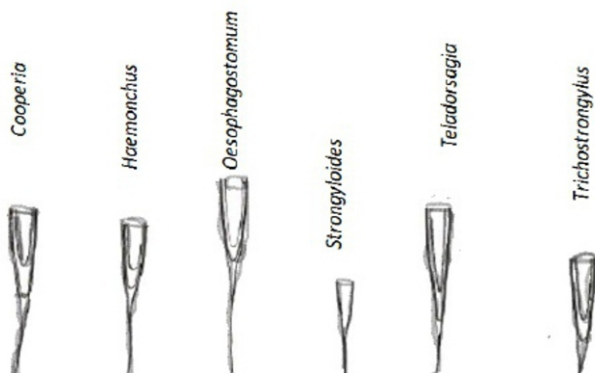


Manual de Técnicas Laboratoriais e de Campo para a Realização de Ensaios Experimentais em Parasitologia Veterinária: Foco em Helmintos Gastrintestinais de Ruminantes



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pecuária Sul
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 148

Manual de Técnicas Laboratoriais e de Campo para a Realização de Ensaio Experimentais em Parasitologia Veterinária: Foco em Helmintos Gastrointestinais de Ruminantes

*Alessandro Pelegrine Minho
Emanuelle Baldo Gaspar
Eidi Yoshihara*

Embrapa Pecuária Sul
Bagé, RS
2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pecuária Sul

BR 153, Km 633. Caixa postal 242
96401-970 - Bagé – RS
Fax: 55 53 3240-4650
<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Claudia Cristina Gúlias Gomes*
Secretária-Executiva: *Graciela Olivella Oliveira*
Membros: *Estefanía Damboriarena, Fernando Flores Cardoso, Jorge Luiz Sant'Anna dos Santos, Lisiane Bassols Brisolará, Marco Antônio Karam Lucas, Naylor Bastiani Perez, Renata Wolf Suñé*

Supervisor editorial:

Revisor de texto: *Fernando Goss*

Normalização bibliográfica: *Graciela Olivella Oliveira*

Editoração eletrônica: *Núcleo de Comunicação Organizacional*

Foto da capa: *Alessandro P. Minho*

1ª edição

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei N° 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Pecuária Sul

Minho, Alessandro Pelegrine

Manual de técnicas laboratoriais e de campo para a realização de ensaios experimentais em parasitologia veterinária : foco em helmintos gastrintestinais de ruminantes / Alessandro Pelegrine Minho, Emanuelle Baldo Gaspar, Eidi Yoshihara. -- Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2015. (Documentos / Embrapa Pecuária Sul, ISSN 1982-5390 ; 148)

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web: <www.embrapa.br>

Título da página da Web (acesso em 31 ago. 2015).

1. Bovino. 2. Parasito. 3. Nematóide. 4. Análise de laboratório. I. Minho, Alessandro Pelegrine. II. Embrapa Pecuária Sul. III. Série.

CDD 636.089696

© Embrapa 2015

Autores

Alessandro Pelegrine Minho

Médico Veterinário, Dr. (D.Sc.),
pesquisador da Embrapa Pecuária Sul,
Caixa Postal 242, BR 153 Km 633,
CEP 96401-970, Bagé, RS, - Brasil

Emanuelle Baldo Gaspar

Médica Veterinária, Doutora em Microbiologia e
Imunologia, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul,
Caixa Postal 242, BR 153 Km 633,
CEP 96401-970 - Bagé, RS - Brasil

Eidi Yoshihara

Médico Veterinário, Doutor em Ciência Animal,
pesquisador científico da Agência Paulista de
Tecnologia dos Agronegócios, Rod. Raposo
Tavares, Km 563
19015-970 - Presidente Prudente, Caixa-postal:
298, SP, Brasil

Apresentação

As publicações técnicas da Série Embrapa são importantes veículos de informação, destinadas a produtores, técnicos, empresários do agronegócio, pesquisadores, estudantes e público em geral interessados nas tecnologias desenvolvidas pela Empresa e seus colaboradores. Tratam-se de publicações com distintas características, objetivos e públicos-alvo, tais como: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento; Documentos; Circular Técnica; Comunicado Técnico; Sistemas de Produção; Livro e outros.

A Embrapa Pecuária Sul utiliza este veículo para comunicar suas tecnologias produzidas, recomendações, práticas agrícolas e resultados de pesquisa e desenvolvimento, direcionando ao público interessado informações ligadas à produção de forrageiras e pastagens, bovinocultura de corte e de leite e ovinocultura dos Campos Sul-brasileiros. É com satisfação que oferecemos mais esta obra, destacando recente trabalho desenvolvido pelo Centro da Embrapa, em Bagé, em benefício à sustentabilidade da pecuária sulina.

Esta publicação da Série Embrapa busca divulgar várias técnicas que possam ser utilizadas para a avaliação do efeito de produtos ou compostos bioativos com efeito anti-helmíntico em ruminantes em estádios iniciais dos parasitos, parasitos adultos, ou mesmo sobre a descontaminação das pastagens. Esta obra pretende orientar técnicos e laboratoristas quanto à coleta de amostras, contagem de ovos, identificação das larvas e avaliação de eclodibilidade dos

ovos, além da avaliação de larvas em necropsia de animais. Os serviços laboratoriais de diagnóstico de endoparasitas e testes de eficácia de ingredientes ativos veterinários podem ainda colaborar com as estratégias de controle e prevenção à resistência em propriedades pecuárias.

