

## COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

# Comparação entre diferentes técnicas coprológicas e larvacultura para o diagnóstico das helmintoses gastrointestinais de bovinos

## Diagnosis of bovine gastrointestinal helminths by coprologic techniques and larvaculture

Cláudia Soares Santos Lessa,\* Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues,\*\* Nicolau Maués da Serra-Freire,\*\* Márcia Medeiros de Araújo\*

### Resumo

A carga parasitária de bovinos foi avaliada através de três técnicas coprológicas para detecção de ovos e através da larvacultura para identificação de L<sub>3</sub>. Foram utilizados 50 bovinos procedentes da região leste do Estado do Rio de Janeiro. Duas técnicas de centrífugo-flutuação foram utilizadas, a de Figueiredo “modificada” e a de Wisconsin e a técnica de McMaster. O número de ovos encontrado em cada técnica variou bastante, o que acreditamos estar relacionado à quantidade de fezes e ao tempo de centrifugação. A técnica de Wisconsin foi a mais eficiente em relação às outras duas técnicas testadas.

*Palavras-chave:* técnicas; helmintos-bovinos; opg e larvacultura.

Na pecuária leiteira as helmintoses assumem papel de grande importância para sanidade dos animais de produção e muitas das vezes passam despercebidas à atenção do criador e até mesmo de profissionais e técnicos, em função da pouca evidência dos sintomas clínicos, principalmente no início da infecção. Nesse contexto, o diagnóstico laboratorial deve ser feito com muito cuidado para que os resultados expressem a realidade, o valor do diagnóstico está diretamente relacionado ao seu processamento, experiência e a seriedade do profissional responsável.

Grisi & Todd (1978) citaram que uma atenção considerável tem sido dada ao parasitismo subclínico em bovinos e ao baixo número de ovos nas fezes.

Medidas de fecundidade dos helmintos intestinais em geral são baseados em estimativas do número de ovos presentes em uma amostra de fezes do hospedeiro e são notórios em sua inconsistência e variabilidade, ou seja, as diferenças existentes entre os exames do mesmo animal devem ser consideradas as variações em função de fatores dependentes do próprio parasito (Moriya, 1954; Hall, 1982; Sinniah 1982; Anderson & Schad; 1985).

São várias as técnicas utilizadas para fins de diagnóstico das helmintoses gastrintestinais dos bovinos. Neste ex-

perimento foram utilizadas três técnicas já descritas: a técnica de McMaster utilizada para contagem de ovos por grama de fezes (opg); duas técnicas de centrífugo flutuação: Wisconsin, que é utilizada para detectar a presença de ovos quando o opg é considerado baixo, e a técnica de Figueiredo et al. “modificada”. Esta última é utilizada para o diagnóstico específico para *Eimeria* sp., onde alteramos a quantidade de fezes de 5g para 1g, mas mantivemos todo o processamento da técnica e a utilizamos com a finalidade de diagnóstico para os ovos de helmintos.

Segundo Santiago (1972, quase sempre o parasitismo em ruminantes é misto e certas espécies de helmintos ovipõem mais 5.000 ovos por dia e outros têm ovopostura baixa, de no máximo 200 ovos por dias. O número de ovos por grama de fezes, além de não indicar realmente a intensidade do parasitismo e devido à grande semelhança morfológica entre eles, impossibilita a identificação genérica ou específica.

Com o objetivo de avaliarmos uma nova técnica, Figueiredo “modificada”, utilizada para o diagnóstico de *Eimeria* sp., fizemos a comparação com outras duas técnicas já bastante utilizadas para o diagnóstico das helmintoses em ruminantes, a de McMaster e a de Wisconsin.

\*Pós-graduandas do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ. CEP 23851-970, Seropédica, RJ.

\*\* Professores no Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ. CEP 23851-970, Seropédica, RJ.

Foram utilizados cinquenta bovinos, com idade variando de quatro a 18 meses, mestiços girolanda, provenientes de duas propriedades para exploração leiteira, localizadas nos municípios de Itaboraí e Rio Bonito, na região leste do Estado do Rio de Janeiro. O processamento laboratorial das técnicas foi realizado na Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz, (EPPWON), do Departamento de Parasitologia Animal/ Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Amostras individuais de fezes foram obtidas diretamente da ampola retal, recolhidas em sacos plásticos 20x30 cm, evitando-se, desta forma, a contaminação com helmintos de vida livre no solo. O material colhido foi identificado individualmente, acondicionado em caixa de isopor com gelo e levado à EPPWON e ao chegar, transferido para geladeira a 5-6°C.

