



Método para Avaliar, sob Condições Controladas, a Contaminação de Forrageiras por Larvas de Nematoides Gastrointestinais de Pequenos Ruminantes

Hévila Oliveira Salles¹
Antônio César Rocha Cavalcante¹
Nicholas Farias Lopes do Vale²
Ana Carolina Linhares Braga³
Fernando Lisboa Guedes¹
Luiz da Silva Vieira¹

Introdução

A verminose é o principal problema sanitário da criação de pequenos ruminantes, causando sérios prejuízos devido à redução da produtividade do rebanho e mortalidade, principalmente entre animais jovens. Existem várias espécies de helmintos gastrointestinais, porém em regiões com clima tropical e subtropical, duas espécies são predominantes: *Trichostrongylus colubriformis* e *Haemonchus contortus*, esta última, a espécie de parasita mais patogênica para pequenos ruminantes (AMARANTE et al., 2004; ROCHA et al., 2008).

O ciclo biológico dos nematoides trichostrongilídeos é direto, com uma fase de vida livre que ocorre no meio ambiente e uma fase de vida parasitária que se desenvolve no animal. O ciclo inicia-se com a eliminação de ovos não embrionados nas fezes. No meio ambiente, os ovos tornam-se embrionados, as larvas de primeiro estágio (L1) eclodem, sofrem duas mudas e evoluem para larvas de terceiro estágio (L3), também conhecidas como larvas infectantes. As L3 possuem cutícula

dupla. O período desde a eliminação dos ovos até L3 varia consideravelmente entre espécies (5 a 10 dias), dependendo das condições climáticas, principalmente umidade e temperatura. As L3 migram do bolo fecal para a pastagem, em que são ingeridas de forma passiva pelos animais, juntamente com a forragem, iniciando-se a fase parasitária (SEQUEIRA; AMARANTE, 2001; TAYLOR et al., 2007).

A pastagem contaminada com as formas infectantes constitui a principal fonte de infecção para os animais, pois há uma relação direta entre o número de L3 na pastagem e a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) eliminada pelos animais infectados (PEGORARO et al., 2008). Esse cenário se agrava ainda mais na produção moderna, seja pela criação em áreas reduzidas, com pastoreio em lotação contínua, seja pela utilização de altas taxas de lotação. Dessa forma, com a exploração intensiva das áreas de pastagem e a superlotação dos piquetes, ocorre um pastejo menos seletivo, diminuindo as áreas de rejeição ao redor das fezes, o que, em tese, levaria à maior ingestão de larvas infectantes.

¹Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos.

²Aluno do Curso de Biologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú, Bolsista Embrapa.

³Aluna do Curso de graduação em Farmácia do Instituto Superior de Teologia Aplicada, Bolsista PIBIC/CNPq/Embrapa.

A sobrevivência das larvas eclodidas de ovos depositados com as fezes no ambiente é garantida quando a pastagem apresenta suficiente cobertura vegetal de forma a propiciar um microclima com elevado teor de umidade e proteção contra radiação solar intensa. Isso diminui a mortalidade de formas larvais livres que contaminam a forragem (CUNHA et al., 1997). Essa migração, das fezes para a forragem, realizada pelas larvas infectantes que sobreviveram às condições inadequadas de ambiente (seco e alta radiação), aumenta quando as condições ambientais tornam-se mais propícias aos parasitos, principalmente em função do maior teor de umidade no período de chuvas (CUNHA et al., 1997).

Almeida et al. (2005) verificaram nos bolos fecais de caprinos e ovinos a sobrevivência de larvas nas fezes de até 105 e 77 dias, respectivamente, após a contaminação da pastagem, na época seca na baixada fluminense, RJ. Os mesmos autores observaram, ainda, que sob as condições do período seco, a sobrevivência das larvas no interior do bolo fecal pode ser bastante longa, o que não garante o controle das nematodioses gastrintestinais em condições de rotação de pastagens.

