



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE FLOTAC[®] NA RECUPERAÇÃO DE
LARVAS INFECTANTES (L₃) DE ESTRONGILÍDEOS PARASITOS DE
EQUINOS NA PASTAGEM**

INGRID CARLA DO NASCIMENTO RAMOS

RECIFE – PE

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE FLOTAC[®] NA RECUPERAÇÃO DE
LARVAS INFECTANTES (L₃) DE ESTRONGILÍDEOS PARASITOS DE
EQUINOS NA PASTAGEM**

INGRID CARLA DO NASCIMENTO RAMOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE – PE

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

R175a Ramos, Ingrid Carla do Nascimento
Avaliação da técnica de FLOTAC® na recuperação de larvas de
estrongilídeos parasitos de equinos na pastagem / Ingrid Carla do
Nascimento Ramos. – 2018.
38 f.: il.

Orientador: Leucio Câmara Alves.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Tropical, Recife, BR-PE, 2018.
Inclui referências. Inclui anexo.

1. Parasitologia 2. Nematódeos 3. Diagnóstico
4. Pastagem I. Alves, Leucio Câmara, orient. II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE FLOTAC® NA RECUPERAÇÃO DE
LARVAS INFECTANTES (L₃) DE ESTRONGILÍDEOS PARASITOS DE
EQUINOS NA PASTAGEM**

INGRID CARLA DO NASCIMENTO RAMOS

Aprovada em _____ de 2018

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

Departamento de Medicina Veterinária-UFRPE

Orientador

Prof. Dr. Gílcia Aparecida de Carvalho

Unidade Acadêmica de Garanhuns-UFRPE

Prof. Dr. Danilo de Souza Pimentel

Unidade de Ensino de Viçosa-UFAL

Dr. Neurisvan Ramos Guerra

Médico Veterinário - UFRPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente A Deus, pois está escrito “... *sem Mim, nada podeis fazer*” (João 15:5).

Aos meus pais Maria Isabel do Nascimento Ramos e Everaldo da Silva Ramos que renunciaram tantas coisas na vida com o propósito de nos permitir aprender.

Aos meus irmãos Carlos Alberto do Nascimento Ramos e Rafael Antonio do Nascimento Ramos que são grandes exemplos na minha vida profissional e pessoal.

Ao meu esposo, Geraldo Antunes de Araújo Júnior, por estar sempre ao meu lado, compartilhando todos os momentos e representar tanto na minha vida.

Ao professor Leucio, por seu carinho, atenção e ter permitido minha presença no seu grupo de pesquisa. Acreditando e apostando que eu poderia aprender sobre coisas tão distintas da minha formação e contribuir de alguma forma.

Aos grandes presentes que recebi na minha breve passagem pelo Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, Victor Fernando e Marília Andrade, amigos que vou levar sempre no meu coração, todos os dias da minha vida.

Às pessoas que fizeram parte da minha passagem pelo Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos e que me propiciaram bons momentos.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 NEMATÓDEOS GASTROINTESTINAIS DE EQUINOS	11
2.2 CICLO BIOLÓGICO	12
2.3 CONTROLE DAS HELMINTOSES	13
2.4 MÉTODOS ALTERNATIVOS DE CONTROLE.....	14
2.5 A PASTAGEM.....	14
2.6 DISTRIBUIÇÃO E LONGEVIDADE DE LARVAS INFECTANTES NA PASTAGEM.....	15
2.7 TÉCNICAS PARA RECUPERAÇÃO DE LARVAS INFECTANTES NA PASTAGEM	16
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
4. OBJETIVOS	23
4.1 OBJETIVO GERAL.....	23
4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	23
5. CAPÍTULO I. APPLICABILITY OF FLOTAC® TECHNIQUE IN RECOVERING EQUINE STRONGYLE LARVAE IN THE PASTURE: A COMPARISON STUDY ...	24
ABSTRACT.....	25
INTRODUCTION	26
MATERIAL AND METHODS	27
RESULTS	30
DISCUSSION.....	31
REFERENCES	33
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: CICLO BIOLÓGICO DOS ESTRONGILÍDEOS13

CAPÍTULO 1

FIGURE 1: MAPS OF TIMBAÚBA-PE, BRAZIL28

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABLE 1: FREQUENCY OF INFECTIVE LARVAE (L3) OF STRONGYLES
RECOVERED FROM THE PASTURE.....30

TABLE 2: STATISTICAL VALUES RECORDED FOR THE RECOVERY OF INFECTIVE
LARVAE (L3) OF STRONGYLES FROM THE PASTURE, ACCORDING TO THE
TECHNIQUE EMPLOYED31

RESUMO

O Brasil possui o maior plantel de equinos da América Latina e o quarto no mundo. Entretanto, apesar desse grande plantel, ainda são poucos os estudos sobre a ecologia e epidemiologia de nematódeos parasitos de equinos na pastagem. Nesse contexto, o conhecimento do grau de contaminação das pastagens é muito útil aos propósitos epidemiológicos. Podendo-se determinar, dessa forma, o risco de infecção dos animais e fornecer dados para o estabelecimento de estratégias de manejo adequadas. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi o de avaliar a técnica de FLOTAC na recuperação de larvas infectantes (L₃) de helmintos gastrointestinais de equinos em pastagem e comparar com as técnicas de Sedimentação espontânea e Centrífugo-sedimentação. Para isso, foram analisadas e comparadas 300 amostras de gramínea pelas técnicas acima propostas. Todas as técnicas utilizadas neste estudo foram capazes de detectar larvas de parasitos gastrointestinais de equinos na pastagem. Sendo a técnica de FLOTAC mais eficaz nesta detecção. Os principais parasitos recuperados pertenciam as subfamílias Cyathostominae e Strongylinae. Para efeito de comparação entre as técnicas foi determinado o índice kappa, e valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos e precisão também foram calculados. Este estudo, trata-se do primeiro relato da utilização da técnica de FLOTAC para recuperação de larvas na pastagem. Tendo em vista os resultados obtidos, a técnica de FLOTAC apresentou-se mais apropriada do que as demais técnicas utilizadas para recuperação de larvas na pastagem.

Palavras-chave: Parasitologia, Nematódeos, Larvas, Pasto, Diagnóstico

ABSTRACT

Brazil has the largest herd of horses in Latin America and the fourth largest in the world. However, despite this large population, there are still few studies on the ecology and epidemiology of parasitic nematodes of horses in pasture. In this context, knowledge of the degree of contamination of pastures is very useful for epidemiological purposes. In this way, the risk of infection of the animals can be determined and data can be provided for the establishment of appropriate management strategies. Therefore, the objective of this study was to evaluate the FLOTAC technique in the recovery of infective larvae (L3) from gastrointestinal helminths of equines in pasture and to compare with the techniques of Spontaneous sedimentation and Centrifugal sedimentation. For this, 300 samples of grass were analyzed and compared by the techniques proposed above. All the techniques used in this study were able to detect larvae of gastrointestinal parasites of horses in the pasture. The FLOTAC technique is more effective in this detection. The main parasites recovered belonged to the subfamilies Cyathostominae and Strongylynae. For comparison purposes, the kappa index was determined, and sensitivity, specificity, positive and negative predictive values and precision were also calculated. This study is the first report of the use of the FLOTAC technique for recovery of larvae in the pasture. Considering the results obtained, the FLOTAC technique was more appropriate than the other techniques used to recover larvae in the pasture.

Keywords: Parasitology, Nematode, Larvae, Pasture, Diagnosis

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil possui oito milhões de equinos movimentando anualmente em torno de 7,3 bilhões de reais, sendo o maior plantel da América Latina e o quarto mundial, distribuídas nas regiões Sudeste (24,2%), Nordeste (22,9%), Centro-Oeste (19,1%), Sul (17,7%) e Norte (16.1%) (MAPA, 2014).

Em função deste plantel de animais, foi instituído o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE), com o objetivo de realizar vigilância epidemiológica e sanitária das principais doenças dos equídeos, visando a profilaxia, o controle e a erradicação destas doenças em todos os Estados da Federação (BRASIL, 2009). Contudo, não se encontra contemplada neste programa as doenças causadas por helmintos.

As helmintoses possuem uma variedade de agentes, que são diretamente influenciados pelo manejo da criação e as condições climáticas de cada região (VERISSÍMO, 2008), que repercutem no bem-estar e produtividade dos animais, além da geração de elevadas perdas econômicas (ALMEIDA, 2010).

Entre esses helmintos parasitos de equinos, os ciatostomíneos (Nematoda - Cyathostominae) são os nematódeos mais prevalentes no intestino grosso de equinos (BEZERRA et al., 2007; CORNING, 2009), sendo apontados como a principal causa de mortalidade, particularmente pela síndrome de cólica em equídeos (MARCHAND, 2000; MAGNAN, 2000).

Os ciatostomíneos apresentam duas fases distintas no seu desenvolvimento, uma fase de vida parasitária que ocorre no hospedeiro, iniciando-se com ingestão da larva infectante e completando-se com o parasito adulto eliminando ovos nas fezes, e uma fase de vida livre, que ocorre na pastagem, e compreende desde a fase de (L₁) até o desenvolvimento da larva infectante (L₃) (CORNING, 2009).

Neste sentido a contaminação da pastagem pode chegar até de 12x10⁶ ovos por dia (REINECKE, 1983) e as L₃ têm sua sobrevivência e manutenção controladas pelas condições climáticas (HERD, WILLARDSON, GABEL, 1985), estando presente na pastagem durante todo o ano e mesmo com um trabalho preventivo realizado através do tratamento do animal,

esta fonte de alimento (pastagem) pode ser considerada uma importante fonte de infecção para os equinos (FOZ FILHO, 1999).

As gramíneas possuem características diferentes, como pilosidade, serosidade, tamanho, hábito de crescimento, que podem auxiliar ou não no desenvolvimento, na sobrevivência e na migração de larvas infectantes nas pastagens (VIANA, 1999). Entretanto, poucos são os estudos sobre a identificação dessas larvas em pastagens do gênero *Panicum*, uma das forrageiras mais utilizadas na alimentação dos equinos.

Porém, além das características bromatológicas das gramíneas, as variáveis ambientais como temperatura e umidade são determinantes para o desenvolvimento, sobrevivência e migração dessas larvas na pastagem. Como essas larvas apresentam fototropismo negativo, migrando para as partes mais elevadas da forrageira no período noturno, existem épocas do ano em que as condições ambientais são mais favoráveis ao seu desenvolvimento e migração nas pastagens. (FOZ FILHO, 1999).

Atualmente, a técnica de FLOTAC[®] tem sido utilizada para detecção de ovos, larvas e oocistos de parasitos gastrointestinais de diferentes espécies animais, incluindo o homem (CRINGOLI et al., 2010) apresentando alta sensibilidade e especificidade quando comparado as demais técnicas (LIMA et al., 2015). No entanto, não existem relatos da utilização desta técnica para detecção larvas de endoparasitos de equinos em pastagens. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a utilização técnica de FLOTAC[®] na recuperação de larvas infectantes (L₃) de strongilídeos parasitos de equinos na pastagem.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nematódeos gastrointestinais de equinos

Os nematódeos gastrointestinais de equinos pertencem ao filo Nematoda, ordem Strongylida, superfamília Strongyloidea e família Strongylidae (URQUHARTH et al., 1996).

Dentre este grupo, destacam-se aqueles espécimes pertencentes a subfamília Cyathostominae, conhecidos como pequenos estrôngilos ou ciatostomíneos que são, por sua vez, representados por mais de 40 espécies, particularmente, *Cyathostomum tetracanthum*, *Cylicocyclus nassatus*, *Cylicostephanus minutus*, *Cylicostephanus longibursatus*, *Cylicocyclus leptostomus*, *Cylicostephanus calicatus*, *Cylicostephanus goldi*, *Cyathostomum pateratum*, *Coronocyclus labiatus*, *Coronocyclus coronatus* (HODGKINSON et al., 2008) e aqueles nematódeos pertencentes a subfamília Strongylinae, conhecida por grandes estrôngilos (*Strongylus vulgaris*, *Strongylus equinus* e *Strongylus edentatus*).

Os pequenos estrôngilos ou ciatostomíneos são considerados as espécies de nematódeos mais prevalentes e patogênicos de equinos, sendo localizados no ceco e cólon, produzindo um considerável impacto negativo na sanidade dos equinos (OGBOURNE, 1976). Além disso, são responsáveis por um grande desconforto abdominal, que é repercutido nos quadros de cólica (KLEI e CHAPMAN, 1999; TAVASSOLI et al., 2010).

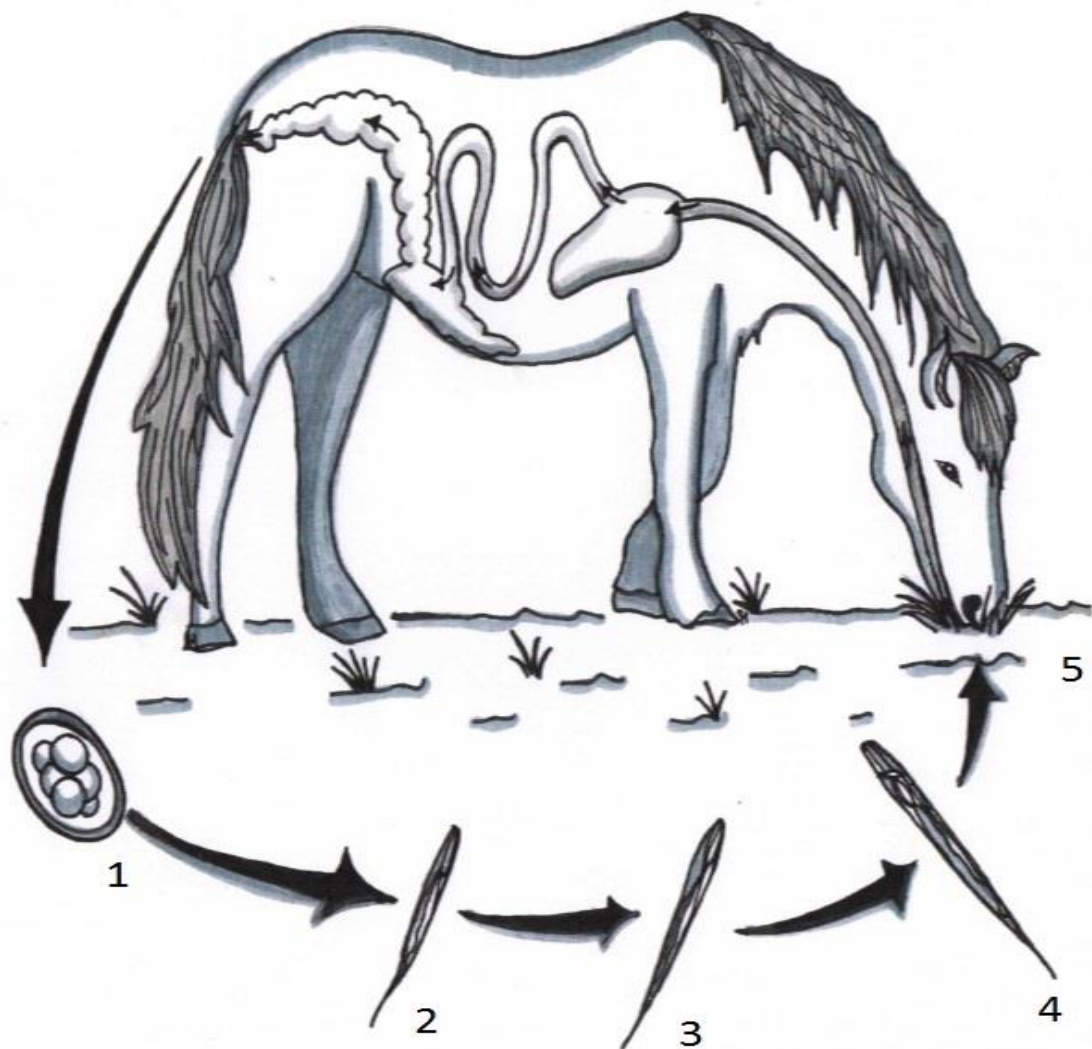
O gênero *Strongylus*, conhecido também como grandes estrôngilos é o mais importante, tendo como principais espécies: *S. vulgaris*, *S. equinus* e *S. edentatus*, sendo o *S. vulgaris* considerado a espécie mais patogênica por suas lesões no sistema arterial mesentérico (ANDERSEN et al., 2013).

2.2 Ciclo Biológico

Em linhas gerais, as espécies da família Strongylidae apresentam um ciclo de vida exógeno e outro endógeno. Na fase exógena, os ovos são eliminados nas fezes dos hospedeiros e se desenvolvem no ambiente até o desenvolvimento da larva de 1º estágio (L1) e sua subsequente eclosão e desenvolvimento de larvas de 2º e 3º estágio (L2 e L3). Na fase endógena, ocorrem os estágios L4 e L5 antes da maturação para adulto (URQUHARTH et al., 1996).

Particularmente, no que se refere aos pequenos estrôngilos, os mesmos possuem um ciclo de vida direto, onde os ovos liberados pelas fêmeas são lançados no ambiente através das fezes do hospedeiro. No ambiente, os ovos passam por um desenvolvimento embrionário que culmina com a eclosão da larva de primeiro estágio (L₁). Na pastagem ocorre o desenvolvimento da larva até o terceiro estágio, também chamada de larva infectante ou L₃. Os equinos são infectados através da ingestão da L₃. Dentro do hospedeiro, a larva continua seu desenvolvimento até chegar à fase adulta (LYONS et al., 1999). Neste tipo de infecção, ocorre uma fase histotrófica conhecida por “ciatostomíase larval”, podendo ocasionar enteropatia inflamatória no ceco e cólon resultando em enterite catarral e hemorrágica, diarreia, cólica, perda de peso, e morte do animal (COBB e BOECKH, 2009).

Em relação ao ciclo biológico do gênero *Strongylus*, as larvas infectantes (L₃) após terem sido ingeridas, penetram na mucosa do intestino até atingirem o estágio L₄ (FREITAS, 1986). As formas L₄ continuam a migração até atingir a artéria mesentérica cranial, local onde evoluem até o estágio de adulto imaturo (L₅) e retornarem ao lúmen intestinal (DUNCAN e PIRIE, 1972). Esta migração de larvas causa endarterite fibrinosa com trombozes pronunciada, formação de aneurismas e outras alterações patológicas das estruturas dos vasos sanguíneos (DUNCAN, 1974; ANDERSEN et al., 2013; NIELSEN et al., 2012).



Fonte: Raphael Lepold, 2018

Figura 1. Ciclo biológico de Estrongilídeos. 1 – ovo embrionado; 2, 3, 4 – larva infectante estágio L₁, L₂, e L₃; 5 – L₃ ingerida através da pastagem.

2.3 Controle das Helmintoses

O controle desses nematódeos geralmente é feito pela utilização de anti-helmínticos, porém o uso indiscriminado e a ausência de estratégias adequadas de controle resultaram no desenvolvimento de uma resistência por parte dos ciatostomíneos, principalmente no que se refere aos benzimidazóis (BORGSTEEDE, et al., 1997; KAPLAN, 2002; MATTHEWS et al., 2004).

Sendo assim, os programas de controle das propriedades, habitualmente baseiam-se em tratamentos frequentes com rotação rápida de fármacos (MATTHEWS et al., 2004). Mantendo dessa forma, um esquema de tratamento antiparasitário de três a quatro vezes por

ano (HERTZBERG et al., 2014). Este uso indiscriminado dos fármacos é o fator mais importante, já que muitas vezes são realizados os tratamentos supressivos sem o conhecimento da carga parasitária do animal (KAPLAN e NIELSEN, 2010), promovendo a relação de organismos resistentes prejudicando a sustentabilidade do programa sanitário. Além disso, a proporção da população de parasitos que não está exposta ao tratamento químico é descrita como refugia e embora muitos fatores afetem a taxa na qual a resistência aos anti-helmínticos se desenvolve, os níveis em refugia são considerados os mais importantes.

2.4 Métodos Alternativos de Controle

Um manejo adequado é parte essencial do controle de estrogilídeos (LYONS et al., 1999). Desse modo, esse controle deve ter como base, estratégias de gestão que busquem reduzir o uso de anti-helmínticos, a seleção de parasitos resistentes e também a liberação de produtos químicos no ambiente (MOLENTO, 2005). Dentre as estratégias de gestão, recomenda-se também uma integração de outras formas de controle, buscando reduzir o número de larvas infectantes nas pastagens, promovendo assim a redução da reinfecção.

Nesse sentido, a rotação de pastagens é amplamente utilizada, associada algumas vezes a um rodízio de animais com a finalidade de reduzir os parasitos no pasto através da retirada de seu hospedeiro e entrada de outro animal. Outros métodos de controle parasitário consistem na retirada das fezes da pastagem e a destruição das massas fecais, expondo os ovos e larvas a ação do ambiente; e, à ação de besouros presentes nas massas fecais atuando na eliminação da refugia (BAUDENA et al., 2000).

Entretanto, esses métodos têm conseguido um sucesso limitado, sendo necessária a adoção de medidas alternativas. Nos últimos anos, tem-se proposto a utilização de fungos nematófagos, que sejam predadores naturais de nematódeos, visando reduzir o número de L3 nas pastagens.

2.5 A Pastagem

A cultivar Massai é um híbrido espontâneo entre *Panicum maximum* e *Panicum infestum*. É uma planta de hábito de crescimento cespitoso, com altura média de 60 cm. Possui uma excelente produção de forragem, boa cobertura do solo, maior tolerância em áreas com grande concentração de alumínio, melhor persistência em terrenos com baixos níveis de

fósforo, com grande velocidade de estabelecimento e rebrota.

Quando comparado a outras variedades do gênero *Panicum maximum*, o capim Massai apresenta-se mais adaptado às condições de baixa fertilidade do solo e com boa resistência ao ataque da cigarrinha-das-pastagens. As lâminas apresentam densidade média de pêlos curto e duro na face superior, já a bainha apresenta densidade alta desses pêlos. Os colmos são verdes e possuem uma excelente produção de forragem, as inflorescências apresentam ramificações primárias (EMBRAPA-CNPQC, 2001). Trata-se de um capim que possui alta aceitação por parte dos equinos, seja na forma de pastagem ou de feno. Por esse motivo é bastante difundido na alimentação desses animais. Esta gramínea possui características específicas que podem influenciar diretamente ou não na dinâmica migratória de larvas infectantes e na sua sobrevivência.

2.6 Distribuição e Longevidade de Larvas Infectantes na Pastagem

Fatores ambientais podem influenciar tanto no desenvolvimento quanto na sobrevivência das larvas na pastagem, assim como sua distribuição na gramínea (STROMBERG, 1997).

O tempo de desenvolvimento varia de uma área geográfica para outra, dependendo das condições geográficas do local. Sendo assim, o desenvolvimento dos ovos e a eclosão das larvas são mais lentos em temperaturas mais baixas, aumentando a taxa de evolução na medida que essa temperatura aumenta (STROMBERG, 1997). O autor relata também que umidade relativa do ar também exercerá influência na motilidade e movimentação das larvas na pastagem; ou seja, quando o ambiente é seco, a movimentação das larvas sobre a pastagem se torna quase impossível, forçando uma migração das larvas para o solo logo abaixo da massa fecal.

Por outro lado, a precipitação pluviométrica pode acarretar a destruição da massa fecal e conseqüente dispersão das larvas pela pastagem. Segundo Craig (1999), apenas uma gota de chuva pode transportar as larvas até uma distância de 90 centímetros da massa fecal.

Outro fator importante é o efeito da temperatura. Acredita-se que a faixa de temperatura ideal para o desenvolvimento de larvas de ciatostomíneos está entre 25 e 33°C. Nesta temperatura, as larvas podem atingir o estágio de L₃ em três ou quatro dias sendo 28°C a temperatura ideal para o desenvolvimento (NIELSEN et al., 2013). O mesmo autor relata

que a temperatura máxima para o desenvolvimento até o estágio de larva infectante, é de 38°C, pois a partir de 40°C foi verificada uma morte muito rápida dos ovos, enquanto que a temperatura mínima observada para eclosão das larvas foi entre 7,5 e 10°C, porém foi observado o desenvolvimento nos ovos embrionados a temperaturas inferiores. Abaixo de 4°C o desenvolvimento dos ovos é interrompido. Todas as variáveis ambientais influenciam e tornam complexo o desenvolvimento, migração e sobrevivência das larvas na pastagem.

2.7 Técnicas para Recuperação de Larvas Infectantes na Pastagem

O primeiro registro de utilização de uma técnica para recuperar larvas infectantes da pastagem foi descrito por Taylor em 1939. A técnica consistia em uma adaptação do clássico método de Baermann em que grandes quantidades de vegetação eram cortadas em pequenos pedaços dispostas em recipientes com água e aguardado um tempo para sedimentação. Em seguida, as amostras eram tamisadas por papel filtro e a subsequente separação das larvas do sedimento era realizado pelo funil de Baermann. A ineficiência do método e a perda de larvas durante a separação foi reconhecida pelo autor.

Outro método para recuperar larvas infectantes da pastagem, foi desenvolvido por Crofton em 1954 e denominado de Flutuação. Neste método, as amostras eram umedecidas, onde se adicionava lentamente uma solução de sulfato de zinco ($ZnSO_4$) que permanecia por cinco minutos e posteriormente eram tamisadas. No entanto, o pesquisador não considerou os resultados satisfatórios.

Em 1955, Parfitt, fez uso do método de centrifugação após lavagem das amostras e adição de solução por diferença de densidade, para separar L_3 do sedimento proveniente da centrifugação. Ele trabalhou com grandes quantidades de pastagem e no teste de seu método, quando adicionou um número conhecido de L_3 na vegetação, foi observado uma taxa de recuperação em torno de 43%.

Mais uma vez a técnica de Baermann modificada foi utilizada para recuperar L_3 de tricostrongilídeos da pastagem por Rohrbacher Jr. (1957). O mesmo adicionou gotas de detergente não-iônico, na proporção de 0,5ml por litro nas amostras de vegetação cortadas submersas em recipientes com água. O procedimento resultou no aumento do número de larvas recuperadas da vegetação. No entanto, o autor concluiu que, os percentuais de recuperação foram baixos; indicando que a estimativa do número de larvas presentes no pasto, por esta técnica inspirava cautela.

No ano de 1967, Donald, visando o estudo da frequência e distribuição de L₃ de tricostrongilídeos em amostras de pastagem ao acaso, desenvolveu uma nova técnica para recuperar larvas de pequenas amostras de 25 a 35g da pastagem. A técnica consistia basicamente em várias lavagens das amostras de vegetação, com a utilização de detergente não-iônico, duas centrifugações e separação das L₃ do sedimento por ressuspensão. Usando para o procedimento solução de iodeto de potássio a 1.63 molar. A avaliação quanto a eficiência da técnica mostrou que seu desempenho foi independente da quantidade de larvas presentes, podendo a mesma recuperar de 90% a 94% das larvas no pasto.

Depois da técnica descrita por Donald, outras técnicas surgiram, baseadas no mesmo princípio tendo na realidade poucas modificações e apresentando pequenas diferenças no percentual de recuperação de L₃ da pastagem (BAWDEN, 1969; LANCASTER, 1970). ESYKER e KOOYMAN (1993) comentaram a falta de padronização de técnicas nessa área e sugeriram que os pesquisadores não só escolhessem determinada técnica mais também testassem e comparassem. COUVILLION (1993) em seu trabalho de revisão enfatizou a padronização da técnica escolhida pelo período de observação, e também, argumentou a importância da estimativa do número de larvas infectantes na vegetação como um importante estudo adjunto a epidemiologia de nematidoses gastrintestinais.

O FLOTAC[®] trata-se de uma nova ferramenta para pesquisa e diagnóstico utilizada para detecção de ovos, larvas e oocistos de parasitos gastrointestinais de diferentes espécies animais. Segundo Cringoli et al. (2010), os resultados parasitológicos obtidos por meio desta técnica são altamente precisos, aumentando em até 10 vezes a possibilidade de detecção de ovos, oocistos e larvas, quando comparado com técnicas clássicas. Outro fator que contribui para alta eficácia do FLOTAC[®] na detecção de parasitos gastrointestinais está relacionado ao desenho do aparelho, o qual foi projetado com duas câmaras amostrais de flutuação com capacidade para 5 mililitros cada, ambas recobertas por uma grade contendo 12 colunas distribuídas em um quadrante de 18x18 milímetros, a fim de aumentar a área de fixação dos ovos e larvas após o processo de flotação. A alta sensibilidade, especificidade e acurácia da técnica FLOTAC[®] está relacionada também a variação das soluções de flotação utilizadas que são o cloreto de sódio e o sulfato de zinco. Apresentando especificidade gravitacional de 1.20 e 1.35 respectivamente sobre a mesma amostra, aumentando a detecção e quantificação dos diferentes gêneros de parasitos gastrointestinais.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA F. Q, SILVA V. P. Progresso científico em equideocultura na primeira década do século XXI. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, p. 119-129, 2010.
- ANDERSEN U. V, HOWE D. K, OLSEN S. N, NIELSEN M .K. - Recent advances in diagnosing pathogenic equine gastrointestinal helminths: the challenge of prepatent detection. *Veterinary Parasitology*, v. 192, p. 1-9, 2013.
- BAUDENA, M. A, CHAPMAN M. R., LARSEN, M., KLEI, T. R. Efficacy of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in reducing equine cyathostome larvae on pasture in south Louisiana. *Veterinary Parasitology*, v. 89, p. 219 – 230, 2000 b.
- BEVILAQUA, C. M .L; RODRIGUES, M. L., CONCORDET, D. Identification of infective larvae of some common nematode strongylids of horses. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v.12, p. 989-995, 1993.
- BEZERRA, S. Q, COUTO M. C. M., SOUZA T. M., BEVILAQUA C. M. .L. Ciatostomíneos (Strongylidae-Cyathostominae) parasitas de cavalos. Ecologia experimental dos estágios pré-parasíticos em gramínea tifton 85 (*Cynodon* spp. cv. Tifton 85) na baixada Fluminense, RJ, Brasil. *Parasitology Latinoamerican*, v. 62, p. 27-34, 2007.
- BAWDEN, R. J. A rapid technique for the recovery of strongyloid larvae from pasture samples. *Australian Veterinary Journal*, v. 45, n. 5, p. 228-230, 1969.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Legislação. Programa Nacional de Saúde Animal. Brasília: MAPA/SDA/DAS, p.440, 2009.
- CASTRO, A. A., OLIVEIRA, C. R. C., ANJOS, D. H. S., ORNELLAS E. I., BITTENCOURT, V. R. E. P., ARAÚJO, J. V., SAMPAIO, I. B. M., RODRIGUES, M. L. A. Potencial dos fungos nematófagos *Arthrobotrys* sp. e *Monacrosporium thaumanisium* para o controle de larvas de ciatostomíneos de eqüinos (Nematoda: Cyathostominae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 12, p. 53-55, 2003.
- COBB, R.; BOECKH, A. Moxidectin: a review of chemistry, pharmacokinetics and use in horses. *Parasites Vectors*, v. 2, p. 2, 2009.
- CORNING S. Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. *Parasites Vectors*, v. 2, p. 1-6, 2009.
- COUVILLION, C. E. Estimation of the numbers of trichostrongylid larvae on pastures. *Veterinary Parasitology*, v. 46, n. 2, p. 197-203, 1993.
- CRAIG, M. T. M. Considerations for the control of equine cyathostomes in arid area. *Veterinary Parasitology*, v. 85, p. 181-188, 1999.
- CRINGOLI G, RINALDI L., MAURELLI M. P., UTZINGER J. FLOTAC: new multivalente techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nat Protoc* 5, p. 503-515, 2010.

- CRINGOLI, G., RINALDI, L., MAURELLI, M. P., MORGOGLIONE, M. E., MUSELLA, V., UTZINGER, J. *Ancylostoma caninum*: calibration and comparison of diagnostic accuracy of flotation in tube, McMaster and FLOTAC in faecal samples of dogs. *Experimental Parasitology*, v. 128, p. 32–37, 2011.
- CROFTON, H. D. The ecology of the immature phases of Trichostrongyle parasites: the estimation of pasture infestation. *Veterinary Parasitology*, v. 44, n.1, p. 313-324, 1954.
- DONALD, A. B. A technique for the recovery of strongyloid larvae from small sample units of pasture. *Journal of Helminthology*, v. 61, n. 1, p. 1-10, 1967.
- DUNCAN, J. L. *Strongylus vulgaris* infection in the horse. *Veterinary Record*, v. 95, n. 2, p. 34-37, 1974.
- DUNCAN, J. L.; PIRIE, H. M. The life cycle of *Strongylus vulgaris* in the horse. *Research in Veterinary Science*, v. 13, n. 4, p. 374-379, 1972.
- EYSKER, M.; KOOYMAN, F. N. J. Notes on necropsy and herbage processing techniques for gastrointestinal nematodes of ruminants. *Veterinary Parasitology*, v. 46, n. 2, p. 206-213, 1993.
- FAUST, E. C., D'ANTONI, J. S., ODOM, V., MILLER, M. J., PERES, C., SAWITZ, W., THOMEN, L. F., TOBIE, J., WALKER, H. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 18, p. 169-183, 1938.
- FOZ FILHO R. A importância clínica dos pequenos estrôngilos. *Revista de Saúde Equina*, v. 11, p. 27-28, 1999.
- FREITAS, M.G. *Helminthologia Veterinária*. Belo Horizonte: Rabelo e Brasil, p. 336.1976.
- HERD R. P.; WILLARDSON K. L.; GABEL A. A. Epidemiological approach to the control of horse strongyles. *Equine Veterinary Journal*, v. 17. P. 2-7, 1985.
- HINNEY B, WIRTHERLE N. C, KYULE M, MIETHE N, ZESSIN K. H, CLAUSEN P. H. - A questionnaire survey on helminth control on horse farms in Brandenburg, Germany and the assessment of risks caused by different kinds of management. *Parasitology Research*, v. 109, p. 1626-1635, 2011.
- HODGKINSON J. E., CLARK H. J., KAPLAN R. M., LAKE S. L., MATTHEWS J. B. The role of polymorphisms at beta tubulin isotype 1 codons 167 and 200 in benzimidazole resistance in cyathostomins. *International Journal for Parasitology*, v. 38, p. 1149-1160, 2008.
- HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration methods in *Schistosomiasis masoni*. *Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine*, v. 9, p. 283-289, 1934.

- KAPLAN R. M; NIELSEN M. K. An evidence-based approach to equine parasite control: it ain't the 60s anymore. *Equine Veterinary Education*, v 22, p. 306-316. 2010.
- KAPLAN, R. M. Anthelmintic resistance in nematodes of horses. *Veterinary Research*, v. 33, p. 491-507, 2002.
- KATAGIRI, S., OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. Comparison of three concentration methods for the recovery of canine intestinal parasites from stool sample. *Experimental Parasitology*, v. 126, p. 214-216, 2010.
- KLEI, T. R.; CHAPMAN, M. R. immunity in equine cyathostome infections. *Veterinary Parasitology*, v. 31, p. 123-133, 1999.
- KORNAŚ S., GAWOR J., CABARET J., MOLEND A. K., SKALSKA M; NOWOSAD B. - Morphometric identification of equid cyathostome (Nematoda: Cyathostominae) infective larvae. *Veterinary Parasitology*, v. 162, p. 290-294, 2009.
- LANCASTER, M. B. The recovery of infective nematode larvae from herbage samples. *Journal of Helminthology*, v. 44, n. 2, p. 219-230. 1970.
- LIMA V. F. S., CRINGOLI G., RINALDI L., MONTEIRO M. F. M., CALADO A. M. C., RAMOS R. A. N., SANTOS P. O. M., ALVES L. C. A comparison of mini-FLOTAC and FLOTAC with classic methods to diagnosing intestinal parasites of dogs from Brazil. *Parasitology Research*, v. 114, p. 3529 – 3533, 2015.
- LYONS E. T., TOLLIVER S. C., DRUDGE J. H. - Historical perspective of cyathostomes: prevalence, treatment and control programs. *Veterinary Parasitology*, v. 85, p. 97-111, 1999.
- MAGNAN C. Les causes de mortalité des équides en Europe: enquête épidémiologique dans les centres nécropsiques universitaires. These pour le Doctorat Vétérinaire, N°72-2000, Diplôme d'Etat, Ecole Nationale Veterinaire de Lyon, 122 pp. 2000.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Equídeos. Brasília, 2014. Disponível em:<http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Equideocultura/11RO/App_PNSE.pdf>. Acesso em 25 de setembro. 2015.
- MARCHAND C. Le parasitisme digestif facteur de risque des coliques chez les Equides: enquête cas-témoin réalisée auprès des écoles vétérinaires. These pour le Doctorat Vétérinaire, N°73-2000, Diplôme d'Etat, Ecole Nationale Veterinaire de Lyon, 140pp. 2000.
- MATTHEWS, J. B., HODGKINSON, J. E., DOWDALL, S. M. J., PROUDMAN, C. J. Recent developments in research into the Cyathostominae and Anoplocephala perfoliata. *Veterinary Research*, v. 35, p. 371 – 381, 2004.
- MAURELLI, M. P., RINALDI, L., ALFANO, S., PEPE, P., COLES, G. C., CRINGOLI, G. Mini-FLOTAC, a new tool for copromicroscopic diagnosis of common intestinal nematodes in dogs. *Parasites & Vectors*, v. 6, p. 356, 2014.

- MOLENTO M. B - Resistência parasitária em helmintos de eqüídeos e propostas de manejo. *Ciência Rural*, v 35, p. 1469-1477, 2005.
- NIELSEN M. K. Sustainable equine parasite control: Perspectives and research needs. *Veterinary Parasitology*, v. 185, p. 32-44, 2012.
- NIELSEN, M. K.; VIDYASHANKA, R. A. N.; HANLON, B. M.; DIAO, G.; PETERSEN, S. L.; KAPLAN, R. M.; Hierarchical model for evaluating pyrantel efficacy against strongyle parasites in horses. *Veterinary Parasitology*, v. 197, n.3, p. 614-622, 2013.
- OGBOURNE C. P. - The prevalence, relative abundance and site distribution of nematodes of the subfamily Cyathostominae in horses killed in Britain. *Journal of Helminthology*, v. 50, p. 203-14, 1976.
- OLIVEIRA S. T. G, AMARANTE A. F. T. *Parasitologia animal: animais de produção*. Rio de Janeiro: EPUB, 2001.
- PARFITT, J. W. Two techniques used for the detection and enumeration of the larvae of *Dictyocaulus viviparus* in faeces and herbage. *Laboratory Practice*, v. 4, n. 1, p. 15-16, 1955.
- REINECKE, R. K. *Veterinary Helminthology*. Butterworths Prof. Publications. Durban, p. 135. 1983.
- REINEMEYER C. R. Small Strongyles: Recent advances veterinary Clinique. *Equine Practice*, v. 2, p. 281-312, 1986.
- ROHBACHER JR., G. H. The recovery of nematode larvae by Baermann apparatus as affected by a detergent. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, v. 24, n. 1, p. 24-25. 1957.
- SANTANA, B. B., SILVA, T. L. B., RAMOS, R. A. N., ALVES, L. C., CARVALHO, G. A. Evaluation of diferente parasitological techniques for diagnosing intestinal parasites in dogs. *Open Journal of Veterinary Medicine*, v. 2, p.19-24, 2015.
- SANTOS, F. A. G., YAMAMURA, M. H., VIDOTTO, O., CAMARGO, P. L. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em cães (*Canis familiaris*) com diarréia aguda oriundos da região metropolitana de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 28, n. 2, p. 257-268, 2007.
- SILVA D. J. *Análise de alimentos (Métodos químicos e biológicos)*. Viçosa. UFV, Imprensa Universitária, 1990.
- SILVA H. M. Nematidioses gastrintestinais de caprinos: uma revisão. *Revista Ciência Agrovet*, v. 13, p. 199-208, 2014.
- STROMBERG, B. E. Environmental factors influencing transmission. *Veterinary Parasitology*, v. 72, p. 247 – 264, 1997.

- TAVASSOLI M., DALIR-NAGHADEH B., ESMAEILI-SANI S. Prevalence of gastrointestinal parasites in working horses. Polish Journal of Veterinary, v.13, p 319-324, 2010.
- TAYLOR, E. L. Technique for the estimation of pasture infestation by strongyloid larvae. Parasitology, v. 31, n.1, p. 473-478, 1939.
- THOMAZ-SOCCOL V., SOUZA F. P, SOTOMAIOR C., CASTRO E. A., MILCZEWSKI V., MOCELIN G, SILVA M. C. P. Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics in sheep (*Ovis aries*) Brazilian Archives Biology Technology, v. 47, p. 41-47, 2004.
- URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; JENNINGS, F .W. Parasitologia Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- VERÍSSIMO C. J. Alternativas de controle de verminose em pequenos ruminantes. Instituto de Zootecnia - Nova Odessa, 2008.
- WILLIS, H. H. A simples levitation methods for detection of hookworm ova. Medical Journal of Australia, v.2, p. 375-376, 1921.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Avaliar a técnica de FLOTAC na recuperação de larvas infectantes (L₃) de helmintos gastrointestinais de equinos em pastagem.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Comparar as técnicas de FLOTAC, Sedimentação espontânea e Centrífugo-Sedimentação para recuperação de larvas na pastagem

Capítulo I

Applicability of FLOTAC[®] technique in recovering equine strongyle larvae in the pasture: A comparison study

Capítulo estruturado em formato de artigo e publicado na revista *Veterinary Parasitology* (v. 250, p. 68-70, 2018)

Applicability of FLOTAC[®] technique in recovering equine strongyle larvae in the pasture: a comparison study

ABSTRACT

The FLOTAC[®] technique represents a highly sensitive method for the isolation of oocysts, eggs, and larvae of parasites in faeces. This assay could be used for detecting free-living stages of nematodes in the pasture but no attempt has been assessed so far. Therefore, the performance of FLOTAC[®] technique for isolating infective larvae of nematodes in the environment was investigated and compared with the spontaneous sedimentation (SST) and centrifugal sedimentation (CST) techniques. The study was conducted in a horse farm located in northeastern Brazil, where the occurrence of strongyle larvae had been previously reported. Pasture samplings were collected monthly from January to May 2016 in a 376 m² crop area harvested with the Guinea grass *Panicum* cultivar Massai. The recovery of third-stage larvae (L3) was performed using the FLOTAC[®], SST and CST techniques. Values of Cohen's kappa coefficient, sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and accuracy of each technique were assessed. Although strongyle larvae were evenly detected, with the FLOTAC[®] technique yielded the highest number of positive samples (i.e., 41%, 41/100, $p < 0.0001$). The main parasites isolated belonged to the Cyathostominae and Strongylineae subfamilies. Based on these results, the FLOTAC[®] technique should be considered as practical and safe method for the isolation of nematode larvae in the pasture, thus opening a new potential use for this tool in the field.

Keywords: Cyathostominae; Horses; Pasture; FLOTAC[®], Strongyles.

1. Introduction

Strongyles are among the most important nematodes affecting equids (Bezerra et al., 2007; Corning, 2009). They have been indeed considered an important cause of mortality in these animals due to the onset of diarrhoea, anaemia, unthriftiness or colic syndrome (Lyons et al., 2000). These parasites show a complex life cycle, which includes parasitic and free-living stages. The development and survival of larvae in the pasture are influenced by climate, being highly variable according to the area where the parasites perpetuate (Rocha et al., 2012). Accordingly, an efficient control cannot be easily achieved for these nematodes, as it largely depends on the population dynamic of the parasite in the infected hosts and in the environment. In fact, it has been recognized that the availability and the occurrence of infective larvae (L3) in the pasture is a key factor for the epidemiology of the infection and its progression into a clinical disease (Stromberg, 1977). Therefore, strategies that reduce the L3 ingestion and quantify the environmental contamination are important to tackle these parasites (Krecek et al., 1992).

Nowadays, classic coproparasitological methods, such as the Baermann-Wetzel technique (Quinelato et al., 2008) and sedimentation methods (Amount et al., 1996) represent the techniques most commonly used for their diagnosis. However, the lack of standardization associated with the low sensitivity of these methodologies has hindered the development of new and more reliable parasitological tools to achieve this purpose (Knapp-Lawitzke et al., 2014).

Recently, a technique known as FLOTAC[®] has been developed, showing a high sensitivity for the detection of oocysts, eggs, and larvae of parasites shed in the faeces by different animal species, including humans (Cringoli et al., 2010). This tool has been extensively tested and its performance overcomes the efficacy of classical methods employed to detect immature forms of parasites (Lima et al., 2016). However, this technique has never

been employed for recovering L3 of gastrointestinal parasites in the pasture. Therefore, the aim of this study was to assess the performance of the FLOTAC[®] technique in detecting larvae of horse strongyles in the field. The spontaneous sedimentation (SST) and centrifugal sedimentation (CST) techniques were used as comparison to assess the efficacy of FLOTAC[®] in the field.

2. Material and methods

2.1 Study area

The study was conducted in a horse farm located in the municipality of Timbaúba (7°30'18' South and 35°19'04" West), state of Pernambuco, northeastern Brazil. According to the classification of Köppen-Geiger, the climate is Tropical (Aw). The average annual temperature of the area is 24.7°C (range= 19.8°C - 38.0°C) and the annual average rainfall is about 1073 mm (range= 1000 - 1150 mm).

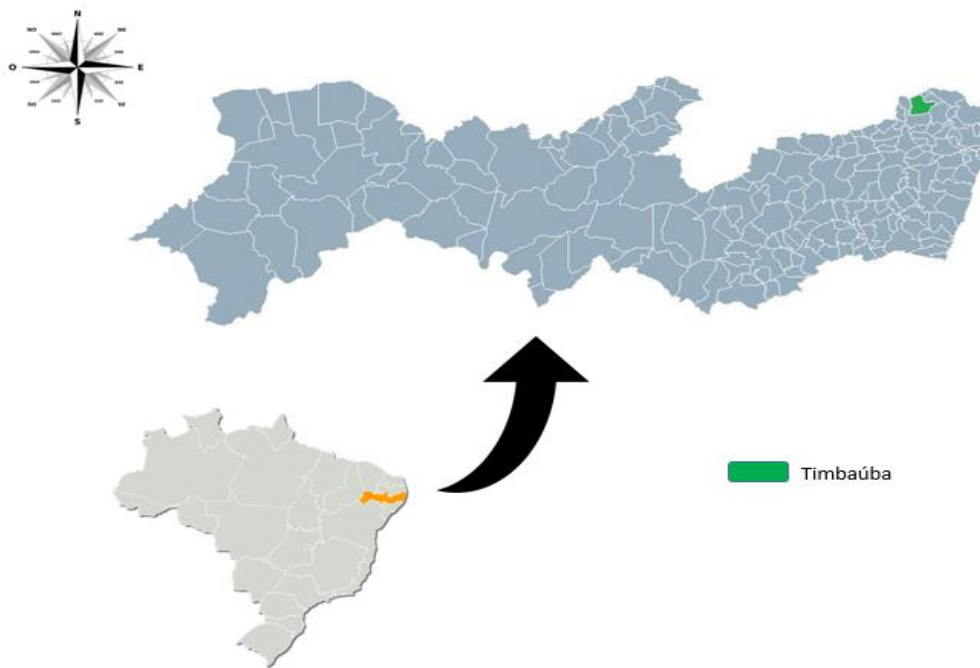


Figure 1: Maps of Timbaúba, Brazil

2.2 Pasture sampling and analysis

From January to May 2016, samplings of pasture were collected monthly in a 376 m² crop area harvested with the Guinea grass *Panicum* cultivar Massai. A total of 10 samples were collected between 06:00 and 07:00 AM by cutting fresh grass and analysed as described in previous studies (Amarante and Barbosa, 1995). Briefly, pasture samples were collected at the crossover points within a grid, with regular intervals of 4.75 m. From each collection point, about 100 g of grass was sampled, totalling a final weight of 1 kg. Twenty horses used continuously the investigated area for grazing (1 horse/18.8 m²).

The grass was cut into small pieces (3-4 cm) and evenly distributed over 10 sieves (1 mm mesh) arranged above a plastic container. Then, 1 L of distilled water was slowly poured over the material, that was plunged for 24 hours. Afterwards, all the material was homogenized, transferred into a 1 L glass container, and stored at 2-6°C for 24 hours (Amarante and Barbosa, 1995). Finally, the supernatant was discarded, 120 mL of the

material was fractionated into aliquots of 40 mL each, and evaluated by the FLOTAC[®] (Cringoli et al., 2010), SST (Hoffman et al., 1934) and CST (Blagg et al., 1955). Samples were analysed in duplicate, totalling 60 samples (i.e., 20 for each technique) of grass per month. At the end of the study period, a total of 300 analyses were performed, being 100 for each method. Larvae were identified at the subfamily level based on their morphological features (Bevilaqua et al., 1993).

Faecal samples collected from the 20 horses grazing the pasture were performed on January and on May 2016, and analysed through the Mini-FLOTAC[®] method (Barda et al., 2013). This technique has a detection limit of 5 eggs per gram (EPG) of faeces, using a saturated glucose-NaCl solution as flotation medium (specific gravity: 1.25).

2.3 Data analysis

Overall data on the positivity of three techniques were analysed using the McNemar's test, with differences considered statistically significant when $p < 0.0001$. Conversely, the Partitioning Chi-square test was used to compare the results of subfamilies with a significant level of $p \leq 0.05$. Both analyses reported above were performed using the BioEstat software (version 5.0; Mamirauá/CNPq, Belém, PA, Brazil).

The Cohen's kappa coefficient (k) was calculated to evaluate the agreement between the different techniques. In addition, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and accuracy of each technique was determined using the InStat software with significance level $p < 0.05$ (GraphPad Software, Inc., 2000).

3. Results

The three techniques allowed a successful isolation of Cyathostominae and Strongylinae larvae in the pasture. In particular, out of 100 samples analysed for each method, 41 (41%) analysed by the FLOTAC® technique were positive, whereas only 6 samples (6/100) were positive at the SST or at the CST ($p < 0.0001$). No statistical difference was observed between the positivity of the test and the subfamily of the parasite detected ($p = 0.4643$) (Table 1).

Table 1. Frequency of infective larvae (L3) of strongyles recovered from the pasture

Technique	Parasite Subfamily	Frequency (%) (n/N)
FLOTAC	Cyathostominae	53.6 (22/41)
	Strongylinae	46.4 (19/41)
Spontaneous sedimentation	Cyathostominae	33.3 (2/6)
	Strongylinae	66.7 (4/6)
Centrifugal sedimentation	Cyathostominae	33.3 (2/6)
	Strongylinae	66.7 (4/6)

According to the values of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and accuracy, the FLOTAC® technique showed the highest performance (Table 2). At the k analyses, a poor concordance ($k = 0$) was observed among methods.

Table 2. Statistical values recorded for the recovery of infective larvae (L3) of strongyles from the pasture, according to the technique employed

Technique	Parasite Subfamily	Parameters (%)				
		Sensitivity	Specificity	Predictive value (+)	Predictive value (-)	Accuracy
FLOTAC	Cyathostominae	32	100	100	41	54
	Strongylinae	28	100	100	39	51
Spontaneous Sedimentation	Cyathostominae	11	100	100	84	85
	Strongylinae	23	100	100	86	87
Centrifugal Sedimentation	Cyathostominae	13	100	100	86	87
	Strongylinae	26	100	100	88	89

During the study, a mean of 4.4 (range= 2-16 larvae), 3 (range 1-6) and 31.2 (range 8-74 larvae) larvae were detected using the SST, CST and FLOTAC[®] technique, respectively. Overall, results of the faecal analysis of horses showed that 80% (16/20) and 85% (17/20) of animals were positive for gastrointestinal parasite eggs (i.e., *Parascaris* sp. and Strongylidae) sampled in January and in May 2016, respectively.

4. Discussion

This study investigated the performance of three different methods for the recovery of L3 of gastrointestinal parasites of horse in the pasture. Results demonstrate that the FLOTAC[®] technique shows a higher performance when compared with other classic methods. Indeed, this assay allowed to isolate and recovery nematode larvae at least sevenfold than SST and CST ($p < 0.0001$). Although these two techniques have been extensively used over the last decades in this type of research (Amount et al., 1996; Rocha et al., 2012), the FLOTAC[®] appears as a high sensitive tool. All nematode larvae recovered belonged to Cyathostominae and Strongylinae subfamilies. Both groups of nematodes detected in this study have been recognized as important and prevalent parasites of horses worldwide (Lester et al., 2013).

The differences of performance among the techniques used could be attributed to the density of solutions and to the presence of faecal/soil debris, which may impair the microscopical examination of the sample, as it happens in the SST. In addition, the higher performance of the FLOTAC® technique may be also related to the variation of flotation solutions employed. It is known that this method employs two types of flotation solutions (i.e., sodium chloride (s.g.=1.2) and zinc sulfate (s.g.=1.35), which increase the sensitivity of the test and the detection of immature forms of parasites (Cringoli et al., 2010).

This is the first study that investigated the use of FLOTAC® for the recovery of nematode larvae from the pasture. Information of the presence of L3 of nematodes in the environment is pivotal to establish appropriate control strategies against different species of parasites. It is known that the survival of free-living stages of nematodes is influenced by different climatic conditions (Rocha et al., 2012). The area of study is located in a tropical region where wide variations of temperature and rainfall are not frequently observed. However, in temperate regions where seasons of year are well defined, the recovery of larvae by the FLOTAC® may be higher than those herein observed.

In conclusion, the FLOTAC® presented a higher performance than other classic methods. Therefore, considering the practicality and safety of this technique, FLOTAC® should be recommended in the future and employed for detecting nematode larvae in the pasture. This might open new possibilities for the application of this test. Further researchers focusing on the recovery of nematode larvae throughout the year could be important to better understand the impact of the use of the FLOTAC® in the determination of the pasture contamination.

References

- Amarante, A.F.T., Barbosa, M.A., 1995. Seasonal variations in populations of infective larvae on pasture and nematode faecal egg output sheep. *Vet. Zootec.* 7, 127–133.
- Amount, G., Frauli, D., Simon, R., Pouillot, R., Diaw, S., Mandonnet, N., 1996. Comparison of methods for counting third stage larvae of gastrointestinal nematodes of small ruminants in tropical pastures. *Vet. Parasitol.* 62, 307–315.
- Bevilaqua, C.M.L., Rodrigues, M.L., Cocordet, D., 1993. Identification of infective larvae of some common equine strongylids of horses. *Rev. Med. Vet.* 144, 989–995.
- Bezerra, S.Q., Couto, M.C.M., Souza, T.M., Bevilaqua, C.M.L., 2007. Ciatostomíneos (Strongylidae-Cyathostominae) parasitas de cavalos: Ecologia experimental dos estágios pré-parasíticos em gramínea tifton 85 (*Cynodon* spp. cv. Tifton 85) na baixada Fluminense, RJ, Brasil. *Parasitol. Latinoam.* 62, 27–34.
- Blagg, W., Schoegel, E.L., Mansour N.S., Knalaf, G.T., 1955. A new concentration technique for the demonstration of Protozoa and Helminth eggs in feces. *J. Trop. Med.* 4, 23–28.
- Corning, S., 2009. Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. *Parasit. Vectors* 2, 1–6.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Utzinger, J., 2010. FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nat. Protocol.* 5, 503–515.
- Hoffman, W.A., Pons, J.A., Janer, J.L., 1934. The sedimentation concentracion methods in *Schistosomiasis mansoni*. *P. R. J. Pub. Health Trop. Med.* 9, 283–289.
- Knapp-Lawitzke, F., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., 2014. Rapid method for recovery of strongylid third stage larvae of parasitic nematodes from small soil samples. *Exp. Parasitol.* 142, 91–94.

- Krecek, R.C., Greneveld, H.T., Martz, J.I., 1992. A preliminary study of the effect of microclimate on third-stage larvae of *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* on irrigated pasture. *Int. J. Parasitol.* 22, 747–752.
- Lester, H.E., Spanton, J., Stratford, C.H., Bartley, D.J., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., Coumbe, K., Mais, T., Swan, B., Lemon, G., Cookson, R., Matthews, J.B., 2013. Anthelmintic efficacy against cyathostomins in horses in Southern England. *Vet. Parasitol.* 197, 189–196.
- Lima, V.F., Ramos, R.A.N., Lepold, R., Cringoli, G. Rinaldi, L. Faustino, M.A., Alves, L.C., 2016. Use of the FLOTAC technique to diagnosing parasites of the urinary tract of dogs. *Parasitol. Res.* 115, 1737–1739.
- Lyons, E.T., Drudge, J.H., Tolliver, S.C., 2000. Larval cyathostomiasis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 16, 501–513.
- Quinelato, S., Couto, M.C., Ribeiro, B.C., Santos, C.N., Souza, L.S., Dos Anjos, D.H., Sampaio, I.B., Rodrigues, L.M., 2008. The ecology of horse cyathostomin infective larvae (Nematoda-Cyathostominae) in tropical southeast Brazil. *Vet. Parasitol.* 153, 100–107.
- Rocha, R.A., Bricarello, P.A., Rocha, G.P., Amarante, A.F., 2012. Recovery of *Trichostrongylus columbriformis* infective larvae from three grass species contaminated in the autumn. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 21, 372–278.
- Stromberg, B.E., 1997. Environmental factors influencing transmission. *Vet. Parasitol.* 72, 247–264.

5. Considerações Finais

- As três técnicas utilizadas foram capazes detectar larvas presentes na pastagem. Entretanto, a técnica de FLOTAC apresentou-se mais apropriada para recuperação de larvas infectantes na pastagem.
- Este estudo trata-se do primeiro relato da utilização da técnica de FLOTAC com o objetivo de recuperar larvas na pastagem.

ANEXO



Short communication

Applicability of FLOTAC[®] technique in recovering equine strongyle larvae in the pasture: A comparison study



Ingrid Carla do Nascimento Ramos^a, Rafael Antonio do Nascimento Ramos^{b,*},
Victor Fernando de Santana Lima^a, Alessio Giannelli^c, Irma Yaneth Torres López^a,
Leucio Câmara Alves^a

^a Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil

^b Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, Brazil

^c Ridgeway Research Ltd, Park Farm Buildings, Park Lane, St. Briavels, United Kingdom

ARTICLE INFO

Keywords:

Cyathostominae
Horses
Pasture
FLOTAC[®]
Strongyles

ABSTRACT

The FLOTAC[®] technique represents a highly sensitive method for the isolation of oocysts, eggs, and larvae of parasites in faeces. This study could be used for detecting free-living stages of nematodes in the pasture but no attempt has been assessed so far. Therefore, the performance of FLOTAC[®] technique for isolating infective larvae of nematodes in the environment was investigated and compared with the spontaneous sedimentation (SST) and centrifugal sedimentation (CST) techniques. The study was conducted in a horse farm located in northeastern Brazil, where the occurrence of strongyle larvae had been previously reported. Pasture samplings were collected monthly from January to May 2016 in a 376 m² crop area harvested with the Guinea grass *Panicum* cultivar Massai. The recovery of third-stage larvae (L3) was performed using the FLOTAC[®], SST and CST techniques. Values of Cohen's kappa coefficient, sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and accuracy of each technique were assessed. Although strongyle larvae were evenly detected, with the FLOTAC[®] technique yielded the highest number of positive samples (i.e., 41%, 41/100, $p < .0001$). The main parasites isolated belonged to the Cyathostominae and Strongylineae subfamilies. Based on these results, the FLOTAC[®] technique should be considered as practical and safe method for the isolation of nematode larvae in the pasture, thus opening a new potential use for this tool in the field.

1. Introduction

Strongyles are among the most important nematodes affecting equids (Bezerra et al., 2007; Corning, 2009). They have been indeed considered an important cause of mortality in these animals due to the onset of diarrhoea, anaemia, unthriftiness or colic syndrome (Lyons et al., 2000). These parasites show a complex life cycle, which includes parasitic and free-living stages. The development and survival of larvae in the pasture are influenced by climate, being highly variable according to the area where the parasites perpetuate (Rocha et al., 2012). Accordingly, an efficient control cannot be easily achieved for these nematodes, as it largely depends on the population dynamic of the parasite in the infected hosts and in the environment. In fact, it has been recognized that the availability and the occurrence of infective larvae (L3) in the pasture is a key factor for the epidemiology of the infection and its progression into a clinical disease (Stromberg, 1997). Therefore, strategies that reduce the L3 ingestion and quantify the environmental

contamination are important to tackle these parasites (Krecek et al., 1992).

Nowadays, classic coproparasitological methods, such as the Baermann-Wetzel technique (Quinelato et al., 2008) and sedimentation methods (Amount et al., 1996) represent the techniques most commonly used for their diagnosis. However, the lack of standardization associated with the low sensitivity of these methodologies has hindered the development of new and more reliable parasitological tools to achieve this purpose (Knapp-Lawitzke et al., 2014).

Recently, a technique known as FLOTAC[®] has been developed, showing a high sensitivity for the detection of oocysts, eggs, and larvae of parasites shed in the faeces by different animal species, including humans (Cringoli et al., 2010). This tool has been extensively tested and its performance overcomes the efficacy of classical methods employed to detect immature forms of parasites (Lima et al., 2016). However, this technique has never been employed for recovering L3 of gastrointestinal parasites in the pasture. Therefore, the aim of this study was

* Corresponding author.

E-mail address: rafael.ramos@ufrpe.br (R.A.d.N. Ramos).

to assess the performance of the FLOTAC[®] technique in detecting larvae of horse strongyles in the field. The spontaneous sedimentation (SST) and centrifugal sedimentation (CST) techniques were used as comparison to assess the efficacy of FLOTAC[®] in the field.

2. Material and methods

2.1. Study area

The study was conducted in a horse farm located in the municipality of Timbaúba (7°30'18' South and 35°19'04" West), state of Pernambuco, northeastern Brazil. According to the classification of Köppen-Geiger, the climate is Tropical (Aw). The average annual temperature of the area is 24.7 °C (range = 19.8 °C–38.0 °C) and the annual average rainfall is about 1073 mm (range = 1000–1150 mm).

2.2. Pasture sampling and analysis

From January to May 2016, samplings of pasture were collected monthly in a 376 m² crop area harvested with the Guinea grass *Panicum* cultivar Massai. A total of 10 samples were collected between 06:00 and 07:00 AM by cutting fresh grass and analysed as described in previous studies (Amarante and Barbosa, 1995). Briefly, pasture samples were collected at the crossover points within a grid, with regular intervals of 4.75 m. From each collection point, about 100 g of grass was sampled, totalling a final weight of 1 kg. Twenty horses used continuously the investigated area for grazing (1 horse/18.8 m²).

The grass was cut into small pieces (3–4 cm) and evenly distributed over 10 sieves (1 mm mesh) arranged above a plastic container. Then, 1 L of distilled water was slowly poured over the material, that was plunged for 24 h. Afterwards, all the material was homogenized, transferred into a 1 L glass container, and stored at 2–6 °C for 24 h (Amarante and Barbosa, 1995). Finally, the supernatant was discarded, 120 mL of the material was fractionated into aliquots of 40 mL each, and evaluated by the FLOTAC[®] (Cringoli et al., 2010), SST (Hoffman et al., 1934) and CST (Blagg et al., 1955). Samples were analysed in duplicate, totalling 60 samples (i.e., 20 for each technique) of grass per month. At the end of the study period, a total of 300 analyses were performed, being 100 for each method. Larvae were identified at the subfamily level based on their morphological features (Bevilaqua et al., 1993).

