

## **DESENVOLVIMENTO DE OVOS DE CIATOSTOMÍNEOS (Nematoda-Cyathostominae) EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

(Development of cyathostomin eggs (Nematoda-Cyathostominae) in different temperatures)

**Luciene Soares de SOUZA<sup>1\*</sup>; Claudia Navarro dos SANTOS<sup>1</sup>; Simone QUINELATO<sup>1</sup>; Bruno dos Santos RIBEIRO<sup>2</sup>; Alisson Rodrigues JORDÃO<sup>3</sup>; Jairo Pinheiro da SILVA<sup>4</sup> & Maria de Lurdes de Azevedo RODRIGUES<sup>5</sup>**

1. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) / Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias; 2. UFRRJ / Graduação em Medicina Veterinária; 3. Universidade Estadual do Norte Fluminense / Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal; 4. UFRRJ / Departamento de Ciências Fisiológicas; 5. UFRRJ / Departamento de Parasitologia Animal.

### **RESUMO**

Os ciatostomíneos (Cyathostominae) são os nematóides mais abundantes no intestino grosso dos equinos e os ovos eliminados nas fezes podem chegar a  $12 \times 10^6$  ovos/dia se o número de ovos por grama de fezes (OPG) for igual a 1000. Variáveis ambientais como temperatura, pluviosidade e umidade influenciam no desenvolvimento e sobrevivência de ovos e de larvas nas fezes e pastagem. O efeito da temperatura sobre o desenvolvimento de ovos dos ciatostomíneos e o tempo de armazenamento são pouco estudados. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito das temperaturas de  $\pm 10^\circ\text{C}$  e  $-4^\circ\text{C}$  sobre as diferentes fases dos ovos. Fezes de equinos foram coletadas, divididas em seis amostras de aproximadamente 1kg, sendo três amostras mantidas a  $\pm 10^\circ\text{C}$  e três a  $-4^\circ\text{C}$ . Durante 18 meses, alíquotas de 4g de fezes foram retiradas semanalmente, de cada temperatura respectiva, para recuperação de ovos que foram mantidos em placas de Petri com água por 24h para observação e contagem das fases de desenvolvimento e contagem dos ovos viáveis e inviáveis e/ou inférteis. Sob a temperatura de  $\pm 10^\circ\text{C}$ , 75% dos ovos encontravam-se na fase de mórula e 20% em gástrula; a  $-4^\circ\text{C}$ , 90% em mórula e 10% em gástrula. Houve diferença significativa no número de ovos em mórula, gástrula e para o OPG entre as temperaturas. Os ovos resistiram a  $-4^\circ\text{C}$ , desenvolveram-se até a fase seguinte e o tempo até ovo larvado foi maior que 24h a  $\pm 25^\circ\text{C}$ . Mais estudos estão em andamento a fim de esclarecer vários aspectos do efeito da temperatura sobre ovos de ciatostomíneos estocados.

Palavras-chave: ciatostomíneos, ovos, temperatura, armazenamento, equinos.

### **ABSTRACT**

The cyathostomin (Cyathostominae) are the most abundant nematodes in the large intestine of horses. A number of eggs per gram of faeces (EPG) equal to 1000 represents a pasture contamination with eggs per  $12 \times 10^6$  day. The environmental variables as temperature, rainfall and humidity influence the development and survival of eggs and larvae in the faeces and pasture. Studies about the storage and the effect of temperature on the development are scarce. The aim of this study was to evaluate the effect of temperatures  $\pm 10^\circ\text{C}$  and  $-4^\circ\text{C}$  on the development of cyathostomin eggs. Feces collected

