

## NOTA DE PESQUISA

### CULTIVO DE LARVAS DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS EM SUBSTRATOS DE SERRAGEM DE *Pinus taeda*, *P. elliottii* E *Araucaria angustifolia*

VALDOMIRO BELLATO<sup>1</sup>; ANTONIO P. DE SOUZA<sup>1</sup>; AMÉLIA A. SARTOR<sup>1</sup>; ANA VALÉRIA D.B. DA SILVA<sup>2</sup>; GUSTAVO DOS S. HENSCHL<sup>3</sup>

**ABSTRACT:** - BELLATO, V.; SOUZA, A.P. DE; SARTOR, A.A.; SILVA, A.V.D.B. DA; HENSCHL, G. DOS S. [Larvae culture of ovine gastrointestinal nematodes in sawdust substrates of *Pinus taeda*, *P. elliottii* and *Araucaria angustifolia*.] Cultivo de larvas de nematóides gastrintestinais de ovinos em substratos de serragem de *Pinus taeda*, *P. elliottii* e *Araucaria angustifolia*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 15, n. 4, p. 199-202, 2006. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Av. Luiz de Camões, 2090, Lages, SC, 88520-000, Brazil. E-mail: a2vb@cav.udesc.br

The aim of this study was to verify the influence of sawdust substrates obtained from wood treated with sodium tribromophenate and not treated of *Pinus elliottii*, *P. taeda*, and *Araucaria angustifolia* in larval cultures of ovine gastrointestinal helminths. Feces samples were collected between 8 to 12am, from a lamb naturally infected with gastrointestinal nematodes and analysed by the modified Mc Master technique for worm egg counting (epg). Six groups of 20g of feces were prepared. Each group received 5g of one of the sawdust substrates and 5 mL of distilled water. The material has been processed, identified and taken to a climatized chamber with a temperature of  $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , relative humidity above 70%, and in escotophase for seven days. The third stage larvae were recovered by the Baermann technique after four hours of sedimentation for the counting and identification of one hundred larvae per treatment. For each treatment were realized 10 repetitions. The average of EPG of Strongylida Order was 630. The average of the larvae number obtained in 20 grams of feces and the percentage of recovery in the different substrates based on the EPG was: *P. taeda* treated, 2719 (22.66%) and not treated, 2353 (20.08%); *P. elliottii* treated, 3069 (22.48%) and not treated, 3181 (24.54%); *A. angustifolia* treated, 2370 (18.73%) and not treated, 3361 (26.75%). There was no statistic difference in 5% level of significance between the averages and the number of larvae in the different substrates.

**KEY WORDS:** Substrates, larvae culture, nematodes, sheeps.

#### RESUMO

Com o objetivo de verificar a influência dos substratos de serragem, obtidos de madeira tratada com tribromofenato de sódio e não tratada, de *Pinus taeda*, *P. elliottii*, e *Araucaria angustifolia*, no cultivo e obtenção de larvas de helmintos gastrintestinais de ovinos, foram coletadas fezes de um cor-

deiro naturalmente infectado com nematóides gastrintestinais. Das fezes coletadas no período das 8h às 12h, foram realizadas as contagens do número de ovos por grama de fezes (OPG) através da técnica Mc Master modificada e formados seis grupos, cada um com 20g de fezes. Cada grupo recebeu 5g de um dos substratos de serragem e 5ml de água destilada. O material foi processado, identificado e levado à câmara climatizada regulada à temperatura de  $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa acima de 70% e escotofase, onde permaneceu durante sete dias. As larvas de 3º estágio foram recuperadas pela técnica de Baermann após um período de quatro horas de sedimentação, para contagem e identificação de cem larvas por tratamento. Para cada tratamento foram realizadas 10 repetições. A média do OPG da Ordem Strongylida foi de 630. A média do número

<sup>1</sup>Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Av. Luiz de Camões, 2090, Lages, SC 88520-000. E-mail: a2vb@cav.udesc.br

