

**AGENTES ASSOCIADOS, ASPECTOS CLÍNICOS
E CONTROLE DA OTITE PARASITÁRIA EM
BOVINOS DA RAÇA GIR**

Patrícia Vieira Bossi

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária, como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: Romário Cerqueira Leite

Co-orientadora: Amália Verônica M. Silva

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2015

B745a Bossi, Patrícia Vieira, 1961-
Agentes associados, aspectos clínicos e controle da otite parasitária em bovinos da
raça Gir / Patrícia Vieira Bossi. – 2015.
105 p. : il.

Orientador: Romário Cerqueira Leite
Co-orientadora: Amália Verônica M. Silva
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Bovino – Parasito – Teses. 3. Otite – Teses.
I. Leite, Romário Cerqueira. II. Silva, Amália Verônica Mendes da. III. Universidade
Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

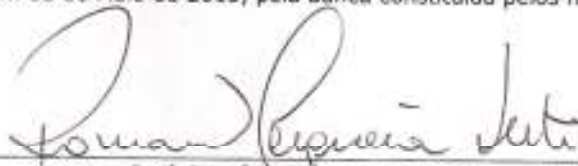
CDD – 636.208 969 68

FOLHA DE APROVAÇÃO

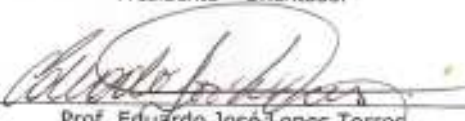
PATRÍCIA VIEIRA BOSSI LEITE

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.

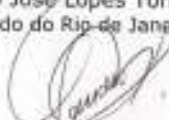
Aprovada em 18 de Maio de 2015, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Romário Corqueira Leite
Presidente - Orientador



Prof. Eduardo José Lopes Torres
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ



Prof. Cláudio Marcelo Gonçalves de Oliveira
Instituto Biológico (IB) Centro de Experimentos de Campinas- SP



Prof. Walter dos Santos Lima
Escola de Veterinária - UFMG



Profª. Kelly Moura Keller
Escola de Veterinária - UFMG

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Máximo (*in memorian*) e Ilka, para quem sempre tentei fazer o melhor a fim de refletir nas minhas ações o orgulho de filha.

Aos meus filhos Luiza, Rafael e Paulo, meus maiores amores, meus melhores projetos e minha razão de sempre buscar superar os obstáculos.

Ao meu inesquecível irmão Paulo (*in memorian*),

Ao Ernani, por ser a luz da minha vida, por não deixar faltar alegrias, por criar prazer na vontade de amar e por fazer de nossos passos poesia.

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar. ”

*Eduardo Galeno
1940 - 2015*

AGRADECIMENTOS

- À Deus, que coloca tudo na minha vida no momento certo e necessário. Muito obrigada pela oportunidade de realizar meus sonhos e construir mais um capítulo da minha estória;
- À Escola de Veterinária da UFMG, por me acolher mais uma vez para a realização do doutorado;
- Ao meu orientador, Professor Doutor Romário Cerqueira Leite, por ter me proporcionado a oportunidade de aprofundar meus conhecimentos, desde a graduação até o doutorado;
- À minha co-orientadora, Professora Doutora Amália Verônica da Silva, por me receber como orientanda e amiga e pelo incentivo em todas as etapas da elaboração deste trabalho;
- Ao Professor Doutor Hudson Andrade dos Santos, pela amizade, apoio, paciência, ensinamentos e inestimável ajuda nas coletas, cultivo dos nematoides e análise morfológica das amostras;
- Ao Professor Doutor Paulo Roberto de Oliveira (*in memoriam*), pela amizade e carinho;
- Ao Professor Doutor Ivan Barbosa Machado Sampaio, pelo auxílio nas análises estatísticas;
- À Professora Doutora Kelly Moura Keller, que disponibilizou todo seu conhecimento e também as instalações do Laboratório de Micologia e Micotoxinas para a realização dos estudos microbiológicos;
- Ao Pós Doutor Claudio Marcelo Gonçalves de Oliveira, pesquisador do Instituto Biológico de São Paulo, que mesmo sem me conhecer pessoalmente, se dispôs a cooperar realizando as primeiras análises moleculares;
- Aos Professores Doutores Eduardo José Lopes Torres e José Roberto Machado e Silva, da Universidade Estadual do Rio de Janeiro - UERJ, que acreditaram neste trabalho e apoiaram nossas ideias;
- Ao Makoto Enoki Caracciolo, da UERJ, pela realização das análises morfológicas e morfométricas deste estudo;
- A todos os funcionários do Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - EV UFMG, em especial à Doutora Livia Loiola, pela realização de parte das análises moleculares e pelas sugestões e esclarecimentos;
- Aos colegas da pós-graduação do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EV UFMG, pela agradável convivência;
- A todos os funcionários da EV da UFMG e do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, em especial, ao amigo Ricardo Canesso Dalla Rosa;
- A todos os funcionários da Fazenda Ariranha, Teófilo Otoni - MG, que sempre estavam dispostos a cooperar nas coletas de material;
- Ao Doutor Daniel Sobreira Rodrigues, pesquisador da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, por ter conseguido que este estudo fosse realizado na Fazenda Experimental de Itabira - FEIT - EPAMIG;

- À todos os funcionários da Fazenda Experimental da EPAMIG em Itabira - MG, em especial ao Senhor Ivys Marlon Kelles Lage, pela disponibilização das instalações e dos animais para a realização deste estudo;
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG, pela concessão de bolsa de estudos;
- Aos meus irmãos, Ronaldo, Márcia e Antônio Augusto, aos cunhados e sobrinhos, pela amizade e carinho.
- Aos meus filhos queridos que souberam compreender os motivos da minha ausência e que me incentivaram a continuar;
- Ao Ernani, por me ajudar em todas as horas, por incentivar e apoiar quando eu estava fraquejando e por me amar assim;
- A todos que se dispuseram a ajudar com sugestões e conselhos, especialmente os amigos Ana, Arildo, Luisa e Paula. Vocês sempre estarão no meu coração e na minha memória.

“A perseverança é a mãe da boa sorte. ”

Miguel de Cervantes

SUMÁRIO

	RESUMO	1
	ABSTRACT	1
i.	INTRODUÇÃO GERAL	2
ii.	OBJETIVO GERAL	3
iii.	MATERIAL E MÉTODOS GERAL	3
iii.1.	Estrutura da redação	3
iii.2.	Local de estudo	4
iii.3.	Animais	4
I.	CAPÍTULO 1 - Taxonomia integrada de nematoides associados à otite parasitária em bovinos	6
0	RESUMO	6
	ABSTRACT	6
I.1	INTRODUÇÃO	7
I.2	OBJETIVOS	7
I.3	REVISÃO DE LITERATURA	8
I.4	MATERIAL E MÉTODOS	10
I.4.1	Data e local de coleta das amostras de nematoides	10
I.4.2	Cultivo dos nematoides.....	11
I.4.2.1	Protocolo de cultivo de fêmeas de nematoides grávidas	11
I.4.3	Locais de realização das análises moleculares e dos estudos morfométricos e morfológicos	12
I.4.4	Fixação dos nematoides.....	12
I.4.5	Preparo e envio das amostras para as análises moleculares e morfológicas.....	12
I.4.6	Análises moleculares	15
I.4.6.1	Instituto Biológico (Campinas - SP)	15
I.4.6.1.1	Aplicação da tecnologia do código de barras do DNA.....	15
I.4.6.1.2	Análises filogenéticas	16
I.4.6.2	Laboratório de genética da EV UFMG.....	16
I.4.7	Análises morfológicas e morfométricas	17
I.4.7.1	Montagem de lâminas e morfometria em microscopia de luz (ML)	17
I.4.7.2	Morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	17
I.5	RESULTADOS	18
I.5.1	Análises moleculares para identificação dos nematoides	18

I.5.1.1	Instituto Biológico	18
I.5.1.2	Laboratório de genética da EV UFMG.....	20
I.5.2	Análises morfológicas para identificação específica.....	22
I.5.2.1	<i>Metarhabditis costai</i> (Martins Jr., 1985) Sudhaus 2011.....	26
I.5.2.2	<i>Metarhabditis freitasi</i> (Martins Jr., 1985) Sudhaus 2011	30
I.5.2.3	<i>Metarhabditis blumi</i> (Sudhuas, 1974) Sudhaus 2011 (DF5010) CGC - USA.....	37
I.6	DISCUSSÃO	39
I.7.	CONCLUSÕES	43
I.8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
II.	CAPÍTULO 2 - Estudo microbiológico do conduto auditivo externo de bovinos da raça Gir, com e sem otite parasitária	45
	RESUMO	45
	ABSTRACT	45
II.1.	INTRODUÇÃO	46
II.2	OBJETIVOS	46
II.3	REVISÃO DE LITERATURA	46
II.4	MATERIAL E MÉTODOS	48
II.4.1	Local de coleta das amostras e duração do estudo.....	48
II.4.2	Diagnóstico parasitológico e seleção dos animais.....	48
II.4.3	Coletas de amostras e análises microbiológicas	48
II.4.4	Teste de sensibilidade a antimicrobianos.....	49
II.4.5	Análise estatística	49
II.5	RESULTADOS	51
II.5.1	Resultados microbiológicos das amostras submetidas à cultura bacteriana	51
II.5.2	Frequência de infecções por fungos.....	55
II.5.3	Perfil de sensibilidade bacteriana <i>in vitro</i>	58
II.6	DISCUSSÃO	60
II.7	CONCLUSÕES	64
II.8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
III.	CAPÍTULO 3 - Avaliação da eficácia de um protocolo de controle de parasitos auriculares em um rebanho bovino da raça Gir	66
	RESUMO	66
	ABSTRACT	66
III.1.	INTRODUÇÃO	67

III.2.	OBJETIVOS	67
III.3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	67
III.4.	MATERIAL E MÉTODOS	69
III.4.1	Inspeção dos animais e classificação das orelhas de acordo com a presença e o aspecto da secreção auricular.....	69
III.4.2	Coleta de material para diagnóstico parasitológico	70
III.4.3	Protocolo de controle da otite parasitária	73
III.4.4	Análise estatística	73
III.5.	RESULTADOS	73
III.6.	DISCUSSÃO	76
III.7.	CONCLUSÕES.....	78
III.8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
v.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

LISTA DE TABELAS

- Tabela I.1.** Comparação da sequência da expansão D2/D3 da região 28S do rDNA da população Fz1 de *Metarhabditis blumi* proveniente de Teófilo Otoni, MG e das populações Fz2 Gama, Fz2 737, Fz2 FGVI2 e Fz2 Piso, provenientes de Itabira, MG, com as sequências de espécies de nematoides depositadas no banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). 19
- Tabela I.2.** Resultados da comparação das sequências dos 54 espécimes provenientes do cultivo de fêmeas grávidas, oriundas da secreção auricular de quatro vacas da fazenda 1, Ipatinga - MG com a sequência da espécie *M. blumi* depositada no GenBank (acesso número EU195965.1). 21
- Tabela I.3.** Comparações das medidas das características anatômicas dos espécimes machos das espécies *Metarhabditis freitasi* e *M. costai* coletadas da secreção auricular de bovinos com otite parasitária nas fazendas 1 e 2, localizadas nos municípios de Teófilo Otoni e Itabira - MG e da *M. blumi* da cultura DF5010 mantida no CGC - USA. Todas as mensurações estão em μm e representadas pelas médias e desvio padrão, seguidas pelos intervalos obtidos (nos parêntesis). 23
- Tabela I.4** Comparações das medidas das características anatômicas dos espécimes machos coletados da secreção auricular de bovinos com otite parasitária nas fazendas 1 e 2, localizadas nos municípios de Teófilo Otoni e Itabira - MG, com as descrições das espécies *Metarhabditis freitasi*, *M. costai* e *M. blumi* encontradas na literatura. Todas as mensurações estão em μm e representadas pelas médias e desvio padrão, seguidas pelos intervalos obtidos (nos parêntesis). 24
- Tabela I.5.** Comparações das medidas das características anatômicas dos espécimes fêmeas, coletados da secreção auricular de bovinos com otite parasitária nas fazendas 1 e 2, com as descrições das espécies *Metarhabditis freitasi*, *M. costai* e *M. blumi* encontradas na literatura. Todas as mensurações estão em μm e representadas pelas médias e desvio padrão, seguidas pelos intervalos obtidos (nos parêntesis). 25
- Tabela II.1.** Resultado do crescimento de bactérias nas amostras coletadas do conduto auditivo externo de bovinos da raça Gir, na fazenda 1, localizada no município de Itabira, MG, nos meses de julho e novembro de 2013 e janeiro e abril de 2014. 52
- Tabela II.2.** Frequência de bactérias isoladas das amostras coletadas nos dois grupos de animais, em culturas puras e em associações, de acordo com as características tintoriais da parede celular. 53
- Tabela II.3.** Resultados do crescimento de fungos nas amostras coletadas nos meses de julho e novembro de 2013 e janeiro e abril de 2014. 56

Tabela II.4. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, no teste de difusão com discos, em isolados bacterianos obtidos das amostras coletadas dos animais dos grupos com otite parasitária e sem otite parasitária, nos meses de julho e novembro de 2013 e janeiro e abril de 2014.	59
Tabela III.1 Classificação auricular de acordo com a presença, localização e aspecto da secreção encontrada no pavilhão auricular e no conduto auditivo externo dos animais estudados (Figura III.1 A - B - C)	70
Tabela III.2 Classificação da otite parasitária bovina, de acordo com a presença, quantidade e o aspecto da secreção auricular e a presença de nematoides	72
Tabela III.3 Resultados dos diagnósticos parasitológicos e das inspeções visuais realizados nos animais estudados em janeiro de 2013, julho de 2013 e janeiro de 2014.....	74
Tabela III.4 Distribuição da infecção pelo nematoide e os graus de otite das orelhas parasitadas, nos meses de janeiro/2013, julho/2013 e janeiro/2014.	75
Tabela III.5 Distribuição da infecção pelo ácaro <i>Railiattia</i> sp. e média da carga parasitária (CP) encontrada nas orelhas, nos meses de janeiro/2013, julho/2013 e janeiro/2014.	76

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Localização da fazenda 1 no município de Teófilo Otoni - MG (A) e 2 no município de Itabira - MG (B). Animais da raça Gir estudados na fazenda 1 (C) e na fazenda 2 (D)..... 5
- Figura I.1** Isolamento dos nematoides das amostras de secreção auricular coletadas nas fazendas 1 e 2 (A). Cultivo das populações de nematoides coletados nas fazendas 1 e 2 em câmara úmida à temperatura ambiente (B). Filtro de Baermann (C), tubo coletor contendo nematoides no fundo (D), placa de Petri contendo os nematoides isolados (E), coleta dos nematoides com o auxílio do estilete (E) 14
- Figura I.2** Relação filogenética de espécies de *Metarhabditis* e de *Rhabditis* com a espécie *M. blumi* originárias do Brasil (Fz1, Fz2 Gama, Fz2 737, Fz2 FGVI2 e Fz2 Piso) e sua similaridade com populações obtidas do GenBank, baseada no alinhamento da sequência da região D2/D3 28S DNAr. A árvore filogenética de máxima verossimilhança foi estimada com o aplicativo PHYLIP DNAML. *Oscheius myriophila* foi utilizado como grupo externo. 20
- Figura I.3** Esquema baseado em imagens obtidas em microscopia de luz mostrando a morfologia dos machos do *Metarhabditis costai*. 27
- Figura I.4** Imagens de microscopia de luz de machos de *Metarhabditis costai* 28
- Figura I.5** Imagens de microscopia eletrônica de varredura de machos do *Metarhabditis costai*. 29
- Figura I.6** Esquema baseado em imagens obtidas em microscopia de luz mostrando a morfologia das fêmeas do *Metarhabditis freitasi*. 31
- Figura I.7** Imagens de microscopia de luz de fêmeas de *M. freitasi*..... 32
- Figura I.8** Esquema baseado em imagens obtidas em microscopia de luz mostrando a morfologia dos machos do *Metarhabditis freitasi*. 34
- Figura I.9** Imagens de microscopia de luz de machos de *Metarhabditis freitasi*. 35
- Figura I.10** Imagens de microscopia eletrônica de varredura de machos de *Metarhabditis freitasi*. 36
- Figura I.11** Imagens de microscopia de luz de machos de *Metarhabditis blumi*. 38

Figura II.1 Coleta de amostra de secreção auricular para análises microbiológicas (A). Visualização dos nematoides presentes na amostra coletada (B).	50
Figura II.2 Teste de sensibilidade a antimicrobianos. Capela com lâmina de fluxo laminar do LAMICO, onde foram processadas as amostras (A). Placa ágar Müller Hinton com os discos de bases de antibióticos distribuídos uniformemente (B).	50
Figura II.3 Frequência de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas isoladas das amostras coletadas do CAE de animais dos grupos estudados.	51
Figura II.4 Frequência de bactérias isoladas nos animais dos grupos estudados, de acordo com as diferenças morfológicas e bioquímicas.	54
Figura II.5 Frequência dos diferentes gêneros de bactérias isoladas nas amostras coletadas do conduto auditivo dos bovinos dos grupos estudados.	55
Figura II.6 Frequência de infecções fúngicas nas amostras coletadas nos animais dos grupos estudados.	57
Figura II.7 Frequência dos diferentes gêneros de fungos encontrados nas amostras coletadas nos animais dos grupos estudados.	58
Figura II.8 Resultados das análises microbiológicas realizadas nas amostras coletadas nos animais com e sem otite parasitária.	61
Figura III.1 (A - B - C) Imagens das orelhas dos bovinos sem secreção auricular (S-), com secreção moderada (S+) e com secreção abundante (S++); coleta do lavado auricular para diagnóstico parasitológico (D); observação do material coletado com o auxílio de microscópio estereoscópico (E); (F - G) aplicação da pasta antiparasitária.	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BGNF	Bastonetes Gram-negativos fermentadores
BGNnF	Bastonetes Gram-negativos não fermentadores
BHC	Hexaclorociclo-hexano
CAE	Conduto auditivo externo
CGC	Centro de Genética do <i>Caenorhabditis</i>
CGP	Cocos Gram-positivos
COP	Com otite parasitária
CP	Carga Parasitária
DDVP	Diclorvos (fosfato de 0,0-dimetil-2,2-diclorovinila
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
FEIT	Fazenda Experimental de Itabira
EV UFMG	Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
GC	Grupo controle
GenBank	Banco genético
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<i>In vitro</i>	Expressão latina que designa todos os fenômenos biológicos que tem lugar fora dos sistemas vivos, no ambiente controlado de um laboratório.
<i>In vivo</i>	Expressão latina que refere a experimentação feita dentro ou no tecido vivo de um organismo vivo.
LAMICO	Laboratório de Micologia e Micotoxinas
LD	Lábio dorsal
LP	Laboratório de parasitoses
LV	Latero-ventral
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
ML	Microscopia de luz
mM	Mile-molar
μ	Micra
n	População amostrada
p	Medida de significância estatística
P +	Refere-se à amostra com até 50 espécimes de nematoides
P ++	Refere-se à amostra com 51 a 100 espécimes de nematoides

P +++	Refere-se à amostra com mais de 100 espécimes de nematoides
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
PG	Papila genital
RAPD	DNA polimórfico amplificado ao acaso
S	Sensila
S -	Sem secreção auricular
S +	Presença moderada de secreção auricular
S ++	Presença abundante de secreção auricular
SOP	Sem otite parasitária
sp.	Refere-se a uma espécie
ssp.	Refere-se a várias espécies de um mesmo gênero
USA	Estados Unidos da América
UERJ	Universidade Estadual do Rio de Janeiro
WLB	Worm lysis buffer

RESUMO

A otite parasitária bovina, doença bastante frequente em rebanhos da raça Gir, compromete o desempenho dos animais e provoca inúmeros prejuízos ao produtor rural. Apesar dos fatores negativos envolvidos, as pesquisas até o momento ainda não foram suficientes para solucionar questões como a prevenção da parasitose e o tratamento dos animais afetados. Este estudo foi desenvolvido em três etapas distintas: inicialmente buscou-se identificar as espécies de nematoides associados à otite parasitária em bovinos da raça Gir pertencentes a duas fazendas do estado de Minas Gerais. Foram utilizadas tanto a técnica do código de barras do DNA para identificação molecular como as análises taxonômicas convencionais. Secundariamente estudou-se o perfil microbiológico do conduto auricular externo de bovinos divididos em dois grupos: com e sem sinais clínicos de otite parasitária. Finalmente, avaliou-se a eficiência de um protocolo de controle dos nematoides e ácaros do gênero *Raillietia* encontrados em animais naturalmente infectados, com sinais de otite. As análises moleculares identificaram os espécimes estudados como da espécie *Metarhabditis blumi*. As análises taxonômicas identificaram nematoides das espécies *M. costai* e *M. freitasi* nas populações estudadas. As bactérias Gram-negativas foram mais prevalentes tanto nas amostras do grupo com otite (COP) quanto naquelas do grupo sem otite (SOP). Verificou-se grande número de bactérias resistentes aos antibióticos de acordo com o teste de sensibilidade realizado nas amostras coletadas em ambos os grupos de animais. O protocolo de controle da otite parasitária mostrou-se ineficiente no combate às infecções pelo nematoide, sendo, porém, capaz de diminuir significativamente o número de orelhas parasitadas pelo ácaro sem, contudo, eliminar completamente a infecção. Os resultados obtidos permitiram elucidar pontos ainda pouco conhecidos da otite parasitária em bovinos e contribuirão para a aplicação prática do conhecimento teórico-científico no dia a dia dos criadores de bovinos da raça Gir.

Palavras chave: taxonomia integrada; perfil microbiológico; protocolo de controle.

ABSTRACT

*The bovine parasitic otitis, a very common disease in Gir cattle, affects the performance of animals and it leads to a large losses to farmers. Despite the negative factors involved, until now the research have been not sufficient to resolve issues such as the prevention of parasitosis and treatment of affected animals. This study was conducted in three distinct phases: the initial objective was to identify the nematoides specimens associated with otitis parasitic in Gir cattle from two farms in the state of Minas Gerais. The technique of DNA barcode for identification and the conventional molecular taxonomic analysis were used. Second, it has been studied the microbiological profile of the external ear canal bovine oh the cattle, which it was divided into two groups: with and without clinical signs of parasitic otitis. Finally, it was evaluated the efficiency of a protocol control of nematodes and mites of the genus *Raillietia*, found in naturally infected animals with symptoms of ear infections. In the analyzed populations species *Metarhabditis Blumi* were identified through molecular analysis. Similarly, nematodes of the species *M. Costai* and *M. Freitasi* have been found through taxonomic analysis. Gram-negative bacteria were the most prevalent in the samples of the two groups with otitis (COP) and without otitis (PCOS). There was a large number of bacteria resistant to antibiotics used in the sensitivity test conducted on samples collected in both groups of animals. The parasitic otitis control protocol was not sufficient to eliminate nematode infections. However, this protocol was able to significantly decrease the number of parasitized by ear mite without, however, eliminate the infection. These results allowed to increase the knowledge of otitis parasite in cattle and to*

contribute to the practical application of theoretical and scientific knowledge in the daily practice of cattle farmers Gir.

Keywords: *integrative taxonomy; microbiological profile; protocol control.*

i. INTRODUÇÃO GERAL

No complexo agroindustrial brasileiro, a cadeia produtiva do leite é uma das mais importantes, colocando o Brasil como o quinto maior produtor mundial deste produto estando atrás apenas da União Europeia, Índia, Estado Unidos da América e China (IBGE, 2012). O estado de Minas Gerais destaca-se como o maior produtor brasileiro, com participação de 27,3% do total de leite produzido. Este estado possui o maior rebanho bovino da raça Gir, cujos animais são bastante valorizados pela eficiência na produção de leite. O número de criadores de animais desta raça tem crescido em todo o Brasil e a população estimada é de aproximadamente 79.000 animais. Outro fator que demonstra a importância da raça é a sua participação na composição da raça Girolando, cujos animais são amplamente utilizados de norte a sul do país, para produção de leite a baixo custo.

Como todos os zebuínos, os bovinos da raça Gir também são resistentes às parasitoses, com exceção aos parasitos auriculares. Tanto ácaros do gênero *Raillietia*, quanto nematoides da família Rhabditidae, são frequentemente encontrados no conduto auditivo destes animais. Estes últimos, parasitos exclusivos dos animais da raça Gir, são responsáveis por casos de otite subclínica, aguda e crônica. A doença é bastante frequente e compromete o desempenho dos animais, levando ao óbito aqueles cronicamente afetados (Leite *et al.*, 2012). A parasitose causada pelo ácaro acomete bovinos de todas as raças, sendo mais frequente naquelas com orelhas curtas e espalmadas. Na maioria dos casos ela é assintomática nos animais Gir. Porém, pode ser considerada como precursora da otite causada por nematoides, devido às alterações que o ácaro provoca no conduto auditivo dos animais tais como: áreas de erosão da mucosa com intensa irritação, aumento da secreção auricular e da temperatura local.

