



## Viabilidade de larvas de trichostrongilídeos parasitos de ruminantes estocadas em geladeira

### *Viability of larvae of trichostrongylid parasites of ruminants stored in refrigerator*

Amanda Furjan Rial<sup>[a]</sup>, Lucas Piroca<sup>[b]</sup>, Fernanda Rosalinski-Moraes<sup>[c]</sup>

<sup>[a]</sup> Graduanda do curso de Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Toledo, PR - Brasil, PIBIC/ICV, e-mail: mandinha98@hotmail.com

<sup>[b]</sup> Graduando do curso de Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), bolsista da Fundação Araucária, Programa Universidade sem Fronteiras, Toledo, PR - Brasil, e-mail: lucaspiroca@gmail.com

<sup>[c]</sup> Médica Veterinária, professora Doutora do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Toledo, PR - Brasil, e-mail: fernanda.rosalinski@pucpr.br

---

### Resumo

Este trabalho tem por objetivo verificar a ocorrência de modificação na motilidade e morfologia de larvas infectantes de trichostrongilídeos (L3) conforme o tempo de estocagem em geladeira. Para isso, as L3 foram obtidas a partir da coprocultura de um *pool* de fezes ovinas, com média de 700 ovos de estrongilídeos por grama de fezes (OPG). As larvas foram distribuídas em tubos cônicos de 1,5 mL e mantidas em geladeira (5 °C a 8 °C). A primeira alíquota foi analisada em duplicata no sétimo dia de estocagem; novas avaliações foram realizadas a cada 21 dias, até o 259° dia. A motilidade foi mensurada em graus de 0 (ausência de movimento) a 3 (movimento normal). Foi observada diminuição gradativa da motilidade da primeira à última avaliação, quando a porcentagem de larvas com grau 0 foi de 30 e 71,91%, respectivamente. A diminuição da proporção de larvas móveis em relação à avaliação anterior foi significativa pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ( $p < 0,05$ ) nas avaliações após o 133° dia de estocagem. Concluiu-se que no 28° dia de estocagem 100% das larvas apresentaram a diminuição do volume das células intestinais e o descolamento parcial ou total de bainha, sendo possível, no entanto, a identificação dos diferentes gêneros de estrongilídeos pelas principais características morfológicas avaliadas concomitantemente até o quinto mês de estocagem.

**Palavras-chave:** Diagnóstico. L3. Larvas infectantes. Identificação. Motilidade.

### Abstract

*This paper aims to determine if there is modification on motility and morphology of trichostrongylid infective larvae (L3) as the storage time in refrigerator. The L3 were obtained from a coproculture proceeded from a pool of sheep faeces, with an average fecal egg count (FEC) of 700 Trichostrongylid eggs per gram (EPG). The larvae were distributed in conical tubes 1.5 mL, which were held vertically in the refrigerator (5 °C a 8 °C). The first aliquot was evaluated in duplicate in the 7<sup>th</sup> day of storage, and new evaluations were performed each 21 days, until the 259<sup>th</sup> day of storage. Motility was measured as scores from 0 (movement absent) to 3 (normal movement). It was observed a gradual decrease in motility from first to last evaluation, when the percentage of larvae witch scored 0 was 30% and 71.91%, respectively. The decrease of proportion of moving larvae related to the previous observation was significant by the Kolmogorov-Smirnov test ( $p < 0,05$ ) after the 133<sup>rd</sup> day of storage. It was concluded that on the 28<sup>th</sup> day of storage, 100% of larvae showed the decrease of intestinal cells size and total or parcial detachment of the sheath, but it is possible to identify different genera of trichostrongyle by other auxiliary characters until five months of storage.*

**Keywords:** *Diagnosis. L3. Infective larvae. Identification. Motility.*

### Introdução

A produção de alimento se mostra cada dia mais importante, e as ciências agrárias têm buscado melhor produtividade e produtos de alta qualidade, independente de sua origem, animal ou vegetal. Para o sucesso na produção animal, indiferente à espécie ou ao produto desejado, é necessária a integração de ferramentas ligadas à nutrição, genética, manejo e sanidade do rebanho. Este é o caso da ovinocultura, que é uma atividade largamente explorada nos países tropicais, visando à produção de carne, leite e peles (VIEIRA; CAVALCANTE, 1999). Entretanto, as endoparasitoses gastrintestinais constituem o limitante para a produção de ovinos em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais, onde os prejuízos econômicos são mais acentuados (FAO, 2003; SOTOMAIOR et al., 2007).