Esperamos que os leitores desfrutem deste Documento e sugerimos que, em caso de maior interesse no tema abordado ou necessidades de esclarecimentos, realizem o contato com nosso serviço de atendimento ao cidadão (SAC), acessando <https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/> ou pelo fone (53) 3240-4650. A Embrapa terá o máximo prazer em atendê-lo.

Alexandre Varella
Chefe-Geral

Sumário

Introdução	08
Coleta de amostras fecais	09
Contagem de ovos por grama de fezes (OPG)	10
Técnica de McMaster - descrita em Ueno e Gonçalves (1998).....	10
Material necessário.....	10
Metodologia	10
Cálculo do fator.....	13
Interpretação do resultado do OPG.....	13
Coprocultura	13
Material necessário.....	13
Metodologia	14
Recuperação das larvas infectantes.....	14
Identificação de larvas infectantes (I₃) de nematódeos de ruminantes	15
Preparo da lâmina para identificação.....	15
Larvas a serem identificadas.....	15
Recuperação de larvas da pastagem	17
Material necessário.....	17
Metodologia	17
Criopreservação de larvas infectantes em nitrogênio líquido	19
Fase I	19
Fase II.....	19
Fase III.....	20

Descongelamento.....	20
Teste de eclodibilidade de ovos - TEO.....	20
Metodologia.....	21
Material necessário.....	21
Recuperação de ovos.....	21
Preparação das placas.....	22
Montagem de lâminas de helmintos.....	23
Coleta de helmintos adultos em necropsia de ovinos.....	24
Material necessário.....	25
Metodologia.....	25
Nematódeos do abomaso.....	25
Nematódeos de intestino delgado.....	26
Montagem de lâminas permanentes com Hoyer.....	27
Lista de soluções.....	27
Referências.....	29
Literatura recomendada.....	30

Manual de Técnicas Laboratoriais e de Campo Para a Realização de Ensaio Experimentais Em Parasitologia Veterinária: Foco em Helmintos Gastrintestinais de Ruminantes

*Alessandro Pelegrine Minho
Emanuelle Baldo Gaspar
Eidi Yoshihara*

Introdução

Doenças causadas por parasitos gastrintestinais em ruminantes acarretam prejuízos de milhões de dólares ao mercado agropecuário mundial a cada ano. Este impacto econômico deriva, não somente das mortes e desempenhos inadequados originados por infecção parasitária, mas também dos gastos com profilaxia e tratamento. O controle dessas parasitoses é realizado basicamente através da administração de anti-helmínticos sintéticos, o que estimula a seleção de parasitos resistentes. O aumento dos relatos isolados de nematoides multirresistentes aos anti-helmínticos convencionais, incluindo multirresistência às três principais classes de produtos mundialmente disponíveis, gerando sérias consequências à criação ovina, até mesmo, inviabilizando sua produção comercial em algumas regiões, deve ser considerado como um alerta ao uso indiscriminado de drogas anti-helmínticas nos programas de controle parasitário. Estudos científicos com animais naturalmente e experimentalmente infectados visando a determinação da .

ocorrência de resistência anti-helmíntica, têm sido conduzidos em todo o mundo, sendo que seus resultados, de uma forma geral, relatam a ocorrência do fenômeno de multirresistência em várias criações de ovinos e, mais recentemente, de bovinos.

Este manual tem o intuito de agrupar várias técnicas que possam ser utilizadas para a avaliação do efeito de produtos ou compostos bioativos com efeito anti-helmíntico em ruminantes (naturalmente ou experimentalmente infectados), seja esse efeito sobre estádios iniciais dos parasitos, parasitos adultos, ou mesmo sobre a descontaminação das pastagens.

Coleta de amostras fecais

- As amostras devem ser coletadas diretamente do reto animal. Desta forma, evita-se a troca de amostras e a contaminação com helmintos do solo.
- As amostras devem ser devidamente identificadas de forma que seja possível a rastreabilidade dos resultados.
- Cada amostra deve ter, no mínimo, dois gramas para fezes de ovinos e quatro gramas para fezes de bovinos ou equinos. As amostras que não apresentarem peso mínimo, não serão analisadas.
- Durante o procedimento de coleta, as amostras devem permanecer resfriadas em uma caixa térmica ou isopor com gelo. Caso não seja possível o envio imediato ao laboratório, as amostras coletadas devem permanecer em geladeira (8 °C) até envio para procedimento de análise. O prazo de armazenamento não deve exceder a dois dias. No caso de realização de coprocultura para identificação larval, as amostras fecais poderão permanecer em temperatura ambiente. As fezes não podem ser congeladas, porque o congelamento pode distorcer os ovos e dificultar sua identificação.
- Antes de realizar testes específicos em amostras fecais, deve-se notar a aparência geral, consistência, cor e a presença de sangue ou muco, que podem indicar infecções parasitárias específicas. A presença de parasitas adultos ou segmentos de cestódeos também devem ser observadas.

- É indicada a amostragem de, no mínimo, 10% dos animais por categoria / faixa etária/potreiro, dentro da propriedade. Para rebanho com menos de 100 animais por categoria/faixa etária/potreiro, recomenda-se coletar, no mínimo, 10 animais.