#### Técnicas utilizadas

A contagem de ovos existentes nas amostras fecais pela técnica de McMaster foi feita a partir de quatro gramas de fezes em 56ml de solução saturada de sacarose (Whitlock, 1958). Após repouso de 10 minutos para que houvesse tempo suficiente para a flutuação, fez-se a contagem dos ovos. Por esta técnica foram examinados 45 animais (Tabela 1).

A técnica de Figueiredo (1984) baseia-se na alteração da quantidade de fezes empregada na técnica original, em que se utilizam cinco gramas de fezes suspensas em 15ml de água. Na técnica modificada trabalhou-se com um grama, que foi suspenso em 15ml de água e centrifugada a 1.500 rpm. O sedimento foi suspenso em solução saturada de sacarose, completando o volume para 15ml; uma segunda centrifugação foi feita a 1.500 rpm. Completou-se o volume com solução saturada de sacarose até formação do menisco, repousou-se uma lamínula sobre a borda do tubo por 10 minutos, sendo removida e colocada sobre lâmina. A contagem dos ovos foi realizada no microscópio binocular com um aumento de 100x. Cinquenta animais foram examinados (Tabela 1).

#### Wisconsin

Utilizou-se nesta técnica cinco gramas homogeneizadas em 15ml de água de torneira e tamizadas; o filtrado foi envasado para tubos de centrifuga de 15ml e centrifugado a 1.500 rpm durante três minutos. Desprezou-se o sobrenadante e homogeneizou-se o precipitado com solução saturada de sacarose até o volume de 15ml. Centrifugou-se novamente a 1.500 rpm/5 minutos; completou-se o volume até formar o menisco, após-se uma lamínula por 10 minutos; os ovos foram observados e contados em um microscópio binocular com um aumento de 100x. Dos 50 animais do experimento, 49 foram examinados através desta técnica (Tabela 1).

**Tabela 1:** Resultado do exame de fezes por ovoscopia de 50 bovinos dos municípios de Itaboraí e Rio bonito-RJ, utilizando técnica quantitativa (McMaster) e qualitativa (Figueiredo e Wisconsin)

Nome/número	Sexo	McMaster	Figueiredo	Wisconsin
Boneca	F	250	Neg.	80
Medalha	F	200	Neg.	08
19 JP	F	300	4	10
Laranja	F	850	10	22
Saúva	F	Neg.	Neg..	06
Arena	F	300	5	140
78 JP	F	Neg.	2	15
Roxinha	F	200	2	80
Havana	F	400	10	100
Aliança II	F	650	5	34,2
Chita	F	1200	14	25
Perdiz	F	2500	50	134
Cabeceira	F	-	Neg.	03
Macieira	F	-	3	58
Mendiga	F	850	31	65
Cocota	F	600	2	3,6
Clarinha	M	100	23	67
Cordilheira	M	1800	90	68
Veludinha	M	2300	179	108
Escurinha	M	-	60	73
Rebeca	F	480	12	9,4
Portela	F	-	13	18
Cotia	F	-	Neg.	-
Rebeca II	F	300	13	32
Azeitona	F	1650	61	155
19	F	1800	22	683
Manga	M	1600	46	482
Domingueira	F	750	22	66,2
16	F	2300	91	192
24	F	1300	36	129,6
21	F	150	5	22
16	F	2300	91	192
Maravilha	M	100	2	4,4
33	F	850	29	46,2
29	F	1900	54	174,8
Ramona	M	800	35	168,2
152	F	1150	117	48
Brahma	M	4900	49	64,4
Olhuda	M	550	272	64,8
20	F	150	2	3,8
Antena	M	4400	295	353
08	F	550	30	18
Ramona II	M	1050	69	85,8
24 II	F	3600	68	193,2
16 II	F	850	62	81
Trombadinha	F	550	31	19
21 II	F	200	4	14
Cigarra	F	1250	47	34,5
Aliança	F	1600	85	118,2
Escurinha	F	900	46	164,6

#### Larvacultura

Utilizando-se a técnica de Roberts e O'Sullivan (1950), coproculturas foram mantidas em temperatura ambiente por um período de sete dias. As larvas foram contadas e identificadas seguindo-se a chave de Ueno e Gutierrez (1983).

Em algumas amostras pôde-se recuperar ovos através das técnicas de centrífugo flutuação os quais não foram detectados pela técnica McMaster, corroborando com Lima (1981), que fez um estudo comparativo entre a técnica McMaster e a de centrífugo flutuação com açúcar, demonstrando que esta última foi mais precisa, chegando a detectar 95% de positividade nas amostras processadas, enquanto a McMaster detectou apenas 30%.