<sup>2</sup>Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, bolsista PROBIC/ UDESC

<sup>3</sup>Médico Veterinário, MSc em Ciências Veterinárias.

de larvas obtidas em 20 gramas de fezes e o percentual de recuperação com base no OPG foi: *P. taeda* tratada, 2719 (22,66%) e não tratada, 2353 (20,08%); *P. elliotti* tratada, 3069 (22,48%) e não tratada, 3181 (24,54%); *A. angustifolia* tratada, 2370 (18,73%) e não tratada, 3361 (26,75%). Não houve diferença estatística no nível de 5% de significância entre as médias do número de larvas nos diferentes substratos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Substratos, cultivo de larvas, nematóides, ovinos.

Os nematóides gastrintestinais de ruminantes, principalmente os da Ordem Strongylida, Família Trichostrongylidae, são responsáveis por grandes prejuízos econômicos. O correto diagnóstico propicia um melhor controle, resultando em melhor rendimento produtivo e retardo no aparecimento de resistência. O diagnóstico laboratorial tem sido realizado através da técnica de Gordon e Withlock (1939). Os ovos da Ordem Strongylida apresentam morfologia semelhante, necessitando portanto, complementar o diagnóstico com o cultivo de larvas e identificação dos gêneros. Para o desenvolvimento da maioria dos helmintos gastrintestinais de ruminantes, as condições favoráveis são: temperatura de 27°C, umidade relativa acima de 70% e presença de oxigênio. Para facilitar a oxigenação das fezes normalmente se utiliza como substrato serragem de *A. angustifolia* (pinheiro-do-paraná), embora possa ser utilizado conteúdo de rúmen esterilizado, fezes secas e esterilizadas, vermiculite ou realizar o cultivo sem substrato.

Segundo Ueno e Gonçalves (1998), a técnica de Roberts e O'Sullivan (1950) é muito prática, mas frequentemente ocorre proliferação de fungos em excesso, dificuldade de manutenção da umidade, além da influência de substâncias químicas encontradas na serragem que poderão interferir na produção de larvas durante o cultivo. Ainda segundo os autores, alguns tipos de serragem podem influir no desenvolvimento das larvas. Castro et al. (2001) verificaram o rendimento de larvas em cultivos de fezes de caprinos tendo como substrato *Pinus* sp. e água destilada nos percentuais de 0%, 50%, 75%, 100% e 125% em relação ao peso das fezes, e não encontraram diferença significativa entre os cinco grupos. Ornelas et al. (2001) utilizando fezes de bovinos, serragem de *Pinus* sp. e percentuais de água de 0%, 25%, 37,5%, 50,5% e 62,5%, verificaram que a faixa ideal do volume de água é de 25% do volume de fezes utilizado para o cultivo de larvas. No entanto, os autores não mencionaram a consistência das fezes em relação ao teor de água.

O substrato de serragem proveniente de *A. angustifolia* vem se tornando de difícil obtenção, pela proibição da extração dessa madeira, o que torna necessário buscar alternativas para sua substituição. Em busca desta resposta, foi realizado o presente trabalho com os objetivos de verificar a influência dos substratos de serragens de *P. taeda* e *P. elliottii*, obtidos

de madeiras tratadas com tribromofenato de sódio e não tratadas, no cultivo e obtenção de larvas de helmintos gastrintestinais de ovinos, em comparação com a utilização do substrato de *A. angustifolia* obtido de madeiras tratadas e não tratadas.