Contagem de ovos por grama de fezes (OPG)

Técnica de McMaster - descrita em Ueno e Gonçalves (1998)

Material necessário:

- Microscópio;
- Copo descartável;
- Peneira;
- Bastão de vidro;
- Pipeta de Pasteur;
- Balança;
- Proveta de 100 mL;
- Câmara de McMaster;
- Solução hipersaturada de NaCl.

Metodologia

- Pesar quatro gramas de material fecal para contagem de OPG de bovinos ou dois gramas de fezes para pequenos ruminantes (ovinos e caprinos);
- Diluir as fezes (quatro gramas para bovinos e dois gramas para pequenos ruminantes) em 56 mL para bovinos ou 58 mL para pequenos ruminantes de solução hipersaturada de NaCl (densidade de 1.2). Inicialmente, adicionar metade do volume de solução saturada, para facilitar a fragmentação das partículas fecais com o bastão de vidro e homogeneizar a diluição.
- Após a homogeneização, filtrar o conteúdo em uma peneira, transferindo assim para outro recipiente. Utilizar a outra metade do volume de solução hipersaturada para lavar a peneira e completar o volume final.

- Utilizando a pipeta de Pasteur, homogeneizar a solução e preencher primeiramente um lado da câmara. Após preencher o primeiro lado, homogeneizar novamente a solução para preencher o segundo lado da câmara de McMaster. Se bolhas de ar estiverem presentes, remova o conteúdo e repita o processo de preenchimento.
- Deixar a câmara descansar por alguns minutos - o processo de flutuação ocorre rapidamente;
- Levar a câmara ao microscópio e contar os ovos presentes da área interna das ranhuras. Cada tipo de parasita deve ser contado separadamente.
- Para determinar o número de ovos por grama de fezes, some a contagem de ambas às câmaras.
- Multiplicar o número de ovos encontrados por 50 para bovinos e 100 para ovinos, o resultado será expresso em Ovos Por Grama de Fezes (OPG).

O volume de amostra nas duas câmaras é de 0,3 mL (300 μ L). Somando-se o número de ovos de ambas as câmaras, encontra-se a quantidade de ovos em 0,3 mL, que, para as amostras de ovinos (2 g/58 mL) é 0,005% (1/200) do volume de 60 mL. O número de ovos deve então ser multiplicado por 200, para encontrar a quantidade total de ovos neste volume. Como foram pesados dois gramas de fezes, divide-se este resultado por dois. Ou, para facilitar, é só multiplicar o resultado de contagem por 100 (200/2). Já para bovinos (4 g/56 mL), 0,3 mL também representam 0,005% da amostra (1/200) então, deve-se multiplicar a contagem das duas câmaras por 200, porém, deve-se dividir por quatro (porque foram pesados quatro gramas de fezes). Ou, multiplicar direto por 50 (200/4).

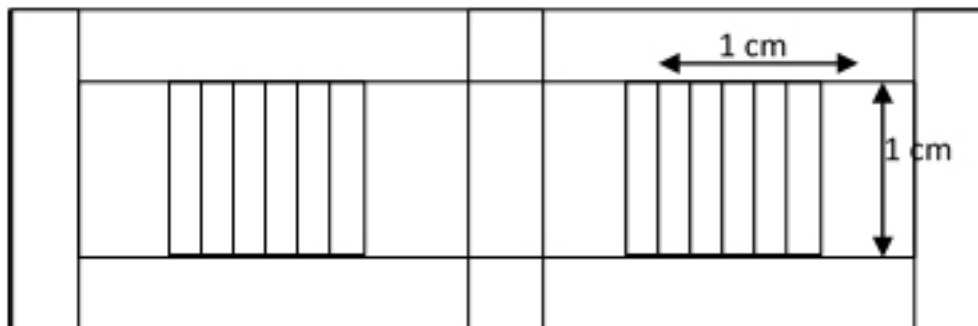
Para facilitar o entendimento desse cálculo podemos observar o esquema a seguir:

O volume contido em cada compartimento é calculado pela seguinte fórmula:

$$1 \text{ cm}^2 \times 0,15 \text{ cm} = 0,15 \text{ cm}^3 = 0,15 \text{ mL}.$$

Considerando-se os dois compartimentos:

$$0,15 \text{ mL} \times 2 = 0,30 \text{ mL (volume total)}.$$



Alessandro P. Minho

Figura 01. Vista superior da câmara de McMaster para contagem de OPG.



Emanuelle B. Gaspar

Figura 02. Vista lateral da câmara de McMaster.

Cálculo do fator

Se em 0,30 mL contamos "x" ovos

Em 60 mL teremos "y" ovos

Ao utilizar dois gramas de fezes, o valor será dividido por dois (2), pois o resultado é expresso em número de ovos por um (1) grama de fezes - OPG:

$$x \cdot 60 \qquad y = x \cdot 100 \text{ (x vezes 100)}$$

Quando utilizamos quatro gramas de fezes, o valor será dividido por quatro (4):

Assim, $y = x \cdot 50$ (x vezes 50)

Identificação do resultado: dependendo dos ovos observados no exame, a contagem deve ser feita separadamente:

Ovos de cestódeos são colocados em observação, entretanto, não são contabilizados na contagem de OPG.