Estudos têm demonstrado que animais em diferentes tipos de pastagens não apresentam os mesmos níveis de infecção por helmintos gastrintestinais. Pegoraro et al. (2008) verificaram maior recuperação de larvas nos estratos inferiores da forragem. Alguns criadores têm utilizado como alternativa, na criação de ovinos, forrageiras de hábito de crescimento ereto e de porte médio, como por exemplo, espécies pertencentes ao gênero *Panicum*. Supõe-se que isso resulte em diminuição da ingestão de larvas infectantes, devido à maior dificuldade na migração das larvas para as partes das forrageiras consumidas pelos animais (MARTIN NIETO et al., 2003).

Observa-se, então, que o controle eficaz de helmintos gastrintestinais está intrinsecamente ligado à dinâmica populacional dos parasitas dentro e fora do hospedeiro. Porém, como mais de 95% da população parasitária encontra-se nas pastagens (DAVID et al., 2007), o controle do parasita no ambiente torna-se uma excelente estratégia para a quebra do ciclo de vida desses organismos.

Dessa forma, vê-se a necessidade de se identificar o comportamento das larvas infectantes em diferentes espécies forrageiras. No entanto, as metodologias disponíveis demandam área cultivável e o uso de animais.

Para associar a facilidade e rapidez de execução, sem, contudo, afetar a qualidade dos resultados, a equipe da Embrapa Caprinos e Ovinos reuniu a *expertise* das metodologias da área de parasitologia com as da área de forragicultura e propõe neste documento um método para avaliar a carga parasitária em forrageiras, por meio da simulação das condições de campo em casa de vegetação.

Experimento-base

Metodologia: Para realização do experimento-base, foram utilizadas sementes de capim piatã (*Brachiaria brizantha*). Foram utilizados 20 vasos plásticos com capacidade para 5 kg. Em cada vaso foram semeadas dezesseis sementes, sendo quatro sementes por cova. Como substrato foi utilizado areia e esterco orgânico na proporção 1:2, divididos em dois grupos, substrato autoclavado (n=10), que simulou pasto não contaminado, e substrato não autoclavado (n=10), que simulou pasto já contaminado. A temperatura da casa de vegetação variou entre 28 e 32°C e a irrigação foi programada para manter nos vasos uma lâmina d'água de 3 mm. Para isso foram realizadas quatro irrigações ao longo do dia, às 10h, às 13h, às 15h30min e às 24h, com duração de 3 minutos cada uma. Aos 30 dias da semeadura, foi realizada adubação (0,24 g de ureia e 0,24 g de KCl por vaso), desbaste do número de plantas e poda dessas plantas a uma altura de 20 cm. Decorridos 60 dias da semeadura, os vasos foram contaminados com 50 gramas de fezes maceradas (n=10) e não maceradas (n=10) de animais sabidamente positivos para ovos de nematoides. A deposição das fezes simulou o pastoreio de animais contaminados na área e a maceração o pisoteio dos animais em áreas com alta carga animal. As larvas foram recuperadas das plantas 30 dias após a contaminação, utilizando o método de Baermann. Através desse método se determina a quantidade de L3/grama de massa seca de forragem.

Resultados: Observou-se maior contaminação do capim (número de L3/massa seca vegetal) quando

foi utilizado substrato não autoclavado e fezes maceradas ($15,89 \pm 3,01$) *versus* os demais tratamentos: substrato autoclavado/fezes maceradas ($5,02 \pm 3,11$), substrato não autoclavado/fezes não maceradas ($4,24 \pm 1,89$), e substrato autoclavado/fezes não macerados ($2,30 \pm 1,29$), $P < 0,05$, teste t de Student. A eficiência da metodologia utilizada foi constatada ao se observar que os resultados reproduziram o que se observa no campo: solos contaminados previamente (substrato não autoclavado) e o pisoteio animal (fezes maceradas) favorecem a contaminação da pastagem.

