

MODIFICAÇÃO DA TÉCNICA DE WHITLOCK (1959),  
PARA O DIAGNÓSTICO DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE BOVINOS

T e s e

Apresentada ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação  
da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
para obtenção do grau de Mestre em Ciências  
na Área de Parasitologia Veterinária

MARIA DE LURDES DE AZEVEDO RODRIGUES

Rio de Janeiro

1980

*À minha mãe  
e aos meus irmãos  
pela compreensão  
e carinho*

WILHELM OTTO DANIEL MARTIN NEITZ

*Ervilhas Silvestres*

*Lindas flores surgiam de sementes nunca encontradas.  
Tão feliz ficava cada vez que as via florescer.  
Flores que faziam surgir sua ternura e sensibilidade,  
sementes que com ele foram para o jardim da eternidade,  
florescendo e nascendo ervilhas silvestres.*

IN MEMORIAN

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho, principalmente:

ao Dr. MICHAEL ROBIN HONER, Professor Titular do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), orientador desta Tese, pela incansável ajuda, constante estímulo e confiança em nós depositada;

à Dra. DELIR CORRÊA GOMES, Pesquisadora do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, pelas sugestões e apoio no decorrer do trabalho;

ao Dr. HUGO EDISON BARBOZA DE REZENDE, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária- Parasitologia Veterinária, da UFRRJ, pelo estímulo e compreensão durante a realização do curso e deste trabalho;

ao Dr. JOSÉ LUIZ DE BARROS ARAÚJO, Professor Adjunto da Área de Parasitologia da UFRRJ, pelos primeiros ensina-

mentos parasitológicos;

a todos os professores e colegas do Curso de Pós-Graduação em Parasitologia Veterinária da UFRRJ, pela colaboração na realização deste trabalho;

aos laboratoristas WALDYR JACINTO DA SILVA, WALTER FLAUSINO e WALTER LEIRA TEIXEIRA FILHO, pelo auxílio prestado nos trabalhos de laboratório;

ao Prof. OSWALDO DUARTE GONÇALVES, pela minuciosa revisão literária do escrito, e à DIVA MONTEIRO DA SILVA, pela mecanografia do texto;

à Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES; que nos tornou possível a realização prática do curso e deste trabalho;

ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela aprovação do Projeto "Parasitismo em Bovinos de Leite no Estado do Rio de Janeiro: Epidemiologia, Importância Econômica e Controle".

## BIOGRAFIA

MARIA DE LURDES DE AZEVEDO RODRIGUES, filha de Antônio Rodrigues e Arminda Lourenço de Azevedo, nasceu em Ponte de Lima, Portugal, em 28 de março de 1955.

Cursou o primário em Portugal, o ginásial no Colégio Reverendo Álvaro Reis e o Científico no Colégio Princesa Izabel, ambos no Rio de Janeiro. Em 1974, ingressou no Curso Superior de Ciências Biológicas, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, graduando-se em 1977. Neste período foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), na modalidade de Iniciação Científica, na Área de Parasitologia da UFRRJ.

Em março de 1978, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária-Parasitologia Veterinária da mesma Universidade, a nível de Mestrado, sendo bolsista da Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). A partir de 1979, foi contratada pela UFRRJ, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Área de Parasi-

tologia, como Professora Colaboradora a nível de Auxiliar de Ensino.

## Í N D I C E

	Página
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	3
III. MATERIAL E MÉTODOS	10
IV. RESULTADOS	15
V. DISCUSSÃO	20
VI. CONCLUSÕES	39
VII. RESUMO	40
VIII. SUMMARY	42
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
X. APÊNDICE	50



## I. INTRODUÇÃO

Partindo simplesmente dos achados de necropsia para diagnosticar infecções humanas por nematódeos, no século passado, parasitologistas de diversos países desenvolveram técnicas que dispensaram, para tal fim, o exame pós-morte, sendo usado o peso específico dos ovos para separá-los do material fecal e, depois, técnicas de cultura dos ovos, para obtenção de larvas, cuja morfologia foi caracterizada para as larvas infectantes, denominadas de L3 ou larvas de 3º estágio. Essas técnicas foram adotadas especialmente na parasitologia veterinária, onde receberam posteriormente mais atenção do que na parasitologia humana.

A coproscopia tem diversas desvantagens, sendo uma das mais importantes a dificuldade na identificação correta dos ovos de nematódeos parasitos gastrintestinais.

A larvacultura, embora apresente maior margem de segurança na identificação dos nematódeos, é uma técnica demorada, pois necessita, no mínimo, de sete dias para se chegar ao

diagnóstico específico com base em L3.

Por este motivo idealizamos este trabalho objetivando adaptar e avaliar a técnica de WHITLOCK (1959), desenvolvida com nematódeos parasitos de ovinos, para a identificação das larvas de 1º estágio ou L1, numa tentativa de diagnosticar infecções em bovinos. Desta forma conseguiríamos diminuir o intervalo de tempo entre a amostragem e o diagnóstico.

Este estudo situa-se dentro do Projeto "Parasitismo em bovinos de leite no Estado do Rio de Janeiro: Epidemiologia, Importância Econômica e Controle", sob os auspícios do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), no Programa Nacional de Saúde Animal.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

Através da extensa literatura, nota-se a preocupação de diagnosticar com precisão e rapidez as infecções por nematódeos gastrintestinais de ovinos e bovinos, o que nos conduziu ao levantamento das diferentes técnicas que passamos a relatar.

### A. TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO ATRAVÉS DE OVOS NAS FEZES

STOLL (1923) descreveu a técnica de flotação para contagem de ovos de ancilostomídeos; em 1930, o mesmo autor relatou adaptações desse método para contagem de ovos de nematódeos gastrintestinais de ovinos, concluindo ser um bom método.

GORDON & WHITLOCK (1939) relataram um método quantitativo que envolve o uso de uma câmara especial para microscopia, a chamada câmara McMaster; neste processamento são gastos cerca de 4 minutos para cada amostra.

SHORB (1940), em estudo comparado de ovos de vários nematódeos gastrintestinais de ruminantes domésticos, evidenciou a dificuldade de identificação específica através de medidas de ovos, aludindo à semelhança de forma e tamanho. Também salientou que para a identificação precisa é necessário conhecer o hospedeiro e a distribuição geográfica da espécie considerada.

FARR & LUTTERMOSER (1941) compararam a eficiência da solução de sulfato de zinco com a da solução saturada de açúcar, para flotação de ovos de helmintos de aves, e concluíram que a segunda era a mais eficiente, devido a seu peso específico, à facilidade de obtenção e à montagem.

TETLEY (1941) comparou as medidas de ovos de *Haemonchus contortus*, obtidos pela dissecação do útero de fêmeas e por oviposição normal, comprovando estatisticamente haver diferenças entre as duas amostras.

KATES & SHORB (1943) identificaram quatorze espécies de nematódeos gastrintestinais de ovinos através de medidas e características morfológicas de ovos.

TURNER (1947) discutiu a eficiência do método de flotação direta (D.C.F.) para a contagem de ovos de *Nematodirus spathiger* nas fezes de ovinos.

WHITLOCK (1948) modificou a técnica que usa a câmara McMaster, concluindo que as modificações tornaram a técnica mais viável, facilitando seu uso na prática.

KRUG & MAYHEW (1949) separaram quatro grupos de ovos de nematódeos de bovinos, classificando-os de acordo com sua forma, tamanho e características da casca. Relataram a dificuldade da diferenciação de algumas espécies, através das características acima mencionadas, devido à grande semelhança em forma e tamanho.

ROBERTS & O'SULLIVAN (1950) sugeriram modificação da técnica apresentada por GORDON & WITLOCK (1939), para contagem de ovos de nematódeos gastrintestinais de ovinos, desenvolvida para baixas infestações.

TETLEY (1950), trabalhando com infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Ostertagia* spp., tentou diferenciar os ovos destas espécies utilizando um gráfico bi-dimensional. Por este método mostrou haver uma pequena superposição de medidas entre eles.

CUNLIFFE & CROFTON (1954), baseando-se na probabilidade estatística, descreveram um método de diferenciação de ovos de nematódeos gastrintestinais de ovinos. Para isto consideraram a hipótese dos ovos de diferentes espécies pertencerem a classes de tamanho particular.

LEVINE et al. (1960), comparando técnicas para contagem de ovos de nematódeos gastrintestinais de bovinos e ovinos, concluíram que: para uma comparação válida, deveria ser usada uma técnica padrão realizada em diferentes laboratórios; a técnica da câmara McMaster deveria ser a escolhida, por sua rapidez e precisão.

BIRD (1971) enfatizou que, na maioria das espécies, os ovos de nematódeos estão dentro das faixas de 50-90 um de comprimento por 21-47 um de largura, seja qual for o tamanho da fêmea adulta. Destacou também que entre exemplares da mesma espécie são encontradas grandes variações. Por estes motivos, diz o autor, torna-se difícil a identificação específica através dos ovos.

#### B. TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO ATRAVÉS DE LARVACULTURA (L3)

VEGLIA (1928) observou que as larvas de alguns nematódeos gastrintestinais de ovinos na África do Sul podiam ser determinadas pelo tamanho da cauda da larva infectante (L3).

MORGAN (1930) identificou larvas infectantes de alguns nematódeos de pequenos ruminantes através da morfologia da cauda.

MONNIG (1931) diagnosticou especificamente nematódeos de ovinos, baseando-se na morfologia das larvas infectantes.

DICKMANS & ANDREWS (1933), em estudo morfológico comparado de larvas infectantes de nematódeos do trato alimentar de ovinos, concluíram ser difícil identificar as larvas de nematódeos da família Trichostrongylidae. Os autores justificaram a conclusão referindo-se ao tamanho das caudas dos trichostrongilídeos, embora ressaltassem que espécimes dos gêneros *Oesophagostomum* e *Chabertia*, por possuírem caudas longas, apre-

sentem maior facilidade de diagnóstico. Desta maneira os autores afirmam que, para se diagnosticar com maior precisão, é necessário trabalhar com infecções puras.

ROBERTS & O'SULLIVAN (1950), para Obtenção das culturas de larvas infectantes, usaram mistura de fezes frescas com fezes esterilizadas e identificaram-nas especificamente através da morfologia.

KEITH (1953) formulou uma chave para identificação das larvas infectantes dos nematódeos de ruminantes domésticos, que é de grande valor no estudo prático.

HANSEN & SHIVNANI (1956), em trabalho sobre morfologia das larvas infectantes de nematódeos de bovinos, admitiram ser possível distinguir estas larvas a nível de gênero e usualmente até de espécie, através dos caracteres morfológicos que apresentam.

DOUVRES (1957) descreveu a morfogênese das formas parasitas de *Trichostrongylus axei* e *T. colubriformis*, em bovinos. Para identificação das larvas infectantes foram usadas as características morfológicas.

WHITLOCK (1960) usou a chave de KEITH (1953) para identificação das larvas infectantes de nematódeos de bovino e recomenda seu uso na prática.

C. TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO  
ATRAVÉS DA LARVACULTURA (L1)

VEGLIA (1915) descreveu a anatomia e o ciclo de vida de *H. contortus*. A metodologia usada foi a oviposição das fêmeas grávidas em água tépida, manutenção dos ovos destas em estufa e, após 24 horas, obtenção das larvas de 1º estágio. O autor concluiu que os ovos obtidos das fezes eclodem mais rapidamente do que aqueles eliminados pela fêmea em condições artificiais. As larvas de 1º estágio foram descritas com base na morfologia e medidas.

VEGLIA (1923) caracterizou brevemente a larva de 1º estágio de *Oesophagostomum columbianum* em seu estudo sobre o ciclo de vida desta espécie. Para a descrição foram usados os caracteres morfológicos.

MONNIG (1926), trabalhando com *Trichostrongylus rugatus* e *T. instabilis* observou que o tempo mínimo para a eclosão da L1 foi de 18 horas e descreveu, com detalhes, a morfologia destas larvas.

ANDREWS (1939), utilizando técnicas desenvolvidas por VEGLIA (1915), encontrou o tempo de 20 horas para a obtenção de L1 de *Cooperia curticei*, caracterizando-a brevemente através da morfologia.

GOLDBERG (1951), descrevendo o ciclo de *Oesophagostomum uenulosum*, encontrou L1 em 24 horas e caracterizou-a, mas com poucos detalhes de morfologia e mensurações.



SILVERMAN & CAMPBELL (1959), estudando sob condições constantes o desenvolvimento embrionário e larval de *Hae-monchus contortus*, obtiveram larvas de 1° estágio no tempo mínimo de 12 horas, quando a 37°C.

WHITLOCK (1959) descreveu técnicas para obtenção de ovos e de L1 de nematódeos de ovinos. Usou uma técnica de separação dos ovos das fezes e cultivou-os em tubo de vidro projetado para a coleta de L1; as larvas eram mortas rapidamente após eclosão com iodo, impregnado num pedaço de filme fotográfico no fundo do tubo, estando em estágio uniforme de desenvolvimento quando examinadas para identificação. A diferenciação das L1 foi baseada em caracteres similares àqueles empregados para identificação do estágio infectante (L3). O diagnóstico diferencial de infecção por nematódeos, pelo exame das L1, pode ser feito entre 24 e 26 horas.

ISENSTEIN (1963), estudando o ciclo de vida de *Cooperia onchophora*, conseguiu obter larvas de 1° estágio em 16,5 horas e caracterizou-a morfológicamente.

AHLUWALIA & CHARLESTON (1974) concluíram que a temperatura ótima para o desenvolvimento mais rápido do ovo em blastômero a larva de 1° estágio de *Cooperia curticei* situou-se entre 27 e 37°C.