Interpretação do resultado do OPG

O resultado do OPG não é indicativo do grau de infecção do hospedeiro, pois a quantidade de ovos nas fezes pode ser influenciada por vários fatores, tais como:

- Hora do dia em que a colheita foi realizada;
- Patogenicidade do parasito;
- Tratamento prévio dos animais;
- Relação machos e fêmeas de parasitos no hospedeiro;
- Fatores relacionados ao hospedeiro, como idade, nutrição, imunidade, alterações fisiológicas e patológicas do sistema digestivo do hospedeiro.

Coprocultura

Material necessário:

- Substrato (utilizado apenas para fezes pastosas; pode ser vermiculita, serragem, cepilho branco ou fezes de equinos autoclavadas);
- Placa de Petri;
- Frasco de vidro de boca larga;

- Pipeta de Pasteur;
- Tubo de ensaio.

Metodologia:

Diversas são as maneiras de realizar a coprocultura.

Para ovinos e caprinos, pode se macerar as fezes, homogeneizar e acrescentar substrato para manter a umidade necessária para a eclosão. Outro método utilizado é colocar as cíbalas em frascos limpos e deixar em condições adequadas para a eclosão dos ovos. As cíbalas também podem ser misturadas com um substrato para que não ocorra a perda de umidade da coprocultura.

Em qualquer um dos métodos, não deve faltar umidade, bem como a mesma não pode ser excessiva (as fezes não devem estar ressecadas, também deve haver acúmulo de água no fundo do frasco). Se a coprocultura estiver seca poderá ocorrer elevada mortalidade de larvas. Por outro lado, se a coprocultura estiver muito úmida, poderá ocorrer o desenvolvimento de fungos, sendo que alguns podem ser nematófagos, o que inviabiliza o procedimento.

Após o preparo das fezes, deve-se colocar o material em frascos com até 3/4 da sua capacidade, limpando os bordos e tampá-lo com uma placa de Petri.

Para obter larvas infectantes (L_3), as coproculturas devem ser mantidas em estufa com temperatura aproximada de 26 a 28 °C, por sete dias. Os frascos da coprocultura também podem permanecer em temperatura ambiente (entre 21 e 23 °C), abrigados do sol, condições em que devem ser mantidos por 10 a 14 dias. Temperaturas abaixo de 20 °C podem inibir o desenvolvimento larvar.

Recuperação das larvas infectantes:

Decorrido o tempo necessário, encher o frasco com água até a borda, tampar com uma placa de Petri e inverter bruscamente para evitar que a água derrame. Acrescentar de 15 a 20 mL de água morna (38 a 40 °C) na placa de

Petri e esperar a saída das larvas infectantes. Após 6 horas, coletar o conteúdo existente na placa com o auxílio de pipeta de Pasteur e colocar num tubo de ensaio. As larvas coletadas nos tubos de ensaio podem ser conservadas na geladeira durante 1-2 meses sem que ocorra a morte, trocando-se a água destilada a cada 15 dias. Recomenda-se identificá-las o mais rápido possível.

Identificação de larvas infectantes (L₃) de nematódeos de ruminantes

Preparo da lâmina para identificação:

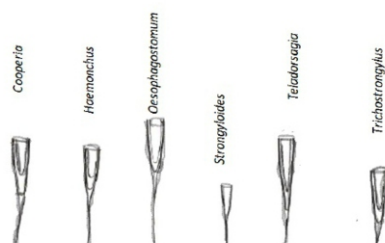
Após coletar as larvas do cultivo, decantar o excesso de água, inclinando o tubo de ensaio, de modo que fique um pouco de água (0,5 mL) no fundo. Agitar o sedimento e com o auxílio da pipeta de Pasteur, colocar uma gota contendo as larvas sobre a lâmina de microscopia. Em seguida, adicionar uma gota de Lugol e cobrir com lamínula para que as larvas fiquem imóveis facilitando a identificação. Acrescentar pequena quantidade Lugol, suficiente para matar as larvas, pois com o passar do tempo as larvas ficam coradas com muita intensidade e que dificulta a identificação.

Larvas a serem identificadas

Devem-se identificar apenas as larvas de terceiro estágio (L₃), ignorando-se as larvas de 1º e 2º estágios, bem como as larvas de nematódeos de vida livre, eventualmente presentes.

A identificação morfológica de L₃ é baseada principalmente na observação das seguintes características:

- Tamanho da larva;
- Formato da região anterior e tipo de cauda das larvas infectantes;
- Espaço entre a ponta da cauda da larva e a ponta da cauda da bainha;
- Presença ou não da bainha caudal;
- Intensidade de coloração com lugol.



Alessandro P. Minho

Figura 3. Desenho esquemático da cauda dos principais nematoides gastrintestinais de ruminantes.

Recomenda-se a identificação de 100 larvas de estrongilídeos de cada coprocultura. Larvas de *Strongyloides* não devem ser incluídas no cálculo do percentual, pois já foram contadas por ocasião da contagem de OPG, já que apresentam morfologia diferente, sendo possível a sua identificação no exame de OPG. A habilidade na identificação só é adquirida com a experiência, o que requer a visualização rotineira de larvas. O auxílio de um técnico treinado é importante para o aprendizado.

Tabela 01. Medidas de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de ovinos (DICKMANS; ANDREWS, 1993).