Materiais

- Vasos plásticos de tamanho médio, capacidade aproximada de 5 kg (Figura 1);
- Substrato de areia e esterco orgânico na proporção 1:2;
- Sementes de forrageiras;
- Fezes contaminadas por ovos de nematoides gastrintestinais;
- Casa de vegetação ou ambiente similar;
- Tesoura de poda;
- Cálices com volume de 100 mL;
- Funil com diâmetro de 15 cm;
- Sifão;
- Provetas de 2 litros;
- Peneiras com diâmetros de 7 cm e de 15 cm;
- Bandejas ou baldes com capacidade para 2,5 litros;
- Microscópio e estereomicroscópio;
- Tubos graduados de 15 mL;
- Pipetas Paster de 3 mL;
- Lâminas e lamínulas;
- Solução de lugol (iodo sublimado 1 g; iodeto de

potássio 2 g; água destilada q.s.p. 300 mL);

- Recipientes de alumínio;
- Balança de precisão (0,000 g);
- Sabão neutro (Extran® MA 02 Neutro);
- Lenços de papel faciais folha dupla;
- Pipeta automática de 20 mL;
- Estufa com ventilação forçada.



Figura 1. Vasos plásticos contendo forrageira cultivada em casa de vegetação.

Etapas

1) Plantio e desenvolvimento das forrageiras

Cada forrageira apresenta suas particularidades quanto às necessidades para germinação e desenvolvimento. Algumas necessitam da quebra de dormência para germinar, outras o plantio é direto. Essas particularidades precisam ser previamente identificadas ou avaliadas. Caso seja objetivo simular um solo livre de nematoides ou de qualquer outro patógeno, recomenda-se autoclavar o substrato antes do plantio (120°C/20 min).

2) Contaminação do solo

É necessário previamente selecionar animais doadores de fezes contaminadas. A primeira etapa da seleção dos animais parasitados pode ser realizada pelo método Famacha® (BATH; VANWYK,

2001; VIEIRA et al., 2009), mas necessita ser confirmada pela contagem de ovos por grama (OPG) de fezes, utilizando a técnica de Gordon e Whitlock, modificada, descrita por Ueno e Gonçalves (1998). Identificar como animais doadores os que apresentarem alto grau de infecção (> 3.000 OPG de fezes). É aconselhado, também, determinar os gêneros de nematoides predominantes nas fezes. A identificação é realizada através da avaliação morfológica das larvas infectantes obtidas por coprocultura (UENO; GONÇALVES, 1998).

Selecionados os animais doadores, as fezes devem ser obtidas em quantidade suficiente para o número de vasos a serem contaminados. Preconiza-se 50 g de fezes contaminadas por vaso. A contaminação do solo deve ser realizada de tal forma que no dia da coleta da parte aérea da forrageira, ela esteja a uma altura mínima de 30 cm. Caso objetive simular uma baixa carga animal na pastagem, depositar as fezes no solo na forma de *pellets* (Figura 2A). Caso deseje simular uma alta carga animal na pastagem, macerar os *pellets* antes de depositá-los nos vasos (Figura 2B). As fezes, maceradas ou não, devem ser depositadas no solo, ao redor do caule da forragem avaliada.



Figura 2. Contaminação do solo. **A:** Fezes na forma de *pellets*; **B:** Fezes com *pellets* macerados.

3) Coleta da parte aérea das forrageiras, recuperação das larvas infectantes na forragem e determinação da massa seca (Método de Baermann)

Com o auxílio de uma tesoura de poda, realizar o corte da parte aérea rente ao solo e transferir a massa verde da forrageira de cada vaso para bandejas ou baldes individuais, com capacidade para 2,5 litros (Figuras 3A e 3B).



Figura 3. A: Corte da forrageira; **B:** Coleta da parte aérea em bandejas.

No laboratório, adicionar na bandeja, ou balde, 2 litros de uma solução de sabão neutro (2 litros de água contendo 0,25 mL de sabão Extran® neutro). A amostra de forragem deverá permanecer nessa solução por quatro horas (Figura 4A).

Decorridas as quatro horas, transferir a solução de sabão para uma proveta de 2 litros, com a ajuda de um funil e uma peneira, ambos com 15 cm de diâmetro (Figura 4B). Em seguida, adicionar nova solução de sabão (2 litros) à amostra de forragem na bandeja ou balde, permanecendo por mais três horas.

Depois de transferida a solução de sabão para nova proveta de 2 litros, transferir a amostra de forragem para recipiente de alumínio, previamente pesado



Figura 4. A: Adição de solução de sabão neutro às bandejas contendo as amostras de forragem; **B:** Transferência da solução de sabão para proveta.