---

Correspondência: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Instituto de Veterinária  
Departamento de Parasitologia Animal. Br 465, Km 7.  
CEP: 23890-000. Seropédica. Rio de Janeiro.  
Email: [luzootecrural@yahoo.com.br](mailto:luzootecrural@yahoo.com.br) / [lurdesar@ufrj.br](mailto:lurdesar@ufrj.br)

from horses were divided into six samples of 1kg, three stored at  $\pm 10^{\circ}\text{C}$  and three stored at  $-4^{\circ}\text{C}$ . Each seven days a sample of 4g was evaluated for counting and observation of the egg stage for a period of 18 months. At  $\pm 10^{\circ}\text{C}$  temperature, 75% of eggs were at the morula stage and 20% gastrula; at  $-4^{\circ}\text{C}$ , 90% were at the morula stage and 10% in gastrula. There were significant differences in the number of eggs in morula, gastrula and the OPG between the temperatures evaluated. Eggs stored at  $\pm 10^{\circ}\text{C}$  and  $-4^{\circ}\text{C}$  remained viable during 18 months, indicating that resistance to freezing temperature. More studies are in process to know many questions about it.

Key words: cyathostomin, eggs, temperature, storage, horses.

## INTRODUÇÃO

Os ciatostomíneos (Nematoda-Cyathostominae) são os nematóides mais abundantes no intestino grosso de equinos (Ogbourne, 1976) e com um número de ovos por grama de fezes (OPG) igual a 1000, a contaminação da pastagem pode ser de  $12 \times 10^6$  ovos por dia (Reinecke, 1983).

As condições climáticas de cada região afetam o desenvolvimento e a sobrevivência de fases pré-parasíticas dos ciatostomíneos (Couto et al. 2008; 2009; Quinelato et al. 2008; Rodrigues et al. 2008), atuando diretamente sobre a carga parasitária. A temperatura é a variável climática que mais influencia o desenvolvimento dos ovos de diferentes espécies de estrongilídeos até a eclosão das larvas (Salih, 1981), sendo a faixa de  $25-33^{\circ}\text{C}$  considerada ótima para o desenvolvimento (Ogbourne, 1972; Rupashinge & Ogbourne, 1978; Mfifilodze & Hutchinson, 1987).

No ciclo biológico, o desenvolvimento de ovo até o estágio de larva infectante ( $L_3$ ) ocorre no ambiente e o equino infecta-se ao ingerir a  $L_3$  na pastagem (Ogbourne, 1978); na mucosa do intestino grosso ocorre fase histotrófica, as  $L_4$  emergem e na luz intestinal dá-se o desenvolvimento até a fase adulta (Ogbourne, 1978).

Diversos estudos sobre a avaliação e comparação entre técnicas para contagem de ovos vêm sendo realizados, porém pouca

informação vem sendo adicionada aos fatores pré-analíticos como coleta e estocagem de amostras fecais antes da análise (Rodrigues et al. 1997; Cringoli et al. 2004). O conhecimento sobre procedimentos de coleta e estoque de amostras fecais é de extrema importância para o veterinário a campo e para cientistas que investigam resistência anti-helmíntica. Fezes estocadas sob várias condições e de diferentes regiões foram avaliadas por Nielsen et al. (2010), levando a conclusão que as fezes podem ser estocadas por até 120h e que a refrigeração é o melhor método para armazenamento. Segundo Salih (1981), os ovos mantidos por longos períodos sob congelamento têm o desenvolvimento até o estágio larval significativamente prejudicado.

Ovos de ciatostomíneos são muito resistentes aos extremos de temperatura antes de estarem embrionados, e quando embrionados tem a sua resistência reduzida e podem morrer rapidamente (Parnell, 1936; Lucker, 1941). Ovos de *Ostertagia circumcincta* foram avaliados em água destilada a 4, 16, 25 e  $35^{\circ}\text{C}$  e a taxa de eclodibilidade das  $L_1$  aumentou com a elevação da temperatura, e os ovos mantidos a  $4^{\circ}\text{C}$  apresentaram alta sobrevivência durante a primeira semana, diminuindo para 10% após 22 dias de estoque. (Pandey et al. 1989; 1993). No entanto, ovos de *Trichostrongylus retortaeformis* permaneceram viáveis por até oito meses quando estocados de 10 a  $28^{\circ}\text{C}$  e por quatro meses à temperatura de  $8^{\circ}\text{C}$  (Nnochiri, 1950). Este é o

primeiro estudo com o objetivo de avaliar o desenvolvimento de ovos de ciatostomíneos (Nematoda-Cyathostominae) sob a temperatura de  $\pm 10^{\circ}\text{C}$  (refrigeração) e  $-4^{\circ}\text{C}$  (congelamento).

