

METODOLOGIA DE OBTENÇÃO DE CULTURAS PURAS DE LARVAS INFECTANTES DE *Haemonchus* sp. PARA O USO EM TESTES SOBRE O PARASITO

MARMITT, Iuri Vladimir Pioly¹; DÍAS, Marcus Vinícius Godoy¹; DONATO, Bruno Medeiros¹; ARAÚJO, Flávia Biasoli²; NIZOLI, Leandro Quintana³

¹Graduando em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas-UFPel;

²Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas-UFPel;

³Professor adjunto, Departamento de Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas-UFPel;
iurihrs@hotmail.com

INTRODUÇÃO

As enfermidades causadas pelas nematodioses gastrintestinais de ruminantes são consideradas como um dos principais entraves na criação desses animais. Esses prejuízos incluem efeitos diretos que podem facilmente resultar em baixo desempenho de todo o rebanho, e até mesmo mortalidade. Além disso, levam a diminuição no ganho de peso (PLOEGER et al., 1990, PLOEGER & KLOOSTERMAN, 1993), a queda na produção de leite (GROSS et al., 1999) e a redução da fertilidade (OSAER et al., 1999). O não discernimento dos aspectos epidemiológicos dos parasitos, fez com que o uso de anti-helmínticos com amplo espectro de ação fosse utilizado sem a devida cautela. Frente ao descontrole, o uso constante e errôneo desses medicamentos, estabeleceu uma série de conseqüências indesejáveis, como ecotoxicidade, resistência dos parasitas frente às diferentes classes de anti-helmínticos, dentre outras (MOLENTO, 2004). Como exemplo, no Rio Grande do Sul, 90% das propriedades apresentam resistência aos benzimidazóis (ECHEVARRIA et al., 1996). A literatura aponta a predominância do gênero *Haemonchus* sp. na resistência a essa classe, mas também indica a presença de populações resistentes dos gêneros *Trichostrongylus* sp. e *Ostertagia* sp. (CUNHA FILHO et al. 1999). Diversas técnicas estão sendo pesquisadas a fim de diminuir a utilização de drogas, dentre elas, uma grande promissora é o controle biológico utilizando fungos nematófagos (ARAÚJO, 2009).

Por estes motivos, pesquisas que envolvam métodos de controle para as doenças causadas por nematóides (vermes), são de caráter urgente. Atualmente, uma gama de pesquisas busca alternativas quanto ao combate dos endoparasitas, tornando necessária a obtenção de culturas puras dos mesmos, para uso em experimentos. Os nematóides não podem ser desenvolvidos em culturas contínuas desde a oviposição até o estágio adulto, na medida em que possuem duas fases: a fase de vida livre, em que se encontram as formas infectantes (L₃), e a fase parasitária, que é onde se encontra os estágios adultos, que são os alvos dos anti-helmínticos. Entretanto, atualmente, para manutenção do cultivo de nematóides adultos, após o isolamento do hospedeiro, a viabilidade decresce inevitavelmente, complicando a interpretação dos testes de toxicidade de drogas (GEARY et al., 1999)

Este estudo teve como objetivo desenvolver a metodologia para a obtenção de culturas puras de *Haemonchus* sp. para estoque em laboratório com fins didáticos e de pesquisa.

METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Foi realizada uma visita no Frigorífico Agrofal-Fita Azul, situado no município de Canguçu-RS, para a obtenção de estágios adultos de nematóides do gênero *Haemonchus* sp. A partir de 11 cordeiros abatidos, os respectivos abomasos (órgão de eleição do parasito) foram coletados, onde os dois esfíncteres foram amarrados de forma a evitar saída de líquido abomasal ou influxo de conteúdo intestinal, e o abomaso foi separado e acondicionado em embalagens plásticas dentro de caixas isotérmicas e remetidos imediatamente ao Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) da Universidade Federal de Pelotas. No laboratório foi realizada uma incisão na curvatura maior do órgão de eleição, onde se coletou juntamente com o líquido abomasal os vermes encontrados. Foi realizada a identificação de machos e fêmeas com a utilização de uma pinça cirúrgica, sendo que as fêmeas foram incisadas e maceradas com finalidade de retirada dos ovos do útero conforme descrito por Vasconcelos (2006). Adicionou-se ao material 50 gramas de serragem de madeira, esterilizada, com comprovada eficiência na confecção de outras culturas, para promover uma devida aeração, e adição de água destilada, para umedecer a mistura obtida. O material foi levado em copos adaptados para cultura para uma estufa onde permaneceu por dez dias a 27°C e 85% de umidade relativa.