Os ovinos são parasitados por helmintos em todas as faixas etárias, o que resulta no atraso de desenvolvimento corporal dos cordeiros, na diminuição da produção e qualidade da carne e lã (URQUHART et al., 1998). Além dos prejuízos decorrentes da morbimortalidade dos animais, há os prejuízos indiretos, que envolvem a mão de obra e custos com medicação anti-helmíntica e terapia de suporte (TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008; SOTOMAIOR et al., 2009). Por isso é necessária a melhoria dos métodos de diagnóstico, para ter-se em mãos informações fidedignas e agir de forma coerente para posterior controle racional de enfermidades.

Geralmente as infecções por helmintos gastrintestinais são ocasionadas por vários gêneros de parasitos, a maior parte deles pertencente à superfamília Trichostrongyloidea (OLIVEIRA et al., 1999; ROSALINSKI-MORAES, 2007). A identificação dos gêneros de parasitos que ocorrem em uma propriedade é dificultada, pois os ovos dos diversos estrongilídeos possuem o mesmo aspecto morulado, quando visualizados nos exames coproparasitológicos (BOWMAN et al., 2006); por isso, é necessário o cultivo das larvas infectantes de terceiro estágio (L3), para identificar a ocorrência dos gêneros mais patogênicos ou que sejam resistentes a determinadas drogas anti-helmínticas e propor ferramentas adequadas de controle (SOTOMAIOR et al., 2009). Esta identificação das larvas é laboriosa e exige treinamento para realizá-la. Para facilitar a rotina laboratorial, é comum a estocagem das amostras de coproculturas em geladeira por muitos dias, até que seja possível realizar a leitura.

Este trabalho objetivou verificar por quanto tempo será possível estocar larvas infectantes de estrongilídeos parasitos de ruminantes sob refrigeração, sem que ocorram alterações morfológicas significativas, bem como verificar em quais gêneros estas modificações seriam mais frequentes e/ou precoces.

### Materiais e métodos

Foi obtido um pool de fezes de ovinos e caprinos criados no município de Toledo, PR, com média de 700 ovos de estrongilídeos por grama de fezes (OPG). As amostras ficaram armazenadas em geladeira por um

dia a 5 °C. Com este pool foram feitas seis culturas de larvas, as quais foram mantidas em estufa a 26 °C por 14 dias. Após este período, as culturas foram retiradas da estufa e as larvas de terceiro estágio foram obtidas pelo método de Roberts e O'Sullivan (1950). Esse consiste em preencher o frasco de cultivo com água à temperatura ambiente até a borda, tampar o frasco com uma placa de Petri, inverter bruscamente para evitar o derramamento do líquido e colocar mais solução fisiológica a 45 °C até a metade na placa de Petri, que resulta na atração das L3 para fora do frasco por termo e hidrotropismo. Transcorrida aproximadamente uma hora e meia, o líquido foi coletado da placa de Petri com uma pipeta e armazenado em um tubo de ensaio. Os tubos foram centrifugados a 1.500 rpm por cinco minutos, e o volume total da suspensão foi ajustado para 60 mL. Destes, 58 mL foram divididos em alíquotas de 1 mL, que foram armazenadas em microtubos de 1,5 mL (Eppendorf®), em geladeira a 5 °C, em posição vertical. A cada 21 dias foram retirados aleatoriamente dois tubos para avaliação. Esta consistiu em deixar a solução de larvas em temperatura ambiente e dividi-la em lâminas de vidro para observação a fresco em microscópio óptico, no aumento de 100x, para avaliação da motilidade. A motilidade das larvas foi classificada em quatro níveis: grau 3 – normal, grau 2 – diminuído, grau 1 – quase imóvel e grau 0 – imóvel. A avaliação morfológica e a identificação genérica foram realizadas após pipetar de duas a três gotas da solução de lugol forte para fixação das larvas e acomodar uma lamínula de vidro para facilitar a visualização das estruturas morfológicas. Os gêneros foram identificados com auxílio da chave morfométrica de Van Wyk et al. (2004).

Para comparar a proporção de larvas com diferentes graus de motilidade de uma avaliação com a subsequente, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. A comparação da proporção de gêneros de tricostrongilídeos com a da primeira coleta foi realizada pelo teste do qui-quadrado. Em ambos os testes foi assumido que as diferenças seriam significativas a partir de 0,05 de chance de erro do tipo I, pelo *software* Biostat® 2.0.