## METODOLOGIA

### *Local*

O estudo foi realizado no Laboratório de Helminologia da Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz, do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no período de outubro de 2004 a março de 2006.

### *Delineamento experimental*

Massas fecais foram coletadas diretamente do reto de oito equinos não vermifugados e naturalmente infectados com nematóides ciatostomíneos. Um pool de fezes foi homogeneizado, sendo retirada uma alíquota de quatro gramas para a avaliação do OPG (Gordon & Whitlock, 1939) com a finalidade de estimar a carga parasitária dos animais utilizados e realização de coprocultura (Roberts & O'Sullivan, 1950) para confirmar o diagnóstico de ciatostomíneos, através da morfologia das larvas infectantes. Para a recuperação de ovos visando avaliar e contar as diferentes fases de desenvolvimento, nas primeiras 24h, utilizou-se a técnica de Rodrigues & Honer (1985). Com o objetivo de avaliar o efeito da temperatura sobre o desenvolvimento dos ovos, seis amostras de 1kg cada foram individualizadas em sacos plásticos, mantendo condições anaeróbicas, sendo três mantidas sob condições de refrigeração ( $\pm 10^{\circ}\text{C}$ ) e identificadas como 1a, e as outras três mantidas sob congelamento ( $-4^{\circ}\text{C}$ ) e nomeadas como 1b. Semanalmente, uma alíquota de quatro gramas da amostra 1a e da 1b foi processada para contagem do OPG e recuperação dos ovos ( $\pm 300$  ovos) que foram mantidos em

placas de Petri à temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) para a observação das diferentes fases: mórula, gástrula, girino e ovo larvado ao microscópio óptico, após o período de 24h. A avaliação do OPG foi realizada semanalmente, a fim de observarmos se a temperatura e o tempo de armazenamento seriam fatores que interfeririam na presença de ovos nas amostras processadas. Os ovos inférteis e/ou inviáveis foram considerados aqueles que não apresentavam conteúdo celular e/ou deformidades. Os resultados foram tabelados no *software* Excel e utilizou-se o teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ) em função da indicação dos dados não-paramétricos, obtidos pelo resultado do teste de Kolmogorov Smirnov, no programa GraphPad versão 3.00, a fim de comparar os valores médios obtidos para as diferentes fases de desenvolvimento dos ovos e temperaturas, durante os 18 meses do estudo.

## RESULTADOS

Observou-se diferença significativa no desenvolvimento dos ovos nas fases de mórula, gástrula e para o OPG entre os ambientes térmicos, destacando o percentual de 88% na fase de mórula a  $-4^{\circ}\text{C}$  (Tabela 1), sendo esta a fase inicial, seguida de gástrula. Na temperatura de  $\pm 10^{\circ}\text{C}$  foi observado menor percentual de mórula (76,5%), quando comparado com de  $-4^{\circ}\text{C}$  (88,22%), porque na geladeira o desenvolvimento para a fase seguinte (gástrula) foi maior. Os valores de ovos na fase de mórula oscilaram de 60 a 100% em ambas as amostras de fezes armazenadas. Para gástrula essa variação foi de 10 a 35% na massa refrigerada ( $\pm 10^{\circ}\text{C}$ ) e de 5 a 25% para a massa congelada ( $-4^{\circ}\text{C}$ ) (Figuras 1 e 2). O OPG se manteve em 1000 por três meses na massa fecal mantida a  $\pm 10^{\circ}\text{C}$  e por até dois meses na massa a  $-4^{\circ}\text{C}$  (Figura 3). Todas as larvas obtidas, da coprocultura, foram de ciatostomíneos.