Criadores de rebanhos da raça Gir e médicos-veterinários têm relatado a diminuição dos índices produtivos e reprodutivos dos animais afetados pela otite parasitária (Leite *et al.*, 2012). A doença está relacionada à grandes prejuízos decorrentes do gasto com medicamentos e à morte dos animais cronicamente afetados. A prevenção e o controle dos parasitos auriculares ainda são considerados pontos de interrogação no meio científico. Estudos foram realizados com o objetivo de estabelecer protocolos de tratamento e controle da doença e uma variedade de produtos já foram testados sem resultados significativos. Acredita-se que a ineficiência dos tratamentos possa ser devido à pouca importância dada à fatores perpetuantes. Como por exemplo, a presença de diversificada flora bacteriana e fúngica associadas à parasitose

A otite causada por nematoides já foi descrita em bovinos de países da África e da América do Sul, como a Colômbia e a Venezuela. No Brasil está presente em rebanhos na maioria dos estados, com níveis de ocorrência variando entre 52,2% e 100% (Leite *et al.*, 1993; Vieira *et al.*, 1998; Brito *et al.*, 2005 e Leite *et al.*, 2013).

Com relação às espécies de nematoides que parasitam o conduto auditivo dos bovinos, as espécies *Rhabditis bovis* e *R. blumi* foram citadas em países africanos como responsáveis pela doença. No Brasil, Martins Jr. *et al.* (1985) descreveram as espécies *Rhabditis costai* e *R. freitasi* após coletá-las do conduto auditivo de bovinos da raça Gir. Os estudos relacionados à identificação das espécies de nematoides responsáveis pela otite parasitária ainda são escassos e necessitam de esclarecimentos, especialmente do ponto de vista de caracteres morfológicos.

Como contribuição pode ser citada a revisão realizada por Sudhaus (2011) que reposicionou algumas espécies de nematoides em gêneros, de acordo com as suas características morfométricas e genéticas. Desta maneira, sete espécies de *Rhabditis*, das quais, três relacionadas à otite parasitária (*Rhabditis costai*, *R. freitasi* e *R. blumi*) passaram a pertencer ao gênero *Metarhabditis*.

A identificação tradicional de nematoides é feita a partir da análise detalhada das características morfológicas de espécimes adultos. O tamanho diminuto dos representantes de alguns gêneros, assim como a dificuldade de se encontrar na literatura as chaves de identificação, tornam o trabalho do taxonomista bastante árduo e demorado. Como alternativa tem-se utilizado a identificação molecular, cujos resultados são rápidos, além de sensíveis e confiáveis. Todos os estádios de vida dos nematoides podem ser utilizados nas análises do DNA e inúmeras regiões genômicas têm sido estudadas para a identificação confiável das espécies (Oliveira *et al.*, 2011a). No entanto, apesar das inúmeras vantagens da utilização da biologia molecular, esta não deve ser a única ferramenta para a identificação específica. Alguns autores indicam a integração entre as informações moleculares e os dados morfológicos para a identificação correta das espécies de nematoides (Tomazini *et al.*, 2013).

Acredita-se ainda que os avanços no conhecimento do nematoide responsável pela otite parasitária dos bovinos poderiam ser úteis na elucidação de pontos ainda não totalmente conhecidos tais como o ciclo biológico e a forma de transmissão entre hospedeiros. Além disso, acredita-se que o esclarecimento da etiologia das infecções secundárias poderia auxiliar na escolha do protocolo mais eficaz para o tratamento da rhabditiose. A soma destes conhecimentos levaria a ganhos consideráveis para o produtor rural e elevariam a importância científica deste estudo, ao ultrapassar os limites da universidade.

ii. OBJETIVO GERAL

Contribuir para o conhecimento de alguns aspectos do controle e da identificação de microrganismos associados à otite parasitária em bovinos da raça Gir de duas fazendas leiteiras do estado de Minas Gerais.

iii. MATERIAL E MÉTODOS

iii.1 Estrutura da redação

Abordou-se no presente estudo temas diversos da infecção parasitária do conduto auditivo externo (CAE) de bovinos e, com o objetivo de tornar mais dinâmica a apresentação, optou-se pelo desenvolvimento do texto no formato de capítulos. Tal disposição também contribuirá para a edição das publicações científicas resultantes do estudo. Cada capítulo será apresentado com seus respectivos tópicos: introdução, objetivos, revisão de literatura, material e métodos, resultados e discussão. O trabalho de conclusão será apresentado em três capítulos, como descrito abaixo:

Capítulo I – Taxonomia integrada de nematoides associados à otite parasitária em bovinos;

Capítulo II – Estudo microbiológico do conduto auditivo externo de bovinos da raça Gir, com e sem otite parasitária.

Capítulo III – Avaliação da eficácia de um protocolo de controle de parasitos auriculares em um rebanho bovino da raça Gir.

Além do exposto, para evitar repetições de tópicos, a metodologia comum a todas as etapas deste trabalho segue descrita a seguir:

iii.2 Locais do estudo

O estudo foi realizado em duas fazendas no estado de Minas Gerais: a primeira, localizada em Teófilo Otoni, região nordeste, denominada Fazenda 1. A segunda, pertencente à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), localizada em Itabira, região central, denominada Fazenda 2 (Figuras 1 A e B). Vale esclarecer que essa última foi selecionada devido à característica especial do seu rebanho bovino, considerado “fechado”, sem introdução de animais externos.

O município de Teófilo Otoni está localizado na Mesorregião do Vale do Mucuri, a nordeste da capital Belo Horizonte, a cerca de 450 km de distância. A área do município, segundo o IBGE (IBGE, 2013), é de 3.242,818 km². Situa-se a 17°51'27" de latitude sul e 41°30'19" de longitude oeste. O relevo do município é predominantemente montanhoso (cerca de 60%) e a altitude máxima chega aos 1.138 metros, enquanto que a altitude mínima é de 366 metros. O clima é do tipo Aw segundo Köppen, caracterizando-se por duas estações bem distintas com invernos secos e com temperaturas amenas e verões chuvosos com temperaturas bastante elevadas. Fevereiro, assim como em Itabira, também é o mês mais quente, com média máxima de 32,3°C e mínima de 19,9°C. O mês de julho é o mais frio, com 26,6°C de média máxima e 14,1°C de média mínima. A precipitação média anual é de 959 mm, variando bastante entre agosto, o mês mais seco (17,8 mm) e dezembro, o mais chuvoso (182,8 mm de média).

Itabira pertencente à Mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte, capital do estado, da qual fica distante cerca de 110 km. A área do município, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013), é de 1.253,704 km², sendo que 12,4377 km² constituem a zona urbana e os 3.223,19 km² restantes constituem a zona rural. Situa-se a 19°37'09" de latitude sul e 43°13'37" de longitude oeste e está a uma distância de 111 quilômetros a nordeste da capital mineira. O relevo do município de Itabira é predominantemente montanhoso sendo que apenas 30% dos terrenos sejam ondulados ou planos. O clima é caracterizado, ainda segundo o IBGE, como tropical subquente e semiúmido (tipo Aw segundo Köppen), tendo temperatura média anual de 21,7°C com invernos secos e amenos e verões chuvosos com temperaturas elevadas. O mês mais quente é fevereiro com temperatura média de 23,8°C. Julho é o mês mais frio apresentando 24,8°C e 12,5°C de médias máxima e mínima. A precipitação média anual é de 1.489,3 mm, com variação inferior chegando a apenas 8,2 mm em julho e a 350,6 mm em dezembro, o mês mais chuvoso.

iii.3 Animais

Para o experimento foram estudados 37 bovinos da raça Gir de diferentes faixas etárias. Na fazenda 1 foi coletado material da secreção auricular de cinco bovinos adultos. Na fazenda 2, todos os 32 animais, participaram da pesquisa. A coleta de secreção auricular para as análises morfológicas e moleculares foi feita apenas em animais com otite clínica. Os estudos microbiológicos foram realizados em 12 animais, seis com sinais de otite e seis sadios. O protocolo de controle foi testado em todos os animais da fazenda 2, com e sem otite (Figura 1C e D).

Este estudo foi certificado junto à Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA), sobre o protocolo n°. 198/2013.

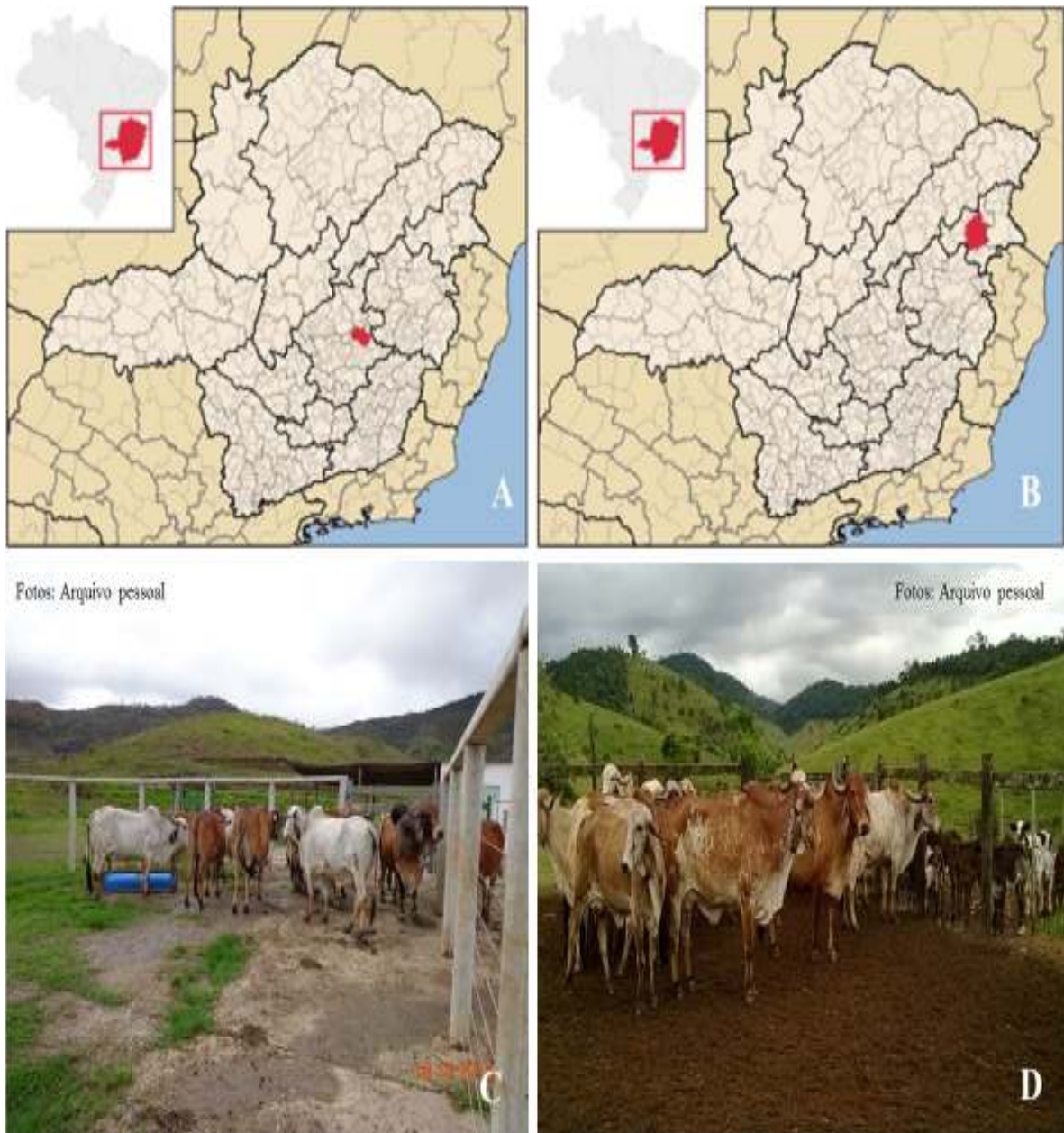


Figura 1 Localização da fazenda 1 no município de Teófilo Otoni - MG (A) e da fazenda 2 no município de Itabira - MG (B) Animais da raça Gir estudados na fazenda 1 (C) e na fazenda 2 (D).

I. CAPÍTULO 1

TAXONOMIA INTEGRADA DE NEMATOIDES ASSOCIADOS À OTITE PARASITÁRIA EM BOVINOS

RESUMO

Este estudo teve o objetivo de identificar o nematoide associado à otite parasitária em dois rebanhos bovinos da raça Gir no estado de Minas Gerais. Espécimes de nematoides foram isolados da secreção auricular de vacas com sinais clínicos de otite. Estes nematoides foram cultivados em placas de ágar sangue bovino desfibrinado 5%. Realizou-se o sequenciamento de fragmentos da expansão D2/D3 do 28S rDNA, utilizando-se a tecnologia do código de barras do DNA e análise filogenética do material obtido. As análises moleculares identificaram os espécimes estudados como *Metarhabditis blumi*, uma vez que o fragmento sequenciado apresentou alto grau de homologia com um isolado dessa espécie depositado no GenBank com acesso número EU195965.1. A árvore filogenética com as demais populações do gênero *Metarhabditis* confirmou o agrupamento da população brasileira como *M. blumi*. Foram realizadas análises morfológicas e morfométricas dos espécimes de nematoides das mesmas populações, utilizando-se microscopia de luz e eletrônica de varredura. De acordo com os estudos taxonômicos dos parasitos isolados, foram identificados nematoides das espécies *M. costai* e *M. freitasi*. Nas amostras estudadas não foram encontrados espécimes com características morfológicas e morfométricas que se assemelhassem à descrição da espécie *M. blumi*.

Palavras chaves: Nematoides; código de barras do DNA; 28S rDNA, morfologia; morfometria.

ABSTRACT

*The aim of this study was to identify the nematode parasite associated with otitis in two cattle herds Gyr in the state of Minas Gerais. Specimens of nematodes were isolated from ear secretion of cows with clinical signs of otitis. These nematodes were cultured on bovine defibrinated blood agar plates 5%. The sequencing fragments of D2 / D3 28S rDNA expansion was performed using the technology of the DNA barcode and phylogenetic analysis of the material obtained. Molecular analysis have identified the species as *Metarhabditis blumi*, since the sequenced fragment showed a high degree of similarity with a single element of this species deposited in GenBank under access number EU195965.1. The phylogenetic tree with the other populations of *Metarhabditis* gender confirmed the grouping of the brasilian population as *M. Blumi*. Morphological and morphometric analyzes of nematode specimens of the same populations were performed using light microscopy and scanning electron microscopy. According to the taxonomic studies of isolated parasites, nematode species *M. costai* and *M. freitasi* were identified. Specimens with morphological and morphometric characteristics similar to the description of the species *M. blumi* were not found in the samples.*

Keywords: Nematodes; DNA barcode; 28S rRNA, morphology; morphometry.

I.1 INTRODUÇÃO

A otite externa desencadeada por nematoides rhabditiformes está presente na maioria dos rebanhos da raça Gir, com altos índices de prevalência. Ela é economicamente importante devido às lesões que acarreta nos animais e deve ser encarada como problema sanitário em países de clima tropical. Os animais adultos são mais susceptíveis à infecção e em geral o quadro clínico se agrava com a idade. Os nematoides são específicos de bovinos de orelha longa e pertencem à família Rhabditidae. Em países da África os casos de otite foram creditados às espécies *Rhabditis bovis* e *M. blumi*. No Brasil, Martins Jr. (1985), após coletar amostras da secreção auricular de bovinos com sinais clínicos de otite, fez a primeira descrição das duas espécies do gênero *Rhabditis* responsáveis pela doença no país: *R. freitasi* e *R. costai*. Não há registros posteriores na literatura sobre estudos de identificação das espécies de nematoides encontrados no canal auditivo de bovinos com otite. Provavelmente a limitação está relacionada ao tamanho diminuto do parasito, bem como ao vasto número de representantes na família Rhabditidae restringido as citações à categoria de gênero.

A identificação taxonômica dos nematoides é feita, tradicionalmente, pela análise minuciosa de características morfológicas e da morfometria dos espécimes adultos, machos e fêmeas, ao microscópio de luz (ML). A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido bastante utilizada para elucidar algumas estruturas externas contribuindo para o diagnóstico específico. Para tanto é necessário o conhecimento dos caracteres utilizados nas chaves de identificação além da correta coleta, fixação e preservação do parasito para a análise das estruturas.

Devido à crescente disponibilidade de metodologias para o conhecimento sobre o genoma de organismos, tem-se observado um vasto número de publicações utilizando as técnicas moleculares para identificação de espécies parasitárias. Atualmente, as análises de regiões específicas do DNA são consideradas de fácil realização, rápidas, de custo relativamente baixo e com resultados confiáveis. Deve ser salientado, que todos os estádios de desenvolvimento do parasito, incluindo os ovos, podem ser utilizados para a determinação específica. E ainda, algumas técnicas moleculares permitem a identificação de cada uma das espécies presentes em uma amostra mista.

As opções disponíveis para a identificação das espécies possuem vantagens e desvantagens, portanto, a melhor alternativa é correlacionar os resultados das análises morfológicas e moleculares, utilizando o conceito de taxonomia integrada, para a obtenção de resultados mais confiáveis.

Devido à escassez de pesquisas a respeito dos nematoides associados pela otite bovina pretendeu-se contribuir para o conhecimento das espécies envolvidas, por meio de estudos morfométricos, morfológicos e tecnologia de código de barras do DNA para os estudos moleculares. Ao final das análises, fez-se a correlação dos resultados, utilizando-se o conceito de taxonomia integrativa.

I.2 OBJETIVOS

- Coletar e isolar os nematoides em cultura de Ágar sangue
- Coletar e fixar nematoides para estudos de microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e estudos moleculares;
- Diagnosticar por estudos de morfologia e morfometria os nematoides encontrados nas amostras coletadas em conduto auditivo de bovinos com otite parasitária;

- Diagnosticar, por meio da técnica de código de barras do DNA, as espécies de nematoide encontradas em bovinos naturalmente infestados;
- Caracterizar a ultraestrutura de superfície dos nematoides utilizando a microscopia eletrônica de varredura;
- Correlacionar os resultados das análises moleculares e morfológicas, utilizando o conceito de taxonomia integrativa, para identificar as espécies de nematoides.

I.3 REVISÃO DE LITERATURA

O primeiro relato de otite parasitária em bovinos da raça Gir no Brasil foi feito por Martins Jr. *et al.* (1971). A doença é causada por nematoides da família Rhabditidae e os animais podem apresentar sinais clínicos que vão de leves a muito graves, especialmente os adultos (Leite *et al.*, 1993; Leite *et al.*, 2012). A inflamação local e a presença de secreção auricular de cor amarela com aspecto fluido é característica com presença de inúmeros parasitos (Duarte e Hamdan, 2004). Vieira *et al.* (2001), relataram consideráveis prejuízos econômicos devido aos gastos com medicamentos, diminuição dos índices produtivos, desvalorização comercial e morte de animais em decorrência da otite crônica. A doença é amplamente disseminada nos rebanhos Gir, com relatos nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Goiás, Paraíba e Distrito Federal (Leite *et al.*, 1993; Vieira *et al.*, 1998, Brito *et al.*, 2005, Abdalla *et al.*, 2008 e Leite *et al.*, 2013). As taxas de prevalência encontradas pelos autores variam entre 52,2% e 100%.

As ações terapêuticas comumente praticadas para o controle da otite associada a nematoides têm se mostrado insuficientes (Leite *et al.*, 2012). Segundo Duarte e Hamdan (2004), isso se deve ao desconhecimento de certos aspectos relacionados ao agente etiológico da doença e às interações parasito-hospedeiro. Alguns autores defendem que os representantes da família Rhabditidae, essencialmente de vida livre, estariam em pré-adaptação ao parasitismo (Campos *et al.*, 2002). Desse modo apresentariam o ciclo biológico dividido em duas fases distintas, uma pré-parasitária, que ocorreria no meio ambiente, e outra parasitária (Park *et al.*, 2012). Estudos realizados por Jibbo (1966) corroboram esta hipótese e sugeriram que *R. bovis*, considerado o agente etiológico da otite parasitária de bovinos na Tanzânia, passaria parte do seu ciclo no solo. O mesmo parece acontecer com a espécie *M. blumi*, que foi isolada de amostra de solo e descrita por Sudhaus (1979) e posteriormente citada por Msolla *et al.* (1993) como responsável pela otite parasitária em bovinos de orelhas longas. Os nematoides isolados do CAE de bovinos são cultivados facilmente em laboratório e o ciclo biológico *in vitro* já foi determinado (Vieira *et al.*, 1998). Contudo, não foram encontrados estudos que descrevessem o ciclo em condições naturais, no solo ou no hospedeiro. Outra característica deste nematoide que tem acarretado muitas dúvidas está relacionada ao mecanismo de infecção dos hospedeiros. Alguns estudos atribuem à ácaros e à moscas a tarefa de iniciar a infecção (Odongo e D'Souza, 1989, Vieira *et al.* (1998). Outros consideram que os próprios bovinos levariam o nematoide as orelhas ao coça-las com as patas sujas de terra contaminada com o parasita (Duarte e Hamdan, 2004). Devido ao grande número de questões ainda pouco esclarecidas a respeito dos nematoides associados à otite parasitária dos bovinos, Silvestre e Humbert (2000) sugeriram que a identificação precisa das espécies dos parasitos é questão fundamental na obtenção de informações básicas que auxiliarão no estabelecimento de programas preventivos e de tratamento.

Os primeiros relatos de otite parasitária relacionada à nematoides em bovinos, tanto na África quanto no Brasil, creditaram a doença a espécies do gênero *Rhabditis*. Jibbo (1966) citou a espécie *R. bovis*. Msolla *et al.* (1993), por sua vez, atribuíram a otite à espécie *R. blumi* e Martins Jr. (1985) descreveu duas espécies parasitando o CAE de bovinos zebuinos da raça Gir, *R. costai* e *R. freitasi*. A classificação taxonômica das espécies permaneceu inalterada até Sudhaus (2011)

realizar uma revisão nos representantes da família Rhabditidae e transferir as espécies *R. blumi*, *R. costai* e *R. freitasi* para o gênero *Metarhabditis*. Desta maneira, a partir do estudo deste autor, todas as espécies de nematoides que até então eram relacionadas à otite de bovinos passaram a pertencer ao gênero *Metarhabditis*. Todos os representantes deste gênero compartilham semelhanças no aparato bucal, no posicionamento do colar esofágico e do anel nervoso, no formato e dimensões do corpo, no número de papilas e no formato e comprimento dos espículos.

Espécies dos gêneros *Rhabditis* e *Metarhabditis* podem ser encontradas em associação saprófita com vegetais e invertebrados ou como parasitos facultativos de animais e de seres humanos (Park *et al.*, 2012).

A família Rhabditidae possui cerca de 360 espécies conhecidas e encontradas em habitats bastante variados (Sudhaus, 2010). O gênero *Rhabditis* (Dujardin, 1845) é classificado na superfamília Rhabditoidea, família Rhabditidae (Oerley, 1880) e subfamília Rhabditinae (Oerley, 1880) Micoletzky, 1922. Este gênero comporta dezenas de espécies, que, no entanto, ainda não foram completamente identificadas e descritas (Park *et al.*, 2012). No caso da parasitose auricular de bovinos, a maioria das publicações tem se restringido a descrição do parasito apenas ao nível de gênero. Recentemente, Sudhaus (2011) em uma revisão da família Rhabditidae, considerou sete espécies como pertencentes ao gênero *Metarhabditis* (Tahseen *et al.*, 2004). Assim, as seguintes espécies passaram a fazer parte deste gênero: *M. andrassyana* (Tahseen *et al.*, 2004); *M. adenobia* (Poinar, 1971) Sudhaus, 2011; *M. amsactae* (Ali *et al.*, 2011) Sudhaus, 2011; *M. blumi* (Sudhaus, 1974) Sudhaus, 2011; *M. costai* (Martins Jr., 1985) Sudhaus, 2011; *M. freitasi* (Martins Jr., 1985) Sudhaus, 2011 e *M. rainai* (Carta e Osbrink, 2005) Sudhaus, 2011.