KHAN & DORSMAN (1978) conseguiram obter grande número de larvas de 1° estágio de *C. curticei* com temperatura entre 27 e 37°C.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### A. MATERIAL

##### 1. Local

O trabalho foi desenvolvido na Área Experimental da Parasitologia e nos laboratórios da Área de Parasitologia no Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

##### 2. Animais

Os animais utilizados no experimento foram ovinos (*Ovis aries*) e bovinos (*Bos taurus* e *Bos indicus*), procedentes de Uruguaiana (RS) e de Barra Mansa e Barra do Piraí (RJ), respectivamente.

Todos OS animais eram portadores de infecção natural, por diversos gêneros de nematódeos gastrintestinais, tais como *Haemonchus*, *Cooperia*, *Trichostrongylus* e *Oesophagostomum*.

## B. MÉTODOS

1. Avaliação da técnica proposta por WHITLOCK (1959) e das modificações sugeridas por nós

Para obtenção de ovos, visando a coleta de larvas de 1° estágio foi utilizada a técnica de WHITLOCK (1959), modificada na forma abaixo para adequação a objetivos propostos.

### **Obtenção de ovos**

A obtenção de ovos obedeceu ao seguinte processamento :

a) de cada amostra de fezes coletada na ampola retal dos animais foram separados 8-10 g que foram homogeneizados em 80 ml de água durante 20 minutos; quando se tratava de fezes de ovinos, recorreu-se ao uso de gral e pistilo para melhor êxito na homogeneização;

b) a suspensão homogeneizada de fezes foi filtrada em peneira com gaze hidrófila, recolhendo-se cerca de 60 ml;

c) o filtrado foi envasado para bécher, ao qual se acrescentou um volume igual de solução saturada de açúcar (3:2) ;

d) a mistura líquida foi homogeneizada e envasada para o frasco de vidro de paredes tetas com capacidade total de aproximadamente 125 ml (8,3x5x3 cm), com tampa de rosca ou de pressão com cortiça; tomava-se o cuidado de tampar o frasco bem cheio evitando-se a formação de bolhas de ar;

e) a mistura no frasco tampado permanecia em repouso durante 30 a 60 minutos;

f) após o repouso inclinou-se o frasco em ângulo de 30° com a linha de terra e destampou-se cuidadosamente, despejando o conteúdo com o cuidado de não deixá-lo tocar na parede superior do frasco, pois nela os ovos ficam aderidos.

g) retirado todo o conteúdo, adicionaram-se 5 ml de água da torneira sem deixar que esta tocasse a parede superior do frasco, desta forma removiam-se grande número de detritos que prejudicam a cultura, desprezando-se esta água com o mesmo cuidado já descrito.

h) removidos os detritos, lavou-se por duas vezes consecutivas, com 5 ml de água da torneira de cada vez, a parede do frasco, e o lavado foi transferido para placa de Petri de 50x20 mm e incubado em estufa a 37°C por 24 horas.

Ovos retirados por dissecação do útero de fêmeas, que haviam sido coletadas de bezerros recém-abatidos, foram submetidos ao mesmo processamento, a partir do item h da técnica descrita.

## 2. Estudo das larvas de referência obtidas de culturas puras

As larvas L1 de culturas puras, obtidas pela dissecação de fêmeas dos nematódeos, serviam como larvas de referência para os estudos morfológicos e identificação específica.

Dentre os aspectos deu-se ênfase às características biométricas diferenciais das L1, salientando-se: o comprimento total, a largura e a distância do ânus à extremidade posterior (cauda) sendo todas as medidas apresentadas em micrometro ( $\mu\text{m}$ ). Para as observações de amplitude de variação das medidas propostas para as larvas, sempre que possível, utilizou-se 100 L1 de cada espécie, ou o maior número possível.

## 3. Estudo comparado das larvas L1-L3 obtidas de culturas mistas para aprimorar a facilidade de identificação das primeiras

Após incubação de 24 horas em estufa a 37°C, obtiveram-se as larvas de 1º estágio (L1), que foram mortas pelo calor e fixadas e coradas pelo azul de algodão lactofenol a 0,01%.

As larvas L1 de nematódeos de bovinos foram comparadas morfológicamente com as de ovinos WHITLOCK (1959) e com as larvas infectantes (L3) de bovinos que foram obtidas segundo a técnica de ROBERTS & O'SULLIVAN (1950) e identificadas através da chave elaborada por KEITH (1953).

Para a mensuração das L1 foi feita escala de proje-

ção com micrômetro objetivo e câmara clara; as imagens das larvas foram projetadas pela mesma câmara clara sobre a escala preparada, facilitando a leitura das medidas.

Todas as larvas foram medidas, desenhadas, identificadas ou fotografadas com auxílio de microscópio WILD M-20 em contraste de fase.

#### 4. Análise estatística

Para análise das medidas usou-se a metodologia e as tabelas de REMINGTON & SHORK (1970) e ZAR (1974).

#### IV. RESULTADOS

As modificações introduzidas na técnica de WHITLOCK (1959) resultaram no estabelecimento de uma nova técnica, representada na Figura 1, técnica essa que permite diagnosticar a infecção de bovinos, por nematódeos gastrintestinais no prazo aproximado de 24 horas a partir da coleta de fezes.

Foram identificadas duas espécies do gênero *Haemonchus*, das quais uma em ovinos e mais *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp. e *Oesophagostomum radiatum*, todos em bovinos. Os dados desses achados constam do relato abaixo.

##### A. *Haemonchus contortus* - PROVENIENTE DE OVINOS

###### a) biometria sobre 100 exemplares

- comprimento total,	y = 304,35,	s = 30,95
- largura,	x = 19,82,	s = 0,62
- distância ânus-cauda,	x = 60,25,	s = 5,40

b) aspectos morfológicos considerados: cavidade bucal pequena, aparecendo como duas linhas paralelas refringentes; esôfago rãbitiforme; anel nervoso periesofágico, na altura da constrição esofágica (Figura 3c); conexão entre o esôfago e o intestino feita por dois anéis; intestino bem desenvolvido, com luz sinuosa e células intestinais pouco nítidas (Figura 5b), abertura anal, ventral e oblíqua, localizada na parte posterior do corpo; em muitas larvas foi possível observar uma dilatação posterior, denominada válvula retal; cauda fina e alongada, ligeiramente assimétrica (Figura 4a) primórdio genital situado lateralmente à parede do intestino, logo após a metade do corpo, observando-se apenas duas células.

#### B. *Haemonchus placei* - PROVENIENTE DE BOVINOS

##### a) biometria sobre 100 exemplares

- comprimento total,	x = 369,35,	s = 24,65
- largura,	x = 19,32,	s = 0,56
- distância ânus-cauda,	x = 74,86,	s = 6,78

b) aspectos morfológicos considerados: cavidade bucal, esôfago (Figura 8a), anel nervoso, intestino, ânus e primórdio genital semelhantes aos das larvas L1 de *H. contortus*; cauda fina e alongada, e simétrica (Figuras 3b, 4b e 8b).



C. *Cooperia* spp. - PROVENIENTE DE BOVINOS

## a) biometria sobre 100 exemplares

- comprimento total,	x = 350,20,	s = 21,50
- largura,	x = 19,58,	s = 0,53
- distância ânus-cauda,	x = 70,85,	s = 5,50

b) aspectos morfológicos considerados: cavidade bucal pequena; geralmente apresentam corpos refringentes na extremidade anterior; esôfago rãbitiforme; anel nervoso peri-esofágico; estriações cuticulares acentuadas; intestino bem desenvolvido, com luz sinuosa terminando em ânus posterior e ventral; cauda de forma cônica, simétrica e afilando-se gradativamente, terminando por um ponto. Figuras 3d, 4c, 6b e 9a:

D. *Trichostrongylus* spp. - PROVENIENTE DE BOVINO

Devido ao pequeno número de exemplares deste gênero nos hospedeiros trabalhados, apresentamos somente os limites de variação das medidas que foram de 310 a 370  $\mu\text{m}$  para o comprimento total, de 20  $\mu\text{m}$  para a largura e de 60 a 65  $\mu\text{m}$  para a distância de ânus à ponta da cauda.

As larvas L1 deste gênero já possuem os caracteres morfológicos típicos das larvas infectantes (L3). Na extremidade anterior nota-se a presença de pequenas papilas, que apa-

recem como pontos refringentes. A cauda é cônica, quase triangular, curta e sem filamento (Figuras 3a, 4d e 11b).

#### E. *Oesophagostomum radiatum* - PROVENIENTE DE BOVINOS

##### a) biometria sobre 100 exemplares

- comprimento total,  $x = 401,20$ ,  $s = 40,27$
- largura,  $x = 21,35$ ,  $s = 0,90$
- distância ânus-cauda,  $x = 101,17$ ,  $s = 14,96$

b) aspectos morfológicos considerados: corpo escuro com muitos grânulos; cavidade bucal pequena; esôfago rãbbitiforme, anel nervoso periesofágico; intestino sinuoso, terminando em ânus ventral e posterior; primórdio genital presente; cauda muito afilada, terminando em um longo filamento. Figuras 3e, 6c e 11c).

#### F. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os estudos estatísticos sobre as amostras de nematódeos estudadas não foram aplicados ao gênero *Trichostrongylus*, em face do pequeno número de exemplares disponíveis.

Para *H. contortus*, *H. placei*, *Cooperia* spp. e *Oesophagostomum radiatum* são apresentados as freqüências acumuladas e os polígonos de freqüência do comprimento total das lar-

vas L1 nas Figuras 12 a 15. Os limites de variação, as médias e os desvios padrões referentes ao comprimento total, à largura e à distância do ânus à ponta da cauda são apresentados nas Figuras 16 a 18.

*H. contortus*, *H. placei*, *Cooperia* spp. e *O. radiatum* demonstram, através do polígono de frequência e da frequência acumulada do comprimento total das larvas L1, distribuição do tipo normal. Pelo histograma da Figura 19, nota-se que a distribuição das medidas da distância do ânus à ponta da cauda, para *H. placei*, é do tipo bimodal.

As medidas de largura e distância do ânus à ponta da cauda não foram representadas por polígonos de frequência acumulada por não serem significativas.

## V. DISCUSSÃO

### A. TÉCNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE OVOS NAS FEZES

Uma constante preocupação para os parasitologistas tem sido a de apurar técnicas de diagnóstico de helmintoses. Nesta preocupação nota-se o cuidado de simplificar técnicas já usadas, tornando-as mais eficientes e práticas para sua utilização como rotina.

A literatura especializada ilustra bem tais objetivos. Por exemplo, STOLL (1923) descreveu a técnica de flotação para a contagem de ovos de ancilostomídeos; sete anos de pois, este mesmo autor relatou adaptações do seu método adequando-o para a contagem de ovos de nematódeos gastrintestinais de ovinos. Ainda sobre a técnica de flotação, FARR & LUTTEROSER (1941) advogam em favor da solução saturada de açúcar sobre a solução de sulfato de zinco, aludindo à sua maior eficiência no método de flotação direta para contagem de ovos de *N. spathiger* nas fezes de ovinos, concluindo pela validade

da técnica.

Entretanto, mesmo sendo tomada a flotação como uma técnica eficiente para contagem de ovos, GORDON & WHITIOCK (1939) idealizaram um método quantitativo para contagem de ovos de nematódeos nos casos de baixa infecção. De acordo com estes pesquisadores, era necessário o uso da câmara McMaster, mas o tempo gasto no processamento de cada amostra era de cerca de quatro minutos. As vantagens desta técnica foram reconhecidas; mesmo assim, WHITLOCK (1945) modificou-a para que ficasse ainda mais viável pela facilidade de seu uso na prática. Com este mesmo intuito, em 1950, ROBERTS & O'SULLIVAN propuseram modificações à técnica.

O emprego da câmara McMaster difundiu-se tanto, principalmente por ter alcançado os objetivos propostos de precisão e rapidez, que LEVINE et al. (1960), após compararem técnicas para contagem de ovos de nematódeos gastrintestinais de bovinos e ovinos, recomendaram-na como a técnica de escolha.

Uma vez equacionado o problema da quantificação de ovos, fez-se necessário identificá-los. A este respeito, SHORB (1940) já havia salientado a dificuldade de identificação específica pelas medidas dos ovos aludindo à semelhança de forma e tamanho. Esta opinião foi endossada por KRUG & MAYHEW (1949) e BIRD (1971), e refutada por KATES & SHORB (1943), que identificaram 14 espécies de nematódeos gastrintestinais de ovinos com base nas características morfológicas e nas medidas dos ovos.

Os aspectos utilizados por KATES & SHORB (1943) para o reconhecimento específico dos ovos parece, entretanto, muito questionável. TETLEY (1941) mostrou haver diferença estatística entre as medidas dos ovos de *H. contortus* contidos no útero das fêmeas e os ovipostos; ainda TETLEY (1950), partindo de infecções mistas de *H. contortus* e *Ostertagia* spp. e recorrendo ao uso de gráficos bidimensionais não conseguiu perfeita individualidade genérica pois ocorreu pequena superposição de dados.

Considerando que a identificação dos nematódeos gastrintestinais através dos ovos seria a técnica mais rápida em termos de diagnóstico prático, muitos pesquisadores insistem em buscar caracteres que tornem válidos tais propósitos. Assim, CUNLIFFE & CROFTON (1954), baseando-se em probabilidade estatística, descreveram um método de diferenciação de ovos de nematódeos de ovinos; porém WHITLOCK (1960) concluiu que, mesmo para uma pessoa com muita experiência, e trabalhando com análise de probabilidade, a identificação dos ovos das espécies mais comuns seria demorada. Além disto, chamou a atenção para o fato de ser necessário verificar as distribuições estatísticas das medidas dos ovos para cada área geográfica.