No mês de maio de 2005, foram coletadas fezes de um cordeiro naturalmente infectado com nematóides gastrintestinais, com o auxílio de um saco coletor, no período das 8h às 12h e transportadas para o Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), da Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC). O material foi homogeneizado e após, realizadas as contagens do número de ovos por grama de fezes (OPG) através da técnica Mc Master modificada e formados seis grupos, cada um com 20 g de fezes. Em três grupos foram adicionados e misturados respectivamente, cinco gramas de serragem de *P. taeda*, cinco de *P. elliottii* e cinco de *A. angustifolia*, obtidos de madeiras tratadas com tribromofenato de sódio três meses antes do início do experimento e cinco ml de água destilada. Os outros três obedeceram a mesma metodologia com a diferença de que as serragens foram obtidas de madeiras sem nenhum tratamento. O material que formou cada grupo foi acondicionado individualmente em frascos de vidro de boca larga com capacidade de 500ml. Os frascos com o material identificado, foram colocados em câmara climatizada tipo BOD, regulada à temperatura de 27±1°C, umidade relativa acima de 70% e escotofase, durante sete dias. As larvas de 3º estágio (L3) foram recuperadas pela técnica de Baermann após um período de quatro horas de sedimentação. Com o auxílio de uma pipeta, foram coletados do fundo do cálice cinco ml do sedimento. Esse material foi transferido para o tubo de ensaio de onde foram, após homogeneização, coletados 0,5ml e distribuídos em cinco lâminas. Foram contadas todas as larvas presentes em 0,5ml e realizada a identificação genérica de 100 larvas, segundo Keith (1953). Para cada tratamento foram realizadas 10 repetições. Os resultados foram submetidos a análise de variância.

Verificou-se que o número de ovos por grama de fezes (OPG) da Ordem Strongylida obtido nas dez repetições apresentou uma amplitude de variação de 300 a 1900 com média de 630. Mesmo coletando fezes do mesmo animal e obedecendo os horários de coleta, os dados confirmam observações de que não existe uma eliminação e/ou distribuição homogênea dos ovos nas fezes. Esta constatação evidencia a importância de se realizar coletas de fezes de um número expressivo de animais do rebanho para se obter dados mais confiáveis nos diagnósticos de rotina.

O número de larvas de nematóides obtido em cada cultivo nas diferentes repetições com diferentes substratos encontra-se na Tabela 1.

Constata-se, de um modo geral, uma tendência de aumento do número de larvas recuperadas com o aumento do OPG, evidenciando que não houve uma competição perceptível alterando o rendimento larval em função do OPG.

Tabela 1. Número de larvas de nematóides gastrintestinais parasitos de ovinos, obtido nos cultivos com 20 gramas de fezes em diferentes substratos, tratados ou não com tribromofenato de sódio.

Repetição	OPG	<i>Pinus taeda</i>		<i>P. elliottii</i>		<i>Araucaria angustifolia</i>	
		tratada	não tratada	tratada	não tratada	tratada	não tratada
1	1900	6860	4740	8980	9620	7240	10300
2	900	3400	4590	6190	5660	2390	4700
3	300	850	1050	1510	250	450	790
4	300	1740	670	1150	970	280	940
5	600	3260	4100	3270	2200	2160	3670
6	600	940	1970	2340	2900	1780	2660
7	600	4900	780	3860	2850	3650	2500
8	400	1960	2120	1820	2620	2100	3170
9	300	1240	1620	290	2410	1840	2720
10	400	2040	1890	1280	2330	1810	2160
Média	630	2719	2353	3069	3181	2370	3361

Não houve diferença estatística no nível de 5% de significância entre as médias do número de larvas.

Tabela 2. Percentual médio de rendimento larval por gênero de nematóide, obtido de cultivo com diferentes substratos, tratados ou não com tribromofenato de sódio.

Substrato	Gênero (%)					Total
	<i>Haemonchus</i>	<i>Cooperia</i>	<i>Teladorsagia</i>	<i>Trichostrongylus</i>	<i>Oesophagostomum</i>	
PTT	14,68	1,87	2,96	1,22	1,93	22,66
PTNT	14,31	1,07	3,00	0,89	0,81	20,08
PET	15,11	1,34	3,18	0,92	1,93	22,48
PENT	17,98	1,04	3,53	1,02	0,97	24,54
AAT	12,01	1,01	4,09	1,08	0,54	18,73
AANT	18,65	1,29	4,38	0,99	1,44	26,75

PTT- *P. taeda* tratada; PTNT- *P. taeda* não tratada; PET- *P. elliottii* tratada; PENT- *P. elliottii* não tratada; AAT- *A. angustifolia* tratada; AANT- *A. angustifolia* não tratada.