As espécies do gênero *Rhabditis* possuem corpo fusiforme e cilíndrico com comprimento variando entre 0,5 a 2,9 mm. A cutícula pode ser lisa ou anelada observando-se finas estriações. Os lábios são pouco desenvolvidos, fechados ou fortemente separados, e com presença de pequena papila labial. Na extremidade anterior é observado um estoma dividido em cinco partes, um longo esôfago terminando em um bulbo e anel nervoso presente. O poro excretor situado ao nível da junção do istmo com o bulbo. A fêmea apresenta a vulva próximo à metade do corpo. Machos com espículos livres e simples com presença de oito pares de papilas genitais e cauda cônica em ambos os sexos (Andrássy, 1983; Sudhaus, 2010). O gênero *Metarhabditis*, proposto por Tahseen *et al.* (2004), tem características bem semelhante ao anterior. Para diferenciar seus espécimes dos demais da família Rhabditidae, Sudhaus (2011) destacou que eles possuem corpo delgado e ventralmente curvado, com estriações transversais e longitudinais na cutícula. A abertura oral é rodeada por três lábios, cada um deles apresentando uma ligeira depressão mediana. O estoma, estreito, alongado e tubular, tem metade do seu comprimento coberto pelo colar esofágico. No metastoma é possível visualizar pequenos denticulos ao redor do aparato glotóide. As fêmeas são didelfas e no longo útero é possível visualizar ovos embrionados. Também são encontradas fêmeas dioicas e hermafroditas. A vagina tem a parede espessada na região proximal e lábios salientes projetando-se para o exterior. A cauda longa tem formato conóide e termina em ponta fina. Na região posterior dos machos é bastante evidente a bursa do tipo leptoderana com oito pares de papilas genitais. Dois fasmídeos tubulares estão localizados logo após o último par de papilas. Os espículos são robustos e não fundidos na porção distal, mas com uma conexão transversal na base. A cauda é cônica e apresenta um pequeno ponto na região terminal.

A identificação taxonômica tradicional necessita de análises minuciosas das características morfológicas e da morfometria dos indivíduos (Consoli *et al.*, 2012). Nos estudos de microscopia de luz (ML) são medidos o comprimento e largura total do corpo, do esôfago, do estoma, da cauda, dos espículos, do gubernáculo, da distância da vulva à cauda, dos ovos, dentre outras

estruturas. São examinados e medidos pelo menos 10 machos e 10 fêmeas para os cálculos dos valores da razão de De Man (De Man, 1876): a = comprimento total do corpo/maior diâmetro do corpo; b = comprimento total do corpo/distância da extremidade anterior até o esôfago, c = comprimento do corpo/comprimento da cauda e V = percentual da razão entre a distância da vulva e o tamanho do corpo. Além disso, as características da bursa copuladora e a quantidade e distribuição das papilas são usadas para a diferenciação das espécies. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) possibilitam a melhor visualização das estruturas externas do corpo do nematoide e somadas às imagens feitas em ML, auxiliam na comparação e diferenciação entre nematoides (Oliveira *et al.*, 2011a). A identificação morfológica de nematoides demanda bastante tempo e é considerada de difícil execução devido ao tamanho reduzido dos espécimes, a grande variedade de espécies existentes e a dificuldade em encontrar na literatura estudos taxonômicos comparativos das espécies (McKeand, 1988; Floyd *et al.* 2002; Oliveira *et al.*, 2011b).

Como alternativa tem-se optado cada vez mais pela utilização de técnicas moleculares como auxiliares aos estudos taxonômicos (Floyd *et al.*, 2002). Elas são consideradas bastante eficientes na identificação de inúmeras espécies de nematoides (Powers *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2009) e permitem a identificação específica de todos os estádios de desenvolvimento. Além disso, nematoides com deformações ou fragmentos, cuja identificação morfológica é dificultada, podem ser caracterizados com o uso de técnicas moleculares (Silvestre e Humbert, 2000). Nas identificações moleculares são utilizadas técnicas de replicação do DNA ribossomal ou do genoma mitocondrial com o auxílio da reação em cadeia da polimerase (PCR) tradicional ou de suas variações. Existem aquelas que estudam o polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD), o polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (PCR-RFLP) e aquela conhecida como Código de Barras do DNA, na qual realiza-se a reação de PCR convencional, com primers universais. Esta última tem sido utilizada rotineiramente, em especial para identificação de nematoides de interesse fitossanitário. Suas principais vantagens consistem na rapidez, simplicidade e no baixo custo do processo (Oliveira *et al.*, 2009). A tecnologia se baseia na variação existente em um pequeno fragmento do DNA mitocondrial ou ribossômico, o qual seria específico para cada espécie. As sequências de DNA provenientes da técnica são facilmente comparadas com as sequências de outras espécies depositadas no banco de dados genético (Powers, 2004). São inúmeras as utilidades do código de barras do DNA tornando-o uma importante ferramenta para os estudos taxonômicos e para os serviços oficiais de defesa animal e vegetal (Stoeckle *et al.*, 2005, Oliveira *et al.*, 2009).

I.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os nematoides analisados neste estudo foram obtidos diretamente da secreção auricular de bovinos da raça Gir com otite parasitária ou após serem cultivados *in vitro* no laboratório de parasitoses do departamento de medicina veterinária preventiva da EV UFMG. Os bovinos pertenciam às propriedades localizadas no município de Teófilo Otoni (fazenda 1) e no município de Itabira (fazenda 2). Foram analisados também os nematoides encontrados em uma amostra coletada do piso do brete no momento em que os bovinos estudados foram contidos para obtenção de amostras da secreção auricular.

Com o objetivo de comparar os indivíduos de uma espécie conhecida com os nematoides isolados neste estudo, solicitou-se espécimes da espécie *M. blumi*, cepa DF5010, ao *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC), localizado na Universidade de Minnesota - USA. A

amostra foi enviada pela transportadora Fedex, em placa de Petri contendo meio de cultura e acondicionada em embalagem própria.

I.4.1 *Data e local de coleta das amostras de nematoides*

Em dezembro de 2012, vinte e cinco fêmeas bovinas adultas da raça Gir pertencentes ao rebanho da fazenda 1, foram contidas em brete para inspeção do pavilhão auricular e da porção inicial do conduto auditivo externo (CAE). Cinco animais apresentaram sinais de otite parasitária, caracterizados pela presença de otorrêia de cor amarela clara, aspecto fluido e odor pútrido. Para confirmar a presença de nematoides, introduziu-se uma zaragatoa estéril na porção inicial do CAE de uma das orelhas de cada animal, em movimentos circulares, como preconizado por Leite *et al.* (1994). Em seguida as zaragatoas foram colocadas, individualmente, em tubos transparentes, que foram mantidos por 5 minutos à luz solar direta para visualização dos nematoides. Após a confirmação macroscópica da presença dos parasitos, os tubos foram identificados individualmente e transportados em caixas de isopor à temperatura ambiente ao laboratório de parasitoses. Espécimes foram isolados destas amostras e repicados em meio de cultura ágar sangue dando origem à população Fz1.

Em janeiro de 2013, na fazenda 2, quando se iniciou o protocolo de controle da otite parasitária descrito no capítulo III, foram coletadas amostras da secreção auricular de três vacas da raça Gir com sinais clínicos de otite parasitária. As amostras foram coletadas conforme descrito no parágrafo anterior e identificadas como Fz2-Gama, Fz2-737, Fz2-FGVI2. Nesta ocasião todos os animais do rebanho passaram por diagnóstico parasitológico utilizando-se o método do lavado auricular. Após a passagem de todos os animais pelo brete, verificou-se que parte do líquido resultante do procedimento havia caído no piso. Com o auxílio de uma zaragatoa, coletou-se uma amostra deste líquido, a qual foi identificada como amostra Fz2-Piso. As quatro amostras foram transportadas em caixas de isopor à temperatura ambiente ao laboratório, onde foram cultivadas separadamente.

Em fevereiro de 2014, foram realizadas coletas em quatro vacas com otite parasitária, na fazenda 2. As amostras obtidas foram enviadas ao laboratório onde foram feitas culturas individuais de fêmeas grávidas, isoladas aleatoriamente de cada amostra.

Em junho de 2014, foram realizadas novas coletas no CAE dos mesmos animais dessa fazenda para isolamento de nematoides para as análises morfológicas.

I.4.2 *Cultivo dos nematoides*

Para a separação dos nematoides foi utilizada a técnica de Baermann e Moraes modificada (Moraes, 1948). Cada zaragatoa foi colocada sob uma gaze em funil por um período de seis horas. Após este período o tubo acoplado foi retirado vertido em placa de Petri e observado em microscópio estereoscópico. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, cerca de 30 espécimes, de ambos os sexos, de cada uma das cinco populações foram colocados em placas individuais, contendo ágar sangue bovino desfibrinado 5% (Figura I.1 A). As placas, após identificação, foram mantidas em câmara úmida à temperatura ambiente (Figura I.1 B).

As cinco populações obtidas nas fazendas 1 e 2 em dezembro de 2012 e janeiro de 2013 (Fz1, Fz2-Gama, Fz2-737, Fz2-FGVI2 e Fz2-Piso) foram mantidas em cultivo no laboratório de parasitoses da EV UFMG como populações estoque.

I.4.2.1 *Protocolo de cultivo de fêmeas de nematoides grávidas*

As amostras de secreção auricular, coletadas em fevereiro de 2014, foram coletadas de quatro vacas com otite clínica. Cada uma delas foi considerada como uma população e identificada com a letra inicial do nome de cada animal (F, I, G e B). No laboratório de parasitoses, os nematoides coletados pela técnica de Baermann e Moraes modificada (Moraes, 1948), foram observados em microscópio estereoscópico (Figura I.1 C, D e E). Com o auxílio de um estilete, foram selecionadas 20 fêmeas grávidas, uma a uma, totalizando 80 fêmeas (Figura I.1 F). Elas foram colocadas, individualmente, em placas de cultivo de células de seis poços, contendo ágar-ágar 0,5% ao qual foi adicionado sangue bovino desfibrinado (Figura I.1 G). Cada poço foi identificado com a letra de identificação da população e numerado de 1 a 20 (ex.: G19, referindo-se à 19ª fêmea isolada da amostra de secreção auricular da vaca G). As placas foram envoltas em filme de PVC para manter os compartimentos isolados e mantidas em estufa à temperatura de 36°C durante sete dias (Figura I.1 H). Diariamente substituiu-se o filme de PVC para permitir a aeração das culturas. Decorrido o período de cultivo, com o auxílio do microscópio estereoscópico, avaliou-se o desenvolvimento dos nematoides e constatou-se que do total de 80 fêmeas grávidas, 78 completaram o ciclo. Posteriormente, de cada cultura, foram selecionados dois espécimes adultos, um macho e uma fêmea, totalizando 156 amostras. Os espécimes foram transferidos, individualmente, para microtubos tipo Eppendorf contendo solução salina, identificados com a letra da população, com o número da fêmea grávida que o originou e com o sexo do espécime (ex.: G53F) e enviados ao laboratório de genética da EV UFMG, para as análises moleculares. A mesma quantidade de espécimes, machos e fêmeas, foram selecionados para os estudos morfológicos e morfométricos e para as imagens em MEV, realizados no laboratório de helmintologia da UERJ.

1.4.3 Locais de realização das análises moleculares e dos estudos morfométricos e morfológicos

Os estudos morfológicos e morfométricos dos nematoides coletados nas duas fazendas foram realizados sob a forma de colaboração entre o laboratório de parasitoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EV UFMG e o laboratório de helmintologia Romero Lacasas Porto do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UERJ, Rio de Janeiro - RJ.

1.4.4 Fixação dos nematoides

Os espécimes de nematoides selecionados diretamente da secreção auricular e dos cultivos em meio de cultura foram fixados quimicamente por imersão em solução de AFA (álcool 95%, formaldeído 3% e ácido acético 2%), a quente (80°C) ou em solução de Karnovsk (glutaraldeído 2,5%, formaldeído recém preparado a 4% em tampão de Cacodilato de Sódio 0,1M, pH 7,2).

Os indivíduos da espécie *M. blumi*, proveniente do CGC, foram fixados em solução de Karnovsk.

1.4.5 Preparo e envio das amostras para as análises moleculares e morfológicas

De cada uma das populações estoque mantidas no laboratório de parasitoses (Fz1, Fz2-Gama, Fz2-737, Fz2-FGVI2 e Fz2-Piso), selecionou-se, aleatoriamente, cerca de 200 espécimes de nematoide, os quais foram colocados individualmente em tubos de microcentrifuga, contendo solução de NaCl 1M. Em seguida foram enviados, via Sedex, em caixa de isopor à temperatura ambiente, ao laboratório de Nematologia do Instituto Biológico, onde foram realizadas as primeiras análises moleculares.

De cada população estoque, selecionou-se outros 100 espécimes (50 já fixados e 50 espécimes vivos, mantidos em frascos contendo meio de cultura) que foram enviados ao laboratório de helmintologia da UERJ. Estes últimos, tão logo chegaram ao laboratório, foram fixados em solução de Karnovsk.

Todos os espécimes de nematoides selecionados das culturas das fêmeas grávidas e das amostras coletadas em julho de 2014 na fazenda 2, foram fixados quimicamente. A metade dos espécimes foram fixados em solução de AFA e a outra metade em solução de Karnovsk. Todas as amostras foram enviadas ao laboratório de helmintologia da UERJ, via Sedex, em caixas de isopor, em temperatura ambiente, acondicionadas em tubos tipo Eppendorf identificados.

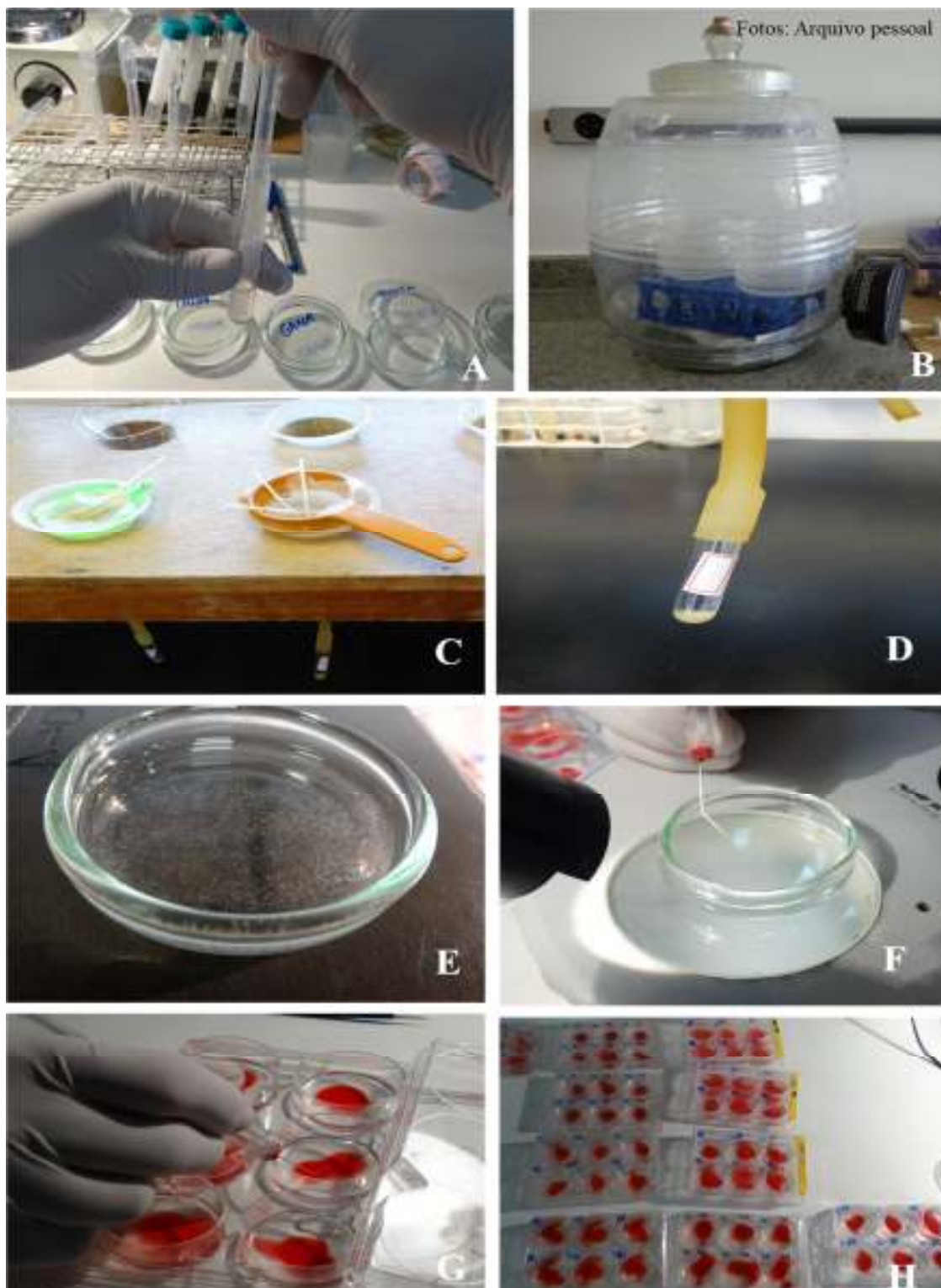


Figura 1.1 Isolamento dos nematoides das amostras de secreção auricular coletadas nas fazendas 1 e 2 (A). Cultivo das populações de nematoides coletados nas fazendas 1 e 2 em câmara úmida à temperatura ambiente (B). Filtro de Baermann (C), tubo coletor contendo nematoides no fundo (D), placa de Petri contendo os nematoides isolados (E), coleta dos nematoides com o auxílio do estilete (F). Cultivos individuais de fêmeas grávidas em placas contendo ágar-ágar 0,5% e sangue bovino desfibrinado (G e H).

1.4.6 Análises moleculares

Os estudos moleculares dos nematoides coletados nas duas fazendas foram realizados sob a forma de colaboração entre o laboratório de Parasitoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EV UFMG, o laboratório de Nematologia do Instituto Biológico, Campinas - SP e o laboratório de Genética da EV UFMG, Belo Horizonte - MG. As duas análises foram realizadas de maneira independente, utilizando-se a mesma tecnologia do código de barras do DNA, de acordo com Oliveira *et al.* (2009). As análises filogenéticas ficaram sob a responsabilidade do laboratório de Nematologia. Os espécimes analisados foram selecionados das cinco populações mantidas em cultura no laboratório de parasitoses da EV UFMG. Os espécimes provenientes das culturas das fêmeas grávidas foram analisados apenas no laboratório de genética.

1.4.6.1 Instituto Biológico (Campinas - SP)

1.4.6.1.1 Aplicação da tecnologia do código de barras do DNA

No laboratório de Nematologia do Instituto Biológico, dos 200 espécimes enviados, foram analisados ao acaso dois espécimes de cada uma das amostras Fz1, Fz2-Gama, Fz2-737 e Fz2-FGVI2 e quatro espécimes da amostra denominada Fz2-Piso para a extração do DNA, totalizando 12 espécimes.

Extração do DNA: Para a extração do DNA genômico foi utilizado o método da proteinase-K (WLB: Worm Lysis Buffer), segundo Williams *et al.* (1994). Cada espécime foi colocado em tubo de microcentrifuga contendo uma gota de 15 μ L WLB e incubado a 20 °C negativos por 15 min. Posteriormente, os tubos foram incubados a 60°C por 1 hora, 95°C por 15 minutos e resfriados a 4°C.

Reação de PCR: Para a reação de PCR, foi utilizado o *kit* de PCR *Go Taq[®] Hot Start Green Master Mix*, fabricante Promega Corporation – São Paulo/SP. Para início, em um tubo de microcentrifuga de 0,2 mL, foi adicionado 12,5 μ L do *Go Taq[®]*, 10 μ L de NFW (Nuclease Free Water), 1 μ L do primer D2 (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3'), 1 μ L do primer D3 (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3') (Al-Banna *et al.*, 2004) e 0,5 μ L de DNA genômico, totalizando um volume final de 25 μ L. As condições de amplificação foram 94°C por 4 minutos (1 ciclo), 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55 °C por 1,5 minuto, 72°C por 2 minutos, seguido por extensão final a 72°C por 10 minutos. Após a amplificação do DNA, 5 μ L do produto da PCR foram utilizados para eletroforese, em tampão 1X TBE (Sambrook *et al.*, 1989), em gel de agarose, a 1%, corado com brometo de etídio (0,02 μ g/mL), visualizado em um transiluminador de luz UV e fotografado.

Sequenciamento e identificação: O sequenciamento dos fragmentos amplificados da expansão D2/D3 foi realizado utilizando o *kit* Big Dye Terminator, fabricante Applied Biosystems - São Paulo/SP e foram realizados no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, SP.

Para cada reação, foi preparada uma mistura contendo 2 μ L de reagente Big Dye, 3,2 μ M do *primer* para o sentido anverso ou para o sentido reverso, 3,0 μ L do produto previamente amplificado contendo aproximadamente 400 ng de DNA e 2,0 mL de água. A reação para sequenciamento foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante (Applied Biosystems). O produto amplificado foi purificado novamente, por precipitação, com isopropanol em microtubos. Após a desnaturação das amostras a 95°C por 3 minutos, foi realizada eletroforese em aparelho ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystem).

As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com auxílio do software BioEdit Sequence Alignment Editor. As sequências de *Metarhabditis* obtidas foram comparadas às sequências de outras espécies de nematoides depositadas no banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para a identificação de similaridade, utilizando-se o programa BLASTN 2.2.19+ (Zhang *et al.* 2000).

1.4.6.1.2 Análises filogenéticas

Para essa etapa, foi utilizado inicialmente o programa CLUTALX v. 1.81 (Thompson *et al.*, 1997), para criação dos alinhamentos múltiplos entre as diferentes sequências dos fragmentos da expansão D2/D3 da região 28S rDNA das diferentes populações analisadas. Após o alinhamento, foi realizada uma edição manual através do programa GeneDoc (Nicholas *et al.*, 1997), onde as colunas filogeneticamente não informativas foram excluídas das análises. As análises filogenéticas foram realizadas com o programa TREE-PUZZLE (Strimmer e Von Haeseler, 1996) e com os aplicativos do programa PHYLIP v.3.6^a, sub-rotina DNAML (Felsenstein e Churchill, 1996). O programa TREE-PUZZLE estimou os seguintes parâmetros: taxa esperada de transição/transversão (Ts/Tv) e o parâmetro alfa associado à distribuição gama. O modelo original de substituição selecionado para as análises filogenéticas foi o F84 + G+I, de acordo com o programa DNAML, dentro do pacote PHYLIP. A espécie *Oscheius myriophila* foi selecionada como grupo externo. A árvore filogenética de máxima verossimilhança foi estimada com o aplicativo PHYLIP DNAML, sendo que as análises de bootstrap foram feitas a partir de 1000 repetições, utilizando-se os aplicativos PHYLIP SEQBOOT e CONSENSE.

1.4.6.2 Laboratório de genética da EV UFMG

Nesta etapa do estudo foram analisados outros 121 espécimes de nematoides, sendo 38, escolhidos ao acaso, nas cinco populações estoque mantidas em cultura no laboratório de parasitoses e 83 selecionados nas culturas das fêmeas grávidas isoladas.

Extração de DNA: Extraíu-se o DNA genômico utilizando-se o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989) modificado: utilizou-se o tampão de digestão (Tris HCl 10 mM, EDTA 0,5 mM, NaCl 5M, SDS 2% e DTT 0,65M) e proteinase K. Em seguida adicionou-se fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v) e precipitou-se o DNA obtido com acetato de sódio 3M e etanol 100%. O pellet foi então lavado com etanol 70% e re-suspendido em tampão Tris-EDTA. As amostras foram incubadas, overnight, a -4°C e, em seguida, a 56°C por 30 minutos. A avaliação da concentração e da pureza (razão absorvância A260/A280) do DNA extraído foi realizada por meio de espectrofotômetro NanoDrop. As amostras que possuíam o resultado da razão 260/280, superior a 1,80, foram consideradas puras. A integridade do DNA foi analisada por meio da realização de eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TBE 1X. As amostras de DNA foram armazenadas em freezer a -20°C.

Reação de PCR: Para a reação de PCR, foi utilizado o kit de PCR Go Taq[®] Hot Start Green Master Mix, fabricante Promega Corporation – São Paulo/SP. Em um tubo de microcentrifuga de 0,2 mL, foi adicionado 12,5 µL do Go Taq[®], com brometo de etídio (0,02 µg/mL) foi visualizado em um transiluminador de luz UV e fotografado. A região do gene nuclear de RNA ribossomal de 28S foi amplificada utilizando os primers D2F (5' – ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG – 3') e D2R (5' - TCGGAGGGAACCAGCTACTA – 3') (adaptado de Tomazini *et al.*, 2012). A PCR de 25µL foi feita utilizando-se 10,5 µL de água ultrapura, 6,25 µL de tampão 5x Colorless Go Taq Flexi (Promega, USA), 2,5 µL de MgCl₂ 25 mM (Promega, USA), 0,25 µL de cada primer (10 µM), 2,5 µL de cada dNTP (1 mM), 0,25 µL de DNA Polimerase GoTaq Hot Start (Promega)

(5 U/ μ L) e 2,5 μ L de DNA molde (50–100 ng/ μ L). As condições da PCR no termociclador automático (Veriti– Life Technologies, USA) foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 7 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 60 s, anelamento a 55°C por 60 s e extensão a 72°C por 60 s, com uma etapa final de alongamento a 72°C por 10 min (adaptado de Mràèek, 2006).