## Resultados

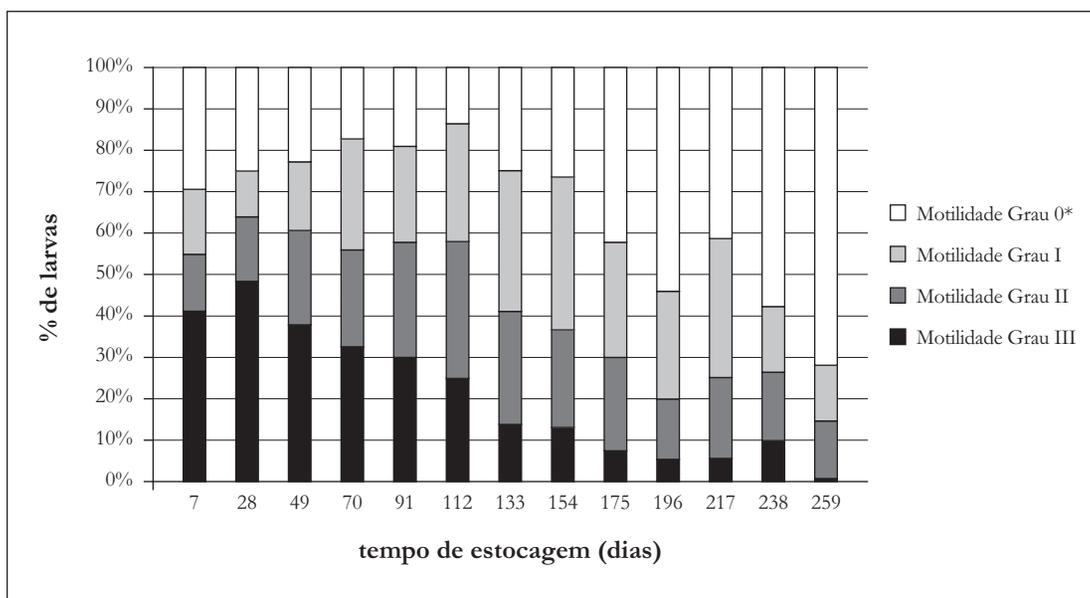
Como não houve diferença significativa entre os dois tubos analisados em cada avaliação ( $p > 0,05$ ) os resultados de ambos foram reunidos por data de leitura. Foi observada diminuição gradativa da motilidade das L3 da primeira à última avaliação, quando a porcentagem de larvas com grau 0 foi de 30% e 71,91%, respectivamente (Gráfico 1). A diminuição da proporção de larvas móveis em relação à avaliação anterior foi significativa pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, no 133° ( $p < 0,0002$ ), 175° ( $p < 0,0005$ ), 196° ( $p < 0,0248$ ), 217° ( $p < 0,0329$ ), 238° ( $p < 0,0027$ ) e 259° ( $p < 0,004$ ) dia de estocagem em geladeira.

Os gêneros de helmintos identificados na primeira avaliação (sétimo dia após estocagem) foram os seguintes: 50% *Cooperia*; 23% *Trichostrongylus*; 10% *Haemonchus*; 6% *Oesophagostomum*, 4% *Ostertagia*, além de 8% *Strongyloides papillosus*. O teste do qui-quadrado demonstrou que esta proporção se manteve inalterada até a 147ª avaliação, exceto na avaliação do 91° dia ( $p < 0,00653$ ). Após o 147° dia, as alterações morfológicas comprometeram muito a identificação dos gêneros.

No 28° dia, 100% das larvas apresentavam diminuição do volume de suas células intestinais e no 70° dia todas apresentavam descolamento total ou parcial de sua bainha. Na avaliação do 217° dia, 26% das larvas se encontravam em decomposição, sendo impossível a identificação da espécie. Na avaliação do 238° dia foram encontradas reais dificuldades para a identificação do gênero pela morfologia, sendo feita apenas mais uma avaliação do 259° dia, pois já não era mais possível identificar as larvas. As larvas do gênero *Haemonchus* foram as que demonstraram maiores e mais precoces alterações de motilidade e morfologia.

## Discussão

Neste trabalho foi observado que houve diminuição significativa de motilidade larval após 133 dias de estocagem. Estes dados assemelham-se aos de O'Connor et al. (2006), que demonstraram a sobrevivência de quase 50% das L3 de strongilídeos após 128 dias a 8 °C e 80% de umidade. As L3 são mais resistentes que os demais estágios não parasitários por causa da bainha que as envolve, tornando-as melhor providas para sobreviver em condições adversas como dessecação, frio e congelamento (URQUHART et al., 1998; BOWMAN et al., 2006).



**Gráfico 1** - Proporção de motilidade das larvas de terceiro estágio de tricostrongilídeos estocadas em geladeira, por tempo de estocagem

Nota: \* grau 3 – normal, grau 2 – diminuído, grau 1 – muito diminuído e grau 0 – imóvel

Como a motilidade é um indicativo de viabilidade larval, a redução gradativa de motilidade observada neste trabalho pode ser resultado da menor viabilidade das larvas ao longo do tempo. A disponibilidade e quantidade de nutrientes armazenados durante as fases larvais microbívoras (L1 e L2) influenciam diretamente a capacidade de infecção e sobrevivência das larvas L3 de tricostrongilídeos (URQUHART et al., 1998). Estas reservas são acumuladas nas células intestinais e fazem com que as células aumentem seu tamanho, resultando na possibilidade de observar diferentes formatos de células ao microscópio óptico, característicos de cada gênero (BOWMAN et al., 2006). Espera-se que, com o passar do tempo, as reservas sejam consumidas e o formato das células seja de mais difícil observação, o que ocorreu neste trabalho a partir do 28º dia de estocagem em geladeira.

A partir do 70º dia do presente estudo, todas as L3 apresentavam descolamento total ou parcial da bainha, indicando início de autólise. A decomposição destas larvas foi evidente do 217º dia em diante. A partir do 238º dia de armazenamento, não era mais possível identificar as larvas pela perda dos principais parâmetros rotineiramente utilizados para reconhecimento de cada gênero, tais como o comprimento de cauda e o número de células intestinais.

A maior parte dos laboratórios de parasitologia tem por hábito o resfriamento das amostras de L3 para identificação, sendo possível a estocagem até 30 dias. Os resultados deste trabalho demonstraram haver alterações importantes na morfologia das larvas a partir do 28º dia de estocagem. No entanto, a proporção de gêneros identificados não diferiu pelo teste do qui-quadrado até o 147º dia. Assim, técnicos treinados a realizar a identificação morfológica por várias características simultaneamente poderiam identificar corretamente os gêneros de parasitos gastrintestinais de ruminantes até próximo de cinco meses de estocagem.

## Conclusão

Após o 28º dia de estocagem em geladeira foi possível verificar a ocorrência de alterações morfológicas, que dificultaram a identificação dos gêneros das L3 de strongilídeos. No entanto, se as principais características morfológicas forem avaliadas concomitantemente, é possível a correta identificação dos gêneros até cinco meses após estocagem.

## Referências

- BOWMAN, D. D.; LYNN, R. C.; EBERHARD, M. L. **Parasitologia veterinária de Georgis**. Barueri: Manole, 2006.
- FAO, SALUD ANIMAL. **Resistência a los antiparasitarios: estado actual énfasis en América Latina**. Roma: FAO, 2003.
- O'CONNOR, L. J.; WALKDEN-BROWN, S. W.; KANH, L. P. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 1 2, p. 1-15, 2006.
- OLIVEIRA, V. P. et al. Epidemiologia da verminose em ovinos na Região de Guarapuava - Paraná. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – EVINCI, 7., Curitiba. **Anais...** Curitiba: Ed. da UFPR, 1999. v. 2, p. 466.
- ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agriculture Research**, v. 1, n. 1, p. 99-102, 1950.
- ROSALINSKI-MORAES, F. **Padronização de ensaio imunoenzimático para a detecção de imunoglobulinas G e E ovinas anti-*Haemonchus contortus*, seu uso na seleção de animais resistentes à verminose gastrintestinal e na compreensão dos fenômenos imunológicos que decorrem da interação hospedeiro-parasito**. 2007. 137 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Ciências Tecnológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- SOTOMAIOR, C. S. et al. Identificação de ovinos e caprinos resistentes e susceptíveis a helmintos gastrintestinais. **Revista Acadêmica: Ciências agrárias e ambientais**, v. 5, n. 4, p. 397-412, 2007.
- SOTOMAIOR, C. S. et al. **Parasitoses gastrintestinais dos ovinos e caprinos: alternativas de controle**. Curitiba: Instituto EMATER, 2009. Série Informação Técnica, n. 80.
- TORRES-ACOSTA, J. F. J.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 77, n. 2, p. 159-173, 2008.
- URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
- VAN WYK, J. A.; CABARET, J.; MICHAEL, L. M. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 4, p. 277-306, 2004.
- VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos do Estado do Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 3 4, p. 99-103, 1999.

Recebido: 15/03/2010

*Received:* 03/15/2010

Aprovado: 12/05/2010

*Approved:* 05/12/2010