COMPARAÇÃO DA CONTAGEM DE EOSINÓFILOS CIRCULANTES E QUANTIFICAÇÃO DE OVOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) ANTES E DEPOIS DA ADMINISTRAÇÃO DE VERMÍFUGOS EM OVINOS E CAPRINOS DA REGIÃO DE CASCAVEL PARANÁ.

OLIVEIRA, Weslley Júnior de¹ BITTENCOURT, Laura Helena França de Barros ²

RESUMO

A ovinocultura e caprinocultura estão em crescente expansão no território brasileiro e, por consequência, as endoparasitoses causam muitos prejuízos econômicos. Um bom controle e manejo das infecções parasitárias é essencial para criação desses animais, para isso, existem meios de identificação de animais parasitados ou não. Este trabalho teve por objetivo realizar a comparação de eosinófilos circulantes e a quantidade de OPG em ovinos e caprinos da região de Cascavel PR, antes e depois da administração de vermífugos. Estudou-se nove ovinos da raça Ile de France e Crioula e quatro caprinos da raça Boer e Sem Raça Definida (SRD) que habitavam as dependências do Hospital Veterinário do Centro Universitário FAG. Foram coletados sangue e fezes dos animais em seis coletas com diferentes tempos de análise e processados nos laboratórios do Hospital. Administrou-se Ivermectina na primeira análise e Closantel nas próximas análises. Os resultados não tiveram significância perante o método estatístico (p< 0,05), porém foi possível avaliar a eosinofilia tecidual de uma das amostras de um animal que foi a óbito. A pesquisa constituiu-se de um estudo de correlação entre duas variáveis. A análise estatística dos dados aconteceu pelo método de correlação entre duas variáveis através da ferramenta Microsoft® Excel 2010. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário FAG, parecer 003/2018.

PALAVRAS-CHAVE: OPG, eosinófilos, ovinos e caprinos

1. INTRODUÇÃO

Os endoparasitas gastrointestinais causam muito prejuízos econômicos na criação e produção de ovinos e caprinos. Sendo assim, uma grande preocupação dos produtores é com o controle desses parasitos gastrointestinais. Altas infecções podem resultar em uma anemia leve à severa, com diminuição das proteínas plasmáticas totais, os animais podem apresentar déficit no desenvolvimento e até morte (SOTOMAIOR *et al.*, 2007).

O maior desafio na criação de pequenos ruminantes é a identificação de animais parasitados, que muitas vezes não apresentam sinais clínicos. Sendo assim, é de suma importância o diagnóstico laboratorial realizado com amostras de fezes coletadas diretamente da ampola retal, para realizar a contagens de ovos por grama de fezes e estimar o grau de infecção. A contagem de eosinófilos sanguíneos através da realização de hemograma, esfregaço sanguíneo e contagem diferencial de leucócitos, também é uma ótima ferramenta para a avaliação e determinação de animais possivelmente parasitados (LOPES *et al.*, 2007).

¹ Graduando em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário Assis Gurgacz de Cascavel – PR. E-mail: weslleyjo@outlook.com

² Médica Veterinária e Professora Doutora do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Assis Gurgacz de Cascavel – PR. E-mail: <u>laura.h.f.b@hotmail.com</u>

Assim, este trabalho se justifica uma vez que existem poucos estudos com contagem de ovos por grama de fezes e contagem de eosinófilos sanguíneos; por isso é necessária realização de estudos para analisar e comparar essas duas formas de diagnóstico laboratorial. Esta pesquisa objetivou comparar a determinação de ovos por grama de fezes e contagem de eosinófilos sanguíneos circulantes antes e depois da administração de vermífugos em ovinos e caprinos da região de Cascavel, Paraná. Para isso, o projeto de pesquisa foi submetido ao comitê de ética em pesquisa com animais e, após a aprovação foi realizada a metodologia descrita posteriormente.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A ovinocultura e a caprinocultura no Brasil, cresce continuamente no ramo da pecuária nacional devido à inovação tecnológica empregada nos sistemas de produção. Porém, as verminoses também alavancaram na produção desses animais, tornando um empecilho para os produtores (AMADUCCI *et al.*, 2016). Para diagnóstico das verminoses em ruminantes de pequeno e grande porte, usa-se, comumente, o método quantitativo de ovos por grama (OPG) de fezes, descrito por Gordon e Whitlock em 1939. Esta metodologia consiste em coletar fezes diretamente da ampola retal dos pacientes, diluir as amostras em solução específica, filtrar e analisar o sobrenadante fazendo a contagem de ovos em amostras positivas. O método de OPG mostra que altas contagens de ovos são concomitantes com altas quantidades de parasitos no intestino dos animais parasitados (UENO e GONÇALVES, 1998).

Outra hipótese para avaliação de animais parasitados é a contagem de eosinófilos sanguíneos através da realização de hemograma, esfregaço sanguíneo e contagem diferencial de leucócitos. A infecção parasitária induz uma resposta imunológica humoral e celular, são liberados anticorpos que se ligam no parasito. As linfocinas liberadas pelos Linfócitos T induzem a produção e liberação de eosinófilos na corrente sanguínea para complementar na destruição do parasito. Com isso é evidente um aumento de eosinófilos circulantes, denominado de eosinofilia (LOPES *et al.*, 2007).

Em infecções parasitárias gastrintestinais ou qualquer inflamação, ocorre a estimulação da produção e liberação de citocinas que fazem a migração de leucócitos para o alvo da infecção e consequentemente a elevação na produção de interleucinas tipo quatro e 13. Os eosinófilos, são células do sistema imune que estão envolvidas ao processo de controle de parasitismo e reações alérgicas pois com o aumento na produção da interleucina 4 acontecerá uma estimulação na produção da interleucina tipo 5 que está associada com as eosinofilias sistêmicas e teciduais (CAVALCANTE et al., 2009).

O maior desafio na criação de pequenos ruminantes é a identificação de animais parasitados, que muitas vezes não apresentam sinais clínicos e baixa quantidade de ovos no exame de OPG, em comparação a outros animais que estão altamente contaminados apresentando sinais clínicos e anemia; no entanto, alguns animais são mais resistentes aos parasitos gastrointestinais (SOTOMAIOR *et al.*, 2007).

O uso indiscriminado de medicamentos anti- helmínticos, sem o devido diagnóstico da infestação parasitária, faz com que os parasitos acabem adquirindo resistência aos princípios ativos dos medicamentos (PACHECO, 2017).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Hospital Veterinário do Centro Universitário FAG, município de Cascavel – PR, no período de 30 de Abril a 30 de Agosto de 2018. Foram analisadas amostras de sangue e fezes de 13 animais sendo, quatro caprinos e nove ovinos. Os ovinos eram da raça Ile de France e Crioula, pesavam em média 50 quilogramas, tinham uma idade média de três anos e viviam nas dependências do Hospital Veterinário FAG. Já os caprinos do estudo em questão, eram alguns da raça Boer e outros Sem Raça Definida (SRD), pesavam em média 40 quilogramas e tinham uma idade média de três anos. O grupo do estudo habitava o mesmo local no Hospital Veterinário FAG e eram criados em sistema de semi confinamento, durante a noite eram recolhidos em um piquete e durante o dia eram soltos a pastejo. A alimentação dos animais era composta principalmente por pastagem da variedade *Brachiaria convert*, semente de aveia e feno pré-secado de Mombaça e Tifton. Além disso, era fornecida a suplementação mineral própria para a espécie.

Foram realizadas seis coletas, a primeira coleta aconteceu no dia 0 e neste mesmo dia foi aplicado o vermífugo e processado a amostras. A segunda coleta foi realizada no dia 15, não ocorreu aplicação de vermífugos, somente processamento de amostras. No dia 45, foi realizada a terceira coleta, administração de vermífugo e processamento das amostras. No dia 60 realizou-se a quarta coleta e processamento das amostras. No dia 90, realizou-se a quinta, administração de vermífugo e processamento das amostras e, no dia 105 realizou-se a sexta e última coleta e processamento das amostras.

O vermífugo utilizado na primeira aplicação foi o Ivomec® por via subcutânea (SC) na dose de 1 ml para 50 kg de peso vivo, como os animais não chegavam a esse peso, foi-se calculado a dosagem correta para cada indivíduo. A segunda e terceira aplicação utilizou-se o princípio ativo Closantel® na dose de 1 ml para cada 10 kg de peso vivo por via oral (VO).

As amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal e armazenadas em frascos plásticos estéreis, previamente identificados com dados como: data, hora de coleta, número e espécie do animal. Em seguida os frascos foram encaminhados para o Laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário do Centro Universitário Assis Gurgacz, para realização dos exames. As amostras foram mantidas sob refrigeração e analisadas no mesmo dia da coleta. Para o diagnóstico coproparasitológico foi realizado o método descrito por Gordon e Whitlock (1939) para quantificação de ovos por grama de fezes (OPG). As amostras foram diluídas em solução hipersaturada salina (30%), posteriormente filtradas e colocadas na câmera de Macmaster, então foi realizada a contagem de ovos em amostras positivas, através de microscopia ótica em um aumento de 100 X (UENO e GONÇALVES, 1998).

A coleta do sangue foi por meio da punção da veia jugular de forma asséptica com uma agulha de calibre 25x08. O material foi acondicionado em tubos próprios para armazenamento de sangue contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário analisadas no mesmo dia da coleta. Para determinação da quantidade de eosinófilos, realizou-se um esfregaço de sangue, corado em kit panótico rápido e analisado em microscopia óptica para quantificação dos eosinófilos em uma porcentagem de 100% dos leucócitos.

A pesquisa constituiu-se de um estudo de correlação entre duas variáveis. A análise estatística dos dados aconteceu pelo método de correlação entre duas variáveis através da ferramenta Microsoft® Excel 2010. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário FAG, parecer 003/2018.

4. ANÁLISES E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Em todas as coletas realizadas foram detectados ovos de estrongilídeos, o que demonstra a presença desses parasitos na população estudada. Na Tabela 1 está representado os valores médios e desvio padrão de OPG das espécies ovinas e caprinas em diferentes tempos de análises. Observa-se que a espécie ovina obteve médias dos valores de OPG superiores aos da espécie caprina.

Tabela 1 - Valores médios e desvio padrão de OPG das espécies ovinas e caprinas em diferentes

tempos de análises

Espécie	Média	Média OPG (períodos)					
Especie	OPG	Dia 0	Dia 15	Dia 45	Dia 60	Dia 90	Dia 105
Caprinos	602,08	400 ±	1112,5±	1181,25±	131,25	287,5	500
	±				±	± 145	$\pm 452,7$
	439,96	461,4	1535,2	1753,6	177,2		
	2249.51	2700 01	901.6	1561 1 .	972,2	2288,8±	5588,8±
Ovinos	2348,5±	2788,8±	891,6 ±	1561,1 ±	<u>±</u>	3865,3	10738,2
	1751,2	5192,3	1706,3	3360,2	1465,2		

^{*} Valores apresentados como Média ± Desvio Padrão.

OPG – Ovos Por Grama de fezes Fonte: Arquivo Pessoal (2018).

Os valores médios e desvio padrão dos eosinófilos absolutos, tanto da espécie ovina quanto da caprina, estão representados na Tabela 2. Observa-se que a espécie ovina obteve médias de valores de eosinófilos inferiores aos da espécie caprina.

Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão de eosinófilos absolutos das espécies ovina e caprina em diferentes tempos de análises.

Espécie	Média	Total Eosinófilos (mm³) (períodos)						
	Eosinófilos	Dia 0	Dia 15	Dia 45	Dia 60	Dia 90	Dia 105	
Caprinos	927,1 ± 334,6	1126 ± 1154,5	474,5 ± 301,3	1407,7 ± 374,9	1063,5 ± 566,8	744,2 ± 432,7	747,2 ± 475,7	
Ovinos	599,88± 425,7	359,4 ± 327,13	374 ± 441,3	850,8 ± 446,8	1361,3 ± 2085	379,7 ± 309,9	274,1± 226,9	

^{*} Valores apresentados como Média ± Desvio Padrão.

Fonte: Arquivo Pessoal (2018).

Realizando uma comparação entre os valores de OPG e eosinófilos absolutos em diferentes épocas de análise e após as administrações dos vermífugos na espécie caprina, pode-se concluir que na primeira administração do fármaco ivermectina 1%, os animais apresentaram um aumento de OPG e diminuição considerável de eosinófilos. Após a segunda administração de fármacos antihelminticos com o princípio ativo de Closantel os caprinos apresentaram uma queda significativa da média do OPG com uma queda dos eosinófilos, e na terceira administração de vermífugo de princípio ativo Closantel, estes animais apresentaram um aumento da média de OPG e mantiveram a quantidade de eosinófilos.

^{*}Valores de referência de eosinófilos (mm³) em caprinos (0 a 650 mm³) e em ovinos (0 a 1000 mm³) segundo a Universidade Federal de Viçosa – MG. Link: http://www.dvt.ufv.br/wp-content/uploads/Valores-de-refer%C3%AAncia_SITE_UFV.pdf

Já na espécie ovina, após a administração da ivermectina e análises de OPG e eosinófilos, podese perceber uma diminuição da média de OPG com um leve aumento da média de eosinófilos. Após a segunda administração de fármacos anti-helmíntico de princípio ativo closantel, observou-se uma diminuição da média de OPG e aumento na média de eosinófilos e, após a terceira administração de anti-helmintico Closantel observou-se um aumento da média de OPG com uma diminuição da média de eosinófilos.

A correlação entre eosinófilos relativos, eosinófilos absolutos e leucócitos totais com o resultado do OPG em diferentes tempos de análise na espécie caprina está representada na Tabela 3.

Tabela 3 - Correlação de OPG com eosinófilos relativos, absolutos e leucócitos totais em diferentes etapas de coleta.

oupus ac corcia.						
	Dia 0 OPG	Dia 15 OPG	Dia 45 OPG	Dia 60 OPG	Dia 90 OPG	Dia 105 OPG
Eosinófilos (%)	-0,428	-0,21835	-0,2126	-0,12011	-0,91284	0,2458
Eosinófilos (mm³)	-0,37965	0,22648	-0,36716	-0,16538	-0,95831	0,61718
Leucócitos (mm³)	-0,48174	-0,12583	-0,24404	0,16522	0,25272	0,82263

Fonte: Arquivo Pessoal (2018).

Não houve correlação de contagem de OPG com eosinófilos relativos e absolutos e leucócitos totais após os tratamentos intitulados. Já no estudo de Coutinho *et al.* (2010), foi observado a correlação dos valores de OPG com níveis hematológicos, incluindo a contagem de eosinófilos na espécie caprina, os autores encontraram uma correlação positiva e significativa com os números de eosinófilos e infestação parasitária, ou seja, quando os animais apresentavam altas infestações também apresentaram eosinofilia sanguínea.

A correlação entre eosinófilos relativos, eosinófilos absolutos e leucócitos totais com o OPG em diferentes tempos de análise na espécie ovina está representada na Tabela 4. De um modo geral, observou uma correlação negativa e não significativa (p>0,05), entre os parâmetros.

Tabela 4 - Correlação da contagem de OPG com os valores de eosinófilos relativos, absolutos e

leucócitos totais em diferentes tempos de coleta.

	Dia 0 OPG	Dia 15 OPG	Dia 45 OPG	Dia 60 OPG	Dia 90 OPG	Dia 105 OPG
Eosinófilos (%)	-0,44001	-0,31481	-0,44804	-0,43878	-0,40741	-0,30657
Eosinófilos (mm³)	-0,40715	-0,28592	-0,69493	-0,36383	-0,45458	0,50933
Leucócitos (mm³)	-0,25251	0,50106	-0,53234	-0,48226	-0,36697	-0,22322

Fonte: Arquivo Pessoal (2018).

De acordo com a pesquisa de Costa et al. (1986), onde os autores procuraram avaliar os números de eritrócitos, leucócitos totais e eosinófilos antes e depois de administrar vermífugos, porém sem correlacionar com a quantidade de OPG em cordeiros, eles obtiveram uma diminuição expressiva de eosinófilos após o tratamento anti-helmíntico, pois a infecção por parasitas gastrintestinais pode submeter os indivíduos a processos de eosinofilia circulante e tecidual. No entanto, não foi possível relatar o mesmo resultado nesta pesquisa.

Apesar dos valores estatísticos não apresentarem significância (p>0,05), no período de pesquisa pôde-se avaliar animais com altas infecções parasitárias e valores de eosinófilos em zero e quando administrado os vermífugos, a quantidade de OPG diminuiu e houve um aumento de eosinófilos, não classificando como eosinofilia, porém havendo uma leve proliferação dessas células na corrente sanguínea dos animais em estudo, interpretando assim uma relação contrária. Esse resultado encontrado, corrobora com o estudo de Melnek et al. (2014), quando descrevem que em sua pesquisa houve uma relação inversa aos valores de OPG e eosinófilos dos animais da espécie ovina, onde encontraram eosinofilia em pacientes com baixo número de OPG.

Durante a realização da pesquisa, um dos animais da espécie ovina foi a óbito. Foi possível avaliar as coletas dos dias 0 e 15 deste animal, onde foi encontrado, em ambos períodos, um alto valor de OPG e os eosinófilos circulantes em valores nulos. Realizou-se a necropsia e avaliou todos os órgãos do ovino, inclusive os intestinos, que não apresentaram presença de parasitos visíveis no exame macroscópico. Uma das hipóteses levantadas foi de que devido ao grau de infecção com altos valores de OPG, poderia haver uma eosinofilia tecidual para tentativa de controle dos helmintos. Coletou-se partes do intestino e fígado e encaminhou-se para exames microscópicos de histopatologia.

No laudo da histopatologia, demostrou moderado infiltrado inflamatório na lâmina própria do intestino, formado principalmente por moderada quantidade de linfócitos, plasmócitos e eosinófilos evidenciados próximos as criptas intestinais. Conforme Schmidt (2000), a produção de eosinófilos

em casos de parasitismo, envolve a liberação de um fator estimulador da proliferação dos mesmos que acontece pela ação ativada da linhagem linfoide, o que corrobora com o exame histopatológico desta pesquisa com a presença de plasmócitos e eosinófilos teciduais.

Quando a infecção parasitária gastrointestinal por nematódeos está em alto nível, observa-se uma migração dos eosinófilos para a mucosa intestinal ou abomasal para efetivar o controle dos parasitas através da liberação de citocinas tóxicas, fazendo com que ocorra a morte dos agentes. Em consequência, observa-se valores reduzidos, ou até mesmo nulos, de eosinófilos circulantes (SILVEIRA *et al.*, 2015).

Na pesquisa de Moraes *et al.* (2011), as autoras também encontraram resultados similares a esta pesquisa, onde no pico de parasitismo observou-se uma redução do número de eosinófilos circulantes que, através da liberação das interleucinas, aconteceu a migração dessas células para os locais afetados em tentativa de controle dos parasitas.

Em um estudo realizado por Buddle *et al.* (1992), pode-se perceber que a eosinoflia foi inversa a quantidade de OPG, fazendo com que evidencie uma correlação negativa entre esses parâmetros. Segundo os autores ainda, os eosinófilos são células que demonstram mais a resistência dos animais do que a infecção parasitária em ovinos.

Portanto, neste estudo de comparação entre eosinófilos circulantes e OPG antes e depois de administração de vermífugos, obteve-se valores estatísticos insignificativos, porém em um caso isolado, pôde-se perceber que a elevada quantidade de OPG demonstrou que os eosinófilos estavam no tecido afetado durante a alta da infecção. Para uma melhor avaliação dos resultados, sugere-se realizar uma nova pesquisa envolvendo um número maior de animais por um tempo mais prolongado.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o período de estudo e resultados levantados, observou-se que alguns animais, provavelmente, apresentam eosinofilia tecidual na maioria das infecções parasitarias grastrointestinais por nematódeos. Não foi observado uma correlação da quantidade de eosinófilos circulantes com o OPG antes e depois da administração de vermífugos em ambas as espécies. É interessante que essa pesquisa seja realizada com um número maior de amostras e divididos em grupo controle e grupo teste, para assim obter resultados mais precisos. É imprescindível a realização de exames parasitológicos para a identificação e escolha dos fármacos para controle dos parasitas.

REFERÊNCIAS

AMADUCI, A. G.; BORGES, J. L.; SITKO, M. D.; MARTINES, T. T.; SILVA, J. C. A.; SANTOS, A. P. Z; FERREIRA, G. A.; ALMADA, A. F. B.; PIAU JUNIOR, R. Parâmetros sanguíneos e OPG (ovos por grama de fezes) de ovelhas mestiças da raça Dorper em diferentes graus do método Famacha. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 19, n. 4, p. 221-225, out./dez. 2016.

BUDDLE, B. M.; JOWETT, G.; GREEN, R. S.; DOUCH, P. G. C.; RISDON, P. L. Association of blood eosinophilia with the expression of resistance in Romney Lambs to nematodes. **International Journal of Parasitology.** V. 22 n. 7, p. 955-960, 1992.

CAVALCANTE, A. C. R.; VIEIRA, L. S.; CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B – editores técnicos. **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos – epidemiologia e controle.** Brasília DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009.

COSTA, C. A. F.; VIEIRA, L. S.; PANT, K. P. Valores de eritrócitos e eosinófilos em cordeiros deslanados, antes e depois de medicações anti-helmínticas. **Pesq. Agropec. Bras**. V.21, p. 193-201, Brasilía, 1986.

COUTINHO, R. M. A.; ANDRADE JUNIOR, A. L. F.; COSTA, C. V. S.; NEVES, M. R. M.; NAVARRO, A. M. C.; BENVENUTI, C. L.; VIEIRA, L. S.; ZAROS, L. G. Influência da carga parasitária sobre os parâmetros hematológicos de caprinos naturalmente infectados por nematoides gastrintestinais. XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Campo Grande, 2010.

LOPES, S. T. A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. **Manual de patologia clínica veterinária-** 3. ed. – Santa Maria: UFSM/Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007.

MELNEK, F. M. C.; SINHORINI, W. A.; LOPES, W. D. Z.; CARDOZO, R. M.; MARTINS, R. R.; FERRARO, G. C. Relação entre parasitose por nematódeos e a eosinofilia em ovinos da região de Umuarama – PR. **Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ.** v.1, supl. 1, p. 072, 2014.

MORAES, F. R.; SOTOMAIOR, C. S.; SCHMIDT, E. M. S.; SOCCOL, V. T. Uso de marcadores parasitológicos e imunológicos na seleção de ovelhas resistentes às parasitoses gastrintestinais. **Archives of Veterinary Science**, v.16, n.1, p.7-20, 2011.

PACHECO, P.A. Avaliação da eficácia anti-helmíntica de albendazol associado a ciclodextrina e pvp e de complexo homeopático para ovinos. 2017. 77p. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Zootecnia. APTA/SAA. Nova Odessa, 2017.

SCHMIDT, E. M. S. Estudo de marcadores parasitológicos e hematológicos de resistência ao parasitismo gastrintestinal em ovinos. Dissertação de Mestrado — Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2000.

SILVEIRA, A.; BRONDANI, F. MOTTA, W. C.; FERREIRA, O. G. L.; LEMES, J. S. Resistencia ovina frente a nematoides gastrointestinais. **Archivos de zootecnia**. V. 64, p. 2, 2015.

SOTOMAIOR, C. S.; DE CARLI, L. M.; TANGLEICA, L.; KAIBER. B. K.; SOUZA, F. P. Identificação de ovinos e caprinos resistentes e susceptíveis aos helmintos gastrintestinais. **Rev. Acad**. Curitiba, v. 5, n. 4, p. 397-412, 2007.

UENO, H.; GONÇALVES, V.C. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. Tóquio: Japan International Cooperation Agency, 1998.