A retirada das larvas infectantes foi realizada preenchendo os copos com água destilada a 40° C para a migração das mesmas por termohidrotropismo para uma placa de petri. Após três horas, o conteúdo encontrado nesta placa, foi retirado com o auxílio de uma pipeta, sendo posteriormente colocado em tubos de ensaio de 5 mL, identificados segundo UENO & GONÇALVES (1998), e acondicionados em refrigerador.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cultura pura produziu larvas infectantes (L₃) de nematódeos em quantidade abundante, demonstrando eficiência na técnica quanto ao seu rendimento.

A amostra obteve 100% de pureza do gênero *Haemonchus* sp., não sendo encontrados outros gêneros de parasitas, o que demonstra que a identificação das fêmeas para cultura foi realizada com sucesso. Se alguma larva de outro gênero, por ventura, fosse introduzida na cultura, a leitura do material revelaria larvas de outro nematóide.

As larvas produzidas possuem alta viabilidade para infecção, encontrando-se integras e ativas ao ser retiradas da refrigeração e expostas a luz do microscópio.

CONCLUSÃO

Com boa viabilidade de larvas na cultura, testes experimentais podem ser feitos, visando buscar dados sobre a epidemiologia e ecologia destes parasitos, buscando elucidar fatores como maior patogenicidade e resistência contra as drogas anti-helmínticas

A necessidade de estudos e conhecimento sobre as mudanças na biologia dos parasitos, no caso em específico sobre a resistência às drogas anti-helmínticas, se torna a cada dia mais necessária.

Para evitar prejuízos futuros na pecuária, estes estudos novos sobre as características peculiares do parasito na região tornam-se essenciais. Sendo

necessário o uso contínuo de metodologias como esta, com culturas puras do parasito presente nos animais da região para possibilitar sequencia de estudos e infestações experimentais visando um auxílio no desenvolvimento de técnicas de controle dos parasitos.

Pelos resultados obtidos, conclui-se que o protocolo utilizado para a obtenção de culturas puras de *Haemonchus* sp. foi eficaz e que sua realização não oferece dificuldades, sendo extremamente viável e útil para pesquisas e estudos.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO; Flávia Biasoli. **Controle de nematóides gastrintestinais de ovinos com o uso do Fungo nematófago *Duddingtonia flagrans***. 2009. Tese de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CUNHA FILHO, L.C.F; YAMAMURA, M.H., PEREIRA, A.B.L. Resistência a anti-helmínticos na Região de Londrina. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 1999. Salvador, BA. **Anais...**Salvador: CBPV, 1999. p. 153.

ECHEVARRIA, F.;BORBA M. F. S.,; PINHEIRO A. C.; WALTER P. J; HANSEN J. W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brasil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, The Netherlands, v. 62, p.199-206, 1996.

GEARY, T. G., SANGSTER, N. C., THOMPSON, D. P. Frontier in anthelmintic pharmacology. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 275-295, 1999.

GROSS, S. J., RYAN, W. G., PLOEGER, H. W. Anthelmintic treatment of dairy cows and its effect on milk production. **The Veterinary Record**, v.144, p.581-587, 1999.

MOLENTO, M. B. Multidrug resistance in *Haemonchus contortus* associated with suppressive treatment and rapid drug alternation. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, p. 272, 2004.

OSAER, S., GOOSSENS, B., EYSKER, M., GEERTS, S. The effects of prophylactic anthelmintic treatment on the productivity of traditionally managed Djallonke sheep and West African Dwarf goats kept under high trypanosomosis risk. **Acta Tropica**, 1999.

PLOEGER, H. W., KLOOSTERMAN, A. BARGEMAN, G., WIJCKHUISE, L. V., BRINK, R. V. D. Milk yield increase after anthelmintic treatment of dairy cattle related to some parameters estimating worm infections. **Veterinary Parasitology**, v.35, p.103-106, 1990.

PLOEGER, H. W., KLOOSTERMAN, A. Gastrointestinal nematode infections and weight gain in dairy replacement stock: first-year calves. **Veterinary Parasitology**, v.46, p.223-241, 1993.

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

1998. 143p.

VASCONCELOS, Ana Lourdes Camurça Fernandes. **Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Croton Zehntneri* sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos.** 2006. Tese de doutorado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ce.