Sequenciamento e identificação: Os produtos de PCR (5 μ L) foram visualizados em géis de agarose e selecionados para o sequenciamento. As sequências foram determinadas bi-direcionalmente para pelo menos dois diferentes amplicons utilizando o kit BigDyeTerminator v.3.1 Cycle Sequencing no sequenciador automático de DNA ABI 3130 (ambos de Life Technologies, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As sequências senso e anti-senso foram alinhadas e editadas usando o software SeqScape (LifeTechnologies). Estas também foram alinhadas e comparadas utilizando o software MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Foram realizadas buscas no GenBank™ para identificar a similaridade das sequências depositadas no site do National Center for Biotechnology Information utilizando o servidor de rede BLAST.

1.4.7 Análises morfológicas e morfométricas

1.4.7.1 Montagem de lâminas e morfometria em microscopia de luz (ML)

Para as análises morfométrica e morfológica os nematoides, previamente fixados, foram diafanizados em lactofenol de Amann e montados entre lâmina e lamínula para observação em microscópio ótico Zeiss Standart 20, acoplado a uma câmara clara. Os desenhos foram realizados neste equipamento, escaneados e posteriormente vetorizados utilizando-se o software Corel Draw 5.0. As imagens foram capturadas pelo sistema de digitalização de imagens (Olympus DP-030) acoplado ao microscópio de luz Olympus BX-51.

Foram analisados nos espécimes de ambos os sexos comprimento total do corpo; largura do corpo (região média); comprimento e largura do estoma; comprimento do esôfago e comprimento da cauda. Nos espécimes machos analisaram-se os comprimentos do espículo esquerdo, do espículo direito e do gubernáculo. Com os dados acima foram calculados os valores clássicos de De Man (De Man, 1876, Cobb, 1914 e Thorne, 1949): **a** (relação entre o comprimento do corpo e a maior largura do corpo), **b** (relação entre o comprimento do corpo e a distância da extremidade anterior até a válvula esofágica-intestinal), **c** (relação entre o comprimento do corpo e o comprimento da cauda) para todos os espécimes. Nas fêmeas calculou-se ainda o **V**, que é a distância da vulva até a extremidade anterior em relação ao tamanho do corpo, representado em percentual. Posteriormente, com os resultados obtidos, calculou-se a média, o desvio padrão e a amplitude máxima de cada uma das características.

Utilizou-se as chaves de identificação e os estudos de Andrassy (1983), Sudhaus (1974), Martins Jr. (1985), Carta e Osbrink (2005) Sudhaus (2011) e Asif *et al.* (2013) para a comparação entre espécies estudadas.

1.4.7.2 Morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para as imagens por MEV convencional, os nematoides, já fixados em solução de Karnovsk, foram lavados em PBS e posteriormente fixados em lamínulas recobertas com gelatina 1% (Sigma - Porcine Skin). Em seguida realizou-se a pós-fixação em tetróxido de ósmio (OsO₄) 1%, ferrocianeto de potássio (K₄ [Fe(CN)₆]) 0,8% e cloreto de cálcio (CaCl₂) 5 mM em água destilada por 40 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água destilada, desidratadas em série crescente de etanol (30%-100%) por 30 minutos em cada

etapa e secadas pelo método de ponto crítico em CO₂ líquido. Finalmente as lamínulas foram coladas com a utilização de fita adesiva impregnada com carbono em suportes metálicos. As amostras secas, depois de montadas, foram recobertas com uma camada de aproximadamente 15nm de espessura de ouro por 30 segundos e analisadas no MEV convencional FEI Quanta 250 operados à 20 kV.

I.5 RESULTADOS

I.5.1 Análises moleculares para identificação dos nematoides

I.5.1.1 Instituto Biológico

Nos estudos moleculares realizados nesta etapa do presente trabalho, a amplificação e o sequenciamento da expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA das cinco populações analisadas, forneceu duas sequências, uma no sentido anverso e outra no sentido reverso. Após o alinhamento das sequências, obteve-se uma sequência consenso com 531 pares de bases (pb). As cinco sequências deste fragmento de rDNA obtidas das populações de Minas Gerais foram idênticas entre si e também à sequência do mesmo fragmento da cultura DF5010 da espécie *Metarhabditis blumi* depositada no GenBank (acesso número EU195965.1), considerando *e-value* 0,0 e similaridade de 100% (Tabela I.1). De acordo com estes resultados, concluiu-se que todas os espécimes estudados pertenciam à espécie *M. blumi* (Sudhaus, 1985) Sudhaus 2011. As sequências das populações analisadas neste estudo foram depositadas no GenBank e receberam os códigos de acesso números KM233152-KM233156.

Na tabela I.1 estão detalhados os resultados da comparação das sequências da expansão D2/D3 da região 28S do rDNA das cinco populações de nematoides estudadas com as sequências de espécies de nematoides depositadas no Genbank.

Tabela I.1 Comparação da sequência da expansão D2/D3 da região 28S do rDNA da população Fz1 de *Metarhabditis blumi* proveniente de Teófilo Otoni, MG e das populações *Fz2Gama*, *Fz2737*, *Fz2FGVI2* e *Fz2Piso*, provenientes de Itabira, MG, com as sequências de espécies de nematoides depositadas no banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Espécie	% de identidade	Código de acesso no Genbank
<i>Metarhabditis blumi</i> strain DF5010	100	EU195965.1
<i>Metarhabditis rainai</i> strain DF5091	82	EU195966.1
<i>Rhabditis</i> sp. Tumian-2007	80	EU273599.1
<i>Rhabditis</i> sp. Hy CM-2010	82	HM474859.1
<i>Rhabditis dolichura</i>	86	EF417150.1
<i>Rhabditis</i> sp. K CM-2010	81	HM474860.1
<i>Rhabditis</i> sp. BC7735	85	EU303298.1
<i>Rhabditis</i> sp. DF5059	85	EU195964.1
<i>Rhabditis terricola</i>	85	EF417152.1
<i>Rhabditis brassicae</i>	85	EU195963.1
<i>Rhabditis</i> sp. SB347	76	EU195960.1
<i>Rhabditis</i> sp. B CM-2010	84	HM474857.1
<i>Rhabditis nidrosiensis</i>	79	AM399067.1

Análise filogenética: Com o objetivo de se estudar a heterogeneidade e agrupamentos entre espécies do gênero *Metarhabditis*, foram incluídas no presente estudo filogenético as sequências da expansão D2/D3 da região 28S de várias espécies de *Metarhabditis* depositadas no GenBank, juntamente com as quatro populações de *M. blumi* provenientes do conduto auditivo de bovino (Fz1, Fz2Gama, Fz2737 e Fz2FGVI2) e daquela obtida da amostra coletada no piso do brete (Fz2Piso). No total foram 19 sequências analisadas.

Após o alinhamento, todas as sequências da expansão D2/D3 apresentaram-se no tamanho de 517pb, incluindo a sequência do *O. miryophilla*, utilizado como grupo externo. A partir do alinhamento das sequências de *Rhabditis* sp.e de *Metarhabditis* sp., produziu-se uma árvore filogenética (Figura I.2), onde verificou-se que todas as populações provenientes do conduto auditivo de bovino (Fz1, Fz2Gama, Fz2737 e Fz2FGVI2) ou do piso do brete (Fz2Piso) permaneceram no mesmo grupo que a espécie *M. blumi*, confirmando o agrupamento dos nematoides das amostras analisadas como *M. blumi*.

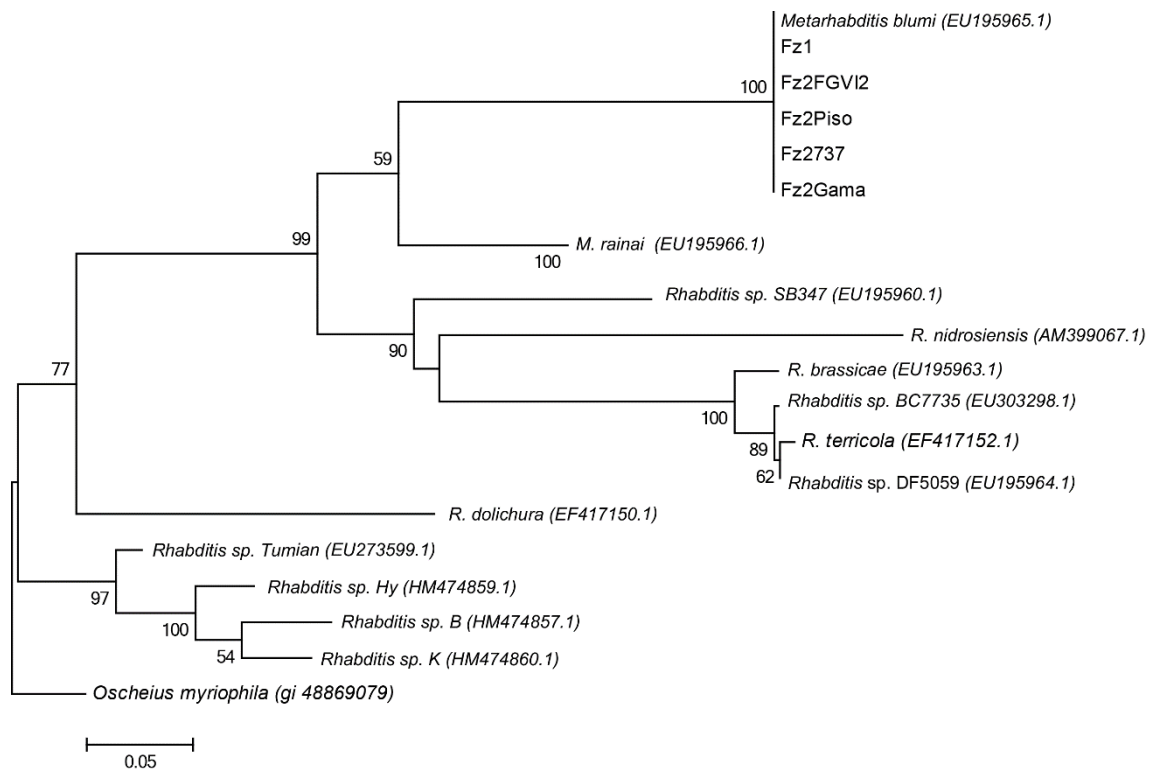


Figura I.2 Relação filogenética de espécies de *Metarhabditis* e de *Rhabditis* com a espécie *M. blumi* originárias do Brasil (Fz1, Fz2-Gama, Fz2-737, Fz2-FGVI2 e Fz2-Piso) e sua similaridade com populações obtidas do GenBank, baseada no alinhamento da sequência da região D2/D3 28S DNAr. A árvore filogenética de máxima verossimilhança foi estimada com o aplicativo PHYLIP DNAML. *Oscheius myriophila* foi utilizado como grupo externo.

I.5.1.2 Laboratório de genética da EV UFMG

Dos 38 espécimes analisados nesta etapa, obteve-se resultados da amplificação da expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA de 34 deles. Produziu-se sequências com homologia de 99% com a sequência de *M. blumi* depositada no GenBank (acesso número EU195965.1). Com esses resultados, concluiu-se que todos os espécimes destas amostras pertenciam à espécie *M. blumi* (Sudhaus, 1985) Sudhaus 2011.

Dos 83 espécimes originados das fêmeas grávidas analisados, obteve-se a sequência consenso de 54 deles. O tamanho médio das sequências da expansão D2/D3 obtidas após o alinhamento foi de 540pb. Ao serem comparadas com as sequências de outras espécies de nematoides depositadas no banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), apresentaram maior similaridade com a mesma sequência da espécie *M. blumi* citada acima, com valores variando entre 94 a 99% e cobertura entre 98 e 100%. Os resultados de cada amostra encontram-se detalhados na Tabela I.2.

Tabela I.2 Resultados da comparação das sequências dos 54 espécimes provenientes do cultivo de fêmeas grávidas, oriundas da secreção auricular de quatro vacas da fazenda 1, Ipatinga - MG com a sequência da espécie *M. blumi* depositada no GenBank (acesso número EU195965.1).

População	Amostra	Espécie	Cobertura	Identidade	Código de acesso
F	F3F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.35
	F4F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.10
	F9F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	98%	EU195965.11
	F9M	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	97%	EU195965.12
	F13F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.33
	F14F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.8
	F15F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.36
	F18F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.9
	F18M	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	98%	EU195965.34
I	I23F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.19
	I23M	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.20
	I25F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.21
	I25M	<i>Metarhabditis blumi</i>	99%	97%	EU195965.46
	I27F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	97%	EU195965.47
	I27M	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	98%	EU195965.22
	I28F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	98%	EU195965.48
	I30F	<i>Metarhabditis blumi</i>	98%	96%	EU195965.49
	I30M	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	98%	EU195965.50
	I33F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.51
	I35F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	97%	EU195965.52
	I36F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	98%	EU195965.53
	I36M	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.54
I37M	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	97%	EU195965.55	
G	G41F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	98%	EU195965.37
	G45F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.13
	G46F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	95%	EU195965.14
	G46M	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.38
	G53F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.39
	G54M	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.18
	G55M	<i>Metarhabditis blumi</i>	99%	99%	EU195965.45
	G56M	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	98%	EU195965.40
	G57F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	96%	EU195965.41
	G57M	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	98%	EU195965.42
	G58F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.16
	G58M	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.17
	G59M	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.43
B	G61F	<i>Metarhabditis blumi</i>	99%	98%	EU195965.44
	B62F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.23
	B64F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	94%	EU195965.24
	B64M	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	98%	EU195965.1
	B65F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.2
	B67F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.3
	B67M	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	97%	EU195965.25
	B70F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.4
	B71M	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.26
	B72M	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.27
	B74F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.28
	B74M	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	97%	EU195965.5
	B75F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.29
	B75M	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	97%	EU195965.30
	B76F	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.31
	B76M	<i>Metarhabditis blumi</i>	99%	94%	EU195965.6
	B77F	<i>Metarhabditis blumi</i>	98%	98%	EU195965.7
	B77M	<i>Metarhabditis blumi</i>	100%	99%	EU195965.32

I.5.2 Análises morfológicas para identificação específica

Nas amostras coletadas dos bovinos das fazendas 1 e 2, tanto nas cultivadas quanto nas a fresco, foram encontrados parasitos das espécies *M. freitasi* e *M. costai*, identificados neste estudo como MfMG2015 e McMG2015, respectivamente (Tabela I.3, I.4 e I.5). Foi encontrado também um outro nematoide do qual não foi possível concluir o diagnóstico diferencial e, portanto, será apenas citado neste estudo. O diagnóstico diferencial de fêmeas das duas espécies foi dificultado diante da grande semelhança existente entre os espécimes deste sexo. Apenas o material do cultivo das fêmeas grávidas permitiu a identificação de fêmeas da espécie *M. freitasi*. Diante da limitação, foram estudados exemplares machos das duas espécies por ML e MEV e as fêmeas apenas por ML.

Os resultados demonstraram que os parasitos coletados diretamente na secreção auricular dos animais eram morfológicamente semelhantes aos espécimes que foram cultivados no laboratório EV UFMG em meio de cultura ágar sangue. A identificação das espécies foi feita a partir do estudo de características morfológicas citadas em chaves de classificação utilizadas em publicações mencionadas na metodologia. Considerou-se mais um caractere taxonômico para os machos, baseado na relação entre o comprimento total da cauda e a largura do primeiro terço do tronco dorsal, como um parâmetro diferencial para as duas espécies já identificadas em relação à terceira que será estudada em pesquisa posterior. Apenas exemplares machos da espécie *M. blumi* da amostra importada do CGC foram analisados sob ML e MEV e os resultados obtidos foram comparados com os dados das espécies *M. costai* e *M. freitasi* identificadas neste estudo. Nas amostras estudadas não foram encontrados espécimes com características morfológicas que se assemelhassem à descrição da espécie *M. blumi*.

Os resultados das análises morfométricas dos nematoides machos coletados no CAE dos animais com sinais clínicos de otite e da espécie *M. blumi* obtidos na amostra importada do CGC, estão representados na Tabela I.3

As medidas das características morfológicas dos machos das duas espécies identificadas neste estudo e da espécie *M. blumi* (DF5010), cuja amostra foi enviada pelo CGC, estão detalhadas na Tabela I.4. Adicionou-se à estas, os dados das descrições das espécies *M. costai*, *M. freitasi* e *M. blumi*, publicadas por Sudhaus (1974), Martins Jr. (1985) e Carta e Osbrink (2005) para comparação.

Tabela I.3 Comparações das medidas das características anatômicas dos espécimes machos das espécies *Metarhabditis freitasi*, *M. costai* coletadas da secreção auricular de bovinos com otite parasitária nas fazendas 1 e 2, localizadas nos municípios de Teófilo Otoni e Itabira - MG e da *M. blumi* da cultura DF5010 mantida no CGC - USA. Todas as mensurações estão em μm e representadas pelas médias e desvio padrão, seguidas pelos intervalos obtidos (nos parêntesis).

Características (μm)	<i>M. costai</i>	<i>M. freitasi</i>	<i>M. blumi</i>
	Mc MG15 Machos n = 10	Mf MG15 Machos n = 10	DF5010* Machos n = 10
Comprimento total	1059,2 \pm 82,2 (993,7 - 1221,0)	971,2 \pm 87,0 (861,2 - 1070,0)	945,4 \pm 129,3 (725,6 - 1089,7)
Largura máxima	52,2 \pm 6,6 (43,5 - 63,5)	59,0 \pm 7,9 (51,3 - 74,2)	52,9 \pm 5,2 (43,6 - 63,8)
Estoma (Comprimento)	23,8 \pm 2,7 (19,0 - 27,2)	26,0 \pm 2,1 (24,3 - 30,6)	24,8 \pm 2,2 (22,4 - 27,6)
Estoma (Largura)	4,2 \pm 1,0 (3,2 - 5,6)	4,2 \pm 0,6 (3,2 - 5,0)	4,6 \pm 0,5 (3,6 - 5,2)
Esôfago SE	190,1 \pm 12,0 (183,1 - 213,7)	205,8 \pm 14,8 (172,6 - 215,3)	180,2 (138,3 - 205,1)
Esôfago T	214,7 \pm 12,3 (183,1 - 213,7)	231,8 \pm 15,9 (198,3 - 261,7)	206,8 \pm 20,6 (169,8 - 232,7)
Espículo esquerdo	38,9 \pm 4,6 (33,4 - 44,8)	40,6 \pm 2,7 (33,9 - 43,1)	43,4 \pm 2,7 (40,6 - 45,8)
Espículo direito	42,2 \pm 5,4 (34,7 - 50,6)	40,6 \pm 3,3 (32,8 - 44,7)	41,2 \pm 2,9 (37,6 - 45,5)
Espículos	40,4 \pm 4,8 (34,0 - 47,7)	-	41,8 \pm 2,5 (39,1 - 45,6)
Gubernáculo	26,2 \pm 0,3 (26,5 - 26,0)	24,6 \pm 2,5 (21,8 - 26,6)	28,8 \pm 3,5 (26,3 - 31,3)
Cauda	41,8 \pm 1,1 (40,5 - 43,7)	43,8 \pm 4,8 (37,6 - 48,9)	56,8 \pm 8,1 (40,0 - 70,0)
Cauda PB	1,4 \pm 0,2 (1,1 - 1,7)	7,8 \pm 1,5 (6,0 - 9,8)	15,3 \pm 2,1 (14,0 - 19,2)
Cauda/LTD	4,0 \pm 0,4 (3,8 - 4,5)	5,0 \pm 0,6 (4,5 - 5,6)	7,3 \pm 1,4 (4,5 - 8,3)
Razões de De Man a	20,4 \pm 1,3 (19,2 - 22,8)	16,7 \pm 3,0 (12,7 - 21,8)	17,9 \pm 1,8 (15,6 - 20,7)
Razões de De Man b	4,9 \pm 0,2 (4,7 - 5,1)	4,2 \pm 0,4 (3,6 - 4,8)	4,5 \pm 0,3 (4,1 - 5,0)
Razões de De Man c	25,0 \pm 2,2 (22,8 - 29,2)	22,3 \pm 2,2 (18,8 - 27,2)	16,5 \pm 1,8 (14,4 - 19,2)
Distribuição papilas	1+1+1/3+2+F	1+1+1/3+2+F	1+1+1/3+2+F

Legenda: Comprimento do esôfago (Esôfago SE); Comprimento do esôfago desde o início do estoma até o final do bulbo (Esôfago T); Comprimento da cauda até a cloca (Cauda); Comprimento da cauda até o término da bursa (Cauda PB); razão entre o comprimento da cauda e a largura do primeiro terço do tronco dorsal (Cauda/LTD). Razões de De Man: a: comprimento do corpo/ largura máxima do corpo; b: comprimento do corpo/esôfago T e c: comprimento do corpo/cauda. Todas as mensurações estão em μm e representadas pelas médias desvio padrão, seguidas pelos intervalos obtidos (nos parêntesis).

* Cultura de *M. blumi* DF5010 mantida no *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC)- University of Missouri - USA e usadas como espécie modelo.

Tabela I.4 Comparações das medidas das características anatômicas dos espécimes machos coletados da secreção auricular de bovinos com otite parasitária nas fazendas 1 e 2, localizadas nos municípios de Teófilo Otoni e Itabira - MG, com as descrições das espécies *Metarhabditis freitasi*, *M. costai* e *M. blumi* encontradas na literatura. Todas as mensurações estão em μm e representadas pelas médias e desvio padrão, seguidas pelos intervalos obtidos (nos parêntesis).