(Figura 5A). Colocar o recipiente em estufa com ventilação forçada à 65°C, por 72 horas (Figura 5B). Ao término do período, pesar o recipiente e, por diferença, determinar em gramas a massa seca da amostra.



Figura 5. A: Transferência da massa verde de forrageira para recipiente de alumínio; **B:** Amostra de massa verde em estufa de ventilação forçada.

Após 24 horas de repouso da solução de sabão nas provetas (duas por amostra de forragem), com a ajuda de um sifão, retirar o sobrenadante da solução contida nas provetas (Figura 6A) e reunir os precipitados das duas provetas da mesma amostra em nova proveta de menor volume (100 ou 250 mL).

Após 24 horas de repouso, retirar o sobrenadante com a ajuda de um sifão e transferir o precipitado para um cálice cônico, contendo sobre ele uma peneira e dentro dessa, um lenço de papel facial folha dupla. Lembrar que o fundo da peneira deve estar mergulhado na solução de sabão transferida para o cálice, permitindo o transporte das larvas através do papel e seu depósito no fundo do cálice. Deixar 12 horas em repouso para que ocorra esse transporte das larvas e seu depósito no fundo do cálice (Figura 6B).

Após as 12 horas, sifonar o sobrenadante do cálice e transferir o precipitado para tubo cônico graduado, com capacidade de 15 mL. Identificá-lo com o número da amostra e mantê-lo sob refrigeração (8°C) até a contagem do número de larvas.



Figura 6. A: Proveta com sifão; **B:** Cálices de vidro.

4) Contagem do número de larvas.

Ajustar o volume nos tubos para 2 mL. Homogeneizar e retirar dez alíquotas de 20 mL. Adicionar solução de lugol (20 mL) em cada gota e contar o número de larvas por gota com auxílio de estereomicroscópio. Determinar a média de larvas por gota de 20 mL. Multiplicar esse resultado por 100 para se obter a quantidade de larvas total em 2 mL. Dividir esse resultado pela massa seca obtida (g). O valor obtido será a concentração de larvas infectantes por g de massa seca (L3/grama de massa seca de forragem).

Vantagens e perspectivas de utilização da metodologia

- Gerar informações sobre forrageiras a serem cultivadas em áreas de pastejo de pequenos ruminantes, quanto à capacidade de retenção de larvas infectantes;
- Para avaliar a dinâmica de migração das L3 em diferentes épocas do ano, ou mesmo, se a espécie forrageira possui uma estrutura que contribui para a migração das larvas. Desta maneira, pode-se verificar a diferença ou não no número de L3 recuperadas nos diferentes estratos da planta, realizando o corte em estratos de 10 cm (0 a 10, 11 a 20 e 21 a 30 cm).
- Reduzir custos na avaliação de forragens, uma vez que evita o uso de grandes áreas cultiváveis e de animais para pastejo;
- Avaliar técnicas de manejo de forrageiras, condições ambientais e de solo que possam reduzir a carga parasitária na pastagem, lembrando que os vasos poderiam ficar expostos à luz solar direta, em ambiente naturalmente ventilado, uma vez que os raios solares e o vento são fatores importantes na dessecação e morte natural das larvas no campo.

Agradecimentos

Ao CNPq e à Embrapa pelas bolsas de iniciação científica, e ao Banco do Nordeste (ETENE-FUNDECI) pelo suporte financeiro da pesquisa.

Referências

- ALMEIDA, L. R. de; CASTRO, A. A. de; SILVA, F. J. M. da; FONSECA, A. H. da. Desenvolvimento, sobrevivência e distribuição de larvas infectantes de nematoides gastrintestinais de ruminantes na estação seca da Baixada Fluminense, RJ. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 3, p. 89-94, 2005. Disponível por: <http://www.cbpv.org.br/rbpv/documentos/1432005/c14389_94.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2014.
- AMARANTE, A. F.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 120, n. 1/2, p. 91-106, 2004.
- BATH, G. F.; VAN WYK, J. A. Using the FAMACHA® system on commercial sheep farms in South Africa. In: International Sheep Veterinary Congress, 5., 2001, Cidade do Cabo, África do Sul. **Proceedings...** Cidade do Cabo: University of Pretoria, 2001. v. 1, n. 2.
- CUNHA, E. A. da; SANTOS, L. E. dos; RODA, D. S.; POZZI, C. R.; OTSUK, I. P.; BUENO, M. S.; RODRIGUES, C. F. de C. Efeito do sistema de manejo sobre o comportamento em pastejo, desempenho ponderal e infestação parasitária em ovinos Suffolk. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 3/4, p. 105-111, 1997. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v17n3-4/0910.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2014.
- DAVID, R. O.; ALMEIDA, R. D.; SOUZA, W. A.; MOÇO, H. F.; NEVES, M. F. 2007. Resistência de larvas de helmintos em pastagens de ovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 4, n. 8, jan. 2014. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/cSqNJsEUPYVueaU_2013-5-21-16-58-38.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2014.
- MARTIN NIETO, L.; MARTINS, E. N.; MACEDO, F. de A. F. de; ZUNDT, M. Observações epidemiológicas de helmintos gastrintestinais em ovelhas mestiças manejadas em pastagens com diferentes hábitos de crescimento. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 4, n. 1, p. 45-51, jan./jun. 2003.

SEQUEIRA, T. C. G. de O.; AMARANTE, A. F.T. do. **Parasitologia animal:** animais de produção. Rio de Janeiro: EPUB, 2001. 158 p.

PEGORARO, E. J.; POLI, C. H. E. C.; CARVALHO, P. C. de F.; GOMES, M. J.T. de M.; FISCHER, V. Manejo da pastagem de azevém, contaminação larval no pasto e infecção parasitária em ovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, DF**, v. 43, n.10, p.1397-1403, out. 2008. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/106314/1/Manejo.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2014.

ROCHA, R. A.; BRESCIANI, K. D. S.; BARROS, T. F. M.; FERNANDES, L. H.; SILVA, M. B.; AMARANTE, A. F.T. Sheep and cattle grazing alternately: Nematode parasitism and pasture decontamination. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 75, n. 2/3, p. 135-143, 2008.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Veterinary parasitology**. 3th. ed. Oxford, UK; Ames, Iowa: Blackwell, c2007. 874 p.

UENO, H.; GONCALVES, P.C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4. ed. Toklyo: JICA, 1998. 143 p.

VIEIRA, L. da S.; CHAGAS, A. C. de S.; MOLENTO, M. B. Nematoides gastrintestinais e pulmonares de caprinos. In: CAVALCANTE, A. C. R.; VIEIRA, L. da S.; CHAGAS, A. C. de S.; MOLENTO, M. B. (Ed.). **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos epidemiologia e controle**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2009. Cap. 2. p. 65-94.

Comunicado Técnico, 139 On line



Embrapa Caprinos e Ovinos
Endereço: Estrada Sobral/Groairas, Km 04 - Caixa Postal 145 - CEP: 62010-970 - Sobral-CE
Fone: (0xx88) 3112-7400
Fax: (0xx88) 3112-7455
Home page: www.cnpc.embrapa.br
SAC: <http://www.cnpc.embrapa.br/sac.htm>

1ª edição
 On-line (Jun./2014)
Cadastro Geral de Publicações da Embrapa - CGPE
 N° 11584

Comitê de publicações

Presidente: *Francisco Selmo Fernandes Alves*
Secretária-Executiva: *Juliana Evangelista da Silva Rocha.* **Membros:** Alexandre César Silva Marinho, Alexandre Weick Uchoa Monteiro, Carlos José Mendes Vasconcelos, Maira Vergne Dias, Manoel Everardo Pereira Mendes, Tânia Maria Chaves Campelo, Diones Oliveira Santos, Viviane de Souza (Suplente).

Expediente

Supervisão editorial: *Alexandre César Silva Marinho.* **Revisão de texto:** *Carlos José Mendes Vasconcelos.* **Normalização bibliográfica:** *Tânia Maria Chaves Campelo.* **Editoração eletrônica:** *Comitê de Publicações.* **Fotos:** *Hévila Oliveira Salles*