Distribuição de
26 Poisson), essa alíquota possivelmente não conterà exatamente a mesma contagem de ovos da
27 massa fecal total, porém próxima (Torgerson et al., 2012), com isso pode estar sendo incluído
28 mais uma possível fonte de variação para COF *pool*, no entanto, é possível padronizar a
29 técnica de COF para *pool* de diferentes tamanhos.

30 A quantidade de amostras individuais utilizadas nos *pools* de fezes (tamanho do *pool*)
31 variou de 3 a 20 amostras, entre os estudos. Embora em todos os estudos as COFs foram
32 realizadas pela técnica de McMaster, houve variações de sensibilidade analítica na técnica.
33 Foram utilizadas também a técnica de Mini-FLOTAC e Wisconsin-modificado para COF

1 *pool* (Tabela 1). A influência dessas variações sobre estimativas de COF *pool* serão abordados
2 mais detalhadamente nos tópicos 3 e 4.

3 Em suma, são favoráveis os resultados, até o momento, do uso de amostras fecais
4 compostas em diferentes espécies visto os elevados níveis de concordância entre COF *pool* e
5 individual, porém é evidente a ausência de unanimidade na metodologia de preparação das
6 amostras fecais compostas, cujas variáveis por vezes aparentam serem determinadas
7 arbitrariamente. Isto faz com que comparações de resultados entre os estudos se tornem
8 imprecisas, além de impossibilitar recomendações práticas para adoção desta ferramenta em
9 laboratórios, centros de pesquisas ou programas de controle de verminose.

10

11 **3. Tamanho da amostra**

12 A determinação do tamanho da amostra é fundamental do ponto de vista metodológico e
13 estatístico, visto que uma determinada característica de uma amostra da população deve
14 representar a característica da população de origem. Nos estudos sobre o uso de amostras
15 fecais compostas, a determinação do tamanho da amostra a ser utilizada nos *pools* de fezes
16 (tamanho do *pool*) não segue nenhum padrão e observam-se variações, tanto no tamanho do
17 *pool*, quanto no volume de fezes utilizado das amostras individuais para preparação dos *pools*
18 de fezes (Tabela 1). Brunsdon et al. (1970) afirmam que a avaliação de amostras de 10 a 12
19 animais confere um diagnóstico satisfatório do nível de infecção de rebanho de ovinos. É
20 possível que o tamanho dos *pools* utilizados até o momento seja derivado deste valor, porém,
21 a ausência de referências sobre a determinação do tamanho da amostra não permite esta
22 conclusão.

23 Com base em simulações matemáticas, é clara a influência do tamanho da amostra na
24 qualidade das COFs, com ou sem o uso de amostra fecal composta, visto que amostras de
25 tamanho reduzido favorecem aparecimento de erros de superestimação, mas principalmente
26 de subestimação, pelo simples fato de que amostras pequenas tem uma menor probabilidade
27 de detectar os hospedeiros com alta carga parasitária, logo a média e a variância são
28 subestimadas, conseqüentemente, variáveis dependentes dessas podem ser subestimadas
29 (Gregory e Woolhouse, 1993; Morgan et al., 2005). Alternativamente, o aumento do tamanho
30 da amostra reduziria a chance de aparecimento de erros, no entanto, o maior volume de fezes
31 resultante do aumento do tamanho da amostra, dificultaria a homogeneização total dos *pools*
32 de fezes e poderia trazer erros decorrentes da má homogeneização (Morgan et al., 2005).

33 A influência do tamanho do *pool* sobre as COFs e TRCOFs em ovinos foi avaliada a partir
34 de dados de campo. Em localidades onde não havia resistência anti-helmíntica dos NGIs

1 (eficácia média de 99,5%) não houve influência do tamanho do *pool* (Rinaldi et al., 2014).
2 Entretanto, quando avaliada em região onde os NGIs eram resistentes aos anti-helmínticos,
3 houve interação entre o tamanho do *pool* e o nível de sensibilidade analítica na classificação
4 de susceptibilidade anti-helmíntica e nas eficácias (Kenyon et al., 2016). O aumento do
5 tamanho do *pool* elevou significativamente os coeficientes de correlação das eficácias obtidas
6 de COF *pool* e individual, nas técnicas de McMaster (1:15 e 1:50), porém, manteve-se
7 inalterado na técnica com maior sensibilidade analítica (Mini-FLOTAC 1:10). Também foram
8 observados erros na classificação de susceptibilidade anti-helmíntica na técnica de menor
9 sensibilidade analítica (McMaster 1:50) (Kenyon et al., 2016). Portanto, o nível de resistência
10 anti-helmíntica também deve ser considerado ao se avaliar a influência de variáveis
11 interferentes, como o tamanho do *pool*, para COF *pool*.

12 Com isso, tem-se evidências de que há uma influência do tamanho do *pool* nas COF e
13 TRCOF em ovinos, porém ainda é desconhecido o seu impacto para COF e TRCOF na
14 espécie bovina, mas também o tamanho de *pool* ideal para avaliações de nível de infecção e
15 eficácia anti-helmíntica.

16

17 **4. Técnicas Coproparasitológicas e Sensibilidade Analítica**

18 Entende-se por sensibilidade analítica (SA) como a menor COF que a técnica laboratorial
19 consegue detectar diferente de zero, por exemplo, ao se dizer que a técnica tem uma
20 sensibilidade analítica de 25, significa que a menor COF possível, depois do zero, é de 25
21 ovos por grama de fezes. Dentre as técnicas coproparasitológicas quantitativas desenvolvidas
22 até o momento, a técnica de Gordon e Whitlock (McMaster), descrita em 1939, é baseada na
23 flutuação em câmara de leitura específica (câmara de McMaster) e, é a mais difundida e
24 recomendada até o momento pela World Association for the Advancement of Veterinary
25 Parasitology (WAAVP) para contagem de ovos na fezes e avaliação de eficácia anti-
26 helmíntica (Coles et al., 2006). Em sua primeira descrição a técnica apresentava uma
27 sensibilidade analítica de 200, porém já são descritas sensibilidades analíticas de 10; 12,5; 15;
28 25; 33,3; 50 e 100 para a mesma técnica (Baldock et al., 1990; Levecke et al., 2011; Kenyon
29 et al., 2016; George et al., 2017).

30 Posteriormente, algumas técnicas com maior sensibilidade analítica foram desenvolvidas,
31 como a técnica de Cornell-Wisconsin, descrita em 1982 e baseada em flutuação em tubos de
32 centrifugação obtendo uma sensibilidade analítica de 1 (Egwand e Slocombe, 1982), assim
33 como na técnica de FLOTAC que foi descrita em 2010 e baseia-se no mesmo princípio de

1 Cornell-Wisconsin, no entanto, utilizando aparatos específicos da técnica (Cringoli et al.,
2 2010).

3 A técnica mais recente até o momento é chamada Mini-FLOTAC, descrita em 2013,
4 baseia-se em flutuação em câmara de leitura específica adaptada da câmara de McMaster,
5 possibilitando uma sensibilidade analítica de 5 ou 10, o que representa, um ganho de
6 sensibilidade em relação a técnica de McMaster (Cringoli et al., 2013; Noel et al., 2017).

7 A influência da SA em técnicas com amostras fecais individuais e amostras fecais
8 compostas, seja para contagem de ovos nas fezes ou avaliação de eficácia anti-helmíntica tem
9 sido motivo de estudos (Morgan et al., 2005; Kenyon et al., 2016).

10

11 **4.1. Influência da SA sobre amostras fecais compostas**

12 O efeito da SA sobre testes de eficácia anti-helmíntica e COF a partir de amostras fecais
13 compostas foi avaliado em duas localidades com diferentes perfis de resistência anti-
14 helmíntica de NGIs em ovinos. Onde não havia resistência anti-helmíntica, a SA não
15 influenciou a eficácia anti-helmíntica, a classificação de susceptibilidade e as contagens de
16 ovos de *pool* de fezes (Rinaldi et al., 2014). Por outro lado, onde os NGIs eram resistentes aos
17 anti-helmínticos, as diferenças das técnicas e das SA das técnicas mostraram-se relevantes ao
18 influenciar nos resultados e conclusões dos TRCOF a partir de *pool* de fezes (Kenyon et al,
19 2016). Logo, ficou evidenciado que a SA afetou as COFs *Pool* e conseqüentemente as
20 conclusões acerca de sua utilização em ovinos, na dependência do tamanho do *pool* e
21 possivelmente do nível de resistência anti-helmíntica.

22 Em bovinos, não há estudos que demonstrem a influência da SA sobre amostras fecais
23 compostas. George et al. (2017) utilizaram três diferentes técnicas para a realização de
24 TRCOF a partir de amostras fecais compostas em bovinos, entretanto, os autores não
25 abordaram as técnicas separadamente possivelmente pela metodologia empregada, a qual
26 exigia-se uma contagem inicial mínima de 140 ovos.

27

28 **4.2. Influência da SA sobre amostras fecais individuais**

29 O efeito de diferentes sensibilidades analíticas (1, 10, 15, 33, 50) de duas técnicas
30 coproparasitológicas (FLOTAC e McMaster) em baixo nível infecção (<200 OPG) em
31 bovinos sobre o TRCOF a partir de amostras individuais, foi avaliado em um modelo
32 experimental baseado em eficácia anti-helmíntica simulada a partir de diluições da COF
33 inicial. Conclui-se que a precisão do TRCOF aumenta à medida que a sensibilidade analítica
34 aumenta (Levecke et al., 2011).

1 Neste mesmo modelo experimental, também foi avaliada a influência da sensibilidade
2 analítica, em diferentes níveis de infecção inicial em bovinos sobre variáveis que predizem a
3 qualidade do TRCOF, como precisão, acurácia e erro. A técnica de FLOTAC (SA:1) forneceu
4 resultados mais precisos no TRCOF em relação a técnica de McMaster (SA:10) e Cornell-
5 Wisconsin (SA:1), que não diferiram entre si, apesar do FLOTAC e Cornell-Wisconsin terem
6 a mesma sensibilidade analítica. Além disso, a precisão e a acurácia aumentaram a medida
7 que o OPG inicial aumentou (Levecke et al., 2012).

8 Em condições naturais, trabalhando com COF individuais de ovinos, observou-se que o
9 Mini-FLOTAC apresentou significativamente maiores COF e sensibilidade quando
10 comparado ao McMaster 15 e McMaster 50, que não apresentaram diferenças significativas
11 nas COF. A técnica de McMaster frequentemente não detectava COF baixa, principalmente
12 na sensibilidade analítica de 50. Com o aumento da COF, a sensibilidade da técnica de
13 McMaster não diferiu do Mini-FLOTAC (Rinaldi et al., 2014).