Nematódeo	Comprimento total (μm)	Comprimento da ponta da cauda da larva até a ponta da cauda da bainha (μm)
<i>Strongyloides</i>	574-710	-
<i>Trichostrongylus</i>	674-749	25-38
<i>Haemonchus</i>	650-751	42 - 116
<i>Oesophagostomum</i>	771-923	125-160
<i>Cooperia</i>	804-924	62-82
<i>Teladorsagia</i>	797-866	30-40

Tabela 02. Medidas utilizadas para identificação específica de *Haemonchus*

Estrutura	<i>H. contortus</i>	<i>H. placei</i>	<i>H. similis</i>
	Valor mínimo - valor máximo (média)		
Comprimento do espículo	383-475 (425)	438-511 (481)	304-389 (341)
Gancho direito (sempre o mais comprido)	37-48 (42)	45-60 (55)	62-81 (71)
Gancho esquerdo (sempre o mais curto)	19-24 (22)	22-32 (27)	41-65 (54)

Recuperação de larvas da pastagem

Material necessário

- Tesoura;
- Sacos plásticos;
- Baldes;
- Cálices de sedimentação;
- Peneira plástica;
- Gaze;
- Sifão;
- Sacos de papel;
- Estufa;
- Lâminas;
- Lamínulas;
- Lugol;
- Tubo tipo Falcon®;
- Pipeta de Pasteur;
- Micropipetas;
- Detergente neutro;
- Microscópio.

Metodologia

A coleta da amostra de capim deve ser feita manualmente, com o auxílio de uma tesoura. As amostras de capim devem ser cortadas bem rentes ao solo e acondicionadas em sacos plásticos limpos.

Para a coleta, fazer um traçado em forma de W, de acordo com a técnica descrita por Taylor (1939). O material vegetal deve ser coletado manualmente, sendo retirada uma amostra de capim a cada quatro passos, aproximadamente a cada 3,5 m de distância entre cada local de coleta. A pastagem deve ser cortada rente ao solo com uma tesoura e acondicionada em sacos plásticos. Após a coleta, encaminhar ao laboratório para a recuperação das larvas.

No laboratório, colocar as amostras em baldes, imersas em quatro litros de água por quatro horas. Após esse período, transferir as amostras para outro balde por mais três horas em quatro litros de água, totalizando sete horas de imersão (NIEZEN et al., 1998). Adicionar 500 μ L de detergente neutro (Tween 80, dextran) para diminuir a tensão superficial da água, facilitando a separação das larvas do capim.

Decorridos às sete horas, retirar as amostras do balde e colocar em sacos de papel e secar em estufa a 60 °C por 72 horas, para o cálculo da matéria seca e determinação do número de L₃ por quilograma de MS.

Manter os baldes em repouso por 24 horas. Após esse período, descartar o sobrenadante e transferir o sedimento para cálices de sedimentação. Deixar o material em repouso nos cálices por 24 horas em temperatura ambiente (de preferência, entre 18 e 23 °C). Posteriormente, descartar o sobrenadante e armazenar o sedimento em tubos de centrífuga de 50 mL (tipo Falcon®).

Realizar a leitura de todo o sedimento ou uma alíquota (20%). No último caso, homogeneizar a amostra antes de coletar as alíquotas. Para quantificação e identificação, as larvas recuperadas serão mortas e coradas com lugol. A identificação das larvas infectantes será realizada de acordo com as descrições de Keith (1956), Ueno e Gonçalves (1998) e Van Wyk e Mayhew (2013).

Criopreservação de larvas infectantes em nitrogênio líquido

Fase I

- Recuperar as larvas obtidas das coproculturas.
- Armazenar as larvas em tubos tipo Falcon® de 50 mL. Reduzir o volume para 10 mL. Realizar a contagem de larvas em 10 μ L. Repetir a contagem em pelo menos 10 análises. Avaliar a motilidade das larvas e determinar a quantidade de larvas em 10 mL.
- Transferir mais ou menos 50.000 larvas para um tubo cônico e centrifugar a 1.000 rpm por 2 minutos. Desprezar o sobrenadante e repetir o processo duas vezes usando água destilada. Após a centrifugação, substituir a água por uma solução contendo hipoclorito de sódio a 0,01% (w/v).
- Homogeneizar a suspensão com uma pipeta de Pasteur e observar o processo de desembainhamento. Quando 90% das larvas estiverem desembainhadas, centrifugar os tubos por 2 minutos a 1.000 rpm. Descartar o sobrenadante e acrescentar solução fisiológica. O material deverá ser submetido ao mesmo processo por pelo menos mais quatro vezes até que o odor do cloro tenha se perdido.
- O volume dos tubos deverá ser reduzido a 1 mL. As larvas ressuspendidas devem ser transferidas para ampolas plásticas de 2 mL (criotubo de polipropileno). Lavar o tubo com mais de 1 mL de solução transferindo-a para o criotubo de polipropileno. O material deverá ser mantido ao longo da noite a temperatura de 4 °C.

Fase II

As ampolas deverão ser inicialmente congeladas no pescoço do botijão de nitrogênio líquido por 2 horas e 30 minutos.

Fase III

- Fixar as ampolas em suporte de alumínio, imergindo-as no nitrogênio líquido.

Descongelamento

- O descongelamento deverá ser feito em banho-maria a 40 °C. Assim que descongelar, as ampolas deverão ser imediatamente removidas para a temperatura ambiente.
- A suspensão de larvas deverá ser transferida para um tubo cônico e centrifugada por 1000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante será desprezado e o sedimento ressuspendido em solução fisiológica.
- Após as larvas terem sido mantidas em temperatura ambiente por 2 horas, uma amostra deve ser examinada para determinar a motilidade.

Teste de eclodibilidade de ovos - teo

O teste da eclodibilidade de ovos ou eclodibilidade larvar, é o teste mais simples para o uso em primeira instância, embora vários outros tipos de ensaios possam ser utilizados como uma triagem primária. Ao contrário de outros testes *in vitro*, além de poder ser utilizado na avaliação direta dos compostos químicos ou vegetais sobre ovos de nematoides gastrointestinais de ruminantes (NGI), o TEO pode avaliar a fecundidade (viabilidade) dos ovos de NGI eliminados por animais que receberam tratamento anti-helmíntico via oral. Essa avaliação possui maior aplicabilidade para substâncias com potencial ovicida que são pouco absorvidas pelo trato digestório, como os taninos condensados, ou para compostos que, em contato com a fêmea do parasito, acarretam infertilidade dos ovos eliminados nas fezes. Neste documento, visamos a avaliação da eclodibilidade dos ovos eliminados por animais tratados em comparação com animais controle negativos (não tratados), ou seja, experimentos *in vivo*. A diferença fundamental para as avaliações *in vitro* de compostos bioativos seria a diluição dos compostos e sua avaliação em quadruplicata em diversas concentrações teste.

Essa avaliação é muito importante quando analisamos o efeito de uma substância na descontaminação da pastagem, pois ao avaliarmos apenas a média da contagem de OPG de um grupo tratado não estamos avaliando o real potencial na diminuição do número de larvas infectantes que irão contaminar o ambiente. Por exemplo, em um experimento com cordeiros, uma contagem de OPG de 1.000 acarretaria a eliminação de, aproximadamente, 2.000.000 de ovos/animal/dia. Caso a substância teste acarrete uma redução de 60% na eclodibilidade (viabilidade) dos ovos eliminados, esse número seria de 800.000 ovos viáveis/animal/dia. Essa redução pode gerar um impacto significativo na redução da contaminação das pastagens ao longo dos anos e diminuir o número de tratamentos anti-helmínticos aplicados no rebanho.

Metodologia

Material necessário

- Peneiras com diversos diâmetros de malhas;
- Centrífuga;
- Microscópio invertido;
- Tubos tipo Falcon®;
- Placas de 24 poços;
- Estufa incubadora tipo B.O.D.

Recuperação de ovos

- Coletar fezes diretamente do reto, dependendo do OPG do animal. Para realização de testes in vitro de avaliação de eficácia de compostos vegetais. Utilizar, preferencialmente, animais com OPG acima de 2000.
- Pegar uma porção das fezes, macerar e acrescentar água morna (± 40 °C).
- Filtrar o material fecal em quatro peneiras com as seguintes reticulações: 1 mm, 105 μ m, 55 μ m e 25 μ m. Podendo variar dependendo da disponibilidade.

- Lavar a peneira de 25 μm com água destilada, com auxílio de pisseta (almotolia), para retirar os ovos que ficaram retidos, vertendo-os para um béquer até completar o volume aproximado de 100 mL (água + ovos).
 - Transferir o material para quatro tubos Falcon® de 50 mL e centrifugar a 3.000 rpm (1.100 xg) por 5 minutos.
 - Após a centrifugação, descartar o sobrenadante e completar com solução salina saturada para a suspensão dos ovos. Misturar por inversão.
 - Centrifugar a 3.000 rpm (1.100 xg) por 5 minutos.
 - Retirar o sobrenadante com auxílio de pipeta Pasteur de 3 mL, transferir para um novo tubo Falcon® de 50 mL e completar com solução salina saturada até o volume de 50 mL.
 - Centrifugar a 3.000 rpm (1.100 xg) por 5 minutos.
 - Despejar o sobrenadante em peneira de 25 μm e lavar lentamente em água morna com auxílio de uma jarra, para retirar o sal.
 - Despejar o conteúdo da peneira em um cálice de decantação usando água deionizada. Deixar descansar durante 1 hora em temperatura ambiente, desde que a mesma não seja inferior a 22 °C, nesse caso colocar em estufa incubadora a 27 °C.
- *Obs: A quantidade de fezes a ser macerada dependerá do OPG. Quanto menor o resultado do OPG, maior quantidade de fezes será necessária para uma recuperação de ovos satisfatória.

Preparação das placas

- Recuperar os ovos como no item anterior (recuperação de ovos).
- Homogeneizar com movimentos em forma de cruz a mistura (ovos + água) com auxílio de pipeta.

- Imediatamente após a homogeneização, retirar três alíquotas de 30 μm e transferi-las para lâminas de microscopia. Realizar a contagem de cada uma das alíquotas em microscópio óptico (objetiva de 4x).
- Fazer a média de contagem entre as alíquotas para estimar a quantidade de ovos por microlitro. Calcular quantos microlitros são necessários para a obtenção de, aproximadamente, 110 ovos.
- Colocar, aproximadamente, 110 ovos por poço (placa de 24 poços), realizar o teste em quadruplicata por grupo experimental (grupo tratado com anti-helmíntico e grupo controle não tratado). No caso de avaliações in vitro de eficácia de extratos vegetais, normalmente são avaliadas seis concentrações iniciais (100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL e 3,125 mg/mL) de cada substância teste, controle negativo (água destilada) e controle positivo (0,78 mg/mL de Tiabendazol) em quatro a seis repetições.
- As placas são homogeneizadas manualmente e acondicionadas em B.O.D. (27 °C) por 24 horas. Após este período, os ovos e as larvas L1 eclodidas são quantificadas com auxílio de microscópio invertido para o cálculo da porcentagem de inibição da eclodibilidade larvar.
- São contadas todas as estruturas (ovos e larvas de primeiro estágio – L1) e realizada uma regra de três simples para calcular o número de L1 em 100 estruturas (ovos + larvas), estimando assim, o percentual de eclodibilidade (viabilidade) dos ovos de NGL eliminados nas fezes ou após o contato com extratos vegetais. Pode-se contar até 100 estruturas e ter o número direto da porcentagem (não é indicado quando a homogeneização da solução contendo os ovos não foi bem realizada).

Montagem de lâminas de helmintos

Para a confecção de lâminas temporárias ou permanentes de helmintos é necessário realizar processos de fixação, clarificação e, em alguns casos, coloração para melhor visualização das estruturas utilizadas na identificação. Para a fixação dos helmintos, pode-se utilizar formol a 10%, álcool 70°, ou

AFA (ácido formol acético). A escolha dos fixadores depende da finalidade com que o helminto será utilizado. Fixadores a base de formol não são recomendados quando o objetivo da fixação e a realização do diagnóstico molecular. No caso de realizar estudos histoquímicos, não se recomenda a utilização do AFA.

Para uma melhor análise dos exemplares fixados, recomenda-se a fixação de forma estendida, para permitir uma boa montagem e visualização da morfologia. Nos estudos morfológicos é indispensável clarificar a maioria dos helmintos, possibilitando a observação morfológica das estruturas internas. A clarificação pode ser feita com fenol, lactofenol de Amann ou solução de Hoyer.

A coloração é uma etapa necessária para a identificação de trematódeos e cestódeos, sendo dispensável nos casos dos nematódeos.

A montagem de lâminas temporárias é indicada em estudos morfológicos das espécies facilitando o posicionamento das estruturas a ser observadas. Neste tipo de montagem, os helmintos são estocados em álcool 70°, e a montagem é realizada no momento da observação microscópica. Para a confecção de lâminas permanentes, estas são montadas com soluções de longa durabilidade, tais como o Bálsamo do Canadá ou Permout™, que não permitem a movimentação do parasito, além de apresentarem montagem trabalhosa, necessitando tempo e prática para obter bons resultados. Para montagem de lâminas de nematódeos, recomenda-se a utilização de Hoyer, pois dispensa o processo de clarificação requerido quando se usa as soluções descritas anteriormente, permitindo-se obter a confecção de lâminas permanentes.

Coleta de helmintos adultos em necropsia de ovinos

O exame "post-mortem" completo deve se basear numa boa necropsia. Existem muitas técnicas, uma simples e outras complexas, para realizar a coleta de nematódeos gastrointestinais.

Material necessário

- Baldes plásticos graduados;
- Tesoura de ponta romba;
- Enterótomo;
- Cálice graduado com capacidade de 2.000 mL;
- Pinças, facas;
- Solução fisiológica;
- Formol a 10%;
- Bandejas, tamises, barbantes.

Metodologia

Deixar o animal a ser necropsiado em jejum, no mínimo 12 horas. Após a eutanásia do animal, abrir as cavidades torácica e abdominal com cuidado para evitar a perfuração das vísceras. Retirar as vísceras cuidadosamente.

Antes de proceder a liberação dos órgãos de seus ligamentos, colocar ligaduras duplas com o auxílio de barbantes entre extremidades posterior do retículo e anterior do abomaso, e extremidade posterior do abomaso e extremidade anterior do intestino delgado e, por último, entre a extremidade posterior do intestino delgado e intestino grosso. A distância entre as ligaduras deve ser de 1 cm, no mínimo, para facilitar o corte entre elas posteriormente. A finalidade de colocar as ligaduras duplas é de evitar o extravasamento de conteúdo e a passagem de helmintos de um órgão para outro, evitando então o diagnóstico incorreto. Após as ligaduras duplas, liberar os órgãos dos ligamentos e separar os mesmos.

Nematódeos do abomaso

Com o auxílio de uma tesoura, abrir o abomaso pela sua curvatura maior, colocando seu conteúdo em um balde graduado. Distender o órgão em uma bandeja, despejar solução fisiológica ou água lentamente e, com o auxílio da mão ou de uma espátula, lavar cuidadosamente a mucosa do órgão para a remoção dos helmintos a ela aderidos.

Recolher o produto da lavagem do órgão no balde graduado, junto ao conteúdo já recuperado. Repetir o processo de lavagem, caso necessário. Adicionar solução fisiológica ou água ao conteúdo do balde até completar o volume de 1 litro. Homogeneizar a suspensão obtida e, com o auxílio de uma concha, retirar pequenas quantidades, colocando-as em um recipiente graduado até completar o volume de 100 mL (10%). Antes de coletar as amostras, homogeneizar o conteúdo com o auxílio da concha. Realizar a lavagem do material da alíquota com água corrente em duas peneiras (uma sobre a outra), com malhas de 1,0 mm e 250 μm , até o conteúdo ficar limpo. Os nematódeos adultos usualmente ficam retidos na peneira com malha de 1,0 mm, enquanto as formas imaturas são retidas na peneira de 250 μm . Se o exame da amostra for realizado logo após a coleta, o frasco poderá ser guardado no refrigerador até a realização do mesmo. Caso o exame não seja realizado logo, deve-se adicionar formol comercial até formar uma suspensão de 5%.

Nematódeos de intestino delgado

Com o auxílio de um enterótomo, abrir o intestino delgado dentro de um balde graduado. Ao mesmo tempo em que estiver abrindo o órgão, realizar a raspagem da mucosa para a retirada dos helmintos ali aderidos. Após a abertura do órgão, realizar a lavagem com água ou solução fisiológica. O material obtido na raspagem e na lavagem do órgão é colocado junto ao conteúdo do balde graduado. Para garantir a retirada dos helmintos que estavam aderidos na mucosa e não foram retirados no processo de raspagem, realizar a digestão do órgão, colocando o mesmo em suspensão no béquer de 2.000 mL contendo solução fisiológica. Após a digestão do órgão, misturar ao conteúdo proveniente da lavagem do órgão. Ao conteúdo do balde graduado, acrescentar água ou solução fisiológica até completar o volume de 2 litros. Os procedimentos posteriores são idênticos aos utilizados para o abomaso.

Montagem de lâminas permanentes com Hoyer

- Desengordurar as lâminas e lamínula com solução de álcool-éter;
- Colocar os parasitos fixados na placa de Petri com pequena quantidade de álcool 70°;
- Selecionar os exemplares desejados, preferencialmente os mais distendidos;
- Transferir para a lâmina;
- Secar o excesso de álcool com papel filtro;
- Colocar uma gota de solução do Hoyer;
- Colocar cuidadosamente a lamínula sobre o material da lâmina;
- Deixar alguns minutos para deslizar completamente;
- Vedar a lamínula com esmalte incolor;
- Deixar secar em repouso na horizontal até a completa fixação da lamínula.

Lista de soluções

Solução de lugol

Iodo cristalizado	1 parte
Iodeto de potássio	5 partes
Água destilada	100 partes

AFA

Álcool 70°	50 mL
Formol comercial 37%	10 mL
Ácido acético	2 mL
Água destilada q.s.p	40 mL

HOYER

Goma arábica	30 g
Hidrato de cloral	200 g
Glicerina PA	16 mL
Água destilada	50 mL

PBS 10X (deve ser diluído 1/10 para o uso)

NaCl	82 g
Na ₂ HPO ₄	10,5 g
Na ₂ H ₂ PO ₄	3,086 g
H ₂ O	q.s.p. 1 L

pH 7 a 7,2 acertado com NaOH ou HCl

Referências

AMARANTE, A. F.T. Why is it important to correctly identify *Haemonchus species*? **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 263-268, out./dez. 2011.

DICKMANS, G.; ANDREWS, J. S. A comparative morphological study of the common nematodes parasitic in the alimentary tract of sheep. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 52, n. 1, p. 1-25, Jan. 1933.

KEITH, R. K. The differentiation of the infective larvae of some common nematode parasites of cattle. **Australian Journal of Zoology**, v. 1, n. 2, p. 223-235, 1953.

NIEZEN, J. H.; WAGHORN, G. C.; CHARLESTON, W. A. G. Establishment and fecundity of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in lambs fed *lotus* (*Lotus pedunculatus*) or perennial ryegrass (*Lolium perenne*). **Veterinary Parasitology**, v. 78, n. 1, p. 13-21, July 1998.

TAYLOR, E. L. Technique for the estimation of pasture infestation by strongyloid larvae. **Parasitology**, v. 31, n. 4, p. 473-478, Dec. 1939.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4. ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1998. 143 p.

VAN WYK, J. A.; MAYHEW, E. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 80, p. 1-14, 2013.

Literatura Recomendada

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific Industrial Research**, v. 12, p. 50-52, 1939.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A high efficiency technique for the long-term preservation of infective nematode larvae. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 77-79, 1997.

JENSEN, J. R.; MERLO, A.; VIEIRA-BRESSAN, M. C. R. Cryopreservation of first and infective stage larvae and the infectivity test by anigical inoculation of the nematodes *Haemonchus placei* and *Cooperia punctata*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, n. 1, p. 175-177, 2000.

LICHTENFELS, J. R.; PILITT, P. A.; HOBERG, P. New morphological characters for identifying individual specimens of *Haemonchus* spp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) and a key to species in ruminants of North America. **Journal of Parasitology**, v. 80, n. 1, p. 107-119, 1994.

MANUAL of veterinary parasitological laboratory techniques. 3rd ed. London: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1986. 159 p.

ROBERTS, F. H. S.; O´SULLIVAN, S. P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agriculture Research**, v. 1, n. 1, p. 99-102, 1950.

SLOSS, M. W.; ZAJAC, A. M.; KEMP, R. L. **Parasitologia clínica veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1999. 198 p.

SOULSBY, E. J. L. **Textbook of veterinary clinical parasitology: helminths**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1965. v. 1, 1120 p.

STEAR, M. J.; BAIRDEN, K.; BISHOP, S. C.; GETTINBY, G.; MCKELLAR, Q. A.; PARK, M.; STRAIN, S.; WALLACE, D. S. The processes influencing the distribution of parasitic nematodes among naturally infected lambs. **Parasitology**, v. 117, n. 2, p. 165-171, Aug. 1998.

Embrapa

Pecuária Sul

CGPE 12342