**Tabela 1:** Influência do tempo de armazenamento e da temperatura de  $\pm 10^{\circ}\text{C}$  (refrigeração) e de  $-4^{\circ}\text{C}$  (congelamento) sobre as fases de desenvolvimento dos ovos em mórula, gástrula e ovo larvado; na presença de ovos inviáveis e/ou inférteis e quanto ao OPG no período de 18 meses (Setembro/04 a Março/06) de armazenamento.

Fases de desenvolvimento dos ovos de ciatostomíneos	$\pm 10^{\circ}\text{C}$ ( $X^* \pm EP^{**}$ )	$-4^{\circ}\text{C}$ ( $X^* \pm EP^{**}$ )
mórula	76,5 $\pm$ 2,35 <sup>a</sup>	88,22 $\pm$ 2,28 <sup>b</sup>
gástrula	18,44 $\pm$ 2,67 <sup>a</sup>	9,44 $\pm$ 1,63 <sup>b</sup>
ovo larvado	0,94 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>	0,89 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>
ovo inviável e/ou infértil	5,22 $\pm$ 1,51 <sup>a</sup>	4,28 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>
OPG	315,22 $\pm$ 114,82 <sup>a</sup>	584,11 $\pm$ 44,03 <sup>b</sup>

\*Médias; \*\*Erro Padrão; Médias na mesma linha seguidas por letras distintas (a e b) diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

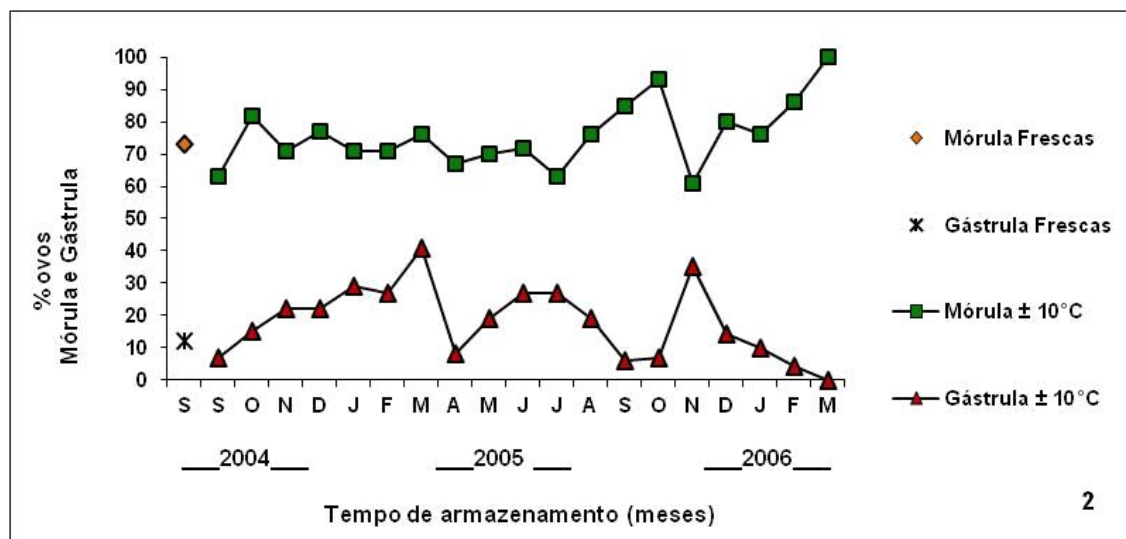
### OPG

Na massa fecal mantida a  $\pm 10^{\circ}\text{C}$  (refrigerada) observou-se menor valor de OPG em relação ao apresentado na massa armazenada a  $-4^{\circ}\text{C}$  (congelada), que pode ser justificado, pela visualização macroscópica da grande presença de fungos na massa refrigerada (Figura 3). Fungos se desenvolvem em fezes de diferentes animais e podem destruir ovos e larvas (Santos et al. 2001; Braga et al. 2009a; 2009b), entretanto neste estudo não se identificou a espécie de fungo. Além disso, o OPG pode variar em função