14 A avaliação de diferença de técnicas e sensibilidade analítica também foi demonstrada em
15 equinos, no qual o Mini-FLOTAC (SA:5) não diferiu significativamente do McMaster
16 (SA:25), no entanto apresentou menores variações no desvio padrão e no coeficiente de
17 variação, principalmente em COF baixa (<200 OPG), logo apresentando uma maior acurácia
18 e precisão (Dias de Castro et al., 2017; Noel et al., 2017).

19 De maneira geral, as técnicas coproparasitológicas e a sensibilidade analítica utilizadas nos
20 estudos, seja em bovinos, ovinos ou equinos, afetam de alguma maneira o TRCOF,
21 geralmente no sentido de técnicas com maior sensibilidade analítica ocasionarem um ganho
22 de precisão na determinação da eficácia anti-helmíntica, pois possibilitam a detecção de COF
23 muito baixa e reduzem a amplitude de variação nas COFs.

24 Apesar do ganho obtido ao utilizar técnicas de elevada sensibilidade analítica, a
25 interpretação final sobre a eficácia do anti-helmíntico aparenta ser pouco afetada, logo
26 influência da sensibilidade analítica e da técnica coproparasitológica ainda devem ser melhor
27 elucidadas, visto que as técnicas de maior sensibilidade analítica requerem mais
28 equipamentos, maior volume de trabalho e maior capacitação profissional, conseqüentemente,
29 maiores custos portanto deve-se buscar um equilíbrio entre sensibilidade analítica e
30 aplicabilidade das técnicas.

31 32 **5. Nível de agregação**

33 O padrão de distribuição de parasitas na população hospedeira, mensurado pelo nível de
34 agregação, apesar de pouco avaliado nos estudos é relatado e discutido como uma variável

1 interferente para COF *pool* em ovinos. Os padrões de distribuição, podem ser divididos em
2 três categorias: sub-dispersa (regular ou homogênea), aleatória ou super-dispersa (agregada ou
3 heterogênea). Esses padrões podem ser descritos empiricamente por três distribuições de
4 probabilidades, distribuição binomial positiva, distribuição de Poisson e distribuição binomial
5 negativa, respectivamente, as quais podem ser verificadas simplesmente pela razão da
6 variância sobre a média (RVM) da amostra, sendo sub-dispersão valor menor que um,
7 aleatorização valor igual a um e super-dispersão valores maiores que um (Anderson e Gordon,
8 1982).

9 Frequentemente, o padrão de distribuição dos NGIs nos hospedeiros é agregado, ou seja, a
10 maioria da população de parasitos tende a ser encontrada dentro de uma proporção
11 relativamente pequena de todos os hospedeiros disponíveis (Barger et al., 1985; Smith e
12 Guerrero, 1993; Morgan et al., 2005). O nível dessa agregação pode ser predito analisando
13 algumas variáveis estatísticas, como o coeficiente k da distribuição binomial negativa, o qual
14 apresenta uma relação inversa com o nível de agregação, logo, populações que apresentem
15 elevado nível de agregação, apresentam um baixo valor de k , conseqüentemente uma grande
16 dispersão dos parasitas dentro da população de hospedeiros. Para melhor entendimento desta
17 relação, o sentido literal do termo agregação não deve ser considerado, uma vez que está
18 diretamente relacionado com um padrão de distribuição heterogêneo.

19 As distribuições de parasitas não são estáticas, mas sim dinâmicas, em conseqüência de
20 mudanças temporais e espaciais dos fatores que determinam a dispersão (Anderson e Gordon
21 1982), como taxa de infecção do hospedeiro, fecundidade e mortalidade do parasito, espécie
22 de parasito, idade do hospedeiro, resposta imune e fisiológicas do hospedeiro e competição
23 intraespecífica (Anderson e Gordon 1982; Smith e Guerrero, 1993; Grenfell et al., 1995;
24 Morgan et al., 2005).

25 Gregory e Woolhouse (1993) em estudo de simulação, discutem as implicações de
26 variáveis como tamanho amostral, nível de agregação e nível de infecção (carga parasitária)
27 nas interpretações de dados de COF. Especificamente, em amostras com nível de agregação
28 elevado (coeficiente k baixo), os parâmetros estatísticos como média, variância, RVM e
29 coeficiente de variação são subestimados, do mesmo modo que amostras de tamanhos
30 reduzidos subestimam o nível de agregação, portanto, erros significativos e baixa precisão das
31 estimativas dos parâmetros estão associados a amostras pequenas e alto nível de agregação,
32 mas independentes do nível de infecção.

33 Morgan et al. (2005), trabalhando com modelo de simulações matemáticas associado a
34 validação a campo, buscaram determinar como a agregação e o tamanho da amostra afetam a

1 acurácia das estimativas de COF a partir de amostras fecais compostas em ovinos.
 2 Demonstraram que o nível de agregação afeta a chance de subestimação das COFs em uma
 3 relação direta, mas também afeta a precisão das COFs *pool*. Esta precisão, que é dependente
 4 da variância das COF, apresenta uma elevação com o aumento da quantidade de câmaras lidas
 5 do *pool* de fezes, principalmente em baixos níveis de agregação. No entanto, baseados nos
 6 dados de campos, não foi observado correlação significativa entre o coeficiente k e a
 7 probabilidade de subestimar a média da COF do rebanho. Os autores discutem a necessidade
 8 de cuidados extras ao se utilizar amostras fecais compostas em rebanhos em que é esperado
 9 um nível de agregação elevado, porém, não há dados a campo suficientes para poder prever o
 10 nível de agregação de um lote, visto que é influenciado por uma gama de fatores biológicos.

11 Os dados de simulações confirmaram a influência do nível de agregação sobre COF *pool*,
 12 no entanto, dados de campo demonstraram não haver correlação entre coeficiente k e
 13 probabilidade de subestimar o nível de infecção a partir de COF *pool* (Morgan et al., 2005), o
 14 que faz com que haja dúvidas sobre a influência dessa variável, logo são necessários mais
 15 estudos para verificar e/ou comprovar a influência do nível de agregação sobre COF
 16 individual e *pool*, em animais de produção.

17

18

4. REFERÊNCIAS

19

20 Anderson, R.M., Gordon, D.M., 1982. Processes influencing the distribution of parasite
 21 numbers within host populations with special emphasis on parasite-induced host
 22 mortalities. *Parasitology* 85, 373-389.

23 Baldock, F.C., Lyndal-Murphy, M., Pearse, B., 1990. An assessment of a composite sampling
 24 method for counting strongyle eggs in sheep faeces. *Aust. Vet. J.* 67, 165–167.

25 Barger, I.A., 1985. The statistical distribution of trichostrongylid nematodes in grazing lambs.
 26 *Int. J. Parasitol.* 15, 645-649.

27 Brundson, R.V., 1970. Within-flock variations in strongyle worm infections in sheep: the
 28 need for adequate diagnostic samples. *N. Z. Vet. J.* 18, 185–188.

29 Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., Samson-Himmelstjerna G. v.
 30 Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruyse, J., 2006. The detection of anthelmintic resistance
 31 in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 136, 167–185

32 Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Utzinger, J., 2010. FLOTAC: new multivalent
 33 techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in
 34 animals and humans. *Nat. Protoc.* 5, 503–515.

- 1 Cringoli, G., Rinaldi, L., Albonico, M., Bergquist, R., Utzinger, J., 2013. Geospatial(s)tools:
2 integration of advanced epidemiological sampling and novel diagnostics. *Geospat. Health*
3 7, 399–404.
- 4 Dias de Castro, L., Abrahao C.L.H., Buzatti, A., Molento, M.B., Bastianetto, E., Rodrigues,
5 D.S., Lopes, L., Xavier Silva, M., Freitas, M.G., Conde, M.H., Borges, F., 2017.
6 Comparison of McMaster and mini-FLOTAC fecal egg counting techniques in cattle and
7 horses. *Vet. Parasitol. Reg. Studies and Re.* 10, 132–5.
- 8 Egwand, T.G., Slocombe, J.O., 1982. Evaluation of the Cornell-Wisconsin centrifugal
9 flotation technique for recovering trichostrongylid eggs from bovine feces. *Can. J. Comp.*
10 *Med.* 46, 133–137
- 11 Eysker, M., Bakker, J., van den Berg, M., van Doorn, D.C., Ploeger, H.W., 2008. The use of
12 age-clustered *pooled* faecal samples for monitoring worm control in horses. *Vet. Parasitol.*
13 151, 249–255.
- 14 Gasbarre, L.C., Ballweber, L.R., Stromberg, B.E., Dargatz, D.A., Rodriguez, J.M., Koprak,
15 C.A., Zarlenga, D.S., 2015. Effectiveness of current anthelmintic treatment programs on
16 reducing fecal egg counts in United States cow-calf operations. *Can. J. Vet. Res.* 79, 296–
17 302.
- 18 George, M.M., Paras, K.L., Howell, S.B., Kaplan, R.M., 2017. Utilization of composite fecal
19 samples for detection of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of cattle.
20 *Vet. Parasitol.* 204, 24–29.
- 21 Gregory, R.D., Woolhouse, M.E.J., 1993. Quantification of parasite aggregation: a simulation
22 study. *Acta Trop.* 54, 131–139
- 23 Grenfell, B.T., Wilson, K., Isham, V.S., Boyd, H.E.G., Dietz, K., 1995. Modelling patterns of
24 parasite aggregation in natural populations: trichostrongylid nematode–ruminant
25 interactions as a case study. *Parasitology* 111, S135–S151
- 26 Gordon, H.McL., Whitlock, H.V., 1939. A new technique for counting nematode eggs in
27 sheep faeces. *J. Counc. Sci. Ind. Res.* 12, 50–52.
- 28 Kenyon, F., Rinaldi, L., McBean, D., Pepe, P., Bosco, A., Melville, L., Devin, L., Mitchell,
29 G., Ianniello, D., Charlier, J., Vercruysse, J., Cringoli, G., Levecke, B., 2016. *Pooling*
30 sheep faecal samples for the assessment of anthelmintic drug efficacy using McMaster and
31 Mini-FLOTAC in gastrointestinal strongyle and *Nematodirus* infection. *Vet. Parasitol.*
32 225, 53–60.
- 33 Levecke, B., Rinaldi, L., Charlier, J., Maurelli, M.P., Morgoglione, M.E., Vercruysse, J.,
34 Cringoli, G., 2011. Monitoring drug efficacy against gastrointestinal nematodes when