Características (μm)	<i>M. costai</i>			<i>M. freitasi</i>		<i>M. blumi</i>		
	Mc MG15	Martins, 1985	Asif et al., 2013	Mf MG15	Martins, 1985	DF5010*	Sudhaus, 1974	Carta e Osbrink, 2005
	Machos n = 10	Machos n = 10	Machos n = 7	Machos n = 10	Machos n = 10	Machos n = 10	Machos n = 10	Machos n = 10
Comprimento total	1059,2 \pm 82,2 (993,7 - 1221,0)	1012,0 \pm 150,0 (844,0 - 1175,0)	777,8 \pm 136,3 (608,0 - 1058,0)	971,2 \pm 87,0 (861,2 - 1070,0)	1235,0 \pm 135,0 (1035,0 - 1405,0)	945,4 \pm 129,3 (725,6 - 1089,7)	(995 - 1415)	1381,0 \pm 292,0 (1102,0 - 1758)
Largura máxima	52,2 \pm 6,6 (43,5 - 63,5)	64,0 \pm 11,0 (51,0 - 79,0)	32,1 \pm 12,0 (27,0 - 42,0)	59,0 \pm 7,9 (51,3 - 74,2)	73,0 \pm 10,0 (54,0 - 88,0)	52,9 \pm 5,2 (43,6 - 63,8)	(49,0 - 68,0)	66,0 \pm 18,0 (43,0 - 86,0)
Estoma (Comprimento)	23,8 \pm 2,7 (19,0 - 27,2)	-	34,1 \pm 2,2 (30,0 - 38,0)	26,0 \pm 2,1 (24,3 - 30,6)	19,7 \pm 2,8 (17,4 - 23,9)	24,8 \pm 2,2 (22,4 - 27,6)	(25,0 - 27,0)	29,0 \pm 5,0 (22,0 - 36,0)
Estoma (Largura)	4,2 \pm 1,0 (3,2 - 5,6)	-	3,2 \pm 0,2 (3,0 - 3,5)	4,2 \pm 0,6 (3,2 - 5,0)	-	4,6 \pm 0,5 (3,6 - 5,2)	(3,0 - 5,0)	24,0 \pm 2,0 (22,0 - 26,0)
Esôfago SE	190,1 \pm 12,0 (183,1 - 213,7)	192,0 \pm 6,0 (183,0 - 198,0)	-	205,8 \pm 14,8 (172,6 - 215,3)	163,0 \pm 16,0 (146,0 - 193,0)	180,2 \pm 21,4 (138,3 - 205,1)	-	-
Esôfago T	214,7 \pm 12,3 (183,1 - 213,7)	-	-	231,8 \pm 15,9 (198,3 - 261,7)	-	225,0 \pm 21,4	-	-
Espículo esquerdo	38,9 \pm 4,6 (33,4 - 44,8)	40,0 \pm 5,5 (32,0 - 43,0)	-	40,6 \pm 2,7 (33,9 - 43,1)	47,0 \pm 4,3 (43,0 - 52,0)	43,4 \pm 2,7 (40,6 - 45,8)	-	-
Espículo direito	42,2 \pm 5,4 (34,7 - 50,6)	40,0 \pm 6,0 (33,0 - 50,0)	-	40,6 \pm 3,3 (32,8 - 44,7)	45,0 \pm 5,5 (35,0 - 52,0)	41,2 \pm 2,9 (37,6 - 45,5)	-	-
Espículos	40,4 \pm 4,8 (34,0 - 47,7)	(33,0 - 50,0)	34,1 \pm 2,3 (30,0 - 38,0)	-	-	41,8 \pm 2,5 (39,1 - 45,6)	(45,0 - 51,0)	54,0 \pm 5,0 (48,0 - 63,0)
Gubernáculo	26,0 (26,0)	21,0 \pm 1,9 (20,0 - 24,0)	14,0 \pm 1,6 (12,0 - 16,0)	24,6 \pm 2,5 (21,8 - 27,6)	20,0 \pm 1,6 (17,0 - 22,0)	28,8 \pm 3,5 (26,3 - 31,3)	(16,0 - 227,0)	27,0 \pm 6,0 (20,0 - 31,0)
Cauda	41,8 \pm 1,1 (40,5 - 43,7)	37,0 \pm 2,8 (35,0 - 42,0)	41,8 \pm 1,1 (40,5 - 43,7)	43,8 \pm 4,8 (37,6 - 48,9)	41,0 \pm 7,0 (35,0 - 48,0)	56,8 \pm 8,1 (40,0 - 70,0)	(50,0 - 66,0)	59,0 \pm 10,0 (46,0 - 73,0)
Cauda PB	1,4 \pm 0,2 (1,1 - 1,7)	-	-	7,8 \pm 1,5 (6,0 - 9,8)	-	-	-	-
Cauda/LTD	4,0 \pm 0,4 (3,8 - 4,5)	-	-	5,0 \pm 0,6 (4,5 - 5,6)	-	-	-	-
Razões de De Man a	20,4 \pm 1,3 (19,2 - 22,8)	16,1 \pm 1,4 (14,0 - 17,0)	21,2 \pm 2,3 (17,0 - 26,4)	16,7 \pm 3,0 (12,7 - 21,8)	17,2 \pm 3,1 (14,0 - 25,5)	17,9 \pm 1,8 (15,6 - 20,7)	(17,3 - 22,3)	16,0 \pm 3,0 (12,0 - 20,0)
Razões de De Man b	4,9 \pm 0,2 (4,7 - 5,1)	5,3 \pm 0,8 (4,4 - 6,7)	4,2 \pm 0,5 (3,6 - 5,5)	4,2 \pm 0,4 (3,6 - 4,8)	7,6 \pm 0,8 (6,7 - 9,1)	4,5 \pm 0,3 (4,1 - 5,0)	(4,2 - 5,9)	5,0 \pm 1,0 (3,0 - 6,0)
Razões de De Man c	25,05 \pm 2,2 (22,8 - 29,2)	27,1 \pm 3,9 (23,2 - 34,2)	26,6 \pm 4,2 (20,7 - 33,2)	22,3 \pm 2,2 (18,8 - 27,2)	30,3 \pm 5,1 (23,9 - 39,5)	16,5 \pm 1,8 (14,4 - 19,2)	(17,0 - 27,0)	17,0 \pm 4,0 (12,0 - 24,0)
Distribuição papilas	1 + 1/1/3 + 2 + F	1+1+1()+3+ 2 + F	1 + 1/1/3 + 2 + F	1+1 + 1 /3 +2+F	1+1+1()+3+ 2 + F	1+1+1/3+2+F	1+1+1/3+2+F	-

Legenda: Comprimento do esôfago (Esôfago SE); Comprimento do esôfago desde o início do estoma até o final do bulbo (Esôfago T); Comprimento da cauda até a cloca (Cauda); Comprimento da cauda até o trêmimo da bursa (Cauda PB); razão entre o comprimento da cauda e a largura do primeiro terço do tronco dorsal (Cauda/LTD). Razões de De Man: a: comprimento do corpo/ largura máxima do corpo; b: comprimento do corpo/esôfago T e c: comprimento do corpo/cauda. Todas as mensurações estão em μm e representadas pelas médias desvio padrão, seguidas pelos intervalos obtidos (nos parêntesis).

* Cultura DF5010 de *M. blumi* mantida no Caenorhabditis Genetics Center - University of Missouri - USA e usadas como espécie modelo para comparação com as espécies descritas neste estudo.

Na Tabela I.5 estão detalhadas as medidas das fêmeas de *M. freitasi* isoladas das amostras deste estudo e também as medidas das fêmeas da espécie *M. costai* descritas por Martins Jr. (1985) e por Asif *et al.* (2013) e da espécie *M. blumi* descrita por Sudhaus (1974) e por Carta e Osbrink (2005) para comparação.

Tabela I.5 Comparações das medidas das características anatômicas dos espécimes fêmeas, coletados da secreção auricular de bovinos com otite parasitária nas fazendas 1 e 2, com as descrições das espécies *Metarhabditis freitasi*, *M. costai* e *M. blumi* encontradas na literatura. Todas as mensurações estão em μm e representadas pelas médias e desvio padrão, seguidas pelos intervalos obtidos (nos parêntesis).

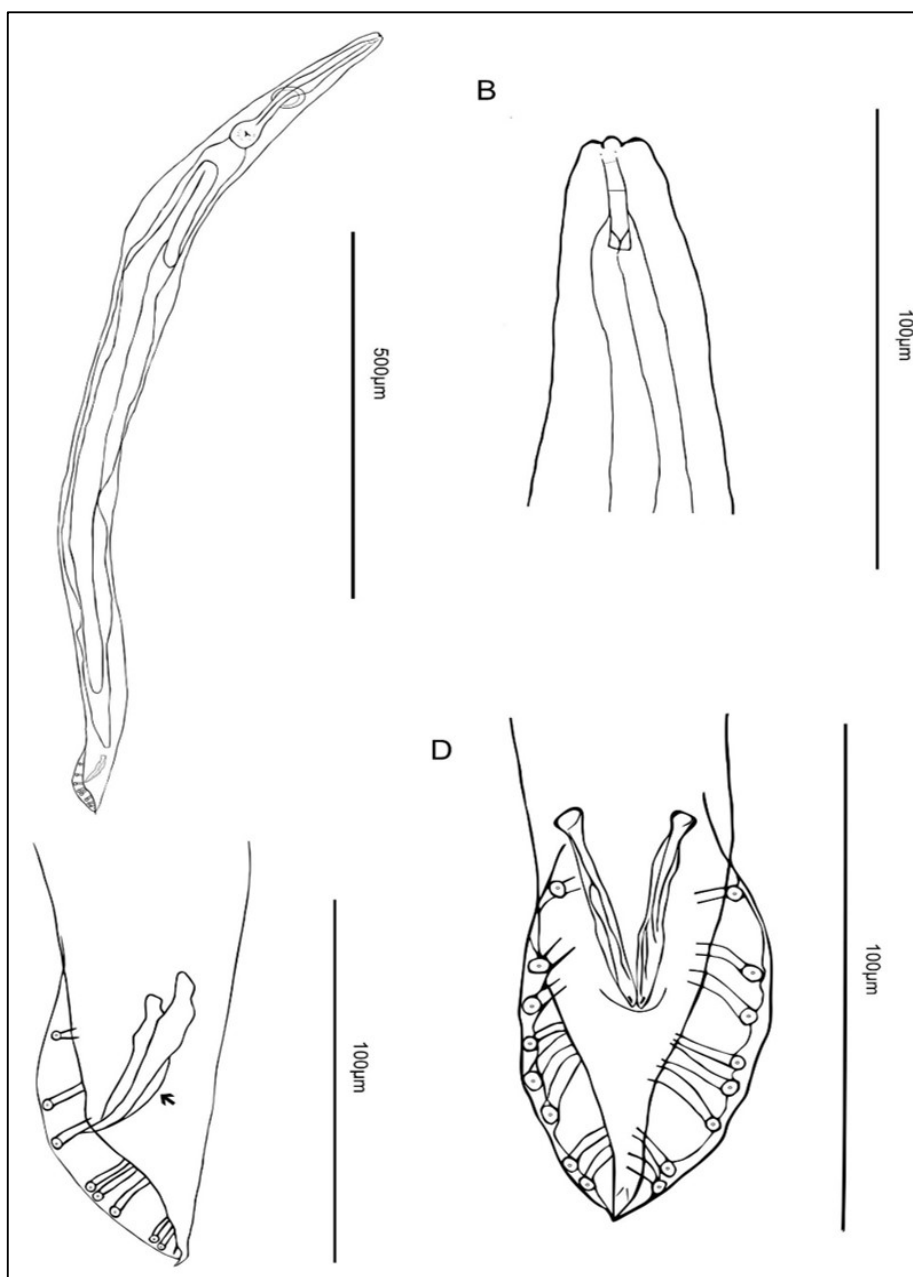
Características (μm)	<i>M. freitasi</i>		<i>M. costai</i>		<i>M. blumi</i>	
	Mf MG15 Fêmeas n = 4	Martins Jr., 1985 Fêmeas n = 10	Martins Jr., 1985 Fêmeas n = 10	Asif et al., 2013 Fêmeas n = 8	Sudhaus, 1974 Fêmeas n = 10	Carta e Osbrink, 2005* Fêmeas n = 10
Comprimento total do corpo	1014,8 \pm 124,5 (838,7 - 1118,6)	1530 \pm 155,0 (1253,0 - 1714,0)	1160 \pm 112,0 (974,0 - 1305,0)	859,0 \pm 65,8 (791,0 - 978,0)	- (1324 - 1819)	1381,0 \pm 292,0 (1102,0 - 1758,0)
Maior diâmetro do corpo	62,5 \pm 7,0 (52,4 - 67,8)	98,0 \pm 13,0 (73,0 - 117,0)	72,0 \pm 9,9 (53,0 - 86,0)	42,3 \pm 2,8 (38,0 - 46,0)	- (48,0 - 52,0)	92,0 \pm 34,0 (57,0 - 152,0)
Estoma (Comprimento)	26,4 \pm 3,3 (23,4 - 30,4)	21,0 \pm 2,0 (19,0 - 26,0)	24,0 \pm 1,7 (22,0 - 26,0)	24,3 \pm 2,6 (21,0 - 29,0)	- (29,0 - 35,0)	29,0 \pm 5,0 (22,0 - 36,0)
Estoma (Largura)	3,6 \pm 0,3 (3,1 - 4,4)	4,2 \pm 0,6 (3,5 - 5,2)	3,4 \pm 0,8 (2,6 - 4,3)	3,9 \pm 0,8 (3,0 - 5,0)	- (3,0 - 5,0)	5,1 \pm 0,7 (3,8 - 5,7)
Esôfago	200,0 \pm 8,0 (192,0 - 210,3)	201,0 \pm 25,0 (176,0 - 262,0)	211,0 \pm 11,0 (191,0 - 224,0)	-	-	-
Cauda	114,4 \pm 36,5 (70,2 - 180,6)	132,0 \pm 15,0 (112,0 - 154,0)	96,0 \pm 8,0 (87,0 - 113,0)	74,8 \pm 14,5 (60,0 - 93,0)	- (156 - 221)	129,0 \pm 39,0 (89,0 - 221,0)
Ovos (Comprimento)	50,7 \pm 10,3 (31,3 - 66,0)	50,0 \pm 6,7 (44,0 - 66,0)	-	-	-	-
Ovos (Largura)	28,7 \pm 3,5 (23,5 - 35,0)	33,0 \pm 3,3 (26,0 - 32,0)	-	-	-	-
Razões de DE MAN a	16,2 \pm 4,8 (13,5 - 27,3)	15,7 \pm 1,7 (13,3 - 18,1)	16,4 \pm 2,0 (13,2 - 19,8)	20,3 \pm 1,3 (18,2 - 22,7)	- (18,0 - 23,0)	15,9 \pm 2,8 (11,0 - 20,0)
Razões de DE MAN b	4,5 \pm 0,6 (4,0 - 5,9)	7,6 \pm 1,9 (6,5 - 8,5)	5,5 \pm 0,4 (5,0 - 6,0)	4,3 \pm 0,4 (3,7 - 4,7)	- (5,0 - 6,0)	6,1 \pm 0,8 (5,3 - 7,2)
Razões de DE MAN c	8,8 \pm 2,8 (7,8 - 14,5)	11,7 \pm 1,7 (8,2 - 14,1)	11,7 \pm 1,7 (8,2 - 14,1)	11,7 \pm 1,6 (9,3 - 13,6)	- (7,0 - 10,0)	11,1 \pm 2,2 (7,7 - 14,8)
V (%)	52,2 \pm 6,1 (42,9 - 65,4)	52,0 \pm 16,0 (50,0 - 56,0)	51,3 \pm 3,1 (45,0 - 55,4)	-	-	53 (49 - 57)

Legenda: Comprimento do esôfago (Esôfago SE); Comprimento do esôfago desde o início do estoma até o final do bulbo (Esôfago T); Comprimento da cauda até a cloca (Cauda); Comprimento da cauda até o trêmio da bursa (Cauda PB); razão entre o comprimento da cauda e a largura do primeiro terço do tronco dorsal (Cauda/LTD). Razões de De Man: a: comprimento do corpo/ largura máxima do corpo; b: comprimento do corpo/esôfago T e c: comprimento do corpo/cauda. Distancia da vulva até a extremidade anterior, representado em percentual desta proporção em relação ao tamanho do corpo. Distancia da vulva até a extremidade anterior, representado em percentual desta proporção em relação ao tamanho do corpo. V%: Distancia da vulva até a extremidade anterior, representado em percentual desta proporção em relação ao tamanho do corpo. Todas as mensurações estão em μm e representadas pelas médias desvio padrão, seguidas pelos intervalos obtidos (nos parêntesis).

* Cultura DF5010 de *M. blumi* mantida no Caenorhabditis Genetics Center - University of Missouri - USA e usadas como espécie modelo para comparação com as espécies descritas neste estudo.

I.5.2.1 *Metarhabditis costai* (Martins Jr., 1985) Sudhaus 2011

Foram estudados seis espécimes machos de *M. costai* por meio de microscopia de luz (Tabelas I.3 e I.4) e eletrônica de varredura observando-se as seguintes características: comprimento médio do corpo variando em $1059,2 \pm 82,2 \mu\text{m}$ ($993,7$ - $1221 \mu\text{m}$) com largura máxima de $52,2 \pm 6,6 \mu\text{m}$ ($43,5$ - $63,5 \mu\text{m}$). Na extremidade anterior destaca-se a abertura bucal com formato triangular, ladeada por três lábios, um dorsal, com quatro papilas labiais e dois latero-ventrais com três papilas. Como característica importante destaca-se uma ligeira depressão mediana em cada um dos lábios que pode ser confundida com uma separação completa. O estoma é retilíneo com $4,2 \pm 1,0 \mu\text{m}$ ($3,2$ - $5,6 \mu\text{m}$) de largura e comprimento de $23,8 \pm 2,7 \mu\text{m}$ (19 - $27,2$), dos quais a metade é recoberta pelo colar esofaríngeo. O aparato glotóide é bem evidente, localizado no limite entre o estoma e o esôfago, cujo comprimento foi de $190,1 \pm 12 \mu\text{m}$ ($183,1$ - $213,7 \mu\text{m}$). Na região posterior os espículos robustos são bem evidentes e apresentam a ponta em forma de flecha, perceptível à MEV. O espículo do lado direito é ligeiramente maior que o do lado esquerdo e o comprimento médio dos dois é de $40,4 \pm 4,8 \mu\text{m}$ (34 - $47,7 \mu\text{m}$). Ambos são sustentados pelo gubernáculo que tem formato de calha e comprimento de $26,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (26 - $26,5 \mu\text{m}$). A estrutura característica desta espécie é a bursa, que é do tipo leptoderana, com formato bem arredondado recobrendo as papilas, os fasmídeos e a porção proximal da cauda (Figuras I.4 e I.5). As papilas genitais são distribuídas em oito pares localizados ao longo da bursa. O primeiro par é ligeiramente menor que os outros sete e se encontra isolado dos demais, localizado próximo à linha mediana dos espículos. Os dois pares seguintes estão ligeiramente afastados entre si, sendo que o terceiro par está localizado na mesma linha da abertura da cloaca. O quarto, o quinto e o sexto par estão localizados bem próximos entre si e afastados dos demais. Pelas imagens de MEV (Figura I.6) é possível verificar que o quinto par de papilas se projeta dorsalmente na bursa. Os dois últimos pares estão bem próximos entre si e afastados dos três anteriores. O comprimento do sétimo e oitavo pares é ligeiramente menor se comparado com o das outras papilas, com exceção do primeiro par. Os fasmídeos são pequenas estruturas tubulares, localizadas logo após as últimas papilas. As papilas e fasmídeos são assim distribuídos: $1+1/1/3+2+F$. A cauda, curta e estreita, tem comprimento total de $41,8 \pm 1,1 \mu\text{m}$ ($40,5$ - $43,7 \mu\text{m}$). A projeção, a partir da porção terminal da bursa, é curta, variando de $1,1$ a $1,7 \mu\text{m}$, o que dificulta a sua visualização. O diâmetro do primeiro terço anterior da cauda variou de $9,2$ a $11,9 \mu\text{m}$. As razões de De Man foram: $a= 20,4 \pm 1,3$ ($19,2$ - $22,8$), $b= 4,9 \pm 0,2$ ($4,7$ - $5,1$) e $c= 25 \pm 2,2$ ($22,8$ - $29,2$).



Caracício (2015)

Figura 1.3 Esquema baseado em imagens obtidas em microscopia de luz, mostrando a morfologia dos machos do *Metarhabditis costai*.

Legenda: A: Visão geral do corpo; B: Extremidade anterior, mostrando o estoma e a porção inicial do esôfago; C: Extremidade posterior em visão lateral, mostrando o contorno da bursa, os espículos e o gubernáculo. D: Extremidade posterior, em visão ventral, mostrando os espículos, distribuição das papilas e a morfologia da bursa copuladora.

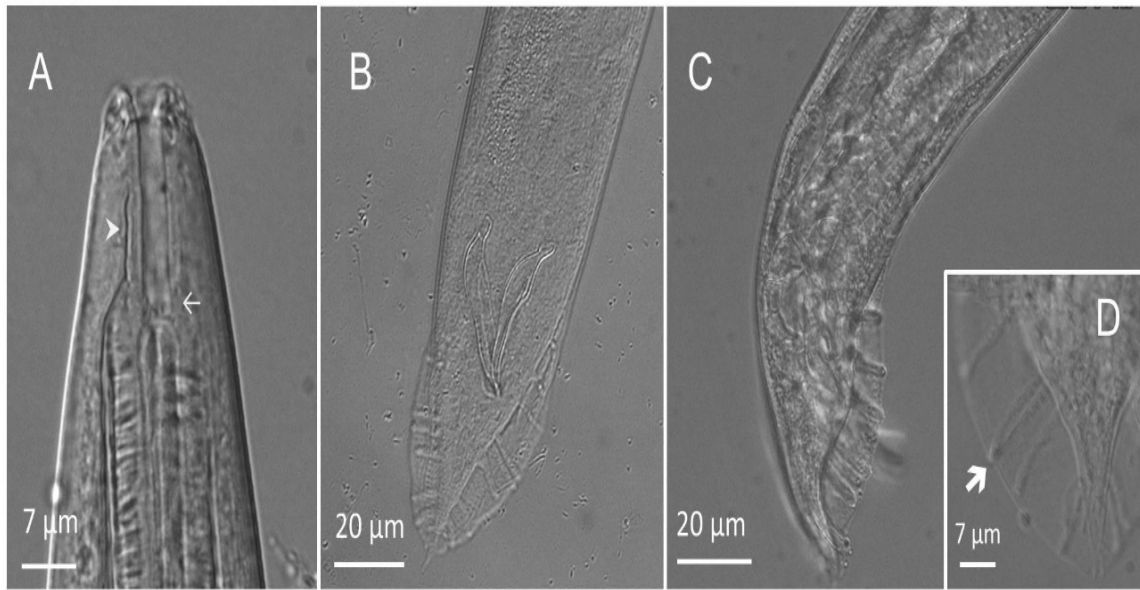
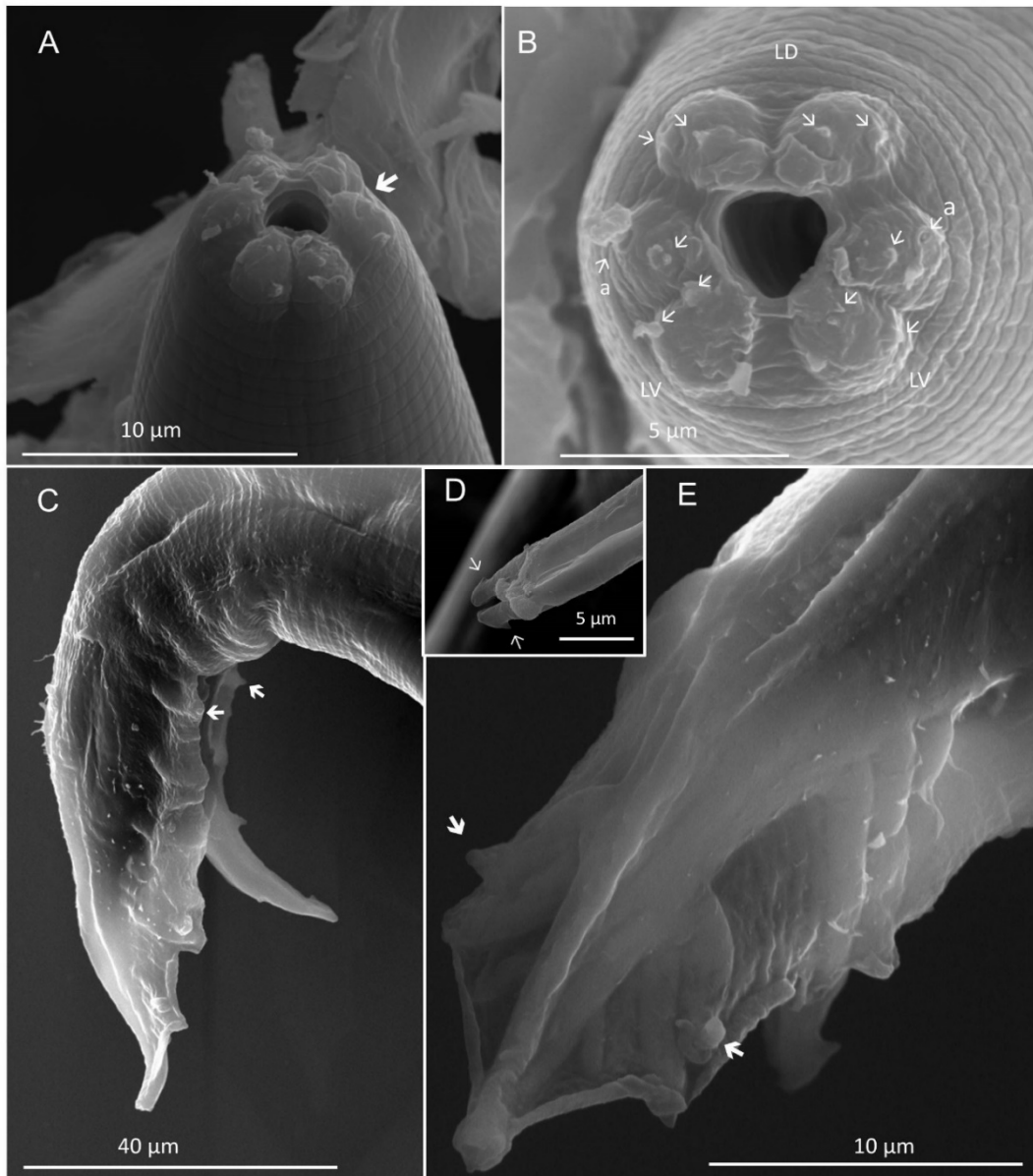


Figura 1.4 Imagens de microscopia de luz de machos de *M. costai*.

Legenda: A - Região anterior mostrando o estoma, o colar esofágico e o aparato glótico; B - Extremidade posterior em visão ventral, mostrando a bursa, a distribuição das papilas e os espículos; C - Visão lateral da extremidade posterior mostrando a bursa em orientação lateral e a distribuição das papilas genitais; D - Detalhe da região terminal da bursa, mostrando os últimos pares de papilas genitais, destacando os pares pós-cloacais e a proximidade entre o quarto e o quinto par.



Caracciolo (2015)

Figura 1.5 Imagens de microscopia eletrônica de varredura de machos de *Metarhabditis costai*.
 Legenda: A - Imagem da extremidade anterior com destaque para o lábio dorsal (LD) e dois latero-ventrais (LV); B - Extremidade anterior, com destaque para a abertura triangular, os dois anfídeos (a). As setas mostram as quatro papilas do lábio dorsal e as três de cada lábio latero-ventral; C - Imagem lateral da bursa com os espículos projetados e os primeiros pares de papilas; D - Detalhe da região distal dos espículos, mostrando a morfologia da ponta em forma de seta ou flecha; E - Imagem da face dorsal da bursa com destaque para a orientação dorsal do quinto par de papilas.