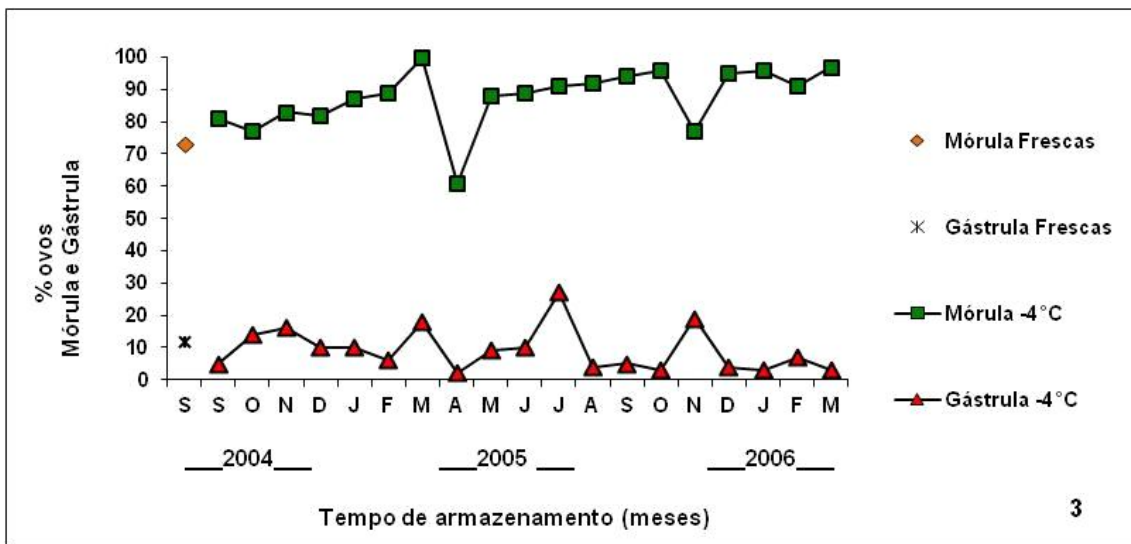
da amostra de fezes, porque a distribuição de ovos nas fezes não apresenta um padrão de normalidade e a redução nos valores do OPG (Figura 4), foi decorrente do tempo de estoque, o que também foi observado por Van Wyk & Van Wyk (2002) e Nielsen et al. (2010).

### Desenvolvimento de ovos

O efeito da variação da temperatura sobre o desenvolvimento dos nematoides é um dado importante para o melhor conhecimento do seu ciclo (Dobson & Carper, 1992), sendo a temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$  a mais próxima do ideal, e



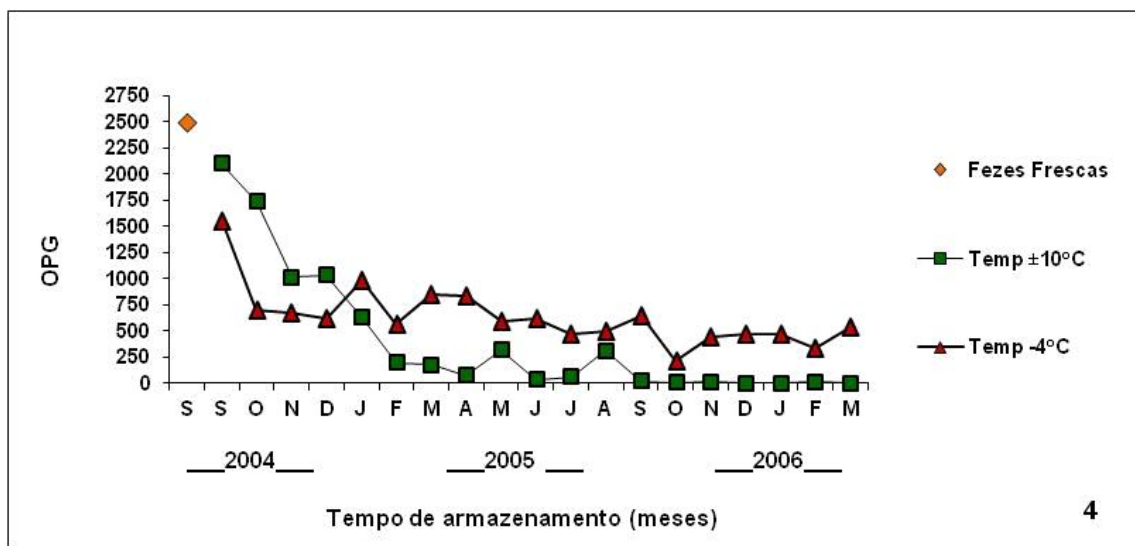
**Figura 1:** Influência do tempo de armazenamento e da temperatura de  $\pm 10^{\circ}\text{C}$  (refrigeração) sobre as fases de desenvolvimento dos ovos em mórula e gástrula, no período de 18 meses (setembro/2004 a março/2006).