- 1 faecal egg counts are low: do the analytical sensitivity and the formula matter? *Parasitol.*
2 *Res.* 109, 953–957.
- 3 Levecke, B., Rinaldi, L., Charlier, J., Maurelli, M., Bosco, A., Vercruysse, J., Cringoli, G.,
4 2012. The bias, accuracy and precision of faecal egg count reduction test results in cattle
5 using McMaster, Cornell-Wisconsin and FLOTAC egg counting methods. *Vet. Parasitol.*
6 188, 194–199.
- 7 Morgan, E.R., Cavill, L., Curry, G.E., Wood, R.M., Mitchell, E.S.E., 2005. Effects of
8 aggregation and sample size on composite faecal egg counts in sheep. *Vet. Parasitol.* 131,
9 79–87.
- 10 Nicholls, J., Obendorf, D.L., 1994. Application of a composite faecal egg count procedure in
11 diagnostic parasitology. *Vet. Parasitol.* 52, 337–342.
- 12 Noel, M.L., Scare, J.A., Bellaw, J.L., Nielsen, M.K., 2017. Accuracy and precision of mini-
13 FLOTAC and McMaster techniques for determining equine strongyle egg counts. *J.*
14 *Equine Vet. Sci.* 48, 182–187 (e181).
- 15 Rinaldi, L., Levecke, B., Boscós, A., Ianniello, D., Pepe, P., Charlier, J., Cringoli, G.,
16 Vercruysse, J., 2014. Comparison of individual and *pooled* faecal samples in sheep for the
17 assessment of gastrointestinal strongyle infection intensity and anthelmintic drug efficacy
18 using McMaster and Mini-FLOTAC. *Vet. Parasitol.* 205, 216–223.
- 19 Smith, G., Guerrero, J., 1993. Mathematical models of the population biology of *Ostertagia*
20 *ostertagi* and the significance of aggregated parasite distributions. *Vet. Parasitol.* 46, 243–
21 257.
- 22 USDA, 2010. Beef 2007–08: part IV: reference of beef cow-calf management practices in the
23 United States, 2007–08. USDA-APHIS National Animal Health Monitoring System.
24 USDA APHIS Veterinary Services, Fort Collins; USA.
- 25 Ward, M.P., Lyndal-Murphy, M., Baldock, F.C., 1997. Evaluation of a composite method for
26 counting helminth eggs in cattle faeces. *Vet. Parasitol.* 73, 181–187.

1 **Amostra fecal composta para monitoramento de infecção e eficácia anti-helmíntica em**
2 **rebanhos bovinos naturalmente infectados por nematodas gastrintestinais**

3 Mário H. Conde^{a*}, Mariana G. Freitas^a, Fernando A. Borges^a

4 ^aFaculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do
5 Sul, Brasil.

6 *Autor de Correspondência: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UFMS, Av.
7 Senador Filinto Muller, 2443, Bairro Ipiranga, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.
8 CEP: 79074-460. Telefone: +55 (67) 33453612.

9 Endereço de e-mail: fernando.borges@ufms.br

10

11 **Resumo:** O objetivo do estudo foi avaliar o uso de *pool* de fezes para monitoramento do nível
12 de infecção (MI) por NGIs de lotes de bovinos e teste de redução da contagem de ovos nas
13 fezes (TRCOF). Adicionalmente, verificar a influência das variáveis sensibilidade analítica
14 das técnicas de COF e tamanho do *pool*. Para MI, foram avaliados 12 lotes de bovinos (875
15 animais), taurinos e zebuínos, em diferentes faixas etárias. Foram coletadas individualmente
16 amostras fecais e realizadas as contagens de ovos nas fezes (COF), pela técnica de McMaster
17 1:25, posteriormente foram preparados *pools* de fezes com subamostras de 5%, 10%, 15%,
18 20%, 25%, 50% e 100% do lote (sem repetição) e realizada a contagem de ovos dos *pools* de
19 fezes (COF *pool*), pela técnica de McMaster 1:25. Para TRCOF, foram realizados 11 testes
20 (222 animais), taurinos e zebuínos, de 8 a 18 meses de idade. Inicialmente, foram realizadas
21 COF individuais, pela técnica McMaster 1:25, em seguida foram preparados *pools* de cinco
22 amostras (*Pool 5*), dez amostras (*Pool 10*) e 13 a 25 amostras (*Pool total*) e realizadas as
23 COFs pelas técnicas de Mini-FLOTAC 1:5 e McMaster 1:25 e 1:50, nas coletas pré e pós-
24 tratamento. Foram realizadas análises de variância, seguido de teste de Dunnett, entre as
25 médias das COF individuais e *pool*, para MI e TRCOF. A capacidade de predição das COFs
26 *pools* foi verificada comparando dados preditos pelas COFs *pools* e dados observados pelas
27 COF individuais e analisando os coeficientes de determinação (R^2) e teste de identidade dos
28 parâmetros ($a=0$ e $b=1$) da regressão linear, coeficiente de correlação e concordância (CCC) e

1 a raiz do quadrado médio do erro da predição (RQMEP). Adotou-se o nível de 5% de
2 probabilidade em todas as análises estatísticas. Para MI, as COFs *pools* das subamostras de 5,
3 10, 20, 25, 50 e 100% diferiram significativamente ($p < 0,0001$) da média das COF individuais
4 dos lotes. Os R^2 foram de -0,52 a 0,79, houve diferença significativa nos testes de identidade
5 dos parâmetros nas subamostras de 10 a 100% dos lotes, os CCCs variaram de 0,26 a 0,75 e
6 os erros de predição foram de 69,9 a 181,9 OPG. Para TRCOF, apenas as eficácias obtidas de
7 COF *pool* nas técnicas de Mini-FLOTAC e McMaster 1:50 com *pool* total, diferiram
8 significativamente ($p < 0,05$) das eficácias obtidas de COF individuais. Os R^2 e CCCs variaram
9 de 0,36 a 0,78, houve diferença significativa nos testes de identidade dos parâmetros, exceto
10 no *pool* 5 na técnica Mini-FLOTAC. Os erros de predição variaram de 21,7 a 35,8% de
11 eficácia. As COFs *pools* não permitiram avaliar de forma representativa o nível de infecção
12 por nematodas gastrintestinais de lotes de bovinos, sob baixo nível de infecção e elevado nível
13 de agregação, no entanto, COFs individuais de subamostras $\geq 20\%$ do lote permitiram
14 monitorar o nível de infecção de lotes de bovinos. Os TRCOFs realizados por COF *pool*, não
15 predisseram precisamente a eficácia anti-helmíntica, sendo influenciados pelo tamanho dos
16 *pools* e sensibilidade analítica.

17

18 Palavra-Chave: Agregação, *Pool*, Resistência, Mini-FLOTAC, McMaster

19

20 **1. Introdução**

21 O diagnóstico do parasitismo por nematodas gastrintestinais (NGIs) em ruminantes é
22 baseado na realização de exames coproparasitológicos quantitativos, apesar dessa prática ser
23 negligenciada pela maioria dos produtores. No entanto, de acordo com dados do Serviço de
24 Inspeção de Saúde Vegetal e Animal dos Estados Unidos, de 2007/2008, dentre as
25 propriedades em que se realizaram tratamento anti-helmíntico em bovinos nos Estados
26 Unidos, apenas 0,6% utilizaram exames coproparasitológicos para determinar quando os

1 animais seriam desverminados. Além disso, 91,1% consideram a eficácia dos anti-helmínticos
2 como importante ou muito importante para escolha dos anti-helmínticos, porém 82,3%
3 utilizam a aparência do animal para determinar a eficácia anti-helmíntica (USDA, 2009), o
4 que reflete um controle inadequado e sem qualquer fundamentação técnica, também
5 observado no Brasil (Delgado et al., 2009).

6 Alguns fatores têm sido associados a este controle inadequado, como a falta de percepção
7 dos produtores e/ou responsáveis pela atividade quanto ao problema dessa parasitose
8 (Delgado et al., 2009; Gasbarre et al., 2015) e os gastos financeiros diretos e indiretos para
9 realização de exames coproparasitológicos (Morgan et al., 2005; Rinaldi et al., 2014). O uso
10 de amostra fecal composta (*pool* de fezes) para contagem de ovos nas fezes (COF) e testes de
11 redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF) é considerado uma estratégia que
12 possibilita a redução da operacionalidade e dos custos em ovinos, bovinos e equinos (Eysker
13 et al., 2008; Kenyon et al., 2016; George et al., 2017).

14 Embora seja uma estratégia inicialmente avaliada a quase três décadas (Baldock et al.,
15 1990), ainda há questionamentos a serem esclarecidos acerca da aplicabilidade dessa
16 estratégia e das variáveis que possam influenciar as contagens de ovos de *pool* de fezes (COF
17 *pool*). Em ovinos, a sensibilidade analítica, a quantidade de amostras utilizada no *pool* de
18 fezes (tamanho do *pool*), o nível de resistência anti-helmíntica e o nível de agregação
19 (dispersão dos parasitas entre os hospedeiros) foram avaliadas e tidas como variáveis que
20 podem interferir nos resultados de COF e TRCOF utilizando amostras fecais compostas
21 (Morgan et al., 2005; Rinaldi et al., 2014; Kenyon et al., 2016). Em bovinos, Ward et al.
22 (1997) citam que as espécies de NGIs presentes nas infecções e a idade do hospedeiro que
23 está diretamente relacionada ao nível de infecção, possivelmente possam influenciar os
24 resultados de COF *pool*, porém, não avaliaram.

1 Há apenas dois estudos sobre o uso de *pool* de fezes de bovinos, demonstrando que houve
2 correlação entre a média das COFs individuais e COF *pool*, embora não seja possível
3 comprovar se essas estimativas avaliaram de forma representativa o nível de infecção (Ward
4 et al., 1994). Foi demonstrado também, uma correlação entre as eficácias anti-helmínticas
5 obtidas de COF individuais e *pool*, porém a metodologia empregada pode elevar a
6 operacionalidade laboratorial em baixos níveis de infecções de lotes ou rebanhos bovinos
7 (George et al., 2017).

8 Com isso, o objetivo do estudo foi avaliar, em bovinos, o uso de *pool* de fezes para
9 monitoramento do nível de infecção por NGIs de lotes bovinos e TRCOF. Adicionalmente,
10 verificar a influência de variáveis interferentes como a sensibilidade analítica das técnicas de
11 COF e tamanho do *pool*.

12

13 **2. Material e métodos**

14 *2.1. Monitoramento de infecção por NGIs*

15 *2.1.1. Local e Amostras*

16 Em uma amostragem por conveniência, foram selecionadas 11 propriedades de criação de
17 bovinos, localizadas em diferentes municípios nos estados do Mato Grosso do Sul e Mato
18 Grosso (Quadro 1). Destas propriedades foram selecionados, aleatoriamente, 12 lotes de
19 bovinos para serem amostrados que apresentavam, no mínimo 20 animais por lote, higidez de
20 todos os animais e ausência de dosificação anti-helmíntica nos últimos 60 dias. Foram
21 amostrados animais machos e fêmeas, de raças taurinas, zebuínas e cruzamentos
22 taurino/zebuíno. As amostras foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais,
23 identificadas individualmente, acondicionadas sob refrigeração e encaminhadas ao laboratório
24 de doenças parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

25

- 1 Quadro 1. Características dos lotes de bovinos utilizados para monitoramento de infecção por
2 nematodas gastrintestinais.

| Lote | Localidade | Tamanho do lote | Idade |
|-------------|---------------------------|------------------------|--------------|
| 1 | Terenos (MS) | 36 | 11-12m |
| 2 | Figueirão (MS) | 40 | 7-8m |
| 3 | Campo Grande (MS) | 44 | 3-8m |
| 4 | Ribas do Rio Pardo (MS) | 50 | 11-12m |
| 5 | Bela Vista (MS) | 55 | 4-6m |
| 6 | Rondonópolis (MT) | 59 | 11-12m |
| 7 | Campo Grande (MS) | 67 | 3-20m |
| 8 | Ribas do Rio Pardo (MS) | 79 | 12-15m |
| 9 | Miranda (MS) | 103 | 36-42m |
| 10 | Nova Alvorada do Sul (MS) | 107 | 7-12m |
| 11 | Bela Vista (MS) | 112 | 4-6m |
| 12 | Jaraguari (MS) | 123 | 7-8m |

3

4 2.1.2. Avaliação do nível de infecção

5 O nível de infecção por NGIs foi avaliado a partir da média das contagens de ovos nas
6 fezes individuais (COF individual) e da contagem de ovos de pool de fezes (COF pool) de
7 subamostras de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50% e 100% do lote. Para isso, foi realizado
8 inicialmente a COF individual de todas as amostras de cada lote, utilizando a técnica de
9 McMaster na sensibilidade 1:25. Posteriormente foram preparados *pools* de fezes das
10 subamostras do lote (sem repetição) e realizada a contagem de ovos dos *pools* de fezes (COF
11 *pool*), através da técnica de McMaster, na sensibilidade 1:25. Em casos de tamanhos de *pools*
12 com números decimais, o arredondamento foi sempre para o próximo número inteiro.

13 A seleção das subamostras que constituíram os *pools* foi de forma aleatória, sem que
14 houvesse a visualização da identificação das amostras (às cegas). A preparação dos *pools* de
15 fezes foi realizada de acordo com George et al. (2017) e a COF *pool* foi realizada de uma
16 alíquota de fezes retirada do *pool*. Após a preparação dos *pools* de fezes, as amostras
17 retornavam ao conjunto de todas as amostras do lote e foram redistribuídas manualmente,
18 permitindo a cada nova seleção de amostras, aleatoriedade na escolha.

1

2 *2.2. Teste de redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF)*

3 Foram realizados 11 TRCOF utilizando de 15 a 25 animais por teste, sendo 123 animais (F1
4 nelore x angus) com 8 meses de idade (propriedade A), 52 animais (nelore) com 12 meses de
5 idade (propriedade B) e 47 animais (F1 nelore x angus) com 18 meses de idade (propriedade
6 C). Os animais não haviam recebido tratamento anti-helmíntico nos 60 dias que antecederam
7 o teste. A quantidade de animais por teste variou de acordo com a disponibilidade de animais
8 no lote e a distribuição dos animais foi realizada de forma aleatória e sem COF prévia.

9 Foram realizadas sempre duas coletas de amostras de fezes para as contagens de ovos nas
10 fezes, sendo a primeira no dia do tratamento (pré-tratamento) e a segunda 14 dias após o
11 tratamento (pós-tratamento), sempre dos mesmos animais.

12 Os anti-helmínticos testados foram: Albendazole 5 mg/kg (n=1), Doramectina 200 µg/kg
13 (n=2), Ivermectina 700 µg/kg (n=1), Ivermectina 450 µg/kg + Abamectina 250 µg/kg (n=3),
14 Levamisol 4,7 mg/kg (n=2), Moxidectina 200 µg/kg (n=1) e Sulfóxido de Albendazole 3,4
15 mg/kg (n=1). A dose administrada seguiu as recomendações dos fabricantes e a escolha dos
16 anti-helmínticos foi determinada pelos responsáveis pelas propriedades.

17 A partir das amostras da coleta pré-tratamento, realizou-se inicialmente, a contagem de
18 ovos nas fezes individual (COF individual) de todas as amostras do teste, utilizando a técnica
19 de McMaster na sensibilidade 1:25. Posteriormente foram preparados os *pools* de fezes com
20 cinco amostras (*Pool* 5), dez amostras (*Pool* 10) e 15 a 25 amostras (*Pool* Total) e realizada a
21 contagem de ovos dos *pools* de fezes (COF *Pool*), através das técnicas de Mini-FLOTAC na
22 sensibilidade 1:5 e McMaster na sensibilidade 1:25 e 1:50, para cada tamanho de *pool*. O
23 número de *pools* realizados dependia da quantidade de animais utilizados em cada TRCOF
24 (Quadro 2).

25

1 Quadro 2. Número de *pools* realizados para diferentes números de animais por teste de
 2 redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF).

3

| Número de animais no TRCOF | Tamanho do <i>Pool</i> | Quantidade de <i>pools</i> |
|----------------------------|------------------------|----------------------------|
| 15-19 | 5 | 3 |
| | 10 | 1 |
| | Total | 1 |
| 20-24 | 5 | 4 |
| | 10 | 2 |
| | Total | 1 |
| 25 | 5 | 5 |
| | 10 | 2 |
| | Total | 1 |

4 *Adaptado de Rinaldi et al. (2014).

5

6 A seleção das amostras que constituíram os *pools* foi feita de forma aleatória, sem que
 7 houvesse a visualização da identificação das amostras (às cegas). A preparação dos *pools* de
 8 fezes foi realizada de acordo com George et al. (2017) e a COF *pool* foi realizada de uma
 9 alíquota de fezes retirada do *pool*, de acordo com a exigência de cada técnica de contagem. Os
 10 *pools* de fezes da coleta pós-tratamento foram feitos com as amostras dos mesmos animais
 11 utilizado no pré-tratamento (pareado).

12 A eficácia dos anti-helmínticos foi calculada para cada teste, de acordo com a seguinte
 13 fórmula: $100 \times (1 - (\text{COF pós-tratamento} / \text{COF pré-tratamento}))$. A população de NGIs foi
 14 classificada como sensível quando a eficácia anti-helmíntica foi maior que 95% e o limite
 15 inferior do intervalo de confiança de 95% (LI IC 95%) menor que 90% (Coles et al., 1992). A
 16 partir das COFs *pool*, apenas o critério de eficácia foi utilizado para a classificação de
 17 susceptibilidade anti-helmíntica.

18 A realização do estudo teve aprovação do comitê de ética de uso de animais da
 19 Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, sob registro nº 936/2018.

1

2 *2.3. Exames Coproparasitológicos*3 *2.3.1. McMaster modificado*

4 A técnica McMaster (Gordon e Whitlock, 1939) foi conduzida de acordo com as
5 modificações de Ueno e Gonçalves, (1998) em nível de sensibilidade 1:50 e 1:25 realizando a
6 leitura de uma e duas câmaras de McMaster, respectivamente.

7 *3.2.2 Mini-FLOTAC*

8 A técnica de Mini-FLOTAC (Cringoli et al., 2013) foi realizada de acordo com Noel et al.,
9 (2017) com as seguintes modificações: utilização de solução de flutuação de sulfato de
10 magnésio (1.2 g/ml), não utilização de Fill-FLOTAC, tempo para flutuação dos ovos de cinco
11 minutos.

12 *2.3.3. Coprocultura*

13 As culturas das fezes foram realizadas de acordo com Roberts e O'Sullivan, (1950) com a
14 seguinte modificação: utilização de vermiculita expandida em substituição as fezes de bovinos
15 seca e esterilizada. A classificação genérica das larvas infectantes seguiu a descrição de Ueno
16 e Goncalves, (1998).

17

18 *2.4. Análise estatística*

19 Uma análise descritiva das COFs individuais para o monitoramento de infecção por NGIs
20 foi realizada, calculando a média aritmética, a COF mínima e máxima, a porcentagem de
21 amostras com COF nula (0 OPG) e o nível de agregação de cada um dos 12 lotes de bovinos
22 avaliados. O nível de agregação, apresentado pelo coeficiente k, foi calculado de acordo com
23 Smith e Guerrero, (1993).

24 Os dados de COF *pool* e individual de cada tamanho de *pool* (subamostras), para
25 monitoramento de infecção por NGIs, foram analisados segundo um modelo inteiramente

1 casualizado, que considerou uma distribuição de Poisson dos dados e o efeito do número de
2 animais de cada lote como covariável. Já os dados de eficácia dos TRCOFs foram analisados
3 seguindo o mesmo procedimento, mas considerando ainda, os efeitos aleatórios da
4 propriedade e do vermífugo utilizado, o número de animais avaliados em cada lote e COF
5 inicial. Utilizou-se o PROC GLIMMIX do Sas University (Sas Institute Inc., Cary, CA) para
6 estas análises. Quando observado efeito do tamanho de pool, as médias das COFs *pool* foram
7 comparadas a média das COFs individuais de todos os animais de cada lote pelo teste de
8 Dunnett. Para a avaliação da capacidade de predição das COFs *pool* para monitoramento de
9 infecção por NGIs e TRCOF, os dados preditos (média COF *pool*) pelos diferentes tamanhos
10 de *pool* foram comparados aos dados observados nas COFs individuais de todos os animais de
11 cada lote, segundo as sugestões de Tedeschi et al. (2006). Foram utilizados nesta avaliação o
12 coeficiente de determinação (R²), o teste de identidade dos parâmetros (a=0 e b=1) da
13 equação de regressão linear dos dados preditos pelos observados, análise de momento (média
14 e desvio padrão), o coeficiente de correlação e concordância (CCC) e a raiz do quadrado
15 médio do erro da predição (RQMEP). Utilizou-se o software Model Evaluation System (MES
16 – Nutrition Models, TAMU, College Station, Tx) nestas análises. Adotou-se o nível de 5% de
17 probabilidade em todas as análises estatísticas.

18

19 **3. Resultados**

20 3.1. *Monitoramento de infecção por NGIs*

21 3.1.1. Infecções por NGIs

22 O nível de infecção médio de 83% dos lotes avaliados esteve abaixo de 200 OPG (média=
23 79,9), que de acordo com Ueno e Gonçalves (1998), considera-se uma infecção leve para
24 infecções mista. Os gêneros de NGIs presentes nas infecções foram *Cooperia* spp. (52,7%),
25 *Haemonchus* spp. (39,1%), *Oesophagostomum* spp. (8,0%) e *Trichostrongylus* spp. (0,2%). O

1 nível de agregação foi elevado, visto que 92% dos lotes avaliados apresentavam um
2 coeficiente k abaixo de 0,6 (média= 0,401) (Tabela 1).

3 3.1.2. Avaliação do nível de infecção por COF individual de subamostras

4 A média das COF individuais das subamostras de 5%, 10% e 15% do lote diferiram
5 significativamente da média das COFs individuais do lote, subestimando o nível de infecção
6 dos lotes, enquanto as médias das subamostras de 20%, 25% e 50% permitiram uma boa
7 estimativa do nível de infecção, pois não diferiram significativamente das COFs individuais
8 (Figura 1). O aumento do tamanho das subamostras, a partir de 20%, proporcionou um
9 aumento do coeficiente de determinação (R^2) e coeficiente de correlação e concordância
10 (CCC) e uma redução dos erros de predição (Tabela 2).

11 Nas subamostras de 10% do lote, o R^2 e CCC foram elevados, os erros de predição foram
12 os menores dentre as subamostras avaliadas porém houve diferença significativa ($p<0,01$) no
13 teste de identidade dos parâmetros ($a=0$, $b=1$), demonstrando não haver equivalência entre a
14 linha de tendência da regressão linear e linha identidade. Nas subamostras de 5 e 15% do lote,
15 o R^2 e CCC foram elevados mas com superioridade das subamostras de 15%, não houve
16 diferença nos testes de identidade dos parâmetros ($a=0$, $b=1$) de ambas as subamostras, mas as
17 predições erraram, em média, 65,5 e 44,9 OPG, respectivamente, representando os maiores
18 erros de predição dentre as subamostras avaliadas. Os CCCs estiveram sempre acima de 0,80
19 nas subamostras de 10 a 50% do lote (Tabela 2).

20 3.1.3. Avaliação do nível de infecção por COF *pool* de subamostras

21 As contagens de ovos de *pool* de fezes das subamostras de 5%, 10%, 20%, 25%, 50% e
22 100% diferiram significativamente ($p<0,0001$) da média das COF individuais dos lotes. Com
23 exceção às COFs *pools* das subamostras de 5% do lote, houve uma superestimação
24 significativa do nível de infecção dos lotes nas demais subamostras (Figura 2).

1 As COFs *pools* das subamostras apresentaram coeficientes de determinação de -0,52 a 0,79
2 e houve diferença significativa nos testes de identidade dos parâmetros ($a=0$, $b=1$) nas
3 subamostras de 10 a 100% dos lotes, além disso, os CCCs foram baixos a moderados,
4 variando de 0,26 a 0,75 e os erros de predição foram de 69,9 a 181,9 OPG, representando de
5 62,1 a 161,7% da média das COFs individuais dos lotes (Tabela 3).

6 3.2. TRCOF

7 3.2.1. Eficácia anti-helmíntica

8 Os resultados dos testes de redução da contagem de ovos nas fezes obtidos de COF
9 individuais estão expressos na Tabela 4. Apenas as eficácias médias obtidas nas técnicas de
10 Mini-FLOTAC e McMaster 1:50 com *pool* total diferiram significativamente ($p<0,05$) da
11 eficácia média obtida de COF individual de todas as amostras dos testes (Figura 3).

12 Os coeficientes de determinação e os CCCs foram baixos a moderados, variando de 0,36 a
13 0,75 e 0,36 a 0,78, respectivamente. De acordo com os testes de identidade dos parâmetros
14 ($a=0$, $b=1$), não houve equivalência ($p<0,05$) das linhas de tendência das regressões lineares
15 com as linhas identidade respectivas, exceto no *pool* 5 na técnica Mini-FLOTAC. Os erros de
16 predição variaram de 21,7 a 35,8% de eficácia, representando de 31,3 a 51,5% da eficácia
17 média obtida de COF individuais, demonstrando uma baixa precisão dos TRCOFs. A análise
18 de ranking, baseada na correlação de Spearman's, demonstraram coeficientes de correlação de
19 moderados a altos, com média de 0,70 (Tabela 5).

20 3.2.2. Classificação de susceptibilidade anti-helmíntica

21 As classificações obtidas pela técnica de MM50 diferiram ($p<0,05$) das classificações da
22 técnica padrão (COF individuais) nos *pools* 5, 10 e total ($p<0,05$), enquanto que na técnica de
23 MM25 a diferença se deu apenas no *pool* total. Na técnica de MF não houve diferença

1 significativa na classificação de susceptibilidade anti-helmíntica ($p=0,11$), independentemente
2 do tamanho do *pool*.

3

4 **4. Discussão**

5 A característica geral da infecção por NGIs dos lotes de bovinos avaliados foi de uma
6 infecção leve com elevado nível de agregação e prevalência de nematodas gastrintestinais dos
7 gêneros *Haemonchus* e *Cooperia*, um padrão de infecção esperado para a espécie hospedeira,
8 na região do estudo (Grenfell et al., 1995; Santos et al., 2010).

9 Tem-se discutido na literatura uma influência dos gêneros de NGIs das infecções no nível
10 de agregação e na qualidade das COF devido a diferenças de potencial biótico entre os
11 gêneros (Smith e Guerrero, 1993; Ward et al., 1997; Morgan et al., 2005), no entanto, a partir
12 dos lotes de bovinos avaliados, não foi possível associar o nível de agregação com o potencial
13 biótico dos gêneros de NGIs envolvidos nas infecções.

14 A avaliação de nível de infecção por NGIs a partir de COF individuais de subamostras,
15 mostrou-se eficaz para monitorar infecções em lotes bovinos a partir de uma amostragem de
16 20% do lote. Gordon (1967) afirmou que para ovinos, uma amostra de 5 a 10% do lote seria
17 suficiente para avaliação do nível de infecção, entretanto para bovinos essa amostragem não
18 foi representativa, uma vez que, em os níveis de infecção por NGIs em bovinos é menor que
19 em ovinos, logo tem-se a necessidade de uma amostragem de maior tamanho em
20 compensação ao nível de infecção. Subamostras inferiores a 20% do lote não predisseram
21 corretamente o nível de infecção, pois em amostras de tamanho reduzido com elevada
22 agregação, aumenta-se a probabilidade de subestimar parâmetros como média e variância,
23 pelo simples fato de pequenas amostras terem baixa probabilidade de detectar os poucos
24 hospedeiros com elevada infecção (Pacala e Dobson, 1988; Gregory e Woolhouse, 1993).

1 Ao avaliar o nível de infecção por NGIs a partir de COF *pool* de subamostras, não foi
2 possível prever adequadamente o nível de infecção dos lotes, dadas as diferenças
3 significativas das médias das COFs individuais e *pool*, os elevados erros de predição e os
4 CCCs baixos a moderados. Os erros de predição das COFs individuais das subamostras
5 representaram, em média, 34 % da média das COFs individuais do lote, enquanto os erros de
6 predição das COFs *pool* das subamostras representaram, em média, 112%, ou seja, um
7 aumento de 78%. O fato das médias de COF *pool* das subamostras de 15% não diferirem da
8 média das COFs individuais do lote, aponta para uma limitação da comparação de médias
9 neste tipo de análise, pois apesar da média geral das COFs *pool* e individuais terem sido
10 semelhantes, uma observação mais detalhada de cada COF *pool* e de sua correspondente
11 média das COFs individuais mostra resultados muito distintos (Figura 4). Pode-se verificar
12 que os R^2 e CCC foram baixos e erros de predição chegaram a 72% da média observada
13 (Tabela 3), demonstrando um ajuste inadequado dos resultados das avaliações. Até o
14 momento, não há dados na literatura que comprovem a representatividade de COF *pool* para
15 verificar o nível de infecção de lotes de bovinos, sendo este o primeiro estudo com este
16 objetivo.

17 De acordo com Morgan et al. (2005), os erros de estimativas de COF *pool* (sub e
18 superestimação) podem ser reduzidos com o aumento do tamanho do *pool* e redução do nível
19 de agregação (aumento do coeficiente k), no entanto, no presente estudo, o aumento do
20 tamanho *pool* não proporcionou redução dos erros de estimativas, visto que as médias das
21 COFs *pool* foram estatisticamente superiores às médias das COFs individuais, em
22 praticamente todas as subamostras (10%, 20%, 25%, 50% e 100%).

23 Considerando uma amostra fecal em que os elementos parasitários (ovos) estejam
24 igualmente distribuídos, se repetidas contagens de ovos desta amostra forem realizadas,
25 variações das contagens serão inevitáveis, em virtude da distribuição de Poisson (Torgerson et

1 al., 2012). No entanto, como a proposta de Baldock et al. (1990) é que uma única contagem
2 de ovos de um agrupamento de amostras fecais seja equivalente a média das COFs
3 individuais, as variações inerentes ao processo de Poisson podem ter sido significativas e
4 terem contribuído para a incapacidade das COFs *pool* de avaliar infecções por NGIs em lotes
5 de bovinos com baixo nível de infecção e elevada agregação. As falhas de amostragem não
6 afetaram as avaliações de COF individuais de subamostras maior ou igual a 20% do lote,
7 devido a equivalência entre as COFs *pools* e individuais e a técnica de COF foi igualmente
8 realizada para ambas as estratégias de avaliação, o que reforça a hipótese da influência dos
9 erros de Poisson sobre as COFs *pool*.