A média do número de larvas obtida nos cultivos com 20 gramas de fezes e o percentual de recuperação com base no OPG foi: *P. taeda* tratada, 2719 (22,66%) e não tratada, 2353 (20,08%); *P. elliottii* tratada, 3069 (22,48%) e não tratada, 3181 (24,54%); *A. angustifolia* tratada, 2370 (18,73%) e não tratada, 3361 (26,75%). Não houve diferença estatística no nível de 5% de significância entre as médias do número de larvas nos diferentes substratos. Estes resultados diferem da afirmação feita por Ueno e Gonçalves (1998) de que diferentes serragens e substâncias químicas encontradas nas mesmas podem interferir na produção de larvas durante o cultivo.

Na Tabela 2 encontram-se os dados referentes ao percentual de rendimento larval por gênero de nematóides obtido de cultivo com diferentes substratos.

Embora as condições de temperatura possam influenciar na produção de larvas de forma diferente de acordo com o gênero, o maior percentual de larvas recuperadas do gênero *Haemonchus*, que apresenta elevada postura, provavelmente deve-se a maior quantidade de ovos deste helminto nas fezes do animal em que foi coletado o material. A predominância deste gênero pode ser constatada nos diagnósticos de rotina do Setor de Parasitologia e Doenças Parasitárias da UDESC (SARTOR et al., 2005), fato que vem se mantendo ao longo dos anos. Ramos et al. (2004) trabalhando com ovinos traçadores, em estudo epidemiológico realizado no Planalto

Catarinense, também verificaram que as mais altas intensidades médias de infecção foram do gênero *Haemonchus*.

Os substratos de *P. taeda*, *P. elliottii* e *A. angustifolia*, obtidos de madeiras tratadas com tribromofenato de sódio e não tratadas, podem ser utilizados na realização de cultivos de larvas de nematóides gastrintestinais de ruminantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASTRO, A.A.; PIMENTEL NETO, M.; ORNELAS, E. I.; GUEDES Jr., D.S.; FONSECA, A.H. Detecção do grau de umidade adequada em coprocultura com fezes normais de caprinos. *Jornal Brasileiro de Patologia*, v. 37, n. 4, p. 205, 2001.
- GORDON, H. McL.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of Commonwealth Science Industry Organization*, v. 12, n. 1, p. 50-52, 1939.
- 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.
- ORNELAS, E.I.; PIMENTEL NETO, M.; CASTRO, A.A.; GUEDES Jr., D.S.; MADUREIRA, R.C. Determinação de umidade em coprocultura utilizando-se fezes normais de bovinos. *Jornal Brasileiro de Patologia*, v. 37, n. 4, p. 205, 2001.

- RAMOS, C.I.; BELLATO, V.; SOUZA, A.P.; ÁVILA, V.S.; COUTINHO, G.C.; DALAGNOL, C.A. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. *Ciência Rural*, v. 34, n. 6, p. 1889-1895, 2004.
- ROBERTS, F.H.S.; O'SULIVAN, J.P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Agricultural Records*, v. 1, n. 2, p. 99-102, 1950.
- SARTOR, A.A.; BASCO, G.C.; SOUZA, A.P.; BELLATO, V. Parasitologia Animal, Assistência Técnica e Diagnóstico de Rotina. In: ENCONTRO DE EXTENSÃO, 2005, Florianópolis, SC. *Anais...*, Florianópolis: UDESC, 2005. CD-ROM.
- UENO, H.; GONÇALVES, P.C. *Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes*. 4. ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1998. 143 p.

Recebido em 06 de março de 2006.

Aceito para publicação em 28 de setembro de 2006.