***I.5.2.2 Metarhabditis freitasi* (Martins Jr., 1985) Sudhaus 2011.**

Os dez exemplares machos desta espécie foram isolados das amostras de secreção auricular coletadas nas fazendas 1 e 2 e de material cultivado no laboratório os quais foram analisados sob microscopia de luz e eletrônica de varredura (Figuras I.9, I.10 e I.11). As fêmeas, em número de quatro, foram obtidas a partir das culturas de fêmeas grávidas e analisadas sob microscopia de luz. (Figuras I.7 e I.8).

As medidas principais foram: tamanho do corpo da fêmea $1014,8 \pm 124,5 \mu\text{m}$ ($838,7-1118,6 \mu\text{m}$) de comprimento e $63,1 \pm 23,0 \mu\text{m}$ ($44,4-110,9 \mu\text{m}$) de largura, enquanto os machos são menores e têm corpo com $971,2 \pm 87 \mu\text{m}$ ($861,2-1070 \mu\text{m}$) de comprimento total e $59 \pm 7,9 \mu\text{m}$ ($51,3-74,2 \mu\text{m}$) de largura. Na extremidade anterior dos espécimes de ambos os sexos observa-se o estoma tubular, recoberto, a partir da sua porção mediana, pelo colar esofágico. O comprimento do estoma é de $24,5 \pm 2,2 \mu\text{m}$ ($22,2-29,4 \mu\text{m}$) nas fêmeas e de $26,0 \pm 2,1 \mu\text{m}$ ($24,3-30,6 \mu\text{m}$) nos machos. A abertura do estoma tem formato triangular e é ladeado por três lábios delicados, um dorsal e dois latero-ventrais. Ao MEV foi possível visualizar próximo a eles, papilas sensoriais, duas de cada lado do lábio dorsal e três ao lado de cada lábio latero-ventral. E ainda, dois anfídeos, órgãos sensoriais de formato arredondado, localizados entre o lábio dorsal e os dois latero-ventrais, separando a face dorsal da ventral. O esôfago, cuja porção inicial é retilínea, apresenta ligeiro estreitamento na porção mediana, caracterizando o istmo que é circundado pelo anel nervoso. Na sua porção distal é bem evidente a dilatação da parede com a formação do bulbo esofágico de formato globoso. Nas fêmeas o esôfago mede $200 \pm 8 \mu\text{m}$ ($192-210,3 \mu\text{m}$) de comprimento e $18,8 \pm 3,4 \mu\text{m}$ ($15-22 \mu\text{m}$) de largura e nos machos esta estrutura mede $205,8 \pm 14,8 \mu\text{m}$ ($172,6-215,3 \mu\text{m}$) de comprimento e $39,6 \pm 2,9 \mu\text{m}$ ($35,4 - 42,9 \mu\text{m}$) de largura na região média.

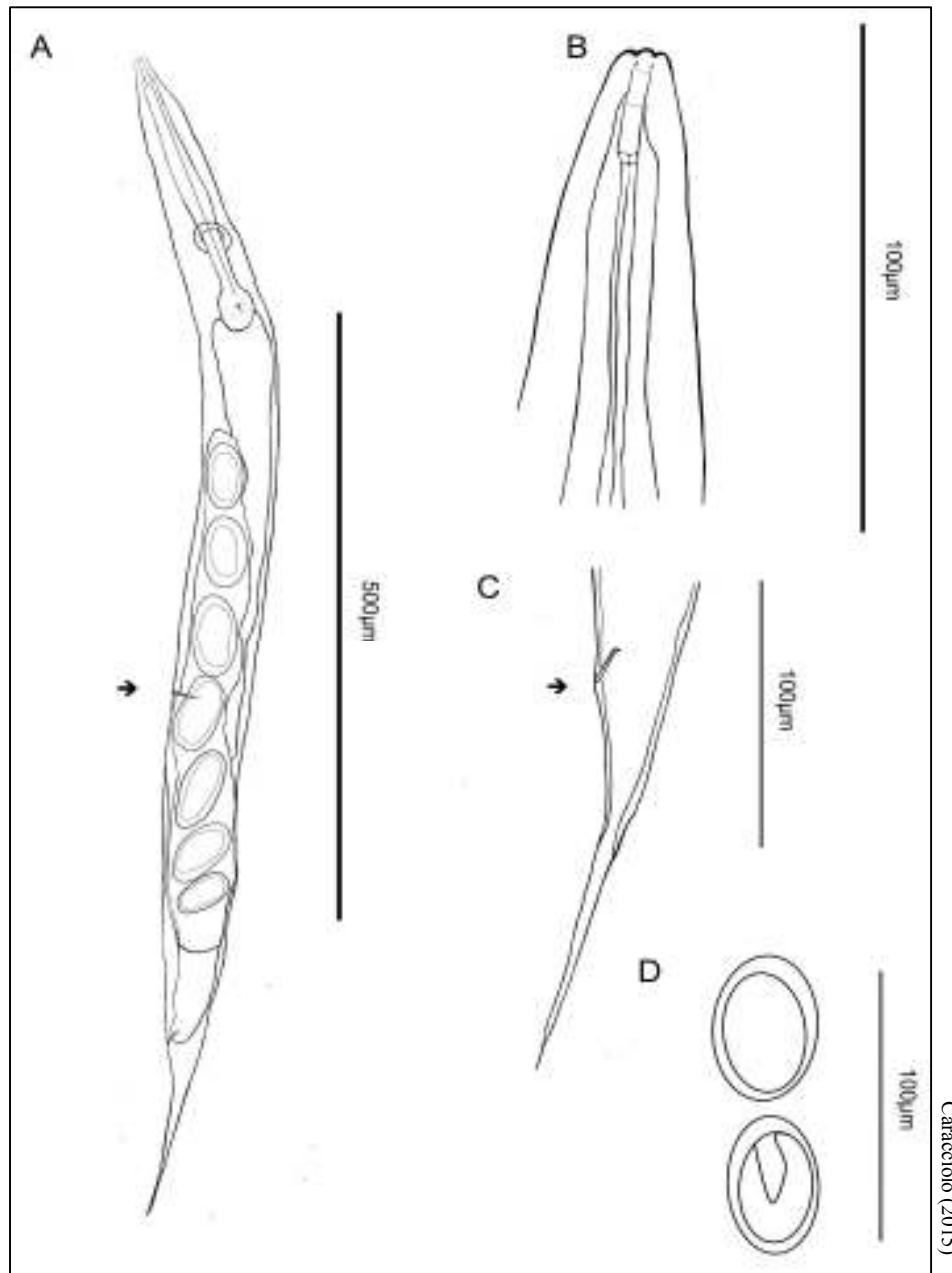
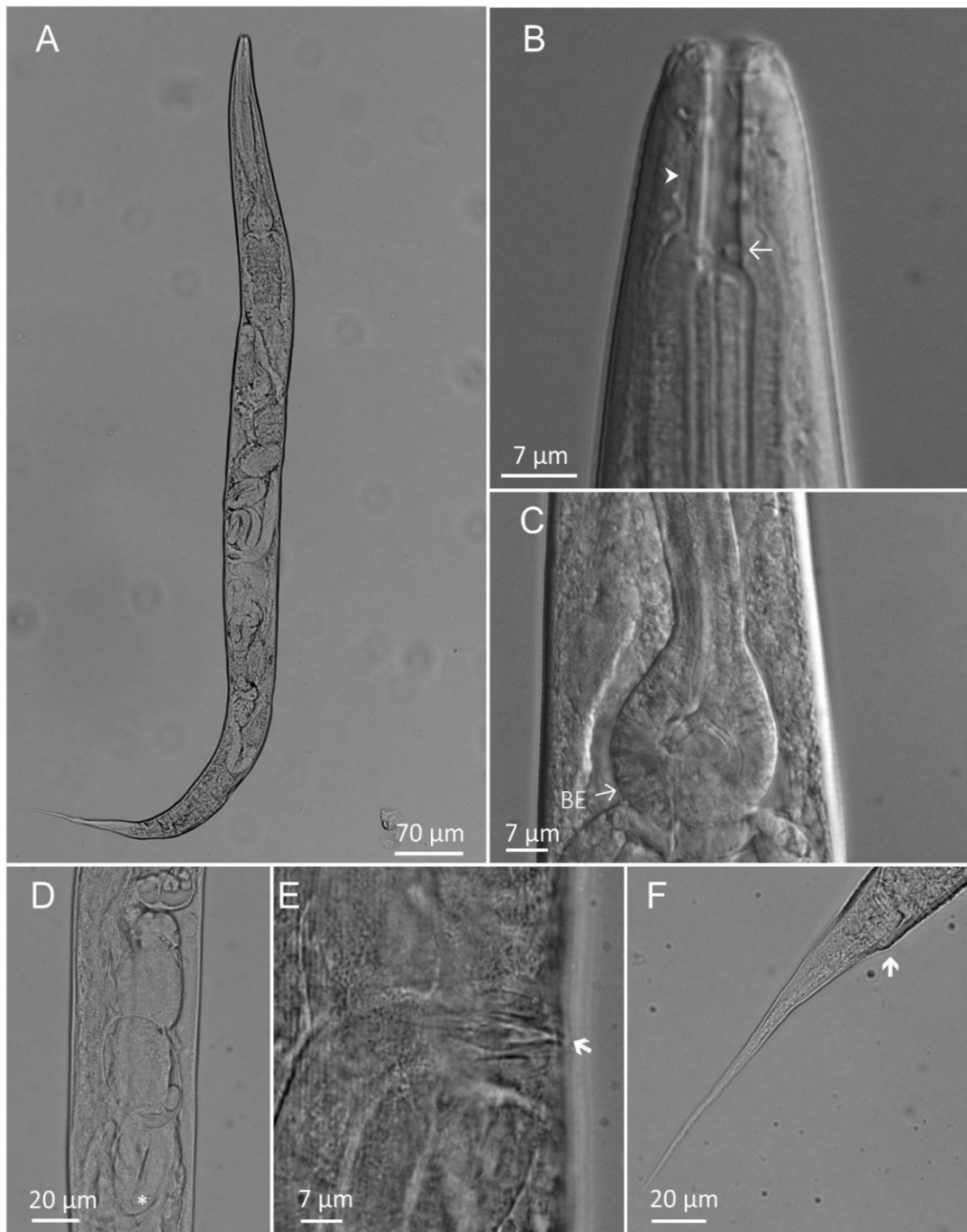


Figura 1.6 Esquema baseado em imagens obtidas por microscopia de luz mostrando a morfologia das fêmeas de *M. freitasi*.

Legendas: A - Visão geral da morfologia do corpo, mostrando o esôfago, anel nervoso, distribuição dos ovos e a abertura da vulva e do ânus; B - Extremidade anterior, mostrando o estoma, colar esofágico, o aparato glotóide e a porção inicial do esôfago; C - Extremidade posterior mostrando a abertura do ânus e a terminação afilada da cauda; D - Ovo não embrionado e embrionado



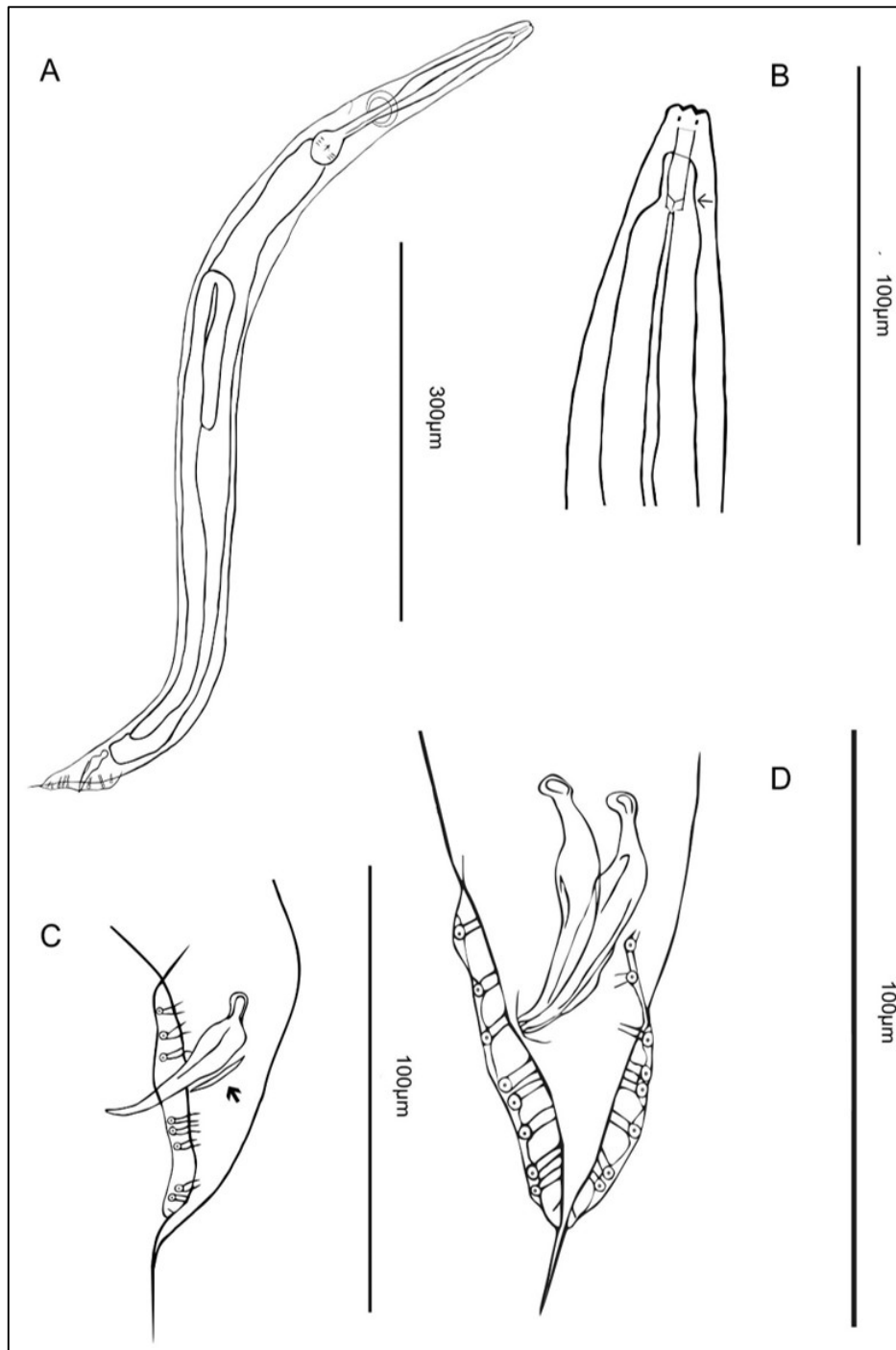
Caraciolo (2015)

Figura I.7 Imagens de microscopia de luz de fêmeas de *M. freitasi*.

Legendas: A - Visão geral do corpo, posicionado lateralmente, mostrando estruturas internas e ovos; B - Extremidade anterior, mostrando o estoma, a abertura oral, o colar esofágico e o aparato glotóide; C - Região final do esôfago, mostrando a parte distal do istmo e o bulbo esofágico (BE); D - Região média do corpo, exibindo ovos e dentre eles um embrião; E- Detalhe da abertura da vulva; F - Extremidade posterior, mostrando a abertura do ânus e a terminação afilada da cauda.

Na porção distal do corpo dos machos está localizado o par de espículos em forma de foice. Logo após a sua base observa-se um curto adelgaçamento que logo depois se alarga até a porção medial, onde verifica-se a maior largura dos espículos. Daí eles vão se estreitando até a ponta em forma de flecha. Eles medem $40,6 \pm 3,7 \mu\text{m}$ ($33,9-44,7 \mu\text{m}$) de comprimento e localizam-se sobre o gubernáculo, que mede $24,6 \pm 2,5$ ($21,8-26,5 \mu\text{m}$) de comprimento. A cauda tem comprimento total de $43,8 \pm 4,8 \mu\text{m}$ ($37,6-48,9 \mu\text{m}$) e a maior largura é $8,7 \pm 1 \mu\text{m}$ ($7-9,8 \mu\text{m}$). A porção que se projeta logo após o final da bursa mede $7,8 \pm 1,5 \mu\text{m}$ ($6-9,8 \mu\text{m}$) de comprimento e é bem delgada desde o final da bursa até sua porção terminal. O diâmetro do primeiro terço anterior da cauda é de $8,7 \pm 1 \mu\text{m}$ ($7-9,8 \mu\text{m}$). A bolsa copuladora leptoderana, é fechada na porção proximal de formato triangular. Na porção distal ela termina de forma abrupta, logo após o pequeno par de fasmídeos, formando uma depressão de cada lado da projeção externa da cauda. As papilas genitais e os fasmídeos estão distribuídos na seguinte configuração: 1+1 + 1/2/1 +2+F. O primeiro, o segundo e o terceiro par de papilas genitais estão igualmente separados entre si. Enquanto o primeiro e o segundo pares se localizam antes da cloaca, o terceiro está na mesma linha da abertura dela. O quarto e o quinto pares de papilas estão bem próximos entre si e ligeiramente afastados do sexto par, que está distante dos dois últimos pares posicionados bem próximos um do outro. Pelas imagens do MEV é possível visualizar que o sétimo par de papilas é o único que se projeta dorsalmente na bursa. As razões de De Man dos espécimes machos são: a= $16,7 \pm 3 \mu\text{m}$ ($12,7 - 21,8 \mu\text{m}$), b= $4,2 \pm 0,4 \mu\text{m}$ ($3,6-4,8 \mu\text{m}$) e c= $22,3 \pm 2,2 \mu\text{m}$ ($18,8-27,2 \mu\text{m}$).

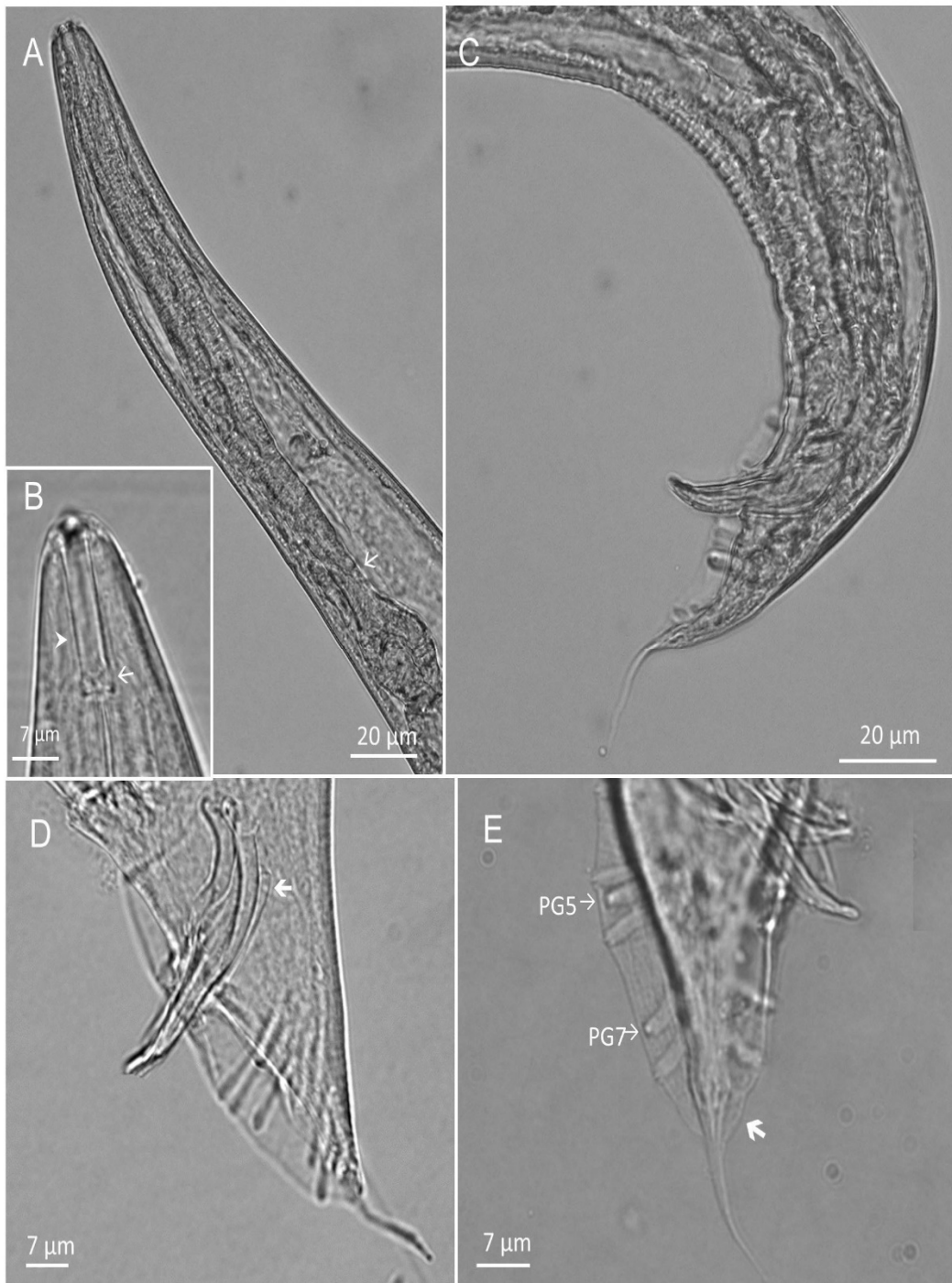
As fêmeas desta espécie têm o corpo fusiforme, estreito na região do aparelho bucal e que vai se espessando gradativamente até atingir a largura máxima na região da vulva, que se localiza próximo à metade do comprimento do corpo. A partir deste ponto o corpo novamente vai se estreitando, a princípio de forma suave, até chegar ao ânus. Daí em diante a espessura do corpo diminui bastante até a cauda que tem forma de um cone e é bem afilada. O poro excretor está localizado na mesma linha do istmo. Por microscopia de luz foi possível observar o útero contendo ovos embrionados de parede espessa com $54 \pm 6,1 \mu\text{m}$ ($49-59,9 \mu\text{m}$) de comprimento e $33,4 \pm 4,1 \mu\text{m}$ ($29,7-39,4 \mu\text{m}$) de largura. A cutícula das fêmeas tem aspecto mais liso que a dos machos e apresenta espessura média de $1 \mu\text{m}$. À MEV, foi possível perceber que nos indivíduos de ambos os sexos, a cutícula é mais lisa na região apical da extremidade anterior. Ao longo do corpo são observadas finas estriações transversais e dois conjuntos de quatro linhas longitudinais, delimitando as porções dorsal e ventral.



Caracciolo (2015)

Figura 1.8 Esquema baseado em imagens obtidas por microscopia de luz mostrando a morfologia dos machos do *Metarhabditis freitasi*.