10 Contrapondo a proposta inicial de Baldock et al. (1990), a realização de repetidas COFs
11 *pools* poderiam minimizar esses erros (Torgerson et al., 2012), no entanto, a viabilidade dessa
12 alternativa deve ser ponderada, uma vez que, a operacionalidade laboratorial e possivelmente
13 os custos, serão aumentados, confrontando o princípio do uso de amostras fecais compostas
14 que seria a redução destes fatores buscando viabilizar a realização de COF e TRCOF em
15 bovinos.

16 Ainda que as eficácias obtidas de COFs *pools* de 5 e 10 amostras não tenham dada
17 diferença significativas das eficácias obtidas de COFs individuais, os elevados erros de
18 predição limitam a aplicação desta estratégia à situações em que não se exija elevada acurácia
19 e precisão dos TRCOF, por exemplo, uma triagem da eficácia dos anti-helmínticos em uma
20 propriedade de criação ou quando haja limitações de recursos humanos e/ou laboratoriais.

21 As classificações de susceptibilidade anti-helmíntica foram afetadas pela sensibilidade
22 analítica, possivelmente em virtude dos baixos níveis de infecção. Foi demonstrado por meio
23 de uma regressão logarítmica, uma considerável redução da sensibilidade da técnica de
24 McMaster 1:50 em COF abaixo de 100 OPG em ovinos (Rinaldi et al., 2014), com isso é
25 possível que haja um aumento do aparecimento de resultados falso-negativo comprometendo

1 as classificações da populações de NGIs, principalmente sob reduzida sensibilidade analítica.
2 A influência da sensibilidade analítica sobre as classificações também foi observada em
3 ovinos quando TRCOF eram realizados a partir de COF *pool* (Kenyon et al., 2016). Portanto,
4 classificações de susceptibilidade anti-helmíntica realizadas a partir de COFs *pools* devem ser
5 obtidas preferencialmente com técnicas de elevada sensibilidade analítica.

6

7 **5. Conclusão**

8 As amostras fecais compostas não permitiram avaliar de forma representativa o nível de
9 infecção por nematodas gastrintestinais de lotes de bovinos, sob baixo nível de infecção e
10 elevado nível de agregação, no entanto, COFs individuais de subamostras maior ou igual a
11 20% do lote permitiram monitorar o nível de infecção de lotes de bovinos. Os TRCOF
12 realizados por meio de amostras fecais compostas, não predisseram precisamente a eficácia
13 anti-helmíntica, sendo essa eventualmente mais influenciada pelo tamanho dos *pools* de fezes,
14 enquanto a classificação da susceptibilidade anti-helmíntica foi mais afetada pela
15 sensibilidade analítica das técnicas de COF.

16

17 **Agradecimentos**

18 Agradecemos o apoio financeiro do CNPq na concessão de bolsa de mestrado ao primeiro
19 autor.

20

21 **Referências**

22 Anderson, R.M., Gordon, D.M., 1982. Processes influencing the distribution of parasite
23 numbers within host populations with special emphasis on parasite-induced host
24 mortalities. *Parasitology* 85, 373-389.

- 1 Baldock, F.C., Lyndal-Murphy, M., Pearse, B., 1990. An assessment of a composite sampling
2 method for counting strongyle eggs in sheep faeces. *Aust. Vet. J.* 67, 165–167.
- 3 Borges, F.A., Almeida, G.D., Heckler, R.P., Lemes, R.T., Onizuka, M.K.V., Borges, D.G.L.,
4 2013. Anthelmintic resistance impact on beef cattle productivity: effect on weight gain of
5 weaned calves. *Trop. Anim. Health. Prod.* 45, 723–727.
- 6 Brundson, R.V., 1970. Within-flock variations in strongyle worm infections in sheep: the
7 need for adequate diagnostic samples. *N. Z. Vet. J.* 18, 185–188.
- 8 Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., Samson-Himmelstjerna G. v.
9 Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruyse, J., 2006. The detection of anthelmintic resistance
10 in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 136, 167–185
- 11 Cringoli, G., Rinaldi, L., Albonico, M., Bergquist, R., Utzinger, J., 2013. Geospatial(s) tools:
12 integration of advanced epidemiological sampling and novel diagnostics. *Geospat. Health*
13 7, 399–404.
- 14 Delgado, F. E. F., Lima, W.S., Cunha, A.P., Bello, A.C.P.P., Domingues, L.N., Wanderley,
15 R.P.B., Leite, P.V.B., Leite, R.C. 2009. Verminoses dos bovinos: percepção de
16 pecuaristas em Minas Gerais, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 18, 29-33.
- 17 Eysker, M., Bakker, J., van den Berg, M., van Doorn, D.C., Ploeger, H.W., 2008. The use of
18 age-clustered pooled faecal samples for monitoring worm control in horses. *Vet.*
19 *Parasitol.* 151, 249–255.
- 20 Gasbarre, L.C., Ballweber, L.R., Stromberg, B.E., Dargatz, D.A., Rodriguez, J.M., Koprak,
21 C.A., Zarlenga, D.S., 2015. Effectiveness of current anthelmintic treatment programs on
22 reducing fecal egg counts in United States cow-calf operations. *Can. J. Vet. Res.* 79, 296–
23 302.

- 1 George, M.M., Paras, K.L., Howell, S.B., Kaplan, R.M., 2017. Utilization of composite fecal
2 samples for detection of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of cattle.
3 *Vet. Parasitol.* 204, 24-29.
- 4 Gordon, H.McL., Whitlock, H.V., 1939. A new technique for counting nematode eggs in
5 sheep faeces. *J. Counc. Sci. Ind. Res.* 12, 50-52.
- 6 Grenfell, B.T., Wilson, K., Isham, V.S., Boyd, H.E.G., Dietz, K., 1995. Modelling patterns of
7 parasite aggregation in natural populations: trichostrongylid nematode–ruminant
8 interactions as a case study. *Parasitology* 111, S135–S151
- 9 Heckler, R. P., Borges, D. G. L., Vieira, M. C., Conde, M. H., Green, M., Amorim, M. L.,
10 Echeverria, J. T., Oliveira, T. L., Moro, E., Van Onselen, V. J., Borges, F. A., 2016. New
11 approach for the strategic control of gastrointestinal nematodes in grazed beef cattle
12 during the growing phase in central Brazil. *Vet. Parasitol.* 221, 123-129.
- 13 Höglund, J., Hessle, A., Zaralis, K., Arvidsson-Segerkvist, K., Athanasiadou, S. 2018. Weight
14 gain and resistance to gastrointestinal nematode infections in two genetically diverse
15 groups of cattle. *Vet. Parasitol.* 249, 88-91.
- 16 Kenyon, F., Rinaldi, L., McBean, D., Pepe, P., Bosco, A., Melville, L., Devin, L., Mitchell,
17 G., Ianniello, D., Charlier, J., Vercruysse, J., Cringoli, G., Levecke, B., 2016. Pooling
18 sheep faecal samples for the assessment of anthelmintic drug efficacy using McMaster
19 and Mini-FLOTAC in gastrointestinal strongyle and *Nematodirus* infection. *Vet.*
20 *Parasitol.* 225, 53–60.
- 21 Levecke, B., Rinaldi, L., Charlier, J., Maurelli, M.P., Bosco, A., Vercruysse, J., Cringoli, G.,
22 2012. The bias, accuracy and precision of faecal egg count reduction test results in cattle
23 using McMaster, Cornell-Wisconsin and FLOTAC egg counting methods. *Vet. Parasitol.*
24 188, 194-199.

- 1 Levecke, B., Rinaldi, L., Charlier, J., Maurelli, M.P., Morgoglione, M.E., Vercruysse, J.,
2 Cringoli, G., 2011. Monitoring drug efficacy against gastrointestinal nematodes when
3 faecal egg counts are low: do the analytic sensitivity and the formula matter? *Parasitol.*
4 *Res.* 109, 953–957.
- 5 Morgan, E.R., Cavill, L., Curry, G.E., Wood, R.M., Mitchell, E.S.E., 2005. Effects of
6 aggregation and sample size on composite faecal egg counts in sheep. *Vet. Parasitol.* 131,
7 79–87.
- 8 Nicholls, J., Obendorf, D.L., 1994. Application of a composite faecal egg count procedure in
9 diagnostic parasitology. *Vet. Parasitol.* 52, 337–342.
- 10 Noel, M.L., Scare, J.A., Bellaw, J.L., Nielsen, M.K., 2017. Accuracy and precision of mini-
11 FLOTAC and McMaster techniques for determining equine strongyle egg counts. *J.*
12 *Equine Vet. Sci.* 48, 182–187 (e181).
- 13 Pacala, S.W., Dobson, A.P., 1988. The relationship between the number of parasites/host and
14 host age: population dynamic causes and maximum likelihood estimation. *Parasitol.* 96,
15 197-210.
- 16 Rinaldi, L., Levecke, B., Bosco, A., Ianniello, D., Pepe, P., Charlier, J., Cringoli, G.,
17 Vercruysse, J. 2014. Comparison of individual and pooled faecal samples in sheep for the
18 assessment of gastrointestinal strongyle infection intensity and anthelmintic drug efficacy
19 using McMaster and Mini-FLOTAC. *Vet. Parasitol.* 205, 216-223.
- 20 Roberts, F.H.S., O'sullivan, P.J. 1950. Methods for egg counts and larval cultures for
21 strongyles infecting the gastro-intestinal tract of cattle. *Aust. J. Agric. Res.* 1, 99-102.
- 22 Santos, T.R., Lopes, W.D.Z., Buzulini, C., Borges, F.A., Sakamoto, C.A.M., Lima, R.C.A.,
23 Oliveira, G.P., Costa, A.J. 2010. Helminth fauna of bovines from the Central-Western
24 region, Minas Gerais State, Brazil. *Ciênc. Rural*, 40, 934-938.

- 1 Smith, G., Guerrero, J. 1993. Mathematical models of the population biology of *Ostertagia*
2 *ostertagi* and the significance of aggregated parasite distributions. *Vet. Parasitol.* 46, 243–
3 257.
- 4 Tedeschi, L.O. 2006. Assessment of the adequacy of mathematical models. *Agric. Syst.* 89,
5 255-247.
- 6 Torgerson, P.R.; Paul, M.; Lewis, F.I. 2012. The contribution of simple random sampling to
7 observed variations in faecal egg counts. *Vet. Parasitol.* 188, 397–401.
- 8 Ueno, H., Gonçalves, P.C. (Eds.), 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de
9 ruminantes. JICA, Tokyo, 166p.
- 10 USDA, 2009. Beef 2007–08: part IV: reference of beef cow-calf management practices in the
11 United States, 2007-08. USDA-APHIS National Animal Health Monitoring System.
12 USDA APHIS Veterinary Services, Fort Collins; USA.
- 13 Ward, M.P., Lyndal-Murphy, M., Baldock, F.C. 1997. Evaluation of a composite method for
14 counting helminth eggs in cattle faeces. *Vet. Parasitol.* 73, 181-187.
- 15
- 16

Tabela 1. Contagens de ovos nas fezes individuais (COF), nível de agregação (coeficiente k) e prevalência dos gêneros de nematodas gastrintestinais dos 12 lotes de bovinos avaliados.

| Lote | COF (opg) | | COF nula (0 opg) | Coeficiente k | Gêneros | | | |
|-----------|-----------|-----------|---------------------|------------------|---------|-------|-------|------|
| | Média | Min.-Máx. | | | H | C | O | T |
| 1 | 264,6 | 0-2150 | 6% | 0,401 | 14,0% | 77,0% | 9,0% | 0,0% |
| 2 | 40,6 | 0-475 | 38% | 0,216 | 6,3% | 92,3% | 1,3% | 0,0% |
| 3 | 64,2 | 0-475 | 32% | 0,433 | 77,0% | 23,0% | 0,0% | 0,0% |
| 4 | 65,0 | 0-575 | 42% | 0,281 | 42,4% | 55,4% | 2,2% | 0,0% |
| 5 | 285,9 | 0-1075 | 2% | 1,804 | 32,8% | 63,3% | 3,8% | 0,0% |
| 6 | 154,7 | 0-1100 | 15% | 0,605 | 49,3% | 30,1% | 20,6% | 0,0% |
| 7 | 89,2 | 0-875 | 42% | 0,272 | 74,3% | 16,3% | 7,7% | 1,3% |
| 8 | 107,6 | 0-775 | 19% | 0,558 | - | - | - | - |
| 9 | 26,7 | 0-150 | 59% | 0,396 | 6,3% | 89,3% | 4,3% | 0,0% |
| 10 | 60,0 | 0-750 | 45% | 0,299 | 7,0% | 57,0% | 35,0% | 1,0% |
| 11 | 97,1 | 0-1050 | 20% | 0,553 | 47,3% | 51,2% | 1,5% | 0,0% |
| 12 | 93,6 | 0-1125 | 28% | 0,404 | 73,2% | 24,3% | 2,5% | 0,0% |

Tabela 2. Avaliação do ajuste dos dados preditos pela contagem de ovos nas fezes individuais de subamostras aos dados de contagem de ovos nas fezes individuais de todos os animais de cada lote.

| Subamostras | Regressão linear | | Análise de momento | | CCC | RQMEP | |
|-------------|------------------|------------------------|--------------------|-------|------|-------|--------------|
| | R ² | p-value* (a=0, b=1) | Média (OPG) | DP | | OPG | % da média** |
| 5% | 0.79 | 0.27 | 96.78 | 85.89 | 0.68 | 65.48 | 58.19 |
| 10% | 0.92 | 0.02 | 101.43 | 91.50 | 0.97 | 18.98 | 16.87 |
| 15% | 0.93 | 0.38 | 94.28 | 66.75 | 0.81 | 44.91 | 39.91 |
| 20% | 0.65 | 0.58 | 107.95 | 59.56 | 0.82 | 41.04 | 36.48 |
| 25% | 0.73 | 0.56 | 110.80 | 87.94 | 0.95 | 26.12 | 23.22 |
| 50% | 0.89 | 0.06 | 119.63 | 99.97 | 0.93 | 32.89 | 29.23 |
| 100% | - | - | 112.53 | 83.13 | - | - | - |

R²: Coeficiente de Determinação; DP: Desvio Padrão; CCC: Coeficiente de Correlação e Concordância; RQMEP: Raiz do Quadrado Médio do Erro da Predição. *Teste de Identidade dos parâmetros da regressão dos dados preditos pelos observados. **Percentual do erro em relação à média das contagens de ovos individuais dos lotes (100%).

Tabela 3. Avaliação do ajuste dos dados preditos pela contagem de ovos de *pools* de fezes de subamostras aos dados observados nas contagens de ovos nas fezes individuais de todos os animais de cada lote.

| Subamostra | Regressão linear | | Análise de momento | | | RQMEP | |
|------------|------------------|------------------------|--------------------|--------|------|--------|---------------|
| | R ² | p-value* (a=0, b=1) | Média (OPG) | DP | CCC | OPG | % da média ** |
| 5% | 0.04 | 0.198 | 75.00 | 61.24 | 0.51 | 73.67 | 65.47 |
| 10% | 0.50 | <0.001 | 154.17 | 202.21 | 0.48 | 153.19 | 136.14 |
| 15% | 0.52 | 0.067 | 112.50 | 106.87 | 0.60 | 81.83 | 72.72 |
| 20% | 0.79 | 0.002 | 160.42 | 107.90 | 0.75 | 69.88 | 62.10 |
| 25% | 0.60 | <0.001 | 177.08 | 184.16 | 0.51 | 142.66 | 126.78 |
| 50% | -0.01 | <0.001 | 162.50 | 197.57 | 0.26 | 181.93 | 161.68 |
| 100% | -0.52 | <0.001 | 170.83 | 197.67 | 0.30 | 178.44 | 158.57 |

R²: coeficiente de determinação; DP: Desvio Padrão; CCC: Coeficiente de Correlação e Concordância; RQMEP: Raiz do Quadrado Médio do Erro da Predição. *Teste de Identidade dos parâmetros da regressão dos dados preditos pelos observados. **Percentual do erro em relação à média das contagens de ovos individuais dos lotes (100%).

Tabela 4. Resultados dos 11 testes de redução da contagem de ovos nas fezes obtidos de contagem de ovos nas fezes individuais.

| Propriedade | Princípio Ativo | Quantidade de animais | COF pré-tratamento (OPG) | | Eficácia (%) | L.I. IC 95% (%) | L.S. IC 95% (%) | Classificação* |
|-------------|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------|-------|--------------|-----------------|-----------------|----------------|
| | | | Média | DP | | | | |
| A | Doramectina 1% "A" | 24 | 85.4 | 99.7 | 31.3 | 0.0 | 67.9 | Resistente |
| A | Albendazol 10% | 25 | 135.0 | 232.2 | 100.0 | - | - | Sensível |
| A | Moxidectina 1% | 24 | 70.8 | 84.3 | 68.1 | 0.0 | 92.2 | Resistente |
| A | Sulfóxido de Albendazol 15% | 25 | 92.0 | 135.2 | 74.1 | 15.4 | 92.0 | Resistente |
| A | Levamisol 18.8% | 25 | 91.0 | 145.6 | 96.6 | 81.6 | 99.4 | Resistente |
| B | Ivermectina 2.25% + Abamectina 1.25% | 18 | 111.1 | 94.4 | 65.0 | 22.5 | 84.2 | Resistente |
| B | Ivermectina 2.25% + Abamectina 1.25% | 17 | 170.6 | 133.2 | 28.4 | 0.0 | 66.3 | Resistente |
| B | Ivermectina 2.25% + Abamectina 1.25% | 17 | 145.6 | 257.4 | 54.5 | 0.0 | 84.2 | Resistente |
| C | Doramectina 1% "B" | 16 | 112.5 | 85.1 | 41.6 | 0.0 | 66.4 | Resistente |
| C | Levamisol 18.8% | 18 | 193.1 | 140.1 | 100.0 | - | - | Sensível |
| C | Ivermectina 3.5% | 13 | 188.5 | 202.7 | 78.5 | 44.3 | 91.7 | Resistente |

DP: Desvio Padrão; L.I. IC 95%: Limite Inferior do Intervalo de Confiança de 95%; L.S. IC 95%: Limite Superior do Intervalo de Confiança de 95%.

*A classificação da susceptibilidade anti-helmíntica seguiu os critérios descritos por Coles et al. (1992).

Tabela 5. Avaliação do ajuste dos dados de eficácia preditos pelas contagens de ovos de *pools* de fezes de subamostras aos dados de eficácia observados nas contagens de ovos nas fezes individuais de todas as amostras de cada teste.

| Subamostras | Regressão Linear | | Eficácia (%) | | CCC | Análise de Ranking | | RQMEP | |
|-----------------------|------------------|------------------------|--------------|-------|------|--------------------|---------|--------------|--------------|
| | R ² | p-value* (a=0, b=1) | média | DP | | r | p-value | Eficácia (%) | % da média** |
| Individual | - | - | 69.43 | 26.16 | - | - | - | - | - |
| <i>Pool</i> 5 MF | 0.57 | 0.051 | 77.62 | 32.78 | 0.69 | 0.67 | 0.017 | 22.83 | 32.88 |
| <i>Pool</i> 5 M25 | 0.65 | 0.007 | 70.13 | 40.19 | 0.78 | 0.90 | 0.000 | 21.75 | 31.33 |
| <i>Pool</i> 5 M50 | 0.60 | 0.015 | 83.28 | 33.77 | 0.62 | 0.71 | 0.010 | 26.64 | 38.37 |
| <i>Pool</i> 10 MF | 0.60 | 0.033 | 76.18 | 35.13 | 0.72 | 0.80 | 0.002 | 22.55 | 32.47 |
| <i>Pool</i> 10 M25 | 0.60 | 0.029 | 79.23 | 34.32 | 0.59 | 0.77 | 0.003 | 27.06 | 38.97 |
| <i>Pool</i> 10 M50 | 0.75 | 0.012 | 81.26 | 36.60 | 0.36 | 0.37 | 0.242 | 35.62 | 51.29 |
| <i>Pool</i> Total MF | 0.50 | 0.002 | 61.21 | 47.08 | 0.54 | 0.67 | 0.016 | 35.40 | 50.99 |
| <i>Pool</i> Total M25 | 0.36 | 0.003 | 66.15 | 46.60 | 0.51 | 0.61 | 0.034 | 35.79 | 51.55 |
| <i>Pool</i> Total M50 | 0.70 | 0.000 | 61.31 | 52.00 | 0.66 | 0.82 | 0.001 | 33.06 | 47.61 |

R²: coeficiente de determinação; DP: Desvio Padrão; CCC: Coeficiente de Correlação e Concordância; r: Coeficiente de correlação de Spearman's; RQMEP: Raiz do Quadrado Médio do Erro da Predição. *Teste de Identidade dos parâmetros. **Percentual do erro em relação à média das eficácias obtidas das contagens de ovos nas fezes individuais de todas amostras do teste (Individual).

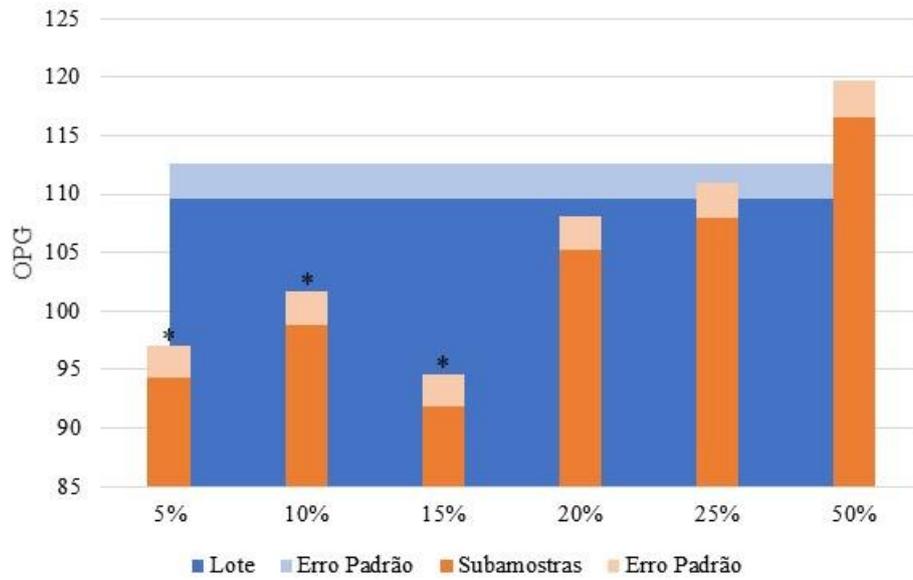


Figura 1. Médias e erro padrão das contagens de ovos nas fezes individuais de 100% das amostras dos lotes (lote) e das subamostras do lote (5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 50%). *Diferença significativa em relação à média de 100% do lote.

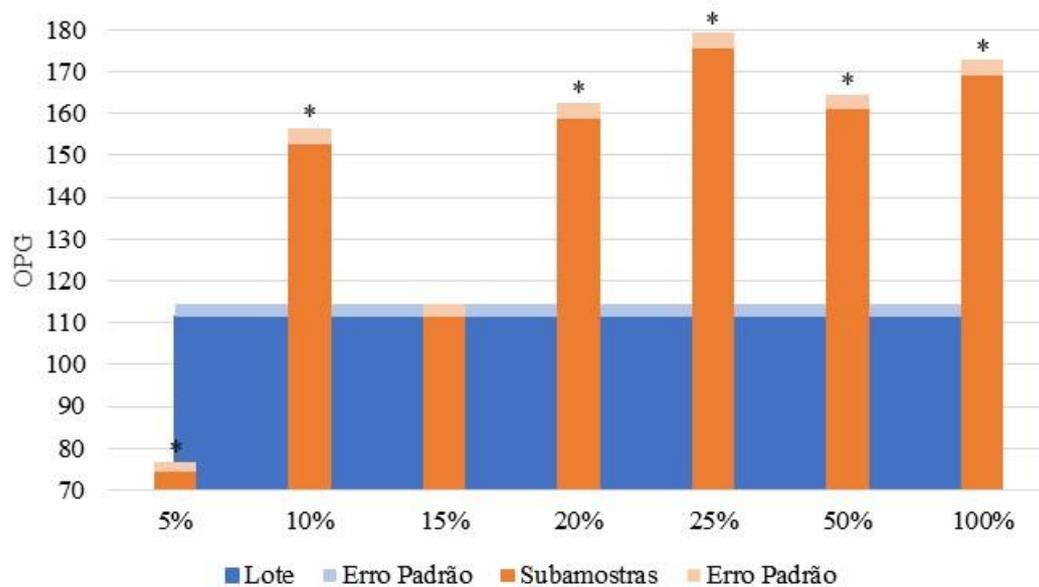


Figura 2. Médias e erro padrão das contagens de ovos nas fezes individuais de 100% das amostras dos lotes (lote) e das contagens de ovos de *pool* fezes das subamostras do lote (5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 50%). *Diferença significativa em relação à média de 100% do lote.

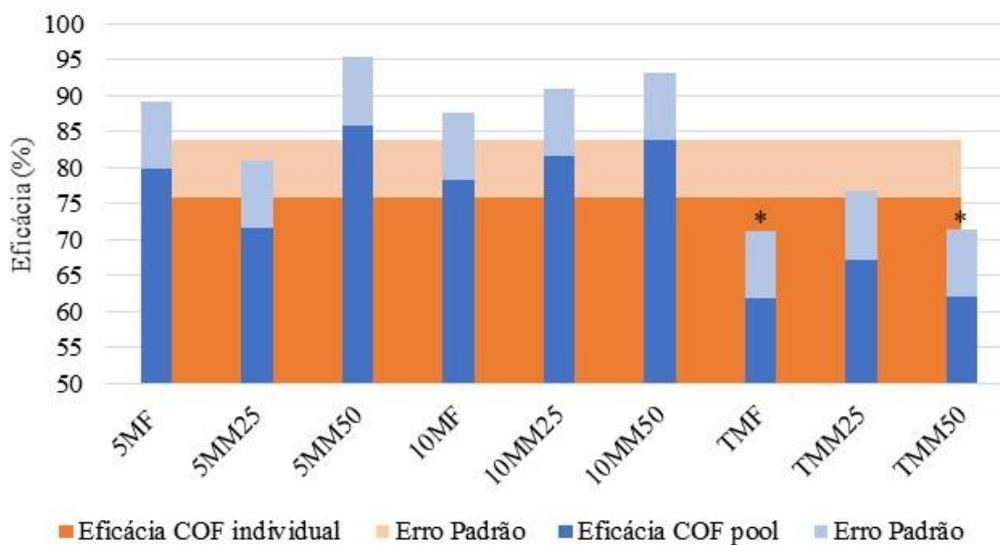


Figura 3. Médias e erro padrão das eficácias obtidas de contagens de ovos nas fezes individuais (COF individual) e contagens de ovos de *pool* fezes (COF *pool*) nos diferentes tamanhos de pool (5 amostras – pool 5; 10 amostras – pool 10; 13 a 25 amostras – pool total) e sensibilidade analítica (Mini-FLOTAC 1:5 – MF; McMaster 1:25 – MM25; McMaster 1:50 – MM50). 5MF: pool 5 com MF; 5MM25: pool 5 com MM25; 5MM50: pool 5 com MM50; 10MF: pool 10 com MF; 10MM25: pool 10 com MM25; 10MM50: pool 10 com MM50; TMM: pool total com MF; TMM25: pool total com MM25; TMM50: pool total com MM50. *Diferença significativa em relação à eficácia da COF individual.

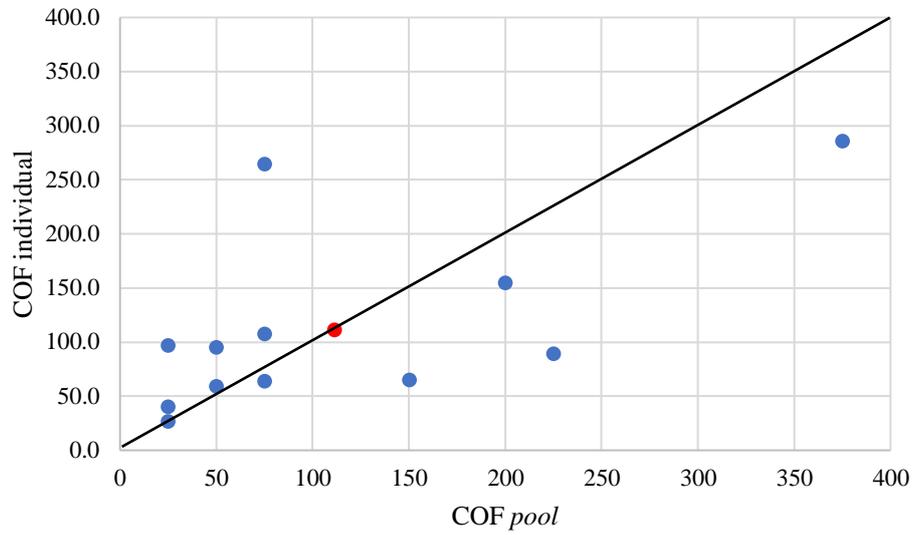


Figura 4. Gráfico de dispersão das contagens de ovos nas fezes individuais (COF individual) e contagens de ovos de *pools* de fezes (COF *pool*) das subamostras de 15% do lote. Ponto vermelho representa a média das COFs *pools* e individuais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As avaliações do uso de *pool* de fezes para COF aplicadas ao monitoramento de infecção por NGIs e TRCOF em bovinos, sob as condições do presente estudo, mostraram uma realidade diferente daquela apresentada pela literatura até o momento, em que, as amostras fecais compostas mostrou-se um método válido para redução da operacionalidade laboratorial e à campo.

A partir deste estudo, certas características, como nível de infecção, sensibilidade analítica e tamanho da amostra, devem ser consideradas antes de se adotar ou recomendar o uso de *pool* de fezes para COF de bovinos.

Ainda se faz necessário mais estudos para verificação da influência de técnica de elevada sensibilidade analítica (Mini-FLOTAC) para monitoramento de infecção por NGIs em bovinos, sob baixo nível de infecção e elevada agregação, e estudos delineados para verificar mais profundamente o impacto da resistência anti-helmíntica, nível de infecção e agregação nas avaliações de *pool* de fezes para TRCOF.



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada “Amostras fecais compostas: ferramenta para monitoramento de infecção por nematodas gastrintestinais e de resistência anti-helmíntica em rebanho bovino”, registrada com o nº 936/2018, sob a responsabilidade de **Fernando de Almeida Borges** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 2ª reunião ordinária do dia 21/03/2018.

| FINALIDADE | () Ensino (x) Pesquisa Científica |
|-------------------------|--|
| Vigência da autorização | 02/02/2018 a 02/02/2019 |
| Espécie/Linhagem/Raça | <i>Bos taurus</i> / <i>Bos indicus</i> (indeterminada) |
| Nº de animais | 600 |
| Peso/Idade | 100 – 400kg / 6 - 24m |
| Sexo | Machos e Fêmeas |
| Origem | Fazendas em Mato Grosso do Sul atendidas pelo LADPAR |


Joice Steih

Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 22 de março de 2018.