**Figura 2:** Influência do tempo de armazenamento e da temperatura de -4°C (congelamento) sobre as fases de desenvolvimento dos ovos em mórula e gástrula, no período de 18 meses (setembro/2004 a março/2006).

com 40°C ocorre morte rápida dos ovos. Segundo Young et al. (1980) a variação brusca da temperatura influenciou no tempo de desenvolvimento dos ovos de *Ostertagia circumcincta* até estágio larval. Observou-se percentual reduzido de ovos na fase de girino, provavelmente por ser uma fase curta. Após a recuperação dos ovos verificou-se ao microscópio óptico (40x) que aproximadamente

80% do total de ovos contidos em placa de Petri estavam na fase de mórula (inicial). Algumas horas, após a eliminação dos ovos em estágio de mórula nas fezes, o desenvolvimento continua para a fase de gástrula e em seguida girino, fase muito rápida e ovo larvado, culminando com a eclosão da larva no tempo aproximado de 24h; o desenvolvimento da maioria dos nematoides da super família Strongyloidea ocorre desta forma



**Figura 3:** Variação do OPG mensal, em virtude do tempo de armazenamento e ação da temperatura de ±10°C (refrigeração) e -4°C (congelamento), no período de 18 meses (setembro/2004 a março/2006).

(Bird, 1971; Bowman, 2006). Segundo Nielsen et al. (2007), os ovos não-embrionados são definidos como ovos que não contém larvas viáveis ao contrário dos ovos embrionados. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para ovos inviáveis e/ou inférteis e para ovos larvados mantidos a  $\pm 10^{\circ}\text{C}$  e  $-4^{\circ}\text{C}$ . O efeito da temperatura sobre ovos de ciatostomíneos e o conhecimento das diferentes fases de desenvolvimento vem sendo pouco estudados e assim comparou-se com nematóides que apresentam fases de desenvolvimento semelhantes (Pandey et al. 1989; 1993). Nas temperaturas estudadas o desenvolvimento dos ovos foi mais lento, porém ocorreu desenvolvimento, sendo diferenciado entre os ambientes térmicos para uma mesma fase, demonstrando que os ovos resistiram a baixas temperaturas. Concluiu-se que, a massa fecal pode ficar armazenada por até 90 dias sob  $\pm 10^{\circ}\text{C}$  e até dois meses sob  $-4^{\circ}\text{C}$  para fins de diagnóstico, uma vez que os ovos dos ciatostomíneos sobreviveram à refrigeração e congelação.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, às agências de fomento: CAPES e CNPq.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEVILAQUA, C.M.L.; RODRIGUES, M.L.A.; CONCORDET, D. Identification on infective larvae of some common strongyles of horses. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v. 44, n. 12, p. 989–995, 1993.

BIRD, A.F. 1971. The structure of Nematodes. New York : Academic press Inc., 1971. 318p.

BOWNAM, D.D. Parasitologia Veterinária de Georgis. São Paulo:Manole, 2006. 422p.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; CARVALHO, R.O.; ARAÚJO, J.M.; SILVA, A.R.; CAMPOS,

A.K. Controle *in vitro* de larvas infectantes de ciatostomíneos (Nematoda: Cyathostominae) de eqüinos utilizando os fungos predadores *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrobotrys robusta*. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n. 3, p. 887-892. 2009a.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; SILVA, A.R.; ARAÚJO, J.M.; CARVALHO, R.O.; TAVELA, A.O.; CAMPOS, A.K.; CARVALHO, G.R. Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 163, p. 335-340. 2009b.

COUTO, M.C.M.; QUINELATO, S.; SANTOS, C.N.; SOUZA, L.S.; SAMPAIO, I.M.; RODRIGUES, M.L.A. Migration and development of Cyathostomin (Nematoda-Cyathostominae) larvae on coast cross pasture in a southeast tropical region of Brazil. *Veterinári Medicina*, v. 53, p. 243-249, 2008.

COUTO, M.C.M.; QUINELATO, S.; SOUZA, T.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; ANJOS, D.H.S.; SAMPAIO, I.B.M.; RODRIGUES, M.L.A. Desenvolvimento e migração de larvas infectantes de ciatostomíneos (Nematoda-Cyathostominae) em gramínea coast-cross (*Cynodon dactylon*) em clima tropical, na Baixada Fluminense, RJ, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, n. 2, p. 31-37. 2009.

CRINGOLI, G.; RINALDI, L.; VENEZIANO, V.; CAPELLI, G.; SCALA, A. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Veterinary Parasitology*, v. 123, p. 121-131. 2004.

DOBSON, A.P.; CARPER, E.R. Global warning and potential changes in host-parasite and disease

- vector relationships. In: Global warning and biodiversity, R. Peters and T. Lovejoy (eds.). Yale University Press, New Haven, Connecticut, p. 201-217. 1992.
- GORDON, H.McL.; WITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in shepp faeces. *Journal Council Science Industry Research*, v. 12, p. 337-355. 1939.
- LUCKER, J.T. Survival and development at low temperatures of eggs and pre infective larvae of horse strongyles. *Journal Agricultural Research Washington*. v.63, p.93-218. 1941.
- MFITLODZE, M.W.; HUTCHINSON, G.W. Development and survival of free-living stages of equine strongyles under laboratory conditions. *Veterinary Parasitology*, v.23, p.121-133, 1987.
- NIELSEN, M.K.; KAPLAN, R.M.; THAMSBORG, S.M.; MONRAD, J.; OLSEN, S.N. Climatic influences on development and survival of free-living stages of equine strongyles: Implications for worm control strategies and managing of anthelmintic resistance. *The Veterinary Journal*, v. 174, n. 1, p. 23-32. 2007.
- NIELSEN, M.K.; VIDYASHANKAR, A.N.; ANDERSEN, U.V.; DELISI, K.; PILEGAARD, K.; KAPLAN, R.M. Effects of fecal collection and storage factors on strongylid egg counts in horses. *Veterinary Parasitology*, v. 167, n. 1, p. 55-61. 2010.
- NNORCHIRI, E. 1950 In: SALIH, N.E. A brief review on the development of Strongylid Nematode eggs and larvae under constant and changing temperature conditions-I. Egg development. *Journal of Thermal Biology*, v. 6, p. 287-295. 1981.
- OGBOURNE, C.P. Observations on the free-living stages of strongylid nematodes of horses. *Parasitology*, v. 64, p. 461-477, 1972.
- OGBOURNE, C.P. The prevalence relative abundance and site distribution of nematodes of the subfamily Cyathostominae in horses killed in Britain. *Journal of Helminthology*, v. 50, p. 203-214, 1976.
- OGBOURNE, C.P.. Pathogenesis of cyathostome infection of the horse. A review. England, Commonwealth Agricultural Bureau, n. 5, p. 1-25. 1978.
- PANDEY, V. S.; CHAER, A.; DAKKAK, A. Effect of temperature on development of the free-living stages of *Ostertagia circumcincta*. *Veterinary Parasitology*, v. 32, n. 2-3, p. 193-197. 1989.
- PANDEY, V. S.; CHAER, A.; DAKKAK, A. Effect of temperature on relative humidity on survival of eggs and infective larvae of *Ostertagia circumcincta*. *Veterinary Parasitology*, v. 49, n. 2-4, p. 219-227. 1993.
- PARNELL, I.W. –Notes on the survival of the eggs in the free living larvae of sclerostomes on the pasture. *Science Agriculture*, v. 16, p. 391-397. 1936.
- QUINELATO, S.; COUTO, M. C. M.; RIBEIRO, B. C.; SANTOS, C. N.; SOUZA, L. S.; ANJOS, D. H. S.; SAMPAIO, I. M.; RODRIGUES, M. L. A. The ecology of free-living stages of horse cyathostomins (Nematoda-Cyathostominae) on Tifton 85 grass (*Cynodon spp. cv. Tifton 85*) in tropical southeast Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 153, p. 100-107, 2008.
- SANTOS, C.P.; PADILHA, T.; RODRIGUES, M.L.A. Predatory activity of *Arthrobotrys oligospora* and *Duddingtonia flagrans* on pre-parasitic larval stages of Cyathostominae under different constant temperatures. *Ciência Rural*, v. 31, n. 5, p. 839-842, 2001.
- REINECKE, R.K. *Veterinary Helminthology*. Butterworths Prof. Publications. Durban. pg. 135. 1983.
- ROBERTS, J.H.S.; O’SULLIVAN, P.S. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, v.1; p. 99-102. 1950.