BIRD (1971) relatou sério aspecto negativo do reconhecimento de ovos de nematódeos pela morfologia. Destacou este autor que a forma e o tamanho dos ovos são independentes dos helmintos adultos e do grupo sistemático e que pertençam, estando a maioria dos ovos na faixa de 50-90  $\mu$ m de comprimen-

to por 21-47 um de largura; também enfatizou que a variação intra-específica pode ser grande. Essas observações de BIRD (1971) demonstram ser ainda mais difícil a aplicação das técnicas envolvendo as análises estatísticas referidas por WHITLOCK (1960), modificando a distribuição das medidas e o valor da constante P, segundo CUNLIFFE & CROFTON (1954) , para cada classe de distribuição.

#### B. LARVAS INFECTANTES (L3)

Desde que o exame dos ovos não permite segura identificação das espécies de nematódeos gastrintestinais, procurou-se desenvolver técnicas para identificação das formas infectantes dos parasitos (L3) .

Sob este prisma, VEGLIA (1928) caracterizou larvas infectantes de nematódeos parasitos de ovinos na África do Sul, valendo-se do tamanho da cauda das L3. Também MORGAN (1930) identificou larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes com base na morfologia da cauda. Por outro lado, MONNIG (1931) recorreu à morfologia geral de L3 de nematódeos de ovinos e conseguiu diagnosticar especificamente as larvas.

Após estudo comparado entre larvas infectantes de nematódeos do trato alimentar de ovinos, DICKMANS & ANDREWS (1933) concluíram ser difícil o reconhecimento das espécies destas larvas sob baixo aumento em microscópio estereoscópico. Para es-

tes autores, a morfologia das larvas infectantes dos nematódeos da família Trichostrongylidae é suficiente para sua identificação, quando observadas em microscópio ótico, embora ressalvassem os gêneros *Oesophagostomum* e *Chabertia* por possuírem caudas longas.

O apurado estudo morfológico das larvas infectantes dos nematódeos de ruminantes domésticos propiciou a KEITH (1953) formular uma chave para identificação destas L3. Este trabalho de KEITH (1953) ainda é o mais utilizado no diagnóstico das infecções por nematódeos parasitos de ruminantes.

Mesmo admitindo não haver relação linear entre as contagens de larvas e as cargas de adultos nos hospedeiros, HANSEN & SHIVNANI (1956) demonstraram que é possível identificar L3 de nematódeos de bovinos a nível de gênero e até espécie, empregando os caracteres morfológicos. Da mesma forma, GORDON (1967) acredita que, pela morfologia das L3, se podem identificar especificamente os parasitos gastrintestinais de ruminantes. Este pensamento é reforçado pelos resultados de DOUVRES (1957), que separou as L3 de *T. axei* e *T. colubri-formis* em bovinos, utilizando apenas recursos morfológicos.

As possibilidades diagnósticas com larvas infectantes conseguiram suprimir de tal forma as dificuldades encontradas com a identificação dos ovos dos nematódeos gastrintestinais, que REINECKE (1961) propôs técnicas de diagnóstico adaptadas para estudos de levantamento. Para tal, este autor recomendou as larvaculturas segundo o método de ROBERTS &



O'SULLIVAN (1950). Contudo, WHITLOCK (1960) recomenda o uso prático da chave formulada por KEITH (1953) para a identificação das L3 de nematódeos de bovinos.

#### C. LARVAS DE PRIMEIRO ESTÁGIO (L1)

Assegurada a perfeita identificação dos nematódeos gastrintestinais através do reconhecimento se suas larvas infectantes, o novo desafio imposto aos pesquisadores foi o de reduzir o tempo necessário para o diagnóstico. Pode-se observar, através de vários trabalhos sobre biologia, a descrição da larva de 1º estágio, porém os autores não visavam especificamente a identificação destas larvas para um diagnóstico. Assim, SILVERMAN & CAMPBELL (1959), mantendo temperatura constante de 37°C conseguiram obter larvas de primeiro estágio de *H. contortus* em 12 horas, enquanto outros pesquisadores conseguiram as L1 de diversos nematódeos entre 16 a 26 horas. Também ISENSTEIN (1963) reduziu o tempo de eclosão de L1 de *C. oncophora* para 16 h 30 min.; neste trabalho, o autor preocupou-se em caracterizar as larvas ainda em seu primeiro estágio, o que já havia sido feito por VEGLIA (1915), que descreveu aspectos morfológicos e biométricos das larvas de 1º estágio de *H. contortus*. Para isto, valeu-se da oviposição de fêmeas grávidas em água tépida, cujos ovos foram mantidos em estufa. Este mesmo autor, em 1923, caracterizou morfológicamente as L1 de *O. columbianum*.

As faixas de temperatura ideal para cada espécie de parasito e a caracterização das larvas L1 passaram a ser estudadas. Nesta tónica aparecem os trabalhos de AHLUWALIA & CHARLESTON (1974), apontando a variação de 27 a 37°C como a faixa de temperatura ideal para o desenvolvimento das larvas L1 de *C. curticei*; KHAN & DORSMAN (1978), utilizando esta variação de temperatura, obtêm grande número de larvas de 1º estágio de *C. curticei*. Ainda com esta espécie de nematódeo, ANDREWS (1939), usando a metodologia de VEGLIA (1915), evidenciou os aspectos morfológicos das larvas L1.

Sobre outros gêneros de parasitos gastrintestinais, também são reportados alguns estudos. Por exemplo, MONNIG (1926) apresenta detalhes de morfologia das larvas L1 de *T. axei* e *T. colubriformis*. GOLDBERG (1951) descreveu morfológicamente larvas de primeiro estágio de *O. venulosum*, apresentando, inclusive, dados de mensuração.

Na realidade foi WHITLOCK (1959) quem desenvolveu técnicas para obtenção de ovos e larvas L1 de nematódeos gastrintestinais de ovinos, com a finalidade específica de diagnóstico rápido. Procurou identificar as L1 com base nos caracteres de similaridade aos utilizados na identificação dos estágios infectantes.

Motivados pela necessidade de reduzir o tempo para diagnóstico das helmintoses, propusemo-nos a este estudo visando a contribuir para o equacionamento do problema. Para tal fim, buscamos avaliar o uso das larvas de primeiro estágio L1 na iden-

tificação de infecções por nematódeos gastrintestinais de bovino. Com o intuito de facilitar a avaliação, esta foi dividida em três fases:

I) avaliação da técnica proposta por WHITLOCK (1959) e las modificações sugeridas por nós;

II) estudo das larvas de referência obtidas de culturas puras;

III) estudo comparado das larvas L1-L3 obtidas de culturas mistas para aprimorar a facilidade de identificação das primeiras.

#### **FASE I**

Para avaliação da técnica proposta por WHITLOCK (1959), consideramos o procedimento desta nas suas três etapas.

A primeira etapa, que consistiu na obtenção de ovos nas fezes, refere-se a um método de flotação simplificado, adaptado por WHITLOCK especialmente para tal fim. Esta fase foi pouco modificada por nós, sendo que as principais alterações consistiriam na não utilização da bomba de pressão negativa e da não filtração da suspensão final pelo filtro de Buchner. Em substituição ao frasco usado por WHITLOCK (1959), identificado como "4oz medicine bottle" ( $\pm$  113 ml), utilizamos um frasco de 8,3 cm de altura x 5 cm de largura x 3 cm de lateral, com diâmetro de abertura (boca) de 2 cm, e com capacidade de

125 ml (Figura 2 ). Apesar das dimensões do frasco original não serem citadas, através do desenho apresentado no trabalho publicado pode-se concluir que estas diferem das do nosso trabalho. Destacou-se, no entanto, que o frasco utilizado por nós funcionou satisfatoriamente na concentração de ovos.

Deixamos de utilizar a bomba de pressão negativa porque, nas primeiras tentativas de avaliação da técnica, ela funcionava ligada a uma torneira, e embora funcionasse bem, percebemos que a velocidade de vazamento era alta demais para o frasco, causando perturbações na camada de ovos aderidos à parede superior do frasco. Para trabalho de rotina, o manuseio da bomba e do frasco simultaneamente tornava-se complicado se realizado por uma pessoa; e o envolvimento de duas ou mais pessoas neste trabalho suprimia o caráter prático e de facilidade da nova técnica. Desta maneira, despejamos cuidadosamente o conteúdo do frasco, sem o auxílio da bomba, e os resultados obtidos foram bons e de fácil execução.

O filtro de Buchner empregado por WHITLOCK (1959) permitia a aderência dos ovos ao papel de filtro, devido à camada fina da solução de açúcar. Entretanto, encontramos dificuldade na recuperação dos ovos após a filtração; por esse motivo, desprezamos a filtração final com filtro de Buchner e não houve problema na recuperação dos ovos.

Todos os outros procedimentos nesta primeira etapa seguiram a descrição original de WHITLOCK (1959).

A cultura de ovos, considerada a segunda etapa no

procedimento de WHITLOCK (1959), foi modificada substancialmente na tentativa de substituir o tubo especial de larvacultura por outros tubos disponíveis e de mais fácil aquisição. Não encontramos tubo similar que proporcionasse o mesmo resultado, por isso resolvemos tentar a utilização de pequenas placas de Petri, e obtivemos resultados bastante satisfatórios. Foram mantidos em estufa entre 30-37°C, conforme as observações de AHLUWALIA & CHARLESTON (1974) e KHAN & DORSMAN (1978). Este procedimento, além de ter ficado menos dispendioso, traz a vantagem da facilidade de obtenção do material, pois é de uso rotineiro em laboratório.

A última etapa desta fase foi a da diferenciação das larvas.

Para avaliação da técnica modificada utilizamos primeiramente larvas de *H. contortus* e comparamos nossos resultados com os de WHITLOCK (1959) para esta espécie. Como a finalidade da tese é a aplicação da nova técnica para diagnosticar infecções em bovinos, e por julgarmos ter atingido o objetivo, apresentamos os dados da comparação (Tabela I) entre larvas estudadas por VEGLIA (1915), WHITLOCK (1959), procedentes de ovinos e as do presente trabalho.

As principais diferenças são: a razão entre o comprimento total e distância ânus-cauda, que é de 4,6 para WHITLOCK e 4,4 para o presente trabalho, e a razão comprimento/largura, que também difere, sendo 18,33 para WHITLOCK (1959) e 15,36 para o presente trabalho.

Tabela 1. Comparação das medidas de larvas L1 de *Haemonchus contortus* (ovino), obtidas por diferentes autores.

Autores	Comprimento total ( $\mu\text{m}$ )	Largura ( $\mu\text{m}$ )	Distância ânus - cauda ( $\mu\text{m}$ )	Nº de exemplares
VEGLIA (1915)	345,0 -	17,0 -	-	-
WHITLOCK (1959)	344,6 $\pm$ 18,1	18,8 $\pm$ 1,2	74,9 $\pm$ 3,2	171
PRESENTE ESTUDO	304,35 $\pm$ 30,95	19,82 $\pm$ 0,62	60,25 $\pm$ 5,40	100

Essas diferenças podem ser atribuídas a diversas origens, como:

- a) a raça do hospedeiro envolvido;
- b) a diferença entre Cepas de *H. contortus*;
- c) as técnicas diferentes utilizadas para a obtenção das larvas.

A primeira das hipóteses formuladas tem apoio nos resultados de TETLEY (1941), que observou diferenças marcantes entre os ovos de *H. contortus* de diferentes procedências e idades, e sugeriu a presença de cepas diferentes deste helminto no mesmo trabalho, descrevendo diferenças entre os ovos dissecados de fêmeas e ovos encontrados naturalmente nas fezes. Sabemos, através do trabalho de CROFTON & WHITLOCK (1965), que o volume do ovo determina o tempo necessário para eclosão; nota-se que as observações deste autor foram feitas com *H. contortus*. Sugerimos, então, que as diferenças entre as medidas feitas por WHITLOCK (1959) e no presente trabalho podem ser devidas a um ou mais desses fatores ou talvez uma combinação de todos.

O cálculo do desvio normal (Z) para a nossa população mostra que somente 9,3% são maiores do que a média da população estudada por WHITLOCK (1959). O teste t das duas populações confirma uma diferença significativa a  $P (t_{0.50} (2)) > 0.001^{**}$ .

Em suma, essas observações indicam que, embora as larvas sejam extremamente semelhantes morfológicamente, temos a ver duas cepas diferentes de *H. contortus*, cujas diferenças talvez

possam depender do volume dos ovos.

WHITLOCK (1959) estudou *H. placei* de bovinos, porém, mantida em ovinos, e em nosso trabalho usamos material procedente de bovinos. Para ROBERTS *et al.* (1954), *H. placei* é uma espécie tipicamente de bovino, mas GIBBONS (1979) rejeita a validade desta espécie. Nenhum outro autor estudou a larva de primeiro estágio de *H. placei* "stricto sensu", por isso só podemos confrontar nossos dados com os de WHITLOCK (1959), o que consta da Tabela 2.

Pode-se constatar uma concordância parcial entre os resultados de WHITLOCK (1959) e os do presente trabalho. Mesmo sem termos encontrado convincente explicação, é importante enfatizar que a distribuição das medidas do ânus à ponta da cauda referidas por WHITLOCK (1959) e as do presente trabalho demonstram distribuições bimodais, que difere das distribuições das mesmas medidas para *H. contortus*. Salientamos, entretanto, que a maior diferença entre os dois trabalhos está na distância do ânus à ponta da cauda.