Egwand & Slocombe (1982) citaram que a técnica de Wisconsin tem auxiliado na detecção de até sete ovos por grama de fezes examinadas e nenhum falso negativo foi encontrado no experimento. Concluíram que, apesar da excelente sensibilidade e especificidade, a técnica recupera não mais que 60 a 90% dos ovos nas fezes.

Thienpont et al. (1979) citaram que métodos que comumente envolvem flutuação e a técnica McMaster, são provavelmente as mais bem conhecidas, e Dunn & Keymer (1986) analisaram a relação entre o tempo de flutuação e o número de ovos presentes na amostra fecal concluindo que esta relação é muito importante. Os autores acima citam que a variação no tempo de flutuação e a leitura pode reduzir substancialmente a contagem dos ovos usando esta técnica e que o decréscimo no número pode ser pelo efeito osmótico da solução de cloreto de sódio, o qual causa deformidade dos ovos.

Dois animais (4,44%), dos 45 examinados, estavam negativos para a técnica McMaster, que correspondeu a falso negativo, já que as fezes desses mesmos animais apresentaram resultados positivos para, pelo menos uma das técnicas de centrífugo flutuação utilizadas. Para a técnica de Figueiredo et al. (1984), cinco amostras (10%) estavam negativas para os 50 animais examinados e quatro amostras foram recuperadas pela técnica de Wisconsin. Em relação à análise quantitativa, as amostras analisadas através da técnica McMaster com opg acima de 100 ovos, apresentaram a contagem muito superior àquelas onde se utilizou a centrífugo flutuação. Para opg inferior a 50 ovos, as técnicas de centrífugo flutuação foram mais eficientes, detectando até três ovos.

As larvas recuperadas foram mortas por aquecimento com cuidado para que não fossem alteradas suas estruturas. Poucas vezes foi utilizada uma gota de solução de lugol, pois observou-se o inconveniente de corar com mais intensidade algumas estruturas das larvas que são de grande importância para sua identificação, como os pontos refringentes de algumas espécies do gênero *Cooperia*, e células intestinais. As larvas estudadas foram identificadas a: *Trichostrongylus spp.*, *Trichostrongylus axei*, *Cooperia sp.*, *Haemoncus sp.*, *Oesophagostomum sp.*, e *Strongyloides sp* (Tabela 2). Houve variação entre

os números de exemplares dos gêneros encontrados, o que está de acordo com Santiago (1972), segundo o qual o parasitismo em ruminantes varia quantitativamente os resultados em consequência de certas espécies de

**Tabela 2:** Resultado de coprocultura de 50 bovinos dos municípios de Itaboraí e Rio Bonito-RJ para nematóides gastrintestinais

Bovino	Sexo	Gênero de nematóide				
		Haem.	Tricho.	Coop.	Oesop.	Strong.
Boneca	F	Neg.	>100	>100	>100	Neg.
Medalha	F	Neg.	Neg.	01	Neg.	Neg.
19 JP.	F	02	Neg.	Neg.	01	Neg.
Laranja	F	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Saúva	F	05	03	01	02	Neg.
Arena	F	>100	>100	>100	>100	Neg.
78 JP	F	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Roxinha	F	15	02	Neg.	Neg.	Neg.
Havana	F	15	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Aliança II	F	12	30	46	12	Neg.
Chita	F	01	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Perdiz	F	SFS	SFS	SFS	SFS	SFS
Cabeceira	F	SFS	SFS	SFS	SFS	SFS
Macieira	F	SFS	SFS	SFS	SFS	SFS
Mendiga	F	04	Neg.	13	Neg.	14
Cocota	F	09	Neg.	12	05	Neg.
Clarinha	M	Neg.	08	Neg.	Neg.	Neg.
Cordilheira	M	06	05	03	Neg.	05
Veludinha	M	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Escurinha	M	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Rebeca	F	06	Neg.	07	Neg.	Neg.
Portela	F	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Cotia	F	01	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Rebeca II	F	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Azeitona	F	3	Neg.	1	2	Neg.
19	F	15	Neg.	05	09	02
Manga	M	02	Neg.	01	01	Neg.
Domingueira	F	13	02	11	Neg.	Neg.
16	F	13	Neg.	08	02	Neg.
24	F	03	Neg.	2	07	Neg.
21	F	03	Neg.	03	06	Neg.
16	F	13	Neg.	02	07	Neg.
Maravilha	M	05	02	25	Neg.	Neg.
33	F	05	03	18	Neg.	09
29	F	80	04	06	10	Neg.
Ramona	M	01	Neg.	01	06	Neg.
152	F	28	01	01	08	Neg.
Brahma	F	03	Neg.	04	02	Neg.
Olhuda	F	02	Neg.	04	01	Neg.
20	F	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Antena	M	06	Neg.	02	02	Neg.
08	F	02	Neg.	03	02	Neg.
Ramona II	F	01	Neg.	01	06	Neg.
24 II	F	03	Neg.	Neg.	05	Neg.
16 II	F	06	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Trombadinha	F	27	04	15	19	01
21 II	F	03	Neg.	Neg.	28	Neg.
Cigarra	F	60	11	10	24	Neg.
Aliança	F	25	Neg.	62	13	Neg.
Escurinha	F	22	Neg.	15	28	Neg.

helminthos em que há nematóides, possuem ovopostura alta, e outros com ovopostura baixa.

O percentual de larvas encontradas foi de 30,28% para *Haemonchus sp*, 28,13% para *Cooperia sp*, 23,76%, *Oesophagostomum sp*, 16,1% *Trichostrongylus spp* e 1,8%, para *Strongyloides papillosus*.

A técnica de Wisconsin foi a mais eficiente em relação às outras duas técnicas testadas, pois alguns animais negativos para as técnicas de McMaster e Figueiredo "modificada" apresentaram resultado positivo para Wisconsin e em nenhuma amostra examinada ocorreu o inverso.

## Abstract

The parasitic burden of bovine gastrointestinal helminths was analysed by three coprologic techniques to search eggs and larvaculture for identifying the infective larvae. Forty five bovines from east region of Rio de Janeiro State were examined. Two techniques of centrifugal flotation

modified "Figueiredo" and Wisconsin were compared to McMaster technique. The centrifugal flotation techniques showed best results when compared to detecting low EPG even when the other techniques were negative. The larvae morphology was used to identify the genera and/or species *Trichostrongylus axei*, *trichostrongylus spp.*, *Cooperia spp.*, *Haemonchus spp.*, *Oesophagostomum spp.* and *Strongyloides papillosus* were the identified larvae from individual larvaculture.

**Keywords:** Techniques; helminths; bovines; EPG; larvaculture.

## Referências bibliográficas

- ANDERSON, R. M. & SCHAD, G. A. Hook worn burdens and faecal egg counts: an analysis of the biological basis of variation. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 79, 812-825, 1985.
- DUNN, A. & KEYMER, A. Factors affecting the reliability of the McMaster technique. *J. Helminth.*, v. 60, p. 260-262, 1986.
- EGWANG, T. G. & SLOCOMBE, J. O. D. Evaluation of the Cornell - Wisconsin Centrifugal Flotation Technique for Recovering Trichostrongylid Eggs from Bovine Feces. *Can. J. Comp. Med.* v. 46, p.133-137, 1982.
- FIGUEIREDO, P. C.; SERRA FREIRE, N. M., GRISI, L. Eimerias de Bovinos Leiteiros no Estado do Rio de Janeiro: Técnica de Diagnóstico e Espécies Identificadas. *Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro*, v. 24, p. 3-10, 1984.
- GRISI, L. & TODD, C. Prevalence of Gastrointestinal Parasitisms Among Milking Cows in Wisconsin, Pennsylvania, and North Carolina. *Am. J. Vet. Res.*, v. 39, n. 1, p. 51-54, 1978.
- HALL, A. Intestinal helminths of man: the interpretation of egg counts. *Parasitology*, v. 85, 605-613, 1982.
- LIMA, M. M. *Helminthíases gastrointestinais em bovinos da raça leiteira*. Tese (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1981.
- MORIYA, S. The reliability of current diagnostic methods for the identification of helminth eggs. *Parasitology*, v. 44, p. 300-303, 1954.
- PORTER, D. A.; CIORDIA, HONORICO & BIZZELL, W. E. Use of vermiculite as a culture medium for larvae of nematode parasites of ruminantes. *J. Parasitol.*, v. 51, p. 47, 1965.
- SANTIAGO, M. A. M. *Identificação das Larvas dos Nematódeos Parasitas dos Ruminantes*. Johnson & Johnson Divisão Veterinária p. 3-18, 1972.
- SINNIAH, B. Daily egg production of *Ascaris lumbricoides*: the distribution of eggs in faeces and the variability of egg counts. *Parasitology*, v. 84, 167-175, 1982.
- THIENPONT, D., ROCHETTE, F., VANPARIJS, O. F. J. *Diagnosing helminthiasis through coprological examination*. Janssen Res. Found.; Beerse, Belgium. 187 p., 1979.
- UENO, H. & GUTIERRES, V. C. *Manual para Diagnóstico de Helminthíases de Ruminantes*. Japan International Cooperation Agency, p. 1-176, 1983.