- RODRIGUES, M.L.A.; HONER, M.R. The collection and identification of first stage larvae of bovine gastrointestinal nematodes: modification of the Whitlock technique (1959). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 5, n. 1, p.1-3. 1985.
- RODRIGUES, M.L.A.; SOUTO-MAIOR; M.P, ANJOS; D.H.; OLIVEIRA, M.D.L. Comparação entre as técnicas McMaster e centrífugo-flutuação para contagem de ovos de helmintos intestinais de equinos. *Revista da Universidade Rural*, v.17, n.2, p.101-102, 1997.
- RODRIGUES, M.L.A.; QUINELATO, S.; COUTO, M.C.M.; SANTOS, C.N.; SOUZA, L.S.; SAMPAIO, I.M. Influência das condições climáticas na migração e sobrevivência de larvas infestantes de ciatostomíneos em *Brachiaria humidicola*, na baixada fluminense do Rio de Janeiro, Brasil. *Ciência Animal*, v. 18, n. 1, p. 7-14, 2008.
- RUPASHINGE, D.; OGBOURNE, C.P. Laboratory studies on the effect of temperature on the development of the free-living stages of some strongylid nematodes of the horse. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, v. 55, p. 249-253. 1978.
- SALIH, N.E. A brief review on the development of Strongylid Nematode eggs and larvae under constant and changing temperature conditions-I. Egg development. *Journal of Thermal Biology*, v. 6, p. 287-295. 1981.
- VAN WYK, J.A.; VAN WYK, L. Freezing of sheep faeces invalidates *Haemonchus contortus* faecal egg counts by the McMaster technique. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 69, p. 299-304. 2002.
- YOUNG, R.R.; ANDERSON, N.; OVEREND, D.; TWEEDIE, R.L.; MALAFANT, K.W. J.; PRESTON, G.A.N. The effect of temperature on times to hatching of eggs of the nematode *Ostertagia circumcincta*. *Parasitology*, v. 81, p. 477-491. 1980.
- ZAR, J.H. Biostatistical analysis, 4. ed., New Jersey: Prentice Hall Upper saddle, 1999.