Em relação à afirmativa de GIBBONS (1979) de que *H. contortus* e *H. placei* não podem ser diferenciados com base nas características morfológicas, de acordo com nossos resultados para as larvas de primeiro estágio, a distribuição das medidas do comprimento total, largura e distância do ânus à ponta da cauda são bastante diferentes (Figura 19).

Na Tabela 3 apresentamos as medidas de *Cooperia* spp.



Tabela 2. Comparação das medidas de larvas L1 de *Haemonchus placei* (bovino), obtidas por diferentes autores.

Autores	Comprimento total ( $\mu\text{m}$ )	Largura ( $\mu\text{m}$ )	Distância ânus - cauda ( $\mu\text{m}$ )	Nº de exemplares
WHITLOCK (1959)	362,8 $\pm$ 19,6	19,3 $\pm$ 1,4	92,3 $\pm$ 5,55	50
PRESENTE ESTUDO	369,35 $\pm$ 24,65	19,32 $\pm$ 0,56	74,86 $\pm$ 6,78	100

Tabela 3. Comparação das medidas de larvas L1 de *Cooperia* spp. (bovino), obtidas por diferentes autores.

Autores	Comprimento total (µm)	Largura (µm)	Distância ânus - cauda (µm)	Nº de exemplares
WHITLOCK (1959)	330,3 ± 13,9	17,1 ± 0,9	76,6 ± 4,3	50
PRESENTE ESTUDO	350,20 ± 21,50	19,58 ± 0,53	70,85 ± 5,50	100

encontradas por WHITLOCK 1959) e por nós no presente trabalho, para comparação de resultados.

Da mesma forma que para *H. placei*, os espécimes de *Cooperia* spp. provenientes de bovino são maiores do que os espécimes dos ovinos, mas preservam as características básicas do gênero. Este Conceito é válido para todas as espécies que foram encontradas, as quais foram agrupadas e referidas em termos genéricos, da mesma forma que WHITLOCK (1959), devido à grande similaridade entre as espécies de *Cooperia* spp., tal como ocorre com as L3.

Identificadas pelos estágios adultos, podemos confirmar que as espécies mais comuns nos animais necropsiados foram *C. pectinata* e *C. punctata*.

Como já foi esclarecido anteriormente, não nos foi possível encontrar material suficiente para estudo analítico de larvas do gênero *Trichostrongylus*. No entanto, acreditamos que a larva pode ser facilmente identificada por suas características morfológicas bem típicas e semelhantes às da larva infectante (Figura 20).

A cauda comprida, a largura e a aparência geral da L1 de *Oesophagostomum radiatum* permite separar facilmente esta espécie das outras discutidas. Observamos que mesmo em culturas mistas o reconhecimento das L1 é muito fácil.

## **FASE II**

Para maior garantia da identificação das larvas de

primeiro estágio de acordo com os estudos feitos, adotamos a técnica de dissecação de fêmeas adultas dos helmintos coletados de bezerros recém-abatidos, após serem classificadas.

As larvas de *H. contortus*, *H. placei*, *Cooperia* spp. e *O. radiatum* foram assim identificadas morfológicamente. Somente as larvas de *Trichostrongylus* spp. não foram identificadas a partir destas culturas puras, pois não logramos obter fêmeas grávidas para dissecar.

Através de tabelas e gráficos mostramos que existe uma superposição das medidas das larvas estudadas para as diferentes espécies. Mesmo assim as larvas L1 podem ser morfológicamente caracterizadas principalmente pelo aspecto da cauda.

### **FASE III**

Devemos enfatizar aqui que na identificação das larvas L1 sempre existe um certo grau de subjetividade na diferenciação, por exemplo, entre *H. contortus* e *Cooperia* spp., mas é válido ressaltar que o mesmo ocorre entre as larvas infectantes dos mesmos gêneros.

Este grau de subjetividade é uma função da superposição das medidas físicas das larvas e de certa semelhança na morfologia chave da "cauda". Porém, concordamos com WHITLOCK (1959) em que existe um grau de precisão na identificação das larvas L1. Este grau de precisão é similar tanto para as L1

como para as L3.

Não existem grandes diferenças estruturais entre as diversas fases larvais dos nematódeos aqui estudados. Este pensamento coincide com o que já foi comentado por CHITWOOD & CHITWOOD (1974) sobre mudanças entre os estágios larvais. Para este autor, não existe uma metamorfose em si, as diferenças são mais nas proporções do que nas estruturas. As características dessas formas exibem uma mistura de aspecto cenogenético e palingenético. As características cenogenéticas mais aparentes envolvem a cauda dos helmintos e como pode ser visto nas Figuras 3a, e; 10a, b e 11a, c, a parte posterior das larvas estudadas difere mais do que as medidas comprimento total e largura.

Pode-se observar nas Figuras 3a, e e 20a, e que existe uma diferença proporcional entre as L1 e L3, e sabe-se que esta diferença é muito menor do que a razão comprimento L3/comprimento adulto. Por isso julgamos que não exista grande dificuldade na identificação das formas L1 em relação às L3, que as mesmas características utilizadas para L3, até certo ponto, podem ser utilizadas para a identificação das L1 e que o aspecto morfológico mais importante é a Chamada "cauda" da larva.

Embora freqüentemente denominada de "cauda", a estrutura referida deve ser identificada com maior precisão. Nas larvas L3 a cauda é, na verdade, a cutícula do estágio anterior, L2, que envolve a larva infectante. A verdadeira cau-

da pode ser muito curta, embora a bainha seja muito comprida (*O. radiatum*) ou a bainha e a cauda curtas *Trichostrongylus* spp.).

Entre as características cenogenéticas, a "cauda" pode ser muito diferente em larvas com necessidades ecológicas similares, por razões ainda não estudadas. Fica claro então que o estudo das formas imaturas dos nematódeos deve concentrar-se na "cauda", a qual merece descrição detalhada.

No que se refere ao primórdio genital, embora tenhamos observado apenas duas células, este seria constituído de um grupo de quatro células segundo CHITWOOD & CHITWOOD (1974), e está localizado lateralmente ao intestino, na metade do corpo.

## VI. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados por nós obtidos podemos concluir que:

1. as modificações por nós introduzidas nas técnicas de WHITLOCK (1959) deram bons resultados na obtenção de ovos e de larvas de primeiro estágio e, além de fácil procedimento, são de baixo custo;

2. a técnica utilizada para obtenção e identificação das larvas L1 de nematódeos gastrintestinais de bovinos permite diagnóstico eficiente no período de aproximadamente 24 horas;

3. as larvas de 1º estágio de *Haemonchus contortus*, *Haemonchus placei*, *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp. e *Oesophagostomum radiatum* podem ser identificados com um grau de facilidade semelhante à larva infectante dos mesmos;

4. uma análise das larvas de 1º estágio do gênero *Haemonchus* demonstra uma descontinuidade na população.

## VII. RESUMO

Objetivando-se diminuir o tempo entre amostragem e o diagnóstico das infecções por nematódeos gastrintestinais de bovinos, modificou-se a técnica de WHITLOCK (1959). A mudança básica consistiu na não utilização da bomba de pressão negativa para retirada do líquido na obtenção de ovos e do filtro de Buchner para a filtração da suspensão e na substituição do frasco usado por WHITLOCK (1959) por outro adaptado por nós. Essas modificações tornaram o processo menos oneroso e facilitaram seu uso na rotina laboratorial dando bons resultados devido à sua fácil execução.

As larvas de primeiro estágio (L1), assim obtidas, podem ser identificadas em um período de tempo menor (24 horas) do que o utilizado para a larva infectante (7 dias).

Preparam-se culturas puras e as larvas, assim obtidas, foram consideradas como larvas de referência para comprovar a identificação das larvas de culturas mistas provenientes dos ovos coletados nas fezes.



No presente estudo trabalhou-se com *Haemonchus contortus* de ovinos, *Haemonchus placei*, *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp. e *Oesophagostomum radiatum* de bovinos, apresentando-se medidas e descrição das características, morfológicas.

## VIII. SUMMARY

With the objective of lessening the time between the sampling and diagnosis of infections due to gastrointestinal nematodes in bovines, modifications were made of the WHITLOCK (1959) technique. Basic changes consisted of the exclusion of the negative pressure pump, used in removing the liquid during the collection of eggs; the exclusion of the Buchner filter in the filtration of the suspension and the substitution of the bottle used by WHITLOCK (1959) by one adapted by the author.

These modifications apart from reducing costs, gave good results under routine laboratory conditions due to increased simplicity.

First stage larvae (L1) thus obtained may be identified in a shorter period (24 hours) than that needed for infective larvae (7 days).

Pure cultures were prepared and these larvae were considered as "reference larvae" for the identification of

mixed cultures derived from eggs in faeces.

In this study, observations were made on *Haemonchus contortus* (ovine), *Haemonchus placei*, *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp, and *Oesophagostomum radiatum* (bovine), measurements and descriptions of their morphological characters are given.

## IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLUWALIA, J.S. & CHARLESTON, W.A.G., 1974. Studies on the development of the free-living stages of *Cooperia curticei*. New Zealand Ver. J., 22(10):191-195.
- ANDREWS, J.S., 1939. Life history of the nematode *Cooperia curticei*, and development of resistance in sheep. J. Agric. Res., 58(10) :771-785.
- BIRD, A.F., 1971. The structure of nematodes. Academic Press. N.Y., U.S.A., 318p.
- CHITWOOD, L.M. & CHITWOOD, M.B., 1974. Introduction to nematology. University Park Press, Baltimore, 364p.
- CROFTON, H.D. & WHITLOCK, J.H. ,1965. Cap.12 In: BIRD,A.F., 1971. The structure of nematodes. Academic Press, N.Y.,279-300p.
- CUNLIFFE, G. & CROFTON, H.D., 1954. Egg size and differential egg counts in relation to sheep nematodes.Parasitology, 45:275-286.

- DICKMANS, G. & ANDREWS, J.S., 1933. A comparative morphological study of the infective larvae of the common nematodes parasitic in the alimentary tract of sheep. *Trans. Am. Micr. Soc.*, 52:1-25.
- DOUVRES, F.W., 1957. The morphogenesis of the parasitic stages of *Trichostrongylus axei* and *T. colubriformis*, nematode parasites of cattle. *Proc. Hflm. Soc. Wash.*, 24(1): 4-14.
- FARR, M.M. & LUTTERMOSER, G.W., 1941. Comparative efficiency of zinc sulfate and sugar solutions for the simultaneous flotation of coccidial oocysts and helminthic eggs. *J. Parasitol.*, 27:417-424.
- GIBBONS, L.M., 1979. Revision of the genus *Haemonchus* Coob, 1898 (Nematoda: Trichostrongylidae). *Systematic Parasitology*, 1 (1) :3-24.
- GOLDBERG, A., 1951. Life history of *Oesophagostomum venulosum*, a nematode parasite of sheep and goats. *Proc. Helm. Soc. Wash.*, 18(1):36-47.
- GORDON, H. McL., 1967. The diagnosis of helminthosis in sheep. *Vet. Med. Review*, 2/5:140-168.
- GORDON, H. McL & WHITLOCK, H.V., 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Council Scient. Indust. Res. Australia*, 12:50-52.

- HANSEN, M.F. & SHIVNANI, G.A., 1956. Comparative morphology of infective nematode larvae of Kansas beef cattle and its use in estimating incidence of nematodiasis in cattle. *Trans, Am. Mi cr. Soe.*, 75:91-102.
- ISENSTEIN, R.S., 1963. The life history of *Cooperia onchophora* (Railliet, 1898) Ransom, 1907, a nematode parasite of cattle. *J. Parasitol.*, 49(2):235-240.
- KATES, K.C. & SHORB, D.A., 1943. Identification of eggs of nematodes parasitic in domestic sheep. *Am. J. Vet. Res.*, 4:54-60.
- KEITH, R.K., 1953. The differentiation of the infective larvae of some common nematode parasites of cattle. *Austr. J. Zool.*, 1/2:223-235.
- KHAN, Z.I: & DORSMAN, W., 1978. *Trichostrongylus colubriformis*: cultivation of the free-living stages. *J. Parasitol.*, 64(6):1024-1027.
- KRUG, E.S. & MAYHEW, R.L., 1949. Studies on bovine gastro-intestinal parasites. XIII. Species diagnosis of nematode infections by egg characteristics. *Trans. Am. Micr. Soc.*, 68:234-239.
- LEVINE, N.D.; MEHRA, K.N.; CLARK, D.T. & AVES, J., 1960. A comparison of nematode egg counting techniques for cattle and sheep feces. *Am. J. ver. Res.*, 511-515.

- MONNIG, H.O., 1926. The life-histories of *Trichostrongylus instabilis* and *T. rugatus* of sheep in South Africa. 11/12 th. Rep. Vet. Res. S. Afr., 221-251.
- MONNIG, H.O., 1931. The specific diagnosis of nematode infestation in sheep. 17th. Rep. Ver. Res. Un. S. Afr., 221-251.
- MORGAN, D.O., 1930. On the differential diagnosis of larvae of some helminth parasites of sheep and goats. Jour. Helminth., 8(4) :223-228.
- REINECKE, R.K., 1961. III. The diagnosis of nematode parasites in ruminants for worm survey purposes. J. s. Afr. Vet. Med. Ass., 32(2):168-174.
- REMYINGTON, R.D. & SHORK, M.A., 1970. Statistics with applications to the biological and health sciences. Prentice-Hall, Inc., N.J., 418p.
- ROBERTS, F.H.S. & O'SULLIVAN, P.J., 1950. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. Aust. J. Agric. Res., 1(1):99-102.
- ROBERTS, F.H.S.; TURNER, H.N. & McKEVETT, M., 1954. On the specific distinctness of the ovine and bovine "strains" of *H. contortus* (Rudolphi) Cobb (Nematoda: Trichostrongyliidae). Austr. J. Zool., 2:275-295.