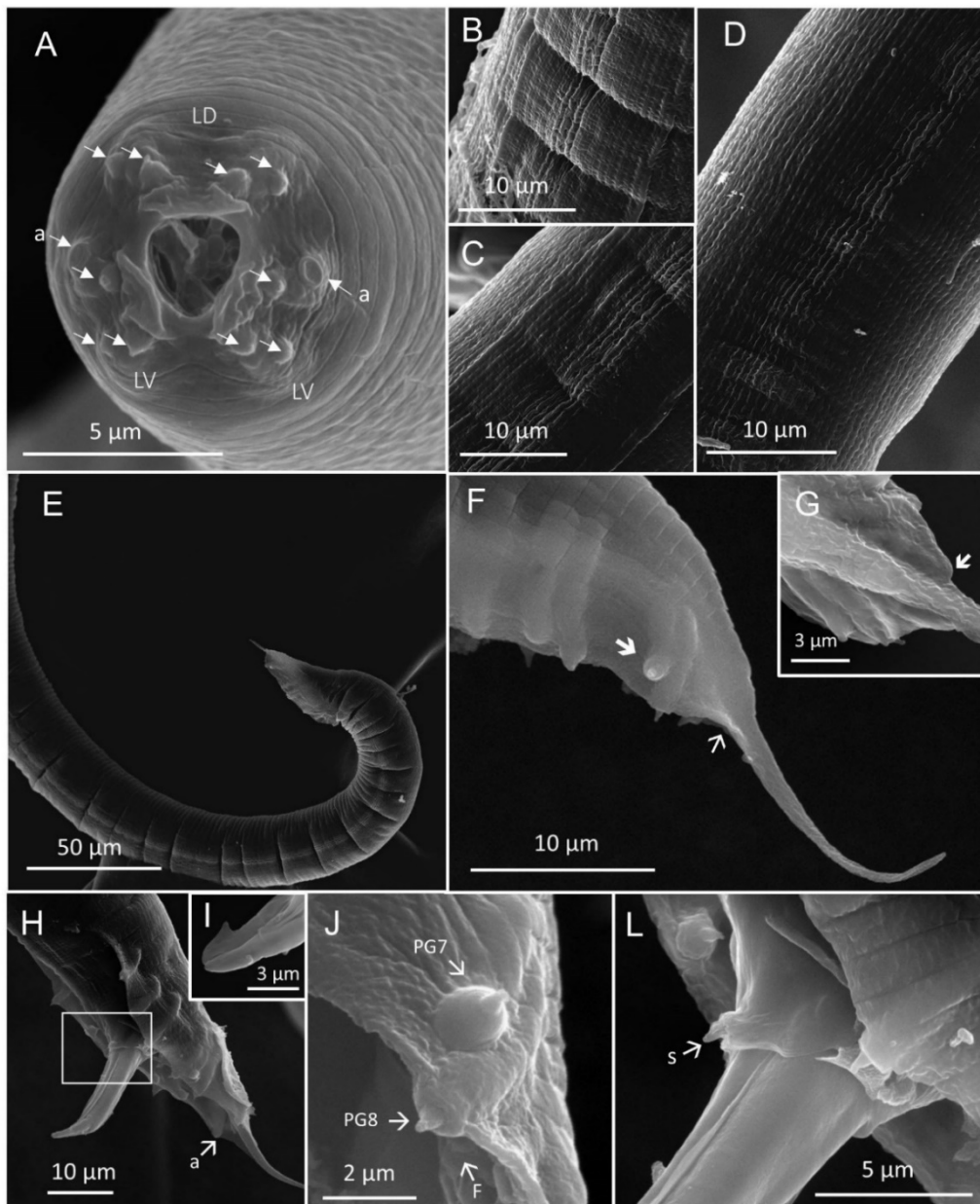
Legendas: A - Visão geral do corpo posicionado lateralmente, mostrando o esôfago, anel nervoso e a dobra da alça testicular; B - Extremidade anterior, mostrando o estoma, o aparato glotóide e a porção inicial do esôfago; C- Extremidade posterior em visão lateral mostrando o gubernáculo; D - Extremidade posterior em visão ventral mostrando o contorno da bursa, os espículos, a distribuição das papilas genitais e a projeção do apêndice caudal na região pós-bursa.



Caracciolo (2015)

Figura 1.9 Imagens de microscopia de luz dos machos de *M. freitasi*.

Legendas: A - Imagem do corpo posicionado lateralmente, mostrando o esôfago, anel nervoso e a dobra da alça testicular; B - Imagem da extremidade anterior, mostrando o estoma, o aparato glotóide e a porção inicial do esôfago; C e D - Extremidade posterior em visão lateral e ventral, respectivamente, mostrando o contorno da bursa, os espículos, o gubernáculo (seta), distribuição das papilas genitais (PG5 e PG7). Destaque para a projeção do apêndice caudal na região pós-bursa.



Caracciolo (2015)

Figura I.10 Imagens de MEV de machos de *M. freitasi*. Legendas: A - Extremidade anterior mostrando a abertura oral triangular, uma par de anfídeos (a), um lábio dorsal (LD) e dois latero-ventrais (LV) ornamentados por papilas; B, C e D - Imagens em sequência das regiões anterior, média e posterior, mostrando as estrias longitudinais; E - Região posterior, mostrando a bursa em visão lateral; F - Extremidade posterior, em visão lateral mostrando a região distal da cauda, a sétima papila genital, orientada para a face dorsal da bursa, e o recorte da bursa; G - Extremidade posterior, em visão lateral, mostrando o detalhe do recorte cuticular da bursa; H - Extremidade posterior em visão latero-ventral, mostrando a distribuição das papilas genitais e o espículo; I - Extremidade distal do espículo mostrando a ponta em forma de flecha ou seta; J - Detalhe da extremidade posterior, mostrando o sétimo (PG7), oitavo (PG8) par de papilas e um dos fasmídeos (F) posterior ao último par de papilas; L- Extremidade posterior, região da abertura da cloaca, mostrando a sensila (S), bem próximo da abertura cloacal.

***Metarhabditis blumi* (Sudhaus, 1974) Sudhaus 2011 (DF5010) CGC - USA**

Dez espécimes da espécie *M. blumi* (DF5010), provenientes do CGC, foram analisados em suas características morfométricas e morfológicas, à ML (Figura I.12). Os espécimes são alongados e fusiformes com comprimento total de 954,4 μm (725,6 - 1089,7 μm) e diâmetro máximo de 52,9 μm (43,6 - 63,8 μm), na região da curvatura do testículo. Na região anterior observa-se os três lábios rudimentares, que apresentam pequenas reentrâncias na região mediana que falsamente sugerem que são divididos. O estoma cilíndrico mede 29,0 μm (22,0 - 36,0 μm) de comprimento e 24,0 μm (22,0 - 26,0 μm) de largura, tem cerca de dois terços do seu comprimento envolto pelo colar esofágico. O esôfago, cujo comprimento é de 180,2 μm (138,3 - 205,1 μm), é liso e sem ondulações. Sua espessura aumenta ligeiramente, do istmo em diante, de forma uniforme até a metade do seu comprimento. A partir daí, até o início do bulbo, ocorre um pequeno estreitamento onde o anel nervoso circunda o esôfago e onde o poro excretor se localiza. A cauda tem comprimento total de 56,8 μm , variando de 37,6 a 48,9 μm e largura máxima de 8,7 μm . A porção que se projeta logo após o final da bursa mede 15,3 μm de comprimento e é bem afilada. A largura do primeiro terço do tronco dorsal mediu 7,3 μm , variando de 4,5 a 8,3 μm . A bursa, do tipo leptoderana, é aberta na região proximal. Na porção distal da bursa é possível visualizar uma depressão em forma de degrau bem próximo à região onde a cauda se projeta. Os oito pares de papilas genitais são distribuídos conforme esquema: (1+1+1/3+2+r). Os três primeiros pares são pré-cloacais e igualmente distantes entre si. O primeiro par é o menor dentre todos e está localizado logo após o início da bursa. Abaixo da linha da cloaca estão localizados o quarto, o quinto e o sexto pares de papilas, bem próximos entre si. Na porção distal da bursa estão as duas últimas papilas e um par de fasmídeos bem delgado, mais parecido com espinhos. O quinto e sétimo pares estão direcionados dorsalmente, ao contrário dos outros que se direcionam ventralmente. Os espículos são curvos e robustos, com comprimento chegando a $41,8 \pm 2,5 \mu\text{m}$ (39,1 - 45,6 μm). Eles são separados, mas quando estão projetados formam uma ponta fina em formato de seta. O gubernáculo é delgado, levemente curvo e mede $28,8 \pm 3,5 \mu\text{m}$ (26,3 - 31,3 μm) de comprimento. A cutícula tem cerca de 0,8 μm de espessura e possui estrias longitudinais e transversais.

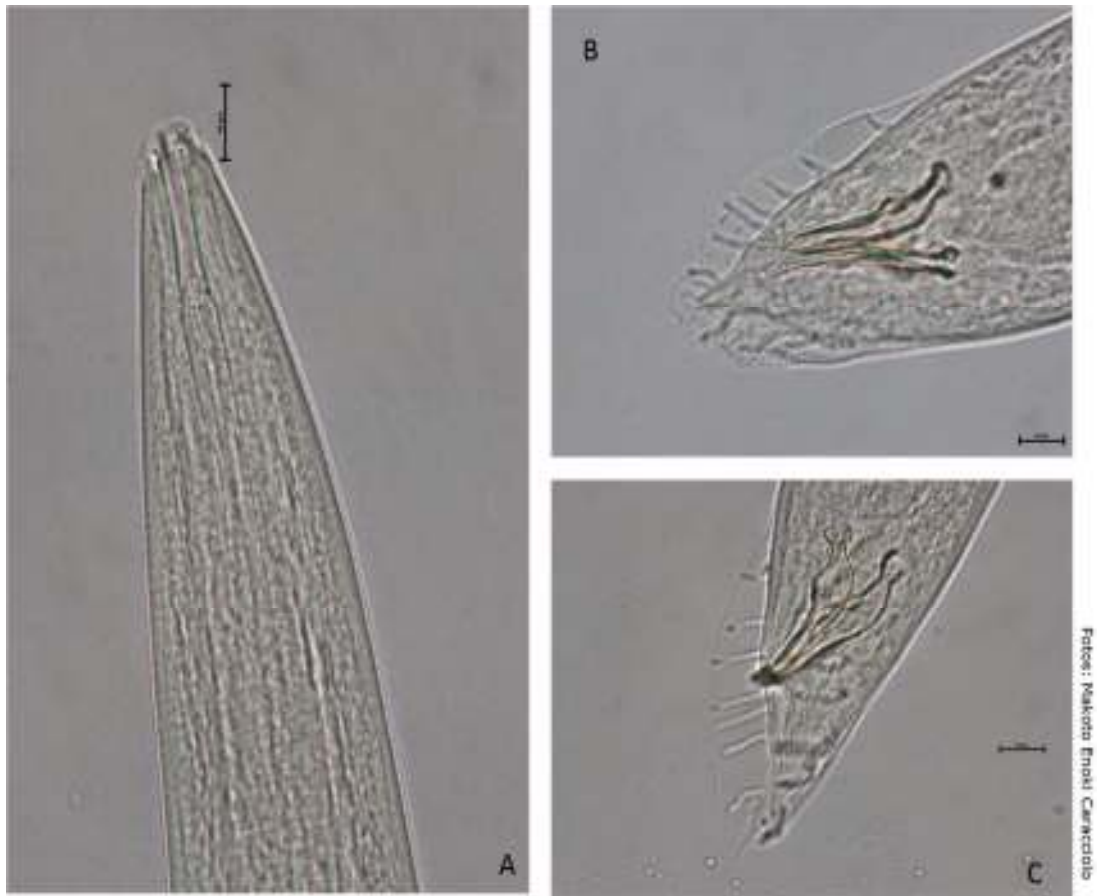


Figura 1.11 Imagens em microscopia luz de machos do *Metarhabditis blumi* (DF 5010).

Legenda: A - Região anterior mostrando o estoma, o colar esofágico e o aparato glotídico; B - Extremidade posterior em visão ventral, com destaque para a bursa, a distribuição das papilas, os espículos e a projeção da cauda pós bursa bastante delgada. É possível visualizar a depressão na porção distal da bursa, em forma de degrau, antes da projeção da cauda; C - Visão lateral da extremidade posterior mostrando a bursa e a distribuição das papilas genitais.

I.6 DISCUSSÃO

A otite parasitária é considerada um grave problema sanitário para os criadores de bovinos da raça Gir do Brasil. Tanto pelos prejuízos que ela acarreta à saúde dos animais, quanto pela dificuldade em controlá-la em um rebanho com animais infectados. Outro fator que deve ser considerado é o aspecto sanitário das exportações de animais para outros países. Na literatura recente já são encontrados registros de casos da doença em países da América Latina, como a Colômbia e a Venezuela (Cardona *et al.*, 2012; Cardona-Álvarez *et al.*, 2014). Neste último, os autores associaram diretamente a presença da parasitose no país aos animais que foram importados do Brasil (Forlano *et al.*, 2014). Acredita-se que medidas efetivas para o controle desta doença devem ser firmemente consideradas, entretanto, é necessário o conhecimento do seu agente etiológico. A falta de informações epidemiológicas e especialmente, o desconhecimento das interações parasito-hospedeiro, dificultam o desenvolvimento de estratégias eficientes no combate e na eliminação da parasitose. Desse modo, o estudo taxonômico dos parasitos auriculares de bovinos é essencial na identificação precisa das espécies envolvidas e na obtenção de subsídios básicos para a elaboração de programas de prevenção e tratamento eficientes.

As análises moleculares utilizando-se primers universais podem ser usadas para a construção de árvores filogenéticas, para a avaliação do nível de evolução populacional e especialmente, para determinar a identidade taxonômica de plantas, fungos, protozoários e vertebrados (Powers *et al.*, 1997, Al-Banna *et al.*, 2004). A técnica do código de barras do DNA faz parte de um sistema projetado para identificar espécies de maneira rápida, precisa e automatizada utilizando fragmentos curtos e padronizados de regiões do DNA ribossomal ou mitocondrial (Herbert e Gregory, 2005). Acredita-se que a sequência de nucleotídeos de um gene comum serve como um identificador único para cada espécie. Tal característica possibilitaria a identificação de amostras simples ou compostas por um *pool* de espécies (Oliveira *et al.*, 2011a). Após consulta ao banco de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), verificou-se que a região genômica dos nematoides do gênero *Rhabditis* e *Metarhabditis* mais estudada é a D2/D3 do gene 28S, situada no DNA ribossômico (rDNA). Portanto esse foi o fragmento do DNA analisado neste estudo.

A comparação das sequências da expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA dos 12 espécimes analisadas no Instituto Biológico com as espécies de *Rhabditis* e *Metarhabditis* depositadas no Genbank permitiu concluir que todos eles pertenciam à uma mesma espécie, *Metarhabditis blumi* (Sudhaus, 1974) Sudhaus 2011. A similaridade de 100% com a sequência da espécie *M. blumi*, e a árvore filogenética resultante, reforçam a afirmativa que, segundo as análises moleculares, os animais das duas propriedades estavam parasitados por *M. blumi*. Da mesma forma, as análises realizadas dos 34 espécimes, no laboratório de genética da EV UFMG, permitiram concluir que todos pertenciam a esta espécie. As sequências consenso da expansão D2/D3 apresentaram similaridade de 99% com a *M. blumi*, cepa DF5010 CGC. Os espécimes analisados nesta etapa do estudo, foram selecionados aleatoriamente das amostras estudadas, como fizeram Oliveira *et al.* (2009a) ao identificar espécies de nematoides encontrados em folhas de lírios e batata semente. Mesmo com poucos parasitos escolhidos aleatoriamente, os resultados alcançados com a tecnologia de código de barras do DNA permitiram que os autores afirmassem com segurança que os espécimes eram das espécies em questão.

A identificação de apenas uma espécie de nematoide no CAE de bovinos com otite parasitária, nos dois rebanhos estudados mostrou-se diferente do estudo de Martins Jr. (1985) em que isolou e identificou duas espécies. Este autor utilizou técnicas taxonômicas tradicionais, analisando a morfologia e a morfometria dos espécimes adultos, assim como no estudo atual, porém não foram utilizadas análises moleculares de identificação.

Os espécimes analisados neste estudo foram originados de amostras de secreção auricular contendo grande quantidade de nematoides. Esperava-se, portanto, que fossem encontradas mais de uma espécie e em diferentes proporções de ocorrência. Objetivando analisar amostras de diferentes espécies, selecionou-se, aleatoriamente, 78 fêmeas grávidas diretamente da secreção auricular de quatro vacas com otite. Estas fêmeas foram cultivadas separadamente *in vitro*, obtendo-se assim, culturas originárias de cada uma delas. Destas culturas, após a utilização da mesma técnica do código de barras do DNA das análises anteriores, obteve-se as sequências consenso de 54 espécimes. Todas as sequências apresentaram maior similaridade com a sequência da espécie *M. blumi*, porém com percentuais variando de 94 a 99%. Oliveira *et al.* (2009b), afirmaram ser necessária homologia de pelo menos 95% entre as sequências para se confirmar a espécie do indivíduo. Percentuais menores que 95% poderiam indicar variabilidade intraespecífica ou amostras de espécie ainda não descrita ou que não tenha a sequência do DNA cadastrada no banco de dados. Este poderia ser o caso das amostras B64F e B76M que apresentaram similaridade de 94%. A variação no percentual de homologia com a sequência da espécie *M. blumi* sugere também a possibilidade de haver mais de uma espécie habitando o CAE dos bovinos desta fazenda ou mesmo uma falha no sequenciamento dos fragmentos. Os resultados obtidos levantaram a necessidade da repetição dos protocolos de sequenciamentos deste material já que estudos anteriores comprovaram a especificidade da expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA para a identificação das espécies do gênero *Metarhabditis*. Estudos futuros poderiam sequenciar regiões diferentes do DNA ou mesmo do genoma mitocondrial dos espécimes acrescentando informações na identificação da espécie de nematoide parasita do CAE dos bovinos.

A espécie *M. blumi* já havia sido relatada anteriormente na Europa em forma de vida livre em amostras de solo úmido (Sudhaus, 1974) e na África e Ásia respectivamente, parasitando o CAE de bovinos e como parasito de besouros (Msolla *et al.*, 1993; Park *et al.*, 2012). Diante desses resultados acredita-se que este seja o primeiro relato da espécie fora destes continentes, ampliando assim, sua abrangência geográfica. Estudo recente relata a presença de *M. blumi* no conduto auditivo de seres humanos com sinais clínicos bastante semelhantes aqueles encontrados em bovinos (Teschner *et al.*, 2014). Os autores isolaram parasitos dessa espécie a partir de estudos moleculares da região ITS2, obtendo-se 100% de homologia com a sequência *M. blumi* (acesso número DQ121436). Este estudo demonstra a importância desta espécie como um dos agentes etiológicos da otite parasitária.

Nos estudos morfológicos dos parasitos obtidos, tanto da secreção auricular como do cultivo *in vitro*, foram identificados três diferentes nematoides: *Metarhabditis costai*, *M. freitasi* e provavelmente *Rhabditis* sp. Esses resultados não corroboram as análises moleculares que apontam como espécie encontrada nessas amostras a *M. blumi*. Por outro lado as análises de morfologia e morfometria estão em conformidade com o estudo de Martins Jr. (1985) que identificou *M. costai* e *M. freitasi* como as espécies responsáveis pela otite parasitária de bovinos da raça Gir no Brasil.

A espécie *M. costai* foi descrita pela primeira vez por Martins Jr. (1985), após ser isolada da secreção auricular de bovinos da raça Gir com otite no estado de São Paulo, Brasil. Posteriormente, Asif *et al.* (2013) isolaram espécimes de *M. costai* de amostras de terra contendo esterco animal em uma fazenda da Índia. O presente estudo seria a terceira referência do isolamento desta espécie na literatura, que, à semelhança do estudo de Martins Jr. (1985) foi encontrada no CAE de bovinos Gir. Não foram encontradas na literatura relatos desta parasitose auricular em bovinos da Índia, porém o estudo de Asif *et al.* (2013) relata a presença desta espécie no solo do país onde a raça Gir se originou. Estes dados poderiam sustentar a hipótese de que este

nematoide, apresentando parte do ciclo em vida livre, teria ampliadas as chances de infectar os bovinos, seja de forma mecânica ou com o auxílio de vetores como sugerido por Odongo e D'Souza (1989), Vieira *et al.* (1998) e Duarte e Hamdan (2004).

Os nematoides da espécie *M. costai* identificados neste estudo apresentaram características morfológicas e morfométricas bastante semelhantes àqueles descritos por Martins Jr. (1985) e Asif *et al.* (2013). Na extremidade anterior observou-se a mesma orientação dos lábios, do formato triangular da abertura bucal e das características do istmo, do bulbo e do anel nervoso. Na região posterior, as três descrições destacam a semelhança de formato da bursa copuladora leptoderana, da distribuição das papilas e da pequena e delicada projeção caudal pós-bursa. Algumas diferenças, especialmente em relação aos aspectos morfométricos, foram detectadas ao serem comparados os espécimes do atual estudo com as descrições de *M. costai*, realizadas por Martins Jr. (1985) e Asif *et al.* (2013). Os espécimes analisados neste estudo apresentaram o corpo mais comprido e estreito do que aqueles descritos nas duas publicações anteriores. Estas características resultaram no maior valor da razão De Man "a" entre as três descrições (19,2-22,8 μ m). Quanto ao valor "b", este foi maior nos espécimes descritos por Martins Jr. (1985). Os nematoides descritos por Asif e col. (2013) apresentaram o estoma maior (30-38 μ m) que os espécimes deste estudo, tanto de maneira absoluta, quanto proporcionalmente em relação ao comprimento do corpo (4,4%). Por sua vez, o gubernáculo descrito por estes autores apresentou comprimento médio menor que os nematoides deste estudo (40,4 e 34,1 μ m, respectivamente). Quanto às características morfológicas, uma característica que apresentou diferenças entre os três estudos foi o aparato glotóide, descrito aqui e por Martins Jr. (1985) possuindo três ônquios e por Asif *et al.* (2013) provido de quatro a cinco e ornamentados por denticulos. Estes autores atribuíram aos espécimes 6 lábios, distribuídos em pares. Estes achados são ligeiramente diferentes dos encontrados neste estudo em que se observou, tanto à ML quanto à MEV, a presença de três lábios com uma leve depressão mediana que não caracteriza uma separação total. Porém as diferenças descritas acima não inviabilizam a identificação dos espécimes já que estas poderiam ser consideradas como variações intraespecíficas.

Martins Jr. (1985) isolaram a espécie *M. freitasi* do ouvido de bovinos com sinais de otite, no Município de Formosa em Minas Gerais. No estudo atual os nematoides estavam parasitando o ouvido dos bovinos das duas propriedades estudadas. Os resultados das análises morfológicas deste estudo permitiram concluir que esta é a mesma espécie descrita por Martins Jr. (1985). Porém, da mesma forma como aconteceu com a espécie *M. costai*, algumas estruturas apresentaram medidas ligeiramente diferentes da descrição de Martins Jr. (1985), sugerindo variações entre espécimes da mesma espécie. Tanto os exemplares machos quanto as fêmeas analisadas neste estudo foram menores e mais finos do que os descritos por Martins Jr. (1985), entretanto estes valores não fizeram com que houvesse diferenças entre as razões "a" de De Man, que foram semelhantes. Tanto as razões "b" e "c" quanto o comprimento da cauda foram menores nas fêmeas deste estudo. Já a cauda dos machos foi ligeiramente maior que dos espécimes de Martins Jr. (1985). Por outro lado, o estoma apresentou maior comprimento e menor diâmetro do que o das fêmeas da descrição original, o mesmo acontecendo com os machos. Enquanto os espículos foram maiores nos espécimes da descrição original, o gubernáculo deles foi menor que dos nematoides deste estudo. As análises realizadas neste estudo, utilizando-se a MEV, possibilitaram a descrição de estruturas de difícil visualização na MO. Ficaram bem evidentes os três lábios, dois latero-ventrais, nos quais estavam inseridas três papilas em cada, e um dorsal, apresentando quatro papilas. Martins Jr. (1985) descreveu os três lábios, porém, com apenas duas papilas em cada um deles.

Ao comparar as espécies *M. freitasi* e *M. costai* isoladas neste estudo verificou-se que ambas apresentaram estruturas similares, o mesmo tendo ocorrido na descrição feita por Martins Jr. (1985). Esta semelhança entre as espécies dificultou a diferenciação, porém, determinadas características morfométricas e morfológicas como o comprimento e largura do corpo, comprimento do esôfago e do estoma, o formato dos lábios, o formato e o comprimento da bursa e da cauda, possibilitaram separar as espécies. Como somente as fêmeas da espécie *M. freitasi* foram identificadas neste estudo, utilizou-se as características dos machos para determinar as espécies estudadas. Na região anterior dos espécimes a maior diferença estava nos lábios, que são mais delicados na espécie *M. freitasi*. No entanto, seus espécimes eram mais compridos e mais largos do que os da espécie *M. costai* e também possuíam o estoma e o esôfago mais compridos. Todos os valores de De Man foram menores na espécie *M. freitasi* do que na *M. costai*. A bursa do *M. costai* apresentou-se mais comprida, larga e arredondada, em formato de meia lua, enquanto na *M. freitasi*, ela tem formato triangular, com uma leve reentrância na região distal. Quanto à cauda, apesar de ambas as espécies apresentarem o comprimento total semelhante, a porção não recoberta pela bursa é significativamente mais curta na *M. costai* (1,4 μm) do que na *M. freitasi* (7,8 μm). A razão entre o comprimento do corpo e a largura do primeiro terço do tronco dorsal foi menor na *M. costai* do que na *M. freitasi*, ou seja, 4,0 μm e 5,0 μm , respectivamente.