Faecal samples collected from the 20 horses grazing the pasture were performed on January and on May 2016, and analysed through the Mini-FLOTAC[®] method (Barda et al., 2013). This technique has a detection limit of 5 eggs per gram (EPG) of faeces, using a saturated glucose-NaCl solution as flotation medium (specific gravity: 1.25).

2.3. Data analysis

Overall data on the positivity of three techniques were analysed using the McNemar's test, with differences considered statistically significant when $p < .0001$. Conversely, the Partitioning Chi-square test was used to compare the results of subfamilies with a significant level of $p \leq .05$. Both analyses reported above were performed using the BioEstat software (version 5.0; Mamirauá/CNPq, Belém, PA, Brazil).

The Cohen's kappa coefficient (k) was calculated to evaluate the agreement between the different techniques. In addition, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and accuracy of each technique was determined using the InStat software with significance level $p < .05$ (GraphPad Software, Inc., 2000).

3. Results

The three techniques allowed a successful isolation of Cyathostominae and Strongylinae larvae in the pasture. In particular, out of 100 samples analysed for each method, 41 (41%) analysed by the

Table 1
Frequency of infective larvae (L3) of strongyles recovered from the pasture.

Technique	Parasite Subfamily	Frequency (%) (n/N)
FLOTAC	Cyathostominae	53.6 (22/41)
	Strongylinae	46.4 (19/41)
Spontaneous sedimentation	Cyathostominae	33.3 (2/6)
	Strongylinae	66.7 (4/6)
Centrifugal sedimentation	Cyathostominae	33.3 (2/6)
	Strongylinae	66.7 (4/6)

FLOTAC[®] technique were positive, whereas only 6 samples (6/100) were positive at the SST or at the CST ($p < .0001$). No statistical difference was observed between the positivity of the test and the subfamily of the parasite detected ($p = .4643$) (Table 1).

According to the values of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and accuracy, the FLOTAC[®] technique showed the highest performance (Table 2). At the k analyses, a poor concordance ($k = 0$) was observed among methods.

During the study, a mean of 4.4 (range = 2–16 larvae), 3 (range 1–6) and 31.2 (range 8–74 larvae) larvae were detected using the SST, CST and FLOTAC[®] technique, respectively. Overall, results of the faecal analysis of horses showed that 80% (16/20) and 85% (17/20) of animals were positive for gastrointestinal parasite eggs (i.e., *Parascaris* sp. and Strongylidae) sampled in January and in May 2016, respectively.

4. Discussion

This study investigated the performance of three different methods for the recovery of L3 of gastrointestinal parasites of horse in the pasture. Results demonstrate that the FLOTAC[®] technique shows a higher performance when compared with other classic methods. Indeed, this assay allowed to isolate and recovery nematode larvae at least sevenfold than SST and CST ($p < .0001$). Although these two techniques have been extensively used over the last decades in this type of research (Amount et al., 1996; Rocha et al., 2012), the FLOTAC[®] appears as a high sensitive tool. All nematode larvae recovered belonged to Cyathostominae and Strongylinae subfamilies. Both groups of nematodes detected in this study have been recognized as important and prevalent parasites of horses worldwide (Lester et al., 2013).

The differences of performance among the techniques used could be attributed to the density of solutions and to the presence of faecal/soil debris, which may impair the microscopical examination of the sample, as it happens in the SST. In addition, the higher performance of the FLOTAC[®] technique may be also related to the variation of flotation solutions employed. It is known that this method employs two types of flotation solutions (i.e., sodium chloride (s.g. = 1.2) and zinc sulfate (s.g. = 1.35)), which increase the sensitivity of the test and the detection of immature forms of parasites (Cringoli et al., 2010).

This is the first study that investigated the use of FLOTAC[®] for the recovery of nematode larvae from the pasture. Information of the presence of L3 of nematodes in the environment is pivotal to establish appropriate control strategies against different species of parasites. It is known that the survival of free-living stages of nematodes is influenced by different climatic conditions (Rocha et al., 2012). The area of study is located in a tropical region where wide variations of temperature and rainfall are not frequently observed. However, in temperate regions where seasons of year are well defined, the recovery of larvae by the FLOTAC[®] may be higher than those herein observed.

In conclusion, the FLOTAC[®] presented a higher performance than other classic methods. Therefore, considering the practicality and safety of this technique, FLOTAC[®] should be recommended in the future and employed for detecting nematode larvae in the pasture. This might open new possibilities for the application of this test. Further researchers focusing on the recovery of nematode larvae throughout the year could be important to better understand the impact of the use of

Table 2

Statistical values recorded for the recovery of infective larvae (L3) of strongyles from the pasture, according to the technique employed.

Technique	Parasite Subfamily	Parameters (%)				
		Sensitivity	Specificity	Predictive value (+)	Predictive value (–)	Accuracy
FLOTAC	Cyathostominae	32	100	100	41	54
	Strongylinae	28	100	100	39	51
Spontaneous Sedimentation	Cyathostominae	11	100	100	84	85
	Strongylinae	23	100	100	86	87
Centrifugal Sedimentation	Cyathostominae	13	100	100	86	87
	Strongylinae	26	100	100	88	89

the FLOTAC® in the determination of the pasture contamination.

References

- Amarante, A.F.T., Barbosa, M.A., 1995. Seasonal variations in populations of infective larvae on pasture and nematode faecal egg output sheep. *Vet. Zootec.* 7, 127–133.
- Amount, G., Frauli, D., Simon, R., Pouillot, R., Diaw, S., Mandonnet, N., 1996. Comparison of methods for counting third stage larvae of gastrointestinal nematodes of small ruminants in tropical pastures. *Vet. Parasitol.* 62, 307–315.
- Barda, B.D., Rinaldi, L., Ianniello, D., Zepherine, H., Salvo, F., Sadutshang, T., Cringoli, G., Clementi, M., Albonico, M., 2013. Mini-FLOTAC, an innovative direct diagnostic technique for intestinal parasitic infections: experience from the field. *PLoS Negl. Trop. Dis.* e2344.
- Bevilaqua, C.M.L., Rodrigues, M.L., Cocordet, D., 1993. Identification of infective larvae of some common equine strongylids of horses. *Rev. Med. Vet.* 144, 989–995.
- Bezerra, S.Q., Couto, M.C.M., Souza, T.M., Bevilaqua, C.M.L., 2007. Ciatostomíneos (Strongylidae-Cyathostominae) parasitas de cavalos: ecologia experimental dos estágios pré-parasíticos em graminea tifton 85 (*Cynodon* spp cv. Tifton 85) na baixada Fluminense, RJ, Brasil. *Parasitol. Latinoam.* 62, 27–34.
- Blagg, W., Schoegel, E.L., Mansour, N.S., Knalaf, G.T., 1955. A new concentration technique for the demonstration of Protozoa and Helminth eggs in feces. *J. Trop. Med.* 4, 23–28.
- Corning, S., 2009. Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. *Parasit. Vectors* 2, 1–6.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Utzinger, J., 2010. FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nat. Protocol.* 5, 503–515.
- Hoffman, W.A., Pons, J.A., Janer, J.L., 1934. The sedimentation concentration methods in *Schistosomiasis mansoni*. *P. R. J. Pub. Health Trop. Med.* 9, 283–289.
- Knapp-Lawitzke, F., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., 2014. Rapid method for recovery of strongylid third stage larvae of parasitic nematodes from small soil samples. *Exp. Parasitol.* 142, 91–94.
- Krecek, R.C., Greneveld, H.T., Martz, J.I., 1992. A preliminary study of the effect of microclimate on third-stage larvae of *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* on irrigated pasture. *Int. J. Parasitol.* 22, 747–752.
- Lester, H.E., Spanton, J., Stratford, C.H., Bartley, D.J., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., Coumbe, K., Mais, T., Swan, B., Lemon, G., Cookson, R., Matthews, J.B., 2013. Anthelmintic efficacy against cyathostomins in horses in southern England. *Vet. Parasitol.* 197, 189–196.
- Lima, V.F., Ramos, R.A.N., Lepold, R., Cringoli, G., Rinaldi, L., Faustino, M.A., Alves, L.C., 2016. Use of the FLOTAC technique to diagnosing parasites of the urinary tract of dogs. *Parasitol. Res.* 115, 1737–1739.
- Lyons, E.T., Drudge, J.H., Tolliver, S.C., 2000. Larval cyathostomiasis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 16, 501–513.
- Quinelato, S., Couto, M.C., Ribeiro, B.C., Santos, C.N., Souza, L.S., Dos Anjos, D.H., Sampaio, I.B., Rodrigues, L.M., 2008. The ecology of horse cyathostomin infective larvae (Nematoda-Cyathostominae) in tropical southeast Brazil. *Vet. Parasitol.* 153, 100–107.
- Rocha, R.A., Bricarello, P.A., Rocha, G.P., Amarante, A.F., 2012. Recovery of *Trichostrongylus columbriiformis* infective larvae from three grass species contaminated in the autumn. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 21, 372–378.
- Stromberg, B.E., 1997. Environmental factors influencing transmission. *Vet. Parasitol.* 72, 247–264.