- SHORB, D.A., 1940. A comparative study of the eggs of various species of nematodes parasitic in domestic ruminants. *J. Parasitol.*, 26:223-231.
- SILVERMAN, P.H. & CAMPBELL, J.A., 1959. Studies on parasitic worms of sheep in Scotland. I. Embryonic and larval development of *Haemonchus contortus* at constant conditions. *Parasitology*, 49(1/2):23-38.
- STOLL, N.R., 1923. Investigations on the control of hook-worm disease. XV. An effective method of counting hook-worm eggs in feces. *Am. J. Hyg.*, 3:59-70.
- STOLL, N.R., 1930. On methods of counting nematode ova in sheep dung. *Parasitology*, 22:116-136.
- TETLEY, J.H., 1941. *Haemonchus contortus* eggs: comparison of those in utero with those recovered from feces, and a statistical method for identifying *H. contortus* in mixed infections. *J. Parasitol.*, 27:433-463.
- TETLEY, J.H., 1950. The differentiation of the eggs of *Haemonchus contortus* and *Ostertagia* species of the sheep and a note on the relative generic egg-laying rates. *Parasitology*, 40:273-275.
- TURNER, J.H., 1947. Counting *Nematodirus spathiger* eggs in sheep dung. *Proc. Helm. Soc. Wash.*, 18(2):132-135.



- VEGLIA, F., 1915. The anatomy and life-history of the *Haemonchus contortus* (Rud.). Union So. Afr. Dept. Agr. Dir. Ver. Res. Rept., 3(4):349-500.
- VEGLIA, F., 1923. Preliminary notes on the life-history of *Oesophagostomum columbianum*. Union So. Afr. Dept. Agr. Vet. Res. Rept., 9(10):811-823.
- VEGLIA, F., 1928. Oesophagostomiasis in sheep (preliminary note). 13/14th. Rep. Vet. Res. S. Afr., 755-797.
- WHITLOCK, H.V., 1948. Some modifications of the McMaster helminth egg-counting technique and apparatus. J. Counc. Sci. Ind. Res. Aust., 21:177-180.
- WHITLOCK, H.V., 1959. The recovery and identification of the first stage larvae of sheep nematodes. Austr. Ver. J., 55: 310-316.
- WHITLOCK, J.H., 1960. Diagnosis of veterinary parasitisms. Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A., 236p.
- ZAR, J.H., 1974. Biostatistical analysis. Prentice-Hall Inc., N.J., 620p.

X. APÊNDICE

## FLUXOGRAMA

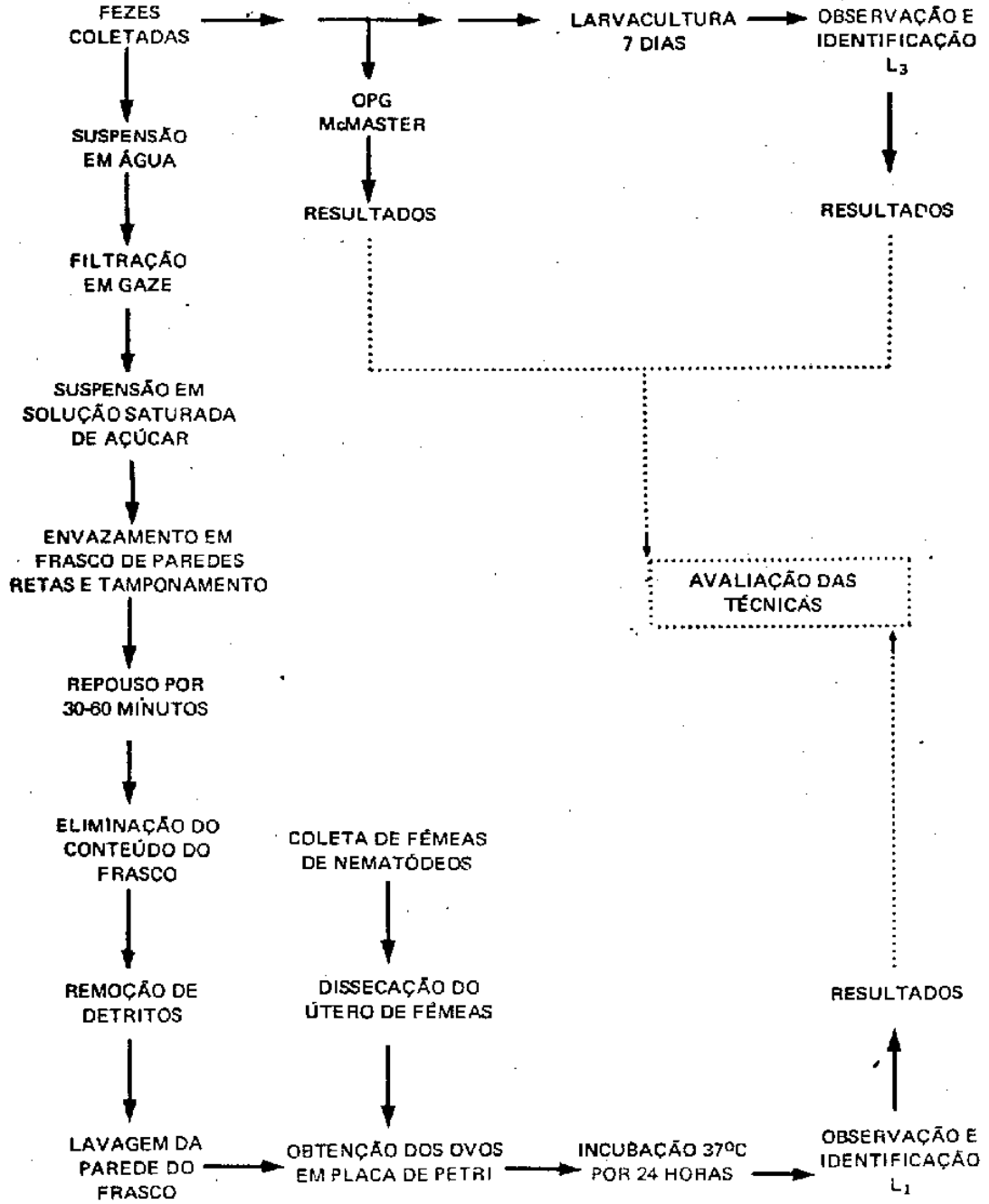


Figura 1

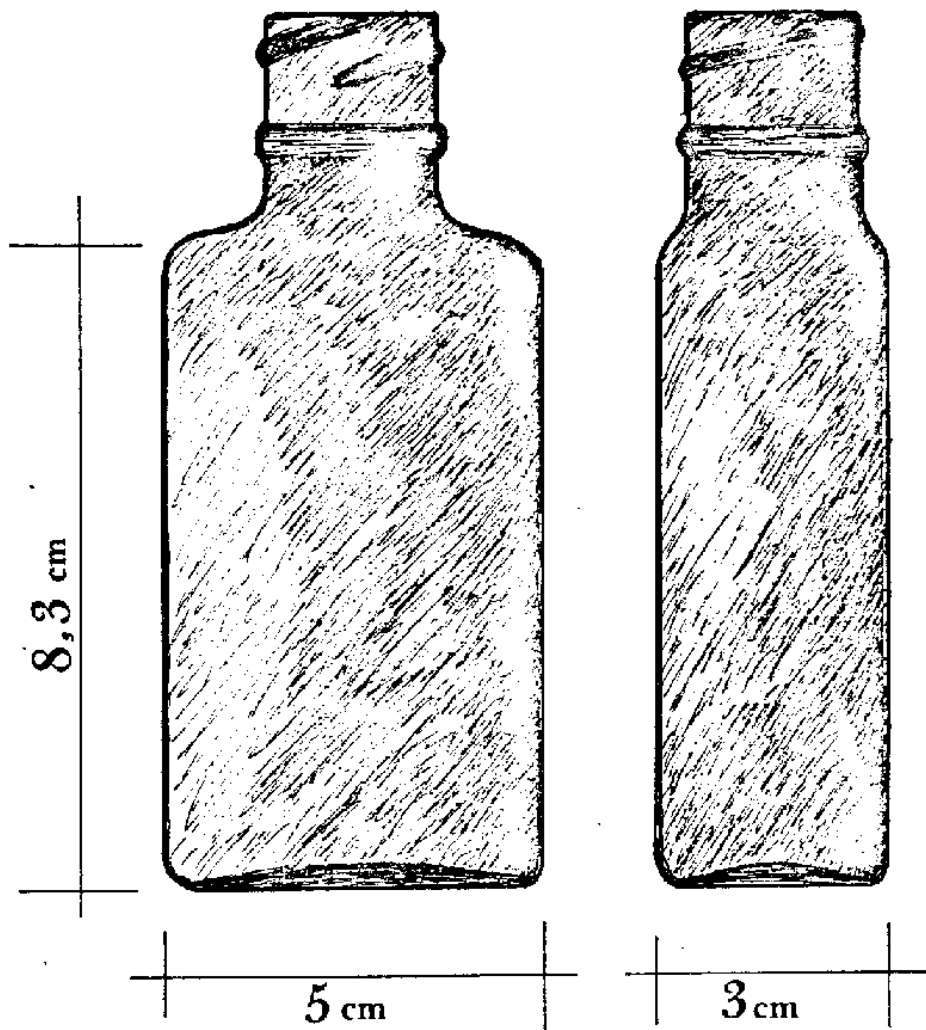


Figura 2. Frasco usado para a coleta de ovos.

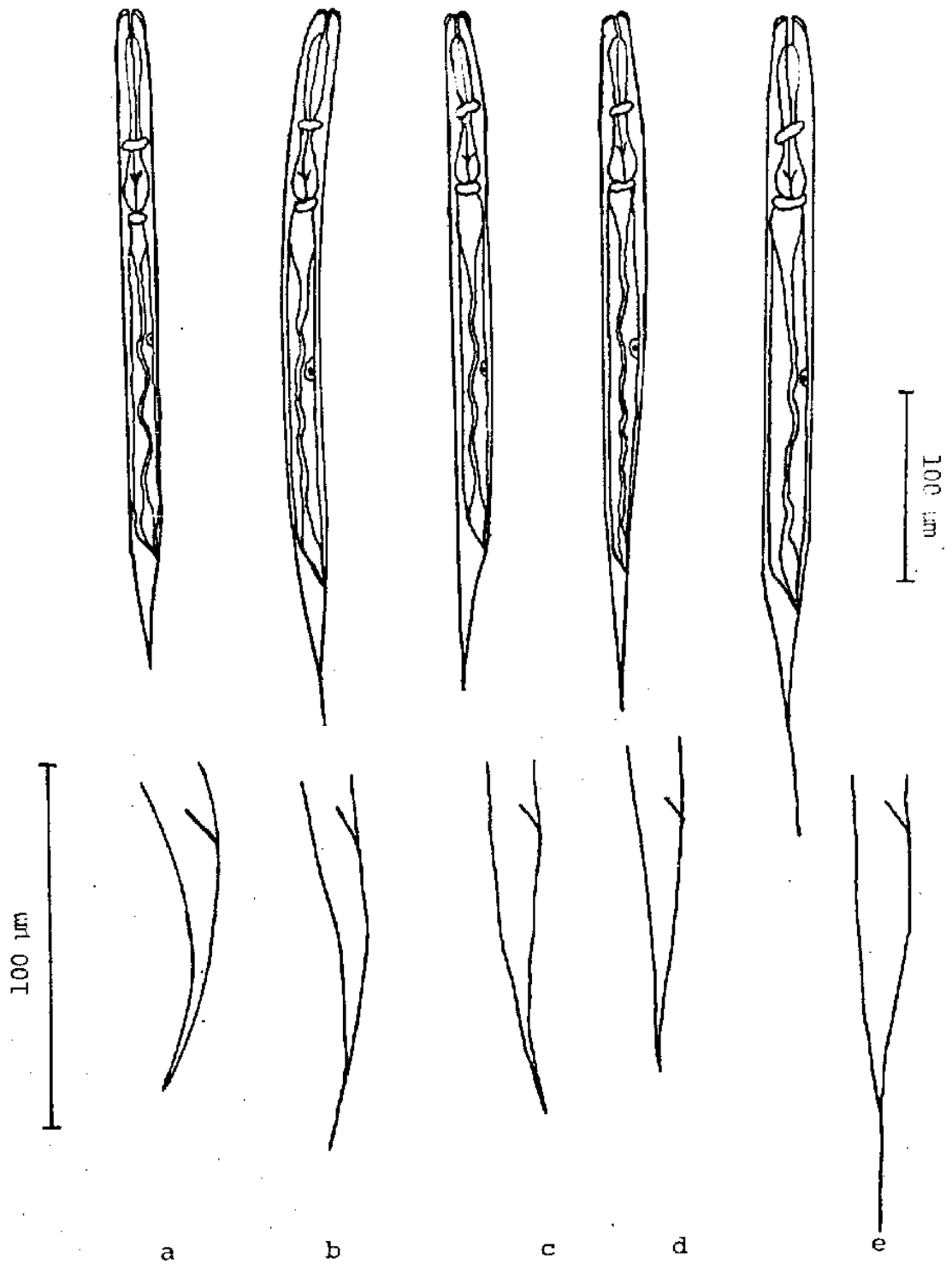


Figura 3. Morfologia geral e aumento da extremidade posterior das larvas de primeiro estágio de: a) *Trichostrongylus* spp.; b) *Haemonchus placei*; c) *Oesophagostomum radiatum*.



a

b

c

d

Figura 4. Larvas de primeiro estágio de:

a = *Haemonchus contortus* (ovino)

b = *H. placei* (bovino)

c = *Cooperia* (bovino)

d = *Trichostrongylus* sp

Aumento = 250 X

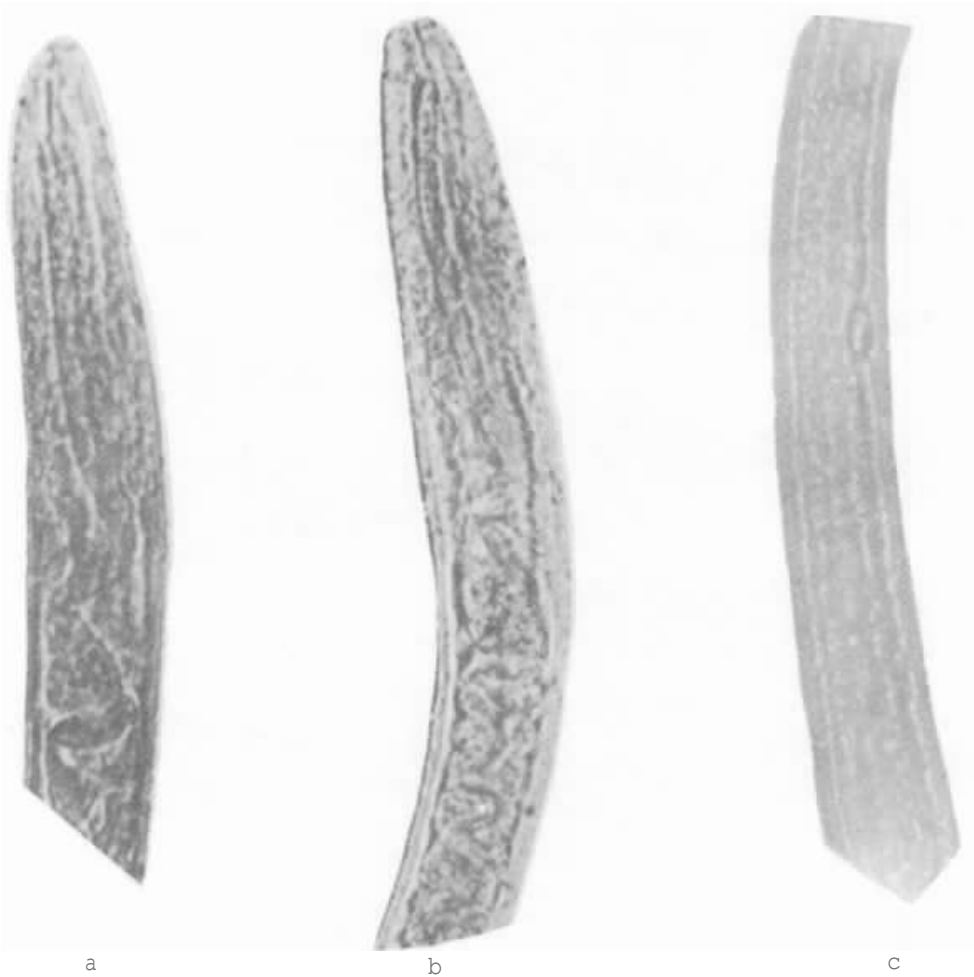


Figura 5. Aspectos morfológicos de L1 de *H. contortus*

a = extremidade anterior

b = extremidade anterior e intestino

c = primórdio genital

Aumento = 600 X



Figura 6. Larvas de primeiro estágio de:

- a = *Haemonchus contortus* (ovino)
- b = *Cooperia* spp. (bovino)
- c = *Oesophagostomum radiatum* (bovino)

**Aumento = 250 X**





Figura 7. L1 de *Haemonchus contortus*

a = extremidade anterior  
b = intestino com luz sinuosa  
c = extremidade posterior

Aumento = 600 X



Figura 8. L1 de *Haemonchus placei*

a - extremidade anterior

b - extremidade posterior

Aumento = 600 X

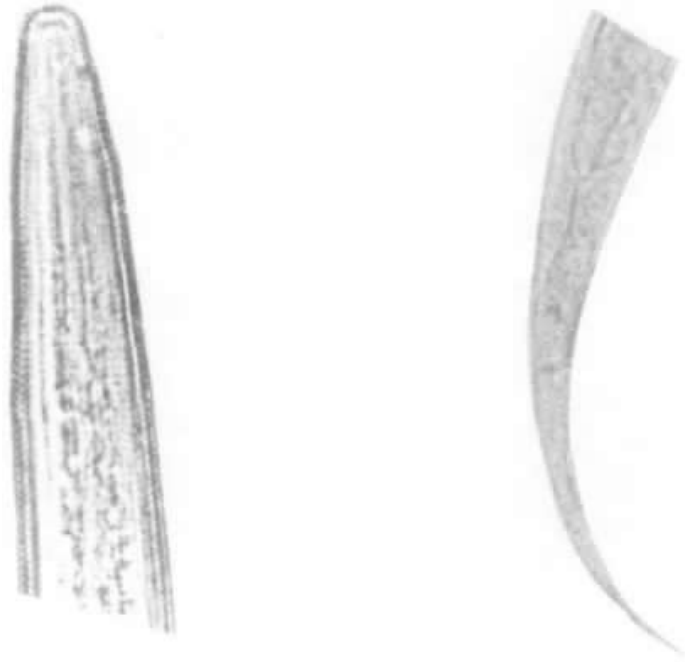


Figura 9. L1 de *Cooperia* sp

a = extremidade anterior  
b = extremidade posterior

Aumento = 600 X



Figura 10. Extremidade posterior de L1

a = *Haemonchus contortus*

b = *H. placei*

Aumento = 600 X

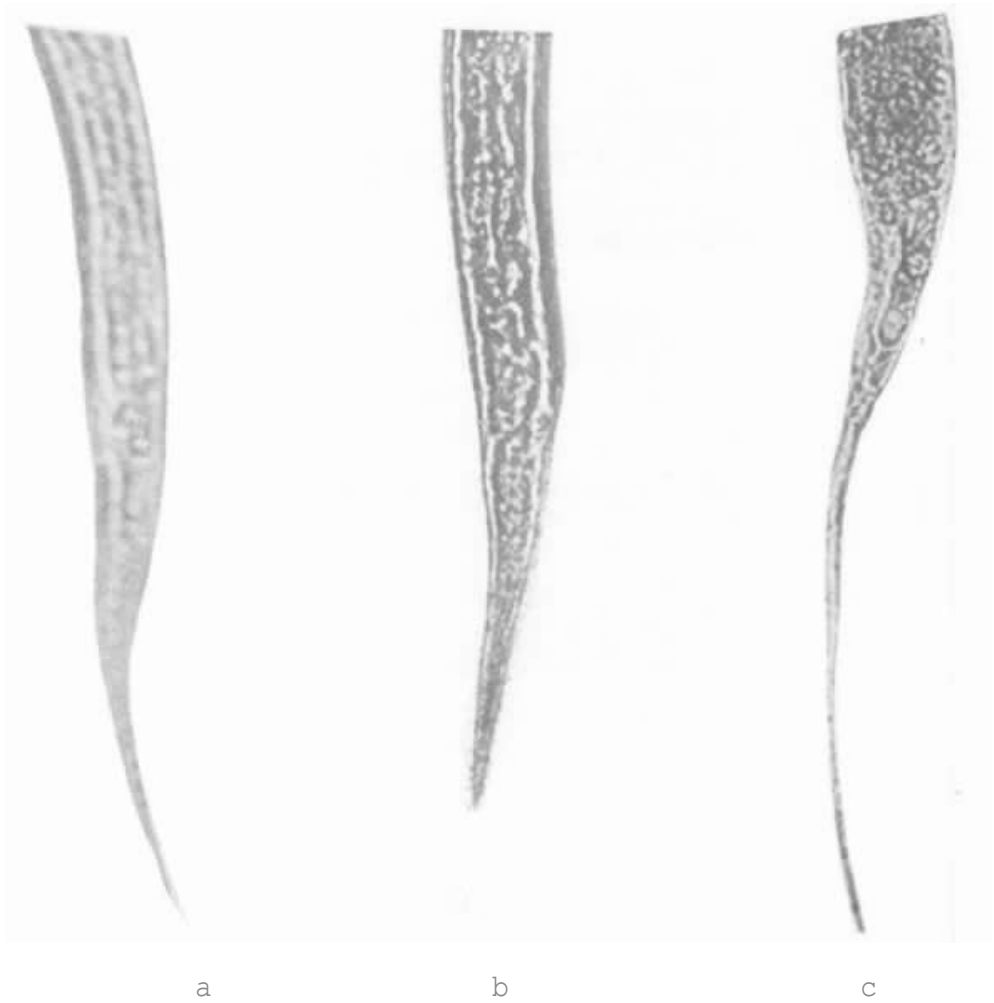


Figura 11. Extremidade posterior de L1

a = *Cooperia* spp  
b = *Trichostrongylus* sp  
c = *Oesophagostomum radiatum*

Aumento = 600 X

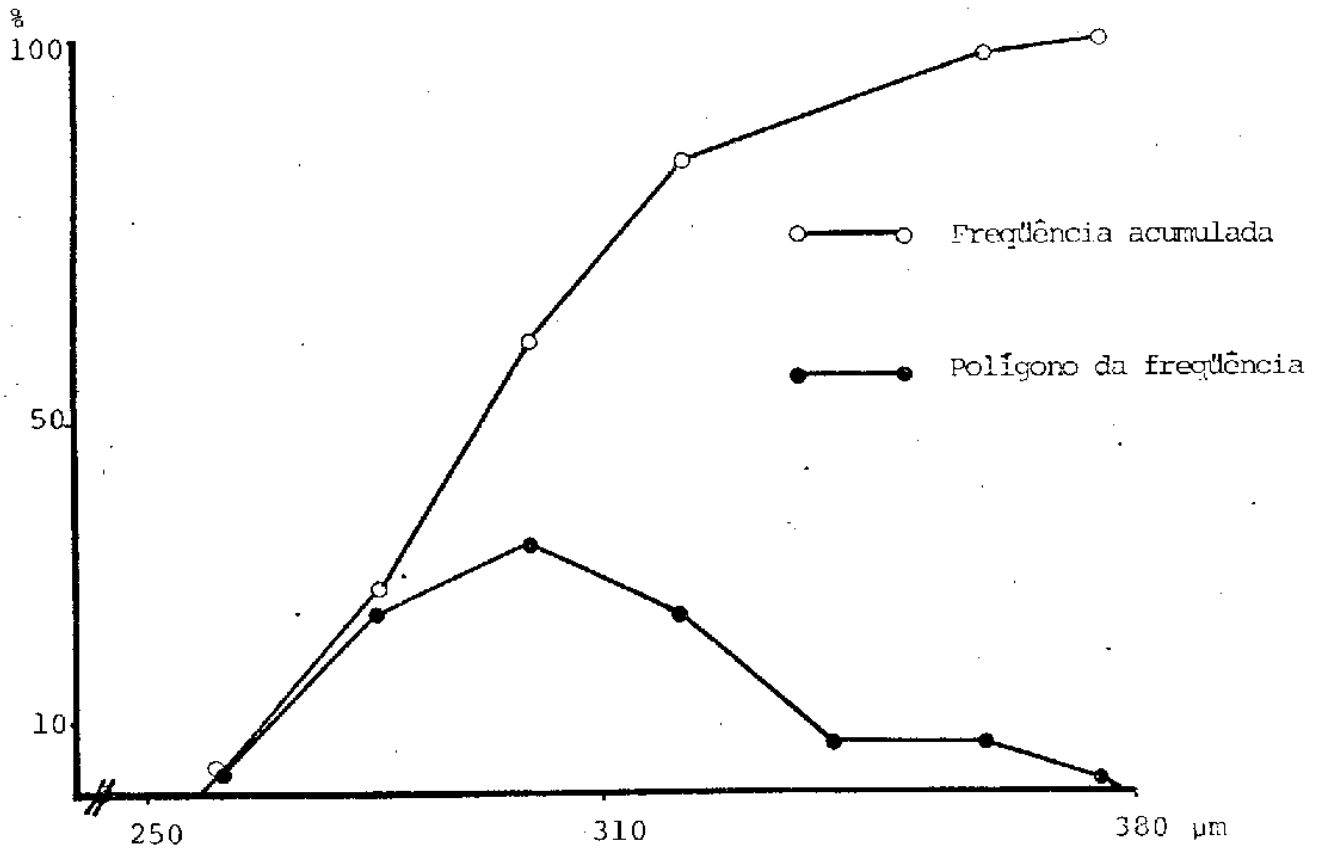


Figura 12. Frequência acumulada e polígono de frequência do comprimento total de L1 de *Harmonchus contortus*.

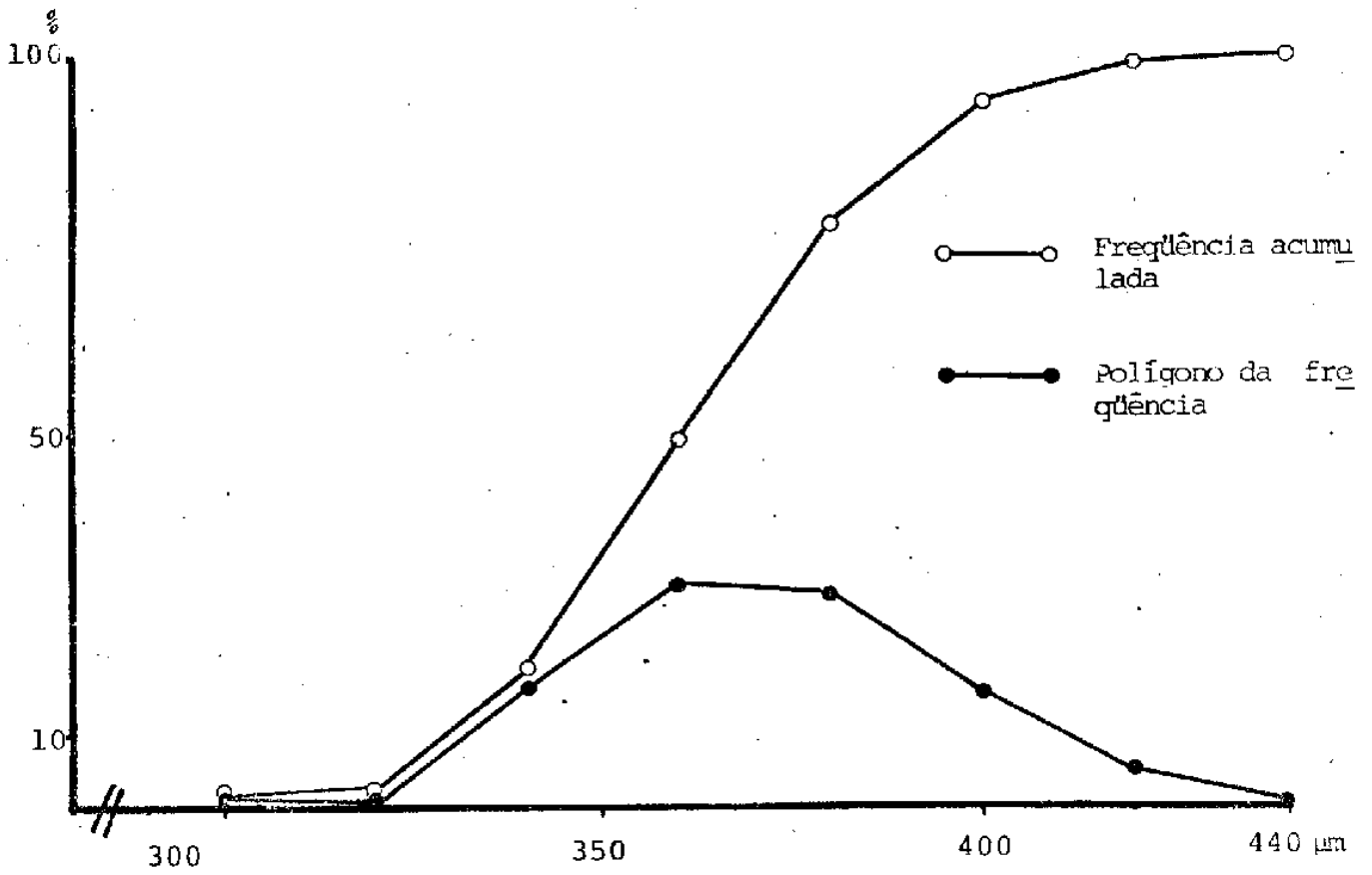


Figura 13. Frequência acumulada e polígono de frequência do comprimento total de L1 de *Haemonchus placei*.

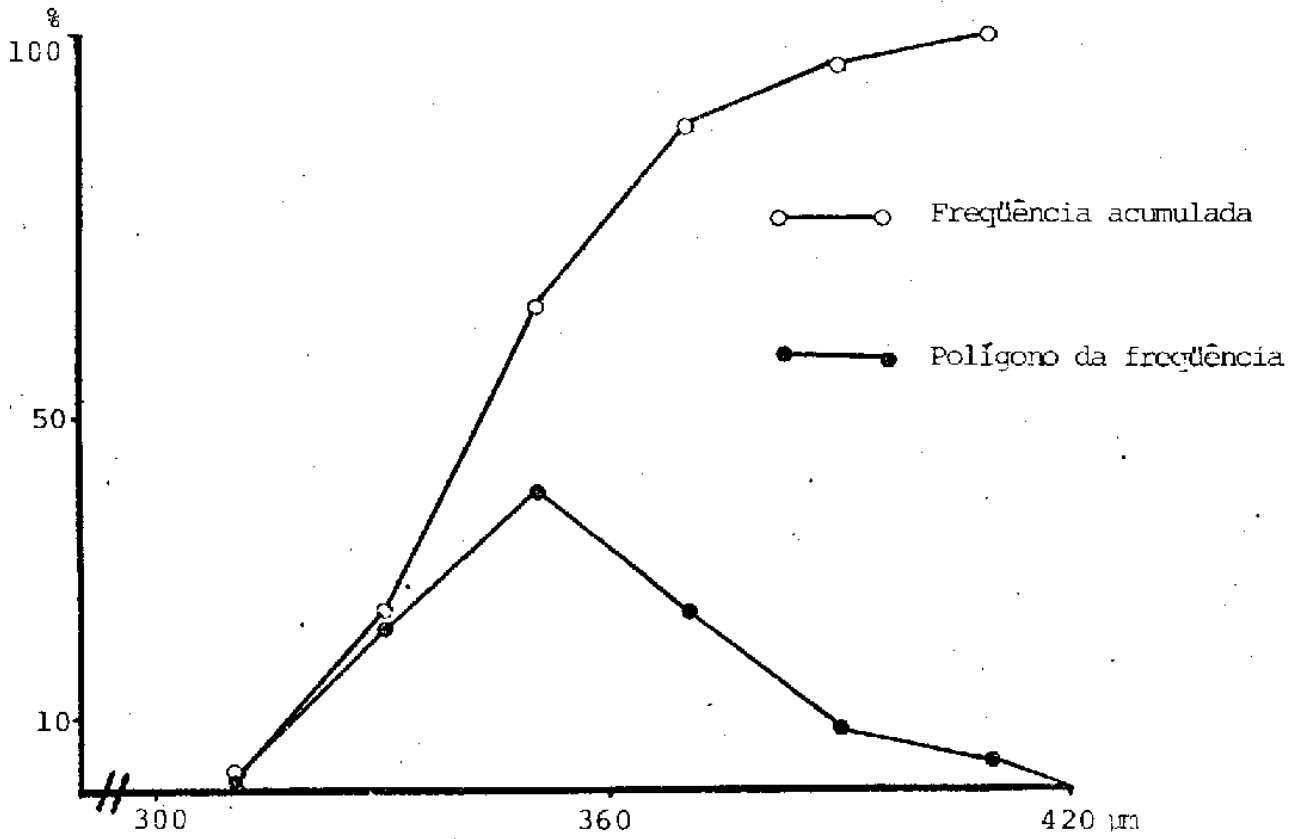


Figura 14. Frequência acumulada e polígono de frequência do comprimento total da L1 *Cooperia* spp.



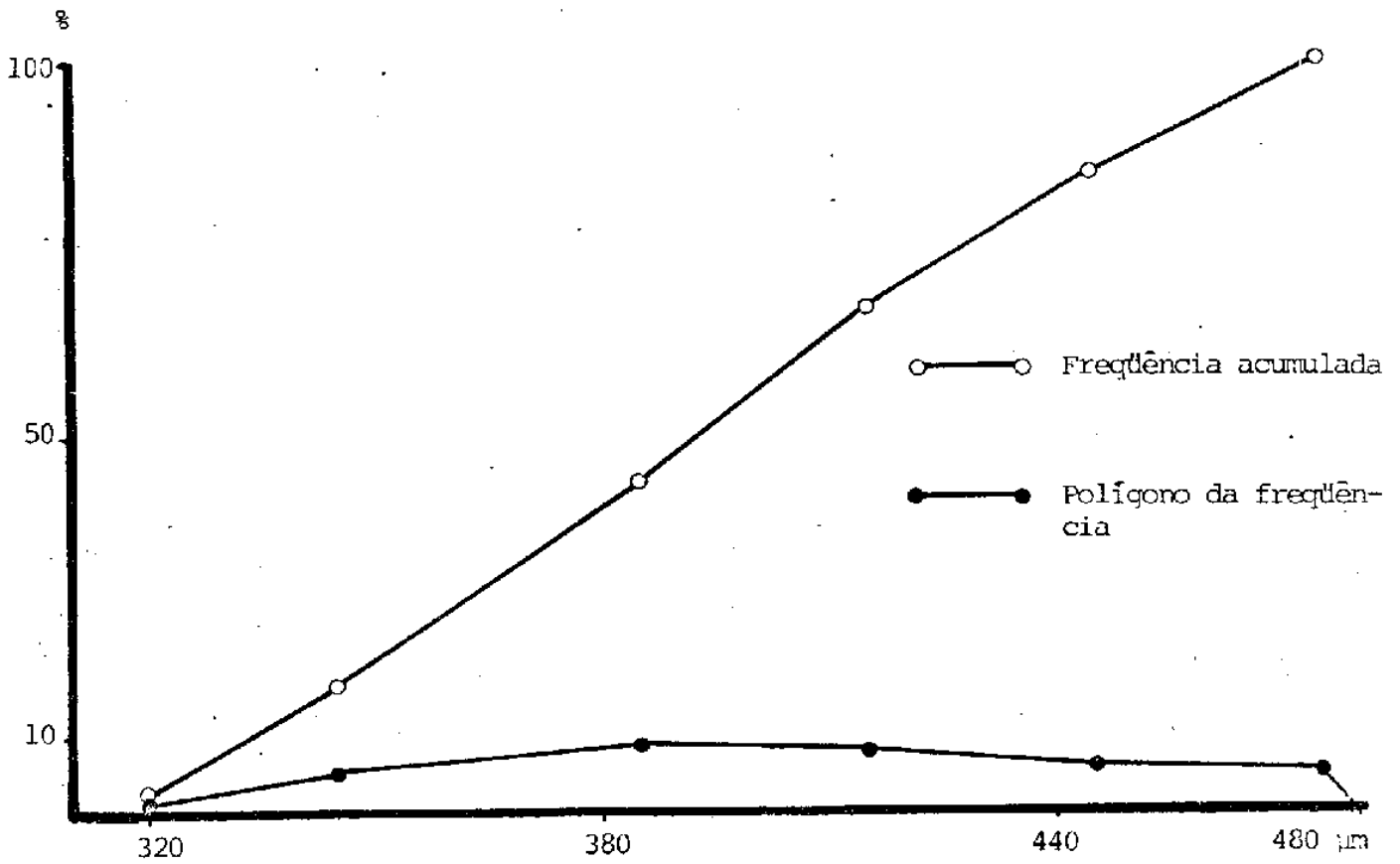


Figura 15. Frequência acumulada e polígono de frequência do comprimento total da L1 de *Oesophagostomum radiatum*.

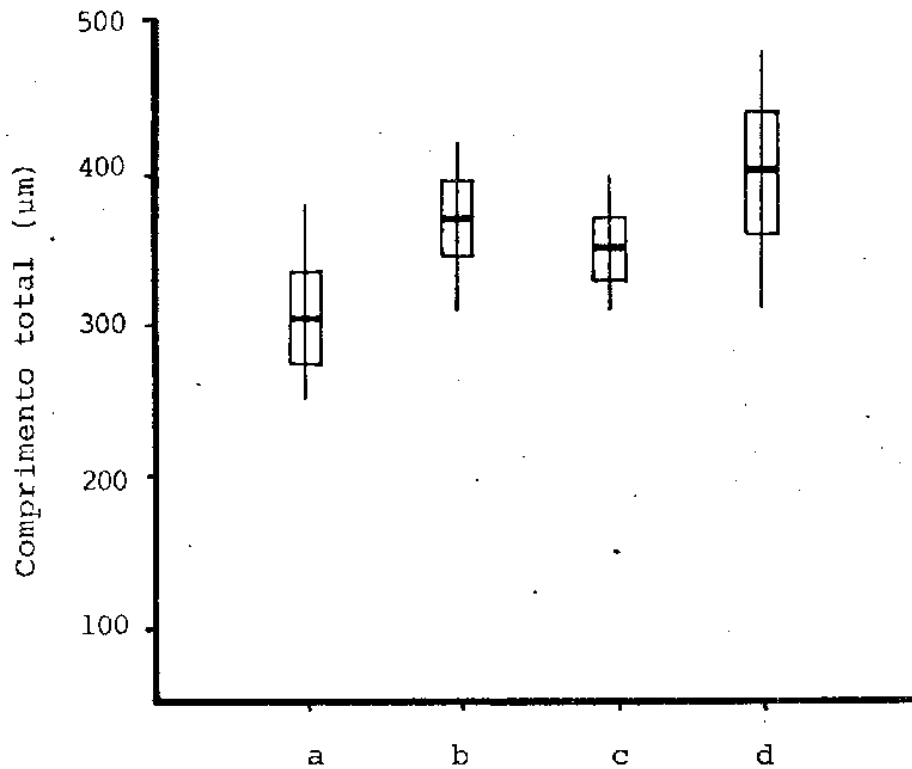


Figura 16. Comprimento total das larvas de primeiro estágio de: a) *Haemonchus contortus*; b) *Haemonchus placei*; c) *Cooperia* spp.; d) *Oesophagostomum radiatum*.

$\bar{x}$  = linha cheia; s = retângulo; limites = linha vertical

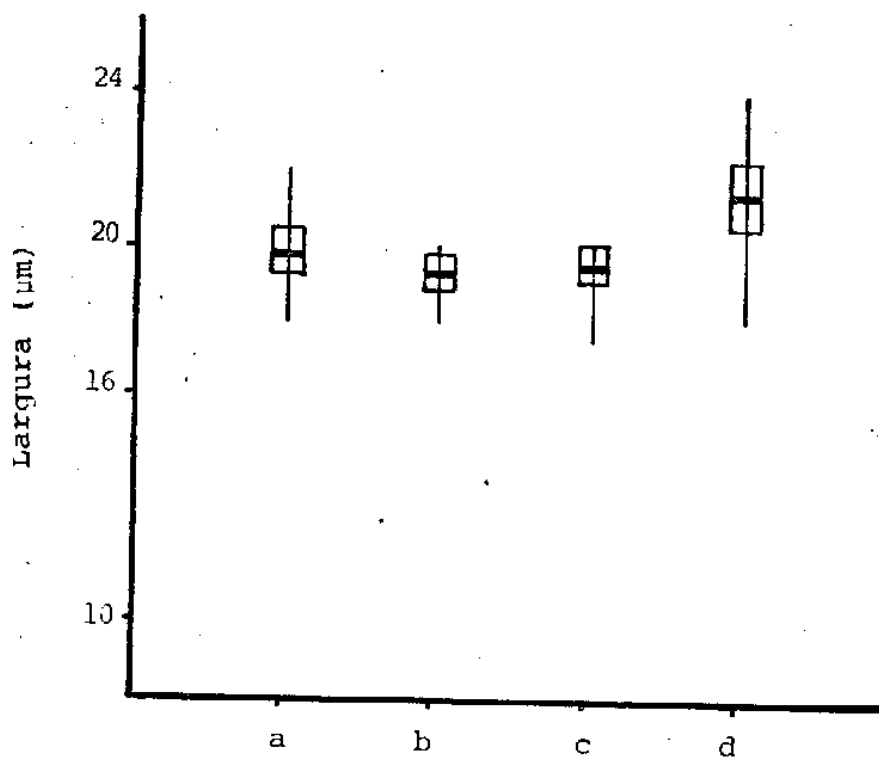


Figura 17. Largura das larvas de primeiro estágio de: a) *Haemonchus contortus*; b) *Haemonchus placei*; c) *Cooperia* spp.; d) *Oesophagostomum radiatum*

$\bar{x}$  = linha cheia; s = retângulo; limites = linha vertical

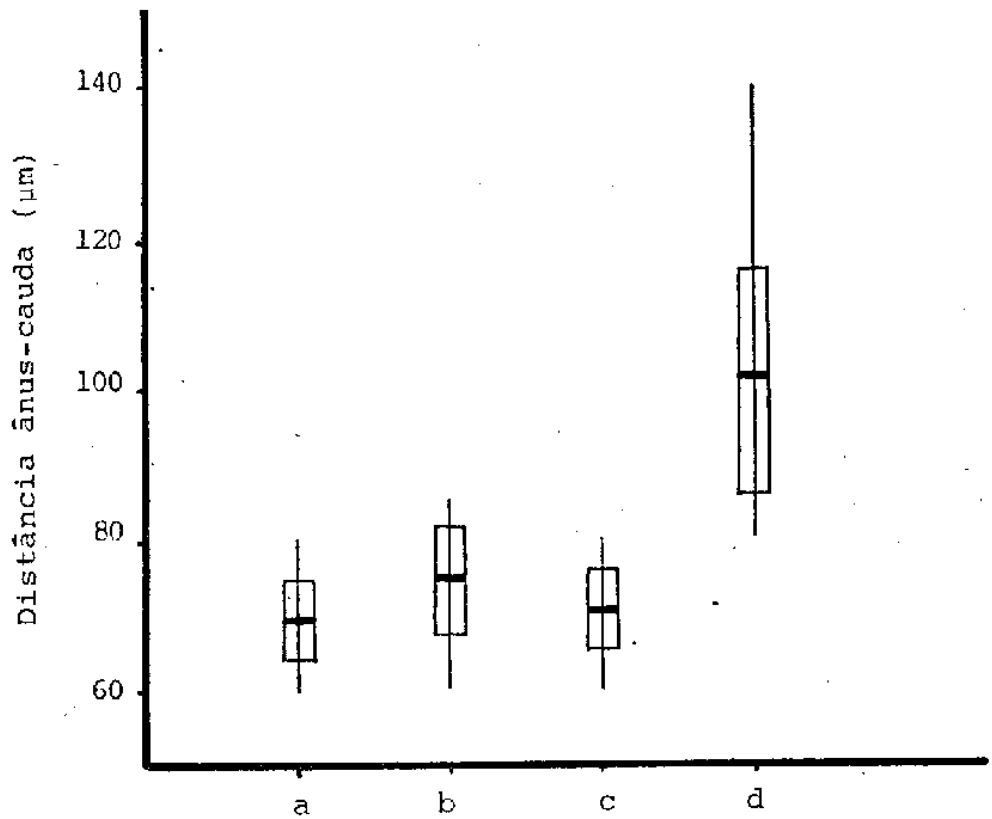


Figura 18. Distância do ânus à ponta da cauda das larvas de primeiro estágio de: a) *Haemonchus contortus*; b) *Haemonchus placei*; c) *Cooperia spp.*; d) *Oesophagostomum radiatum*.

$\bar{x}$  = linha cheia; s : retângulo; limites = linha vertical

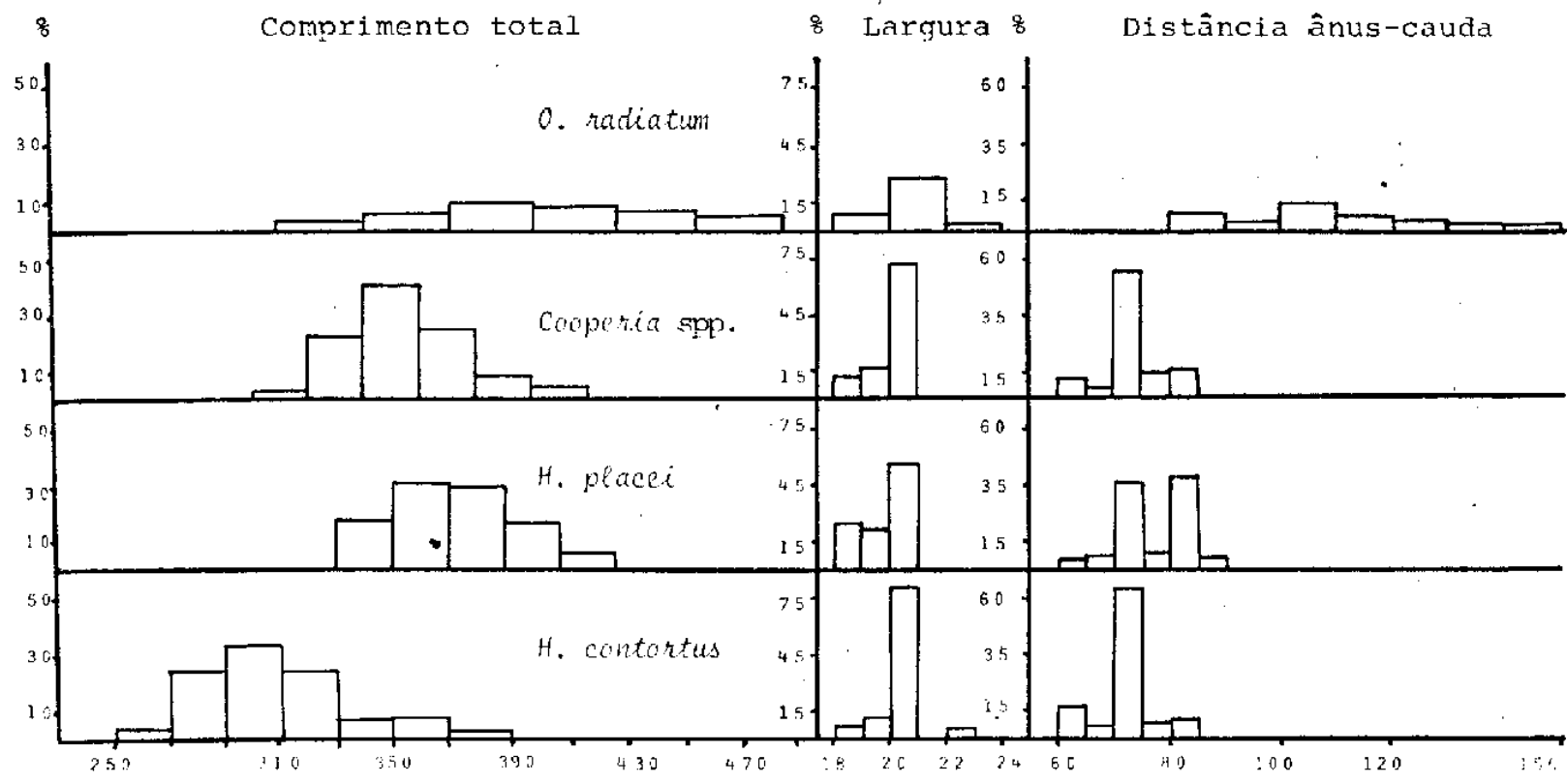


Figura 19. Distribuição da freqüência do comprimento total, largura e distância do ânus à ponta da cauda para *Haemonchus contortus*, *Haemonchus placei*, *Cooperia spp.* e *Oesophagostomum radiatum*.

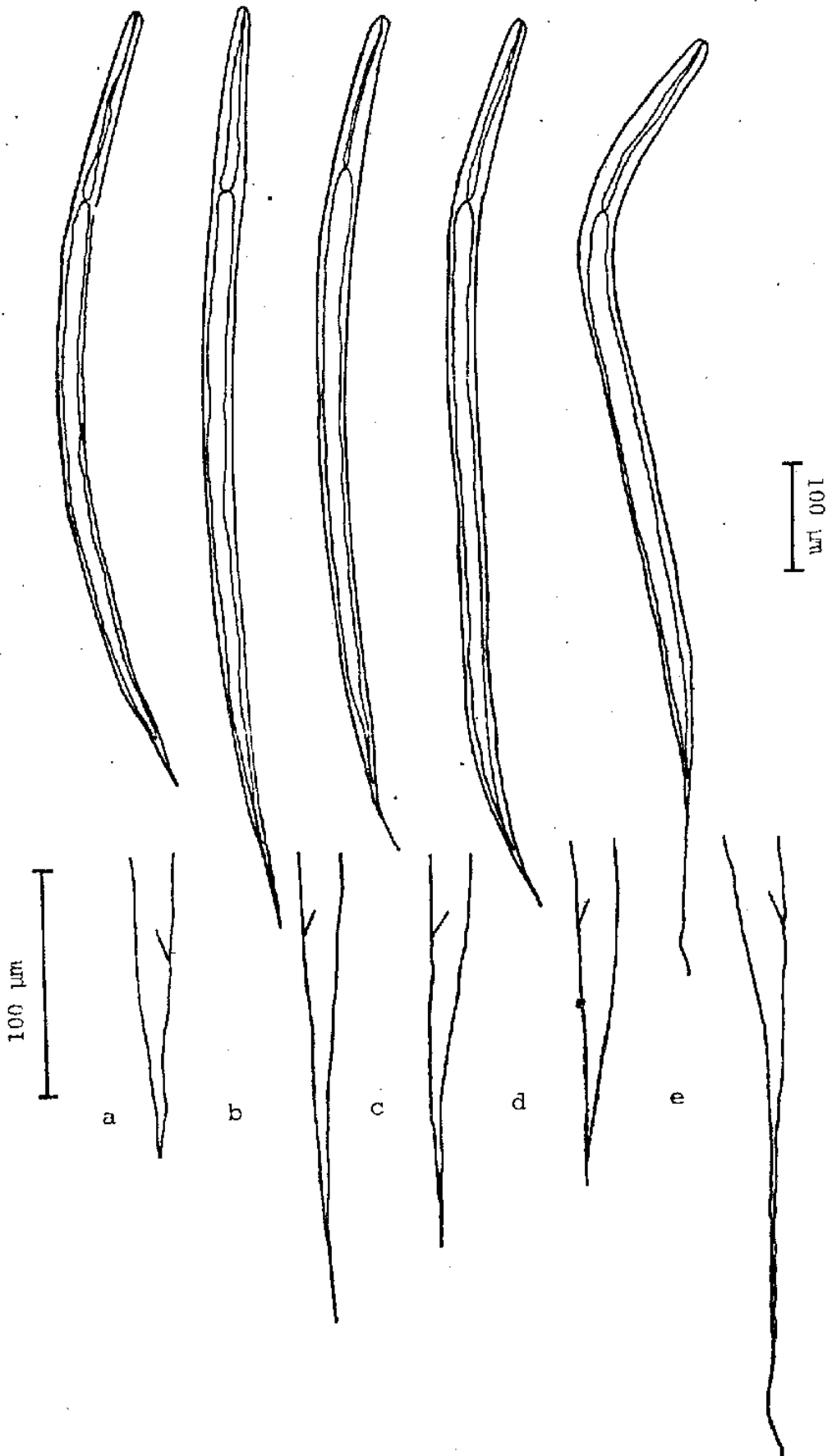


Figura 20. Morfologia geral e aumento da extremidade posterior das larvas de terceiro estágio do a) *Trichostrongylus* spp.; b) *Haemonchus placei*; c) *Haemonchus contortus*; d) *Cooperia* spp.; e) *Oesophagostomum radiatum*.