Quanto aos espécimes de *M. blumi* (DF5010), solicitados junto ao CGC, as análises morfométricas mostraram resultados ligeiramente diferentes aos da descrição original da espécie (Sudhaus, 1974) e ao estudo de Carta e Osbrinck (2005). Estes últimos, que também analisaram amostras da mesma cultura do atual estudo (*M. blumi* DF5010), já haviam detectado ligeiras diferenças. Estas foram atribuídas ao longo período de cultivo o qual predisporia a mutações e a mudanças nos parâmetros morfométricos, em especial, no comprimento e largura do corpo e no comprimento da cauda. Ao serem comparados com os espécimes de *M. costai* e *M. freitasi* verificou-se diferenças em algumas estruturas, o que permitiu concluir que os espécimes de *M. blumi* originados do CGC eram diferentes dos nematoides identificados neste estudo. A espécie *M. costai* apresentou os três valores das razões de De Man maiores, já na espécie *M. freitasi*, apenas o valor “c” foi maior do que em *M. blumi*. A cauda de *M. blumi* apresentou-se mais comprida se comparada com a *M. costai* e a *M. freitasi*, enquanto a projeção pós bursa foi aproximadamente 10 vezes mais comprida do que na *M. costai* e cerca do dobro do comprimento da *M. freitasi*. O resultado da razão entre o comprimento do corpo e a largura do primeiro terço do tronco dorsal da cauda também foi maior na *M. blumi* (7,3 μm) do que nas *M. costai* (4,0 μm) e na *M. freitasi* (5,0 μm). Em relação às diferenças morfológicas, a espécie *M. costai*, apresentou a bursa mais larga, arredondada e em formato de meia lua. Na *M. blumi* o formato também é arredondado, porém a finalização da bursa ocorre de forma abrupta com a formação de uma reentrância em forma de degrau próximo à projeção da cauda (Sudhaus, 1974). Na espécie *M. freitasi* a bursa é estreita e tem formato de um triângulo isósceles em que o vértice distal coincide com a projeção da cauda delgada. Em relação aos espículos, a espécie *M. blumi* apresentou o comprimento ligeiramente maior do que nas outras espécies. Os resultados da comparação entre as espécies isoladas do CAE dos bovinos com a amostra de *M. blumi* oriunda do CGC sugerem que são três espécies diferentes. Vale ressaltar que Sudhaus (1991), ao relacionar as espécies da família Rhabditidae descritas entre os anos de 1976 e 1986, sugeriu que *M. costai* e *M. freitasi* eram idênticas à *M. blumi* (Sudhaus 2011), o que diverge dos resultados do estudo atual.

Os resultados das análises moleculares e morfológicas para identificação das espécies de nematoides presentes na secreção auricular de bovinos com otite parasitária levam a questionamentos que provavelmente só poderão ser respondidos com a continuidade dos estudos utilizando-se, tanto as metodologias utilizadas neste estudo quanto associações com outras diferentes técnicas além do estudo de um maior número de exemplares de nematoides. O uso da

técnica de código de barras genético é defendido por inúmeros pesquisadores como uma solução rápida, eficiente e de baixo custo para identificar toda a biodiversidade do nosso planeta, inclusive nematoides (Floyd *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2009; Consoli *et al.*, 2012; Stoeckler *et al.*, 2015). Eles acreditam que a taxonomia convencional além de ser um processo lento, necessita de taxonomistas de amplo conhecimento, devido especialmente à dificuldade em discriminar as variações intra e interespecíficas. No entanto, pesquisadores como Solé-Cava (2008) questionam a utilização da técnica sem a associação da taxonomia convencional para auxiliar na interpretação dos resultados moleculares.

Vale frisar que seria de enorme valia para este estudo a análise das lâminas montadas com as espécies *M. costai* e o *M. freitasi* depositadas na coleção de helmintologia do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG por Martins Jr. (1985). Entretanto, essa avaliação não foi possível pois as mesmas não encontradas na coleção. Soma-se ao exposto a evidente necessidade de se utilizar, tanto as técnicas morfológicas de taxonomia convencional quanto as moleculares de identificação específica, de maneira conjunta e complementar. O diagnóstico molecular de nematoides tem proporcionado novas oportunidades à Nematologia, incrementando a capacidade de analisar grande número de amostras ou detectar *mix* de espécies, mas não pode ser considerado de maneira isolada (Pires e Marinori, 2012). Acredita-se que seria ideal que as espécies, cujas sequências estejam no GenBank, sejam previamente analisadas por um taxonomista.

I.7 CONCLUSÕES

- De acordo com as análises moleculares utilizando a tecnologia de código de barras do DNA para obtenção das sequências consenso da expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA, os nematoides originários das populações Fz1, Fz2-Gama, Fz2-737, Fz2-FGVI2 e Fz2-Piso das fazendas de Minas Gerais, pertencem à espécie *Metarhabditis blumi* (Sudhaus, 1985) Sudhaus 2011.
- A árvore filogenética resultante do alinhamento das sequências de *Rhabditis* sp. e de *Metarhabditis* sp. depositadas no GenBank, com as cinco populações estudadas confirmou o agrupamento dos nematoides das amostras analisadas como *M. blumi*.
- Nas amostras coletadas dos bovinos das fazendas 1 e 2, tanto nas cultivadas quanto nas a fresco, foram identificados morfológicamente, parasitos das espécies *M. freitasi* e *M. costai*. Foi identificado também um outro nematoide do qual não foi possível concluir o diagnóstico diferencial.
- E de acordo com as análises morfométricas e morfológicas, em nenhuma das amostras analisadas identificou-se espécimes da espécie *M. blumi*.
- Novos estudos morfológicos e moleculares devem ser realizados para elucidar quais são as espécies de nematoides presentes na secreção auricular dos bovinos da raça Gir.

I.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo sugerem que a expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA é eficaz na diferenciação dos espécimes de nematoides do gênero *Metarhabditis*. As análises morfológicas e morfométricas mostraram que os nematoides isolados do conduto auditivo dos bovinos das duas fazendas estudadas eram de espécies já descritas em estudo anterior, porém ainda não cadastradas no GenBank. Sugere-se que os estudos taxonômicos e moleculares sejam aprofundados e sempre

realizados em conjunto, utilizando-se um número maior de espécimes e ampliando-se a coleta de amostras em outros rebanhos de bovinos da raça Gir em todo o país.

II. CAPÍTULO 2

ESTUDO MICROBIOLÓGICO DO CONDUTO AUDITIVO EXTERNO DE BOVINOS DA RAÇA GIR, COM E SEM OTITE PARASITÁRIA.

RESUMO

Avaliou-se com este estudo o perfil microbiológico do conduto auditivo externo (CAE) de bovinos da raça Gir sadios e com otite relacionada a nematoides da família Rhabditidae. Foram utilizadas 12 fêmeas adultas, com idade entre cinco e oito anos, pertencentes à Fazenda Experimental da EPAMIG, Itabira, MG. Os animais foram separados em dois grupos: seis com otite (COP) e seis sem otite (SOP). Foram realizados cultivos bacterianos e fúngicos das amostras coletadas no CAE dos 12 animais. De cada animal foram feitas quatro coletas totalizando 47 amostras, já que um dos animais não estava presente na última coleta. Em todas amostras houve crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, em culturas puras ou em associações. No total foram 38 isolados bacterianos no grupo dos animais com otite e 34 no grupo dos animais sadios. As bactérias Gram-negativas foram mais prevalentes tanto nas amostras do grupo COP (65,8%), quanto naquelas do grupo SOP (60,0%). Os gêneros mais prevalentes em ambos os grupos foram *Staphylococcus* sp. e o *Pseudomonas* spp. Os testes de sensibilidade aos antibióticos realizados em todos os isolados bacterianos indicaram que as bactérias mais resistentes foram as isoladas dos animais com otite parasitária. Quanto aos fungos, foram 34 isolados fúngicos em 17 amostras do grupo COP e 14 em 11 amostras do grupo SOP. O gênero mais prevalente em ambos os grupos foi o *Aspergillus* sp.

Palavras chave: Microrganismos, multirresistência, antibióticos, otite parasitária, Gir.

ABSTRACT

*The goal of this study was the evaluation of the microbiological profile of the external auditory canal (EAC) of Gir cattle with and without otitis related to nematodes of Rhabditidae family. Twelve adult females from the Experimental Farm EPAMIG, Itabira, MG were studied, which were aged between five and eight years. The animals were separated into two groups: six with otitis (COP) and six without otitis (SOP). Bacterial and fungal cultures of samples collected in the EAC of these 12 animals were performed. Four samples have been taken of each animal. Forth seven samples was analyzed, as one of the animals was not present in the last collection day. In all samples, it was observed the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria in pure or mixed cultures. Thirty-eight bacterial isolates was isolated in the group of animals with otitis and 34 in the group of animals without otitis. Gram-negative bacteria are the most prevalent in both groups: COP (65.8%) and SOP (60.0%). The most frequent genera in both groups were *Staphylococcus* sp. and *Pseudomonas* spp. The sensitivity tests against antibiotic performed on all bacterial isolates indicated that the most resistant bacteria were present in animals with otitis parasitic. The fungi were also studied. Thirty-four fungi isolated were obtained in 17 samples of the COP group and 14 in 11 samples of the SOP group were studied. The most frequent genre in both groups was *Aspergillus* sp.*

Keywords: *Microorganisms; multi resistance, antibiotics, parasitic otitis, Gir.*

II.1 INTRODUÇÃO

A otite externa causada por nematoides da família Rhabditidae ocorre frequentemente em bovinos da raça Gir. Veterinários e criadores relacionam os casos de otite parasitária a elevados prejuízos devido à diminuição dos índices produtivos e à morte dos animais cronicamente afetados. Quando parasitado, o conduto auditivo externo (CAE) torna-se susceptível à proliferação de microrganismos devido ao aumento da temperatura e da umidade local e ao acúmulo de cerúmen, frequentes em processos inflamatórios. Duarte e Hamdan (2004) sugeriram que a ineficiência dos tratamentos da otite parasitária teria como causa as infecções secundárias decorrentes da presença dos parasitos. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de fungos e leveduras, já foram associados a casos de otite parasitária em bovinos. No entanto, são escassos os relatos na literatura a respeito da flora normal do ouvido de bovinos hígidos. Este estudo teve como objetivo conhecer a microbiota do conduto auditivo externo de bovinos da raça Gir, sadios e com sinais clínicos de otite parasitária causada pelo nematoide. Acredita-se que o conhecimento da microflora auricular dos bovinos poderá auxiliar na determinação de protocolos de tratamento e controle eficientes contra os parasitos auriculares de bovinos da raça Gir.

II.2 OBJETIVOS

- Determinar o perfil microbiológico do conduto auditivo externo (CAE) de bovinos sadios e com sinais clínicos de otite parasitária;
- Conhecer o perfil de sensibilidade aos antibióticos das bactérias isoladas das amostras obtidas no CAE dos animais com e sem otite.

II.3 REVISÃO DE LITERATURA

O ouvido dos animais domésticos é dividido em três compartimentos interligados entre si: ouvido externo, ouvido médio e ouvido interno. De acordo com Sisson e Ghandhi (1986), o primeiro, constituído de pavilhão auricular e conduto auditivo externo (CAE), possui epiderme semelhante à da pele. Na sua porção mais profunda localiza-se o tímpano, membrana que separa o ambiente externo do interior do corpo do animal. Já o ouvido médio, também chamado de cavidade timpânica, é onde se localizam os ossículos (martelo, estribo e bigorna) e a trompa de Eustáquio, com ligação direta com a faringe. O ouvido interno, a porção mais especializada, é subdividido em cóclea, porção acústica e órgão vestibular. Segundo Santos (1979), as otites são classificadas de acordo com a localização onde o processo está presente em: externas, médias e internas.

Casos de otite ocorrem em todos os animais domésticos e sua etiologia inclui fungos, leveduras, parasitos e bactérias. É uma doença frequente em cães de todas as idades, sendo um dos principais motivos para as consultas na clínica veterinária (Oliveira *et al.*, 2012; Petrov *et al.*, 2013). Gatos, equinos, suínos e pequenos ruminantes também são acometidos (Jensen *et al.*, 1982; Al-Farwachi e Al-Hassan, 2008). De maneira geral os três tipos de otite são comuns em bovinos. Entretanto, as otites que acometem as porções média e interna do ouvido de animais jovens são mais comuns (Jensen *et al.*, 1982; Yeruham *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2005). Um caso incomum de otite média bilateral, de origem bacteriana, foi descrito em uma vaca leiteira por Yeruham e Elad (2004). De acordo com relatos de Nunes e Nunes (1975), a extensão da otite externa até o ouvido médio é uma ocorrência frequente em casos de infecção por parasitos das orelhas e de corpos estranhos penetrantes. A otite média também pode originar-se do aparelho respiratório,

com o agente etiológico propagando-se ao ouvido pela Trompa de Eustáquio ou por via hematogena (Rosemberg e Stöber, 1993; Macy, 2004).

A inflamação do ouvido externo tem inúmeros fatores predisponentes e perpetuantes, tais como: anatomia das orelhas, umidade local excessiva, corpos estranhos, uso prolongado de antibióticos sistêmicos, ocorrência de neoplasias, imunossupressão e parasitos, tais como fungos, leveduras, moscas, ácaros e nematoides (Rosemberg e Stöber, 1993). Os sinais clínicos iniciais são hiperemia seguida de acúmulo de cerúmen, secreção amarelada e fluida localizada na porção inicial do CAE. Às vezes o processo inflamatório tem evolução crônica, ocorrendo ulcerações ou hiperplasias e hiperqueratose, com constrição do lúmen. As infecções bacterianas secundárias são frequentes. A ruptura da membrana timpânica acontece devido à necrose ou ao acúmulo de secreção purulenta no local, e como consequência ocorre a propagação da infecção à porção média do ouvido.

De maneira similar às outras espécies animais, a otite externa também ocorre em bovinos de todas as faixas etárias. Em bezerros, ela geralmente é decorrente de sequelas de infecções respiratórias (Al-Farwachi e Al-Hassan, 2009). Os parasitos auriculares são importantes agentes etiológicos da doença. Autores como Leite *et al.* (1989b) e Duarte e Hamdan (2004) consideram os nematoides do gênero *Rhabditis* e ácaros do gênero *Raillietia* como os agentes primários da otite em bovinos. Os ácaros não fazem distinção de idade ou raça do hospedeiro, já o nematoide só é encontrado em animais da raça Gir, com idade superior a 18 meses (Duarte *et al.*, 2001a; Leite *et al.*, 2012).

A doença causada pelo nematoide auricular é um grave problema sanitário que acarreta diminuição dos índices produtivos podendo, inclusive, levar à morte os animais cronicamente afetados (Msolla *et al.*, 1993; Vieira *et al.* 2001; Duarte & Hamdan 2004; Brito *et al.* 2005; Leite *et al.*, 2012). Apesar da doença ter sido descrita no Brasil em 1974, ainda é considerada um desafio para veterinários e criadores devido à ineficiência dos protocolos de tratamentos utilizados (Leite *et al.*, 2012). Quando não ocorre tratamento adequado a cronicidade da infecção é acompanhada pelo crescimento de microrganismos como bactérias, fungos e leveduras (Duarte e Hamdan, 2004). Nestes casos a otite externa pode evoluir para a otite média e interna, com graves consequências para o animal. Dune *et al.* (2004) relataram a morte de uma vaca Gir devido à um abscesso cerebelar secundário à otite associada ao nematoide.

Os agentes microbiológicos presentes no sistema auditivo dos animais domésticos, sadios e com otite, têm sido objeto de inúmeros estudos realizados em seres humanos e em algumas espécies animais. Em cães e gatos o assunto tem grande relevância devido à proximidade e a importância afetiva destas espécies para os homens (Oliveira *et al.*, 2012; Petrov *et al.*, 2013). Leite *et al.* (1987) descreveram a flora bacteriana em diferentes locais do aparelho auditivo de bovinos sadios e parasitados pelo ácaro *Raillietia auris*. Foram isolados *Micrococcus* e *Bacillus*, além de Bastonetes Gram-negativos não classificados nos ouvidos hígidos e parasitados. Bactérias Gram-negativas dos gêneros *Proteus*, *Pseudomonas* e *Corynebacterium pyogenes*, foram as mais prevalentes no CAE com otite. Al-Farwachi e Al-Hassan (2009), isolaram cocobacilos *Pasteurella multocida* e *Mannheimia hemolytica* de bezerros com otite e *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumonia* de animais hígidos, porém não foram encontrados parasitos auriculares.

Com relação à presença de fungos e leveduras no CAE de bovinos, Duarte *et al.* (1999) e Duarte *et al.* (2001b) isolaram os gêneros *Candida*, *Aspergillus* e *Malassezia*, assim como as espécies *Rhodotorula mucilaginosa* e *Micelia sterilia* em animais com otite parasitária.

De acordo com Duarte e Handam (2004), a ineficiência dos tratamentos da otite parasitária em bovinos pode ser atribuída ao desconhecimento dos produtos mais indicados, em especial, contra as infecções bacterianas e fúngicas, secundárias à infecção por nematoides. Este estudo teve como objetivo investigar os microrganismos presentes no CAE de dois grupos de bovinos da raça Gir, com e sem sinais clínicos de otite causada por nematoides. Procurou-se também conhecer o perfil da sensibilidade à antimicrobianos das bactérias isoladas em ambos os grupos.

II.4 MATERIAL E MÉTODOS

II.4.1 Local de coleta das amostras e duração do estudo

As amostras utilizadas para a avaliação microbiológica do conduto auditivo de bovinos da raça Gir foram coletadas na fazenda 2 (Fazenda Experimental de Itabira (FEIT) - EPAMIG), localizada em Itabira, MG. Foram realizadas quatro coletas de material de cada animal, nos meses de julho e novembro de 2013 e janeiro e abril de 2014.

II.4.2 Diagnóstico parasitológico e seleção de animais

Os 32 animais do rebanho foram contidos em brete de madeira e, utilizando-se um cabresto de corda, foi feita a imobilização da cabeça, de maneira que as orelhas ficassem livres. Realizou-se a inspeção visual do pavilhão auricular e da porção inicial do conduto auditivo externo (CAE). Foi utilizada uma zaragatoa estéril para coletar uma amostra do CAE de cada animal. A amostra foi colocada em um tubo de vidro transparente e em seguida mantida por 5 minutos à luz solar direta para verificar a presença de nematoides (Figura II.1 A e B), conforme preconizado por Leite *et al.* (1989).

Após este procedimento selecionou-se 12 fêmeas adultas, com idade variando entre seis e oito anos. Elas foram divididas em dois grupos de seis animais cada: grupo com otite (COP) e grupo sem otite parasitária (SOP). Os animais do grupo COP, numeradas de 1 a 6, apresentaram sinais clínicos de otite parasitária, caracterizado pela presença de secreção amarelada na porção inicial do CAE, com odor desagradável e grande quantidade de nematoides. Os animais do grupo SOP, numerados de 7 a 12, estavam livres da infecção pelo parasito e apresentaram o CAE hígido, com pequena quantidade de cerúmen de cor marrom.

II.4.3 Coletas de amostras e análises microbiológicas

As amostras para avaliação microbiológica foram coletadas da orelha direita de cada animal. Utilizou-se uma zaragatoa estéril que foi friccionada, com movimentos rotatórios na porção inicial do CAE (Leite *et al.*, 1994). Em seguida cada zaragatoa foi colocada em tubo de ensaio identificado, contendo meio de transporte (Stuart). As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Micologia e Micotoxinas da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (LAMICO/EV-UFGM), onde foram feitas as análises microbiológicas.

Foram realizados cultivos bacterianos e fúngicos da amostra do CAE dos 12 animais, em quatro coletas diferentes, totalizando 47 amostras. O animal de número oito, pertencente ao grupo SOP foi vendido em dezembro de 2013, portanto, só foram analisadas três amostras deste animal. As 47 amostras foram analisadas independentemente, mesmo quando pertenciam ao mesmo animal. Cada uma delas foi classificada no grupo COP ou no grupo SOP, conforme pertencesse à um bovino com ou sem sinais clínicos de otite parasitária.

A avaliação dos microrganismos isolados nas amostras de secreção auricular, iniciou-se com o exame direto de esfregaços submetidos à coloração de Gram através de microscopia de luz de

imersão (1.000x). Em seguida, o material foi incubado por 24 a 48 horas a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ em placas de Petri com cinco tipos distintos de ágar, de acordo com o objetivo a ser alcançado:

- Ágar sangue bovino (5%) desfibrinado - meio rico, utilizado para o isolamento de microrganismos não fastidiosos;
- Ágar manitol salgado - meio seletivo para o isolamento e identificação presuntiva de *Staphylococcus* spp. patogênicos;
- Ágar MacConkey - meio seletivo para bactérias Gram negativas;
- Ágar Sabouraud dextrose (SDA) com cloranfenicol - utilizado para o isolamento de fungos e leveduras patogênicos
- Ágar Sabouraud dextrose com azeite de oliva (1%) - utilizado para isolamento de leveduras do gênero *Malassezia*.

Os cultivos em SDA foram incubados a $27 \pm 2^\circ \text{C}$ por até sete dias, condição mais favorável ao desenvolvimento de fungos filamentosos e leveduras e a $32 \pm 2^\circ \text{C}$ favorável ao desenvolvimento de *Malassezia* sp. Todos os aspectos do crescimento das colônias foram anotados e serviram como base para a identificação presuntiva.

As colônias que apresentaram características diferentes, em cada amostra, foram novamente isoladas e foram realizados testes adicionais específicos com o objetivo de classificá-las em gêneros e/ou espécies (Pitt e Hocking, 2009; Koneman e Allen, 2008). Para classificação presuntiva de bactérias Gram-positivas foram realizadas as provas de catalase, coagulase, produção de hemólise em ágar sangue, pigmentação das colônias, resistência à bacitracina e oxidase. Para classificação das bactérias Gram-negativas utilizou-se as provas bioquímicas de citrato, ágar triplice ferro açúcar (TSI), vermelho de metila (VM), Voges Proskauer (VP), indol e motilidade.

II.4.4 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

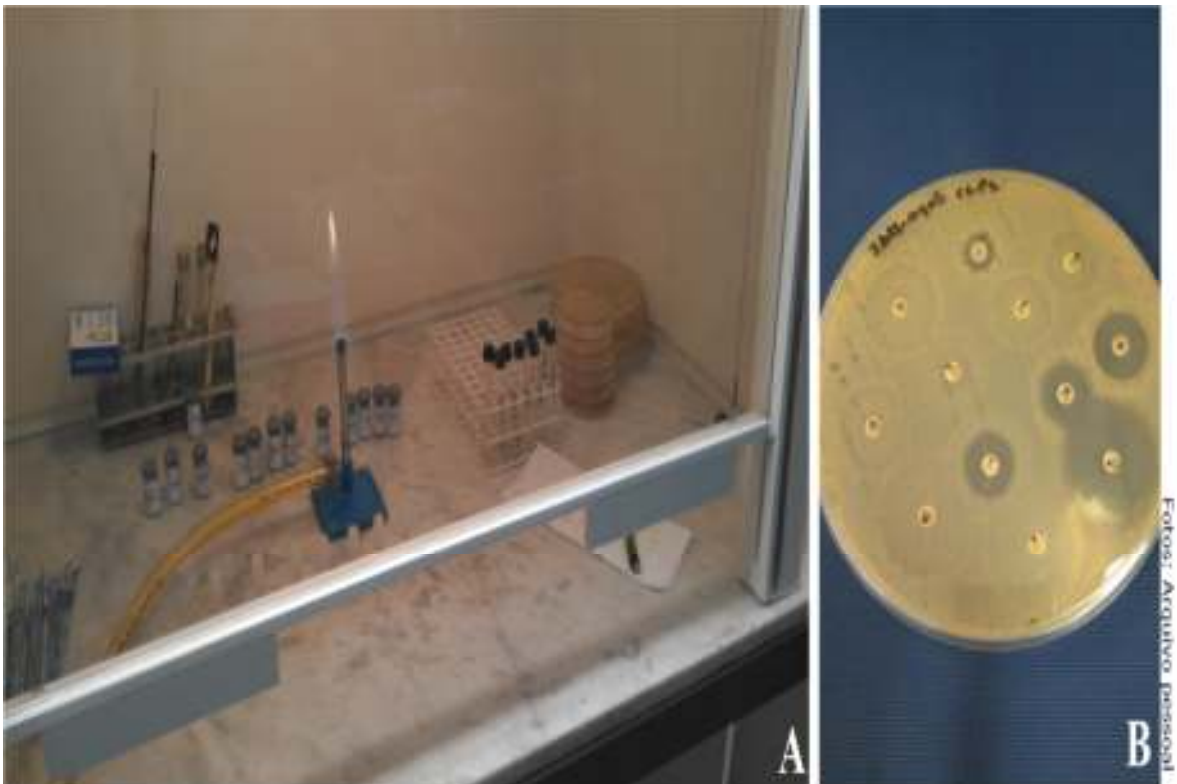
Após a identificação bacteriana, cada colônia foi repicada em caldo infusão de cérebro coração (BHI), incubadas a 37°C por 24 horas. O inóculo resultante foi transferido, com a ajuda de zaragatoa estéril, para placas de Petri, contendo ágar Müller Hinton, para avaliar a sensibilidade bacteriana *in vitro*, segundo o método Kirby Bauer modificado. Foram utilizados os principais antibióticos preconizados para a terapêutica das otites, os quais foram disponibilizados pelo LAMICO/EV-UFG: Gentamicina, Ciprofloxacina, Sulfametoxazol + Trimetoprima, Cefalexina, Cefalotina, Cefoxitina, Ceftiofur, Polimixina B, Florfenicol, Amoxicilina, Amoxicilina + Ac. Clavulânico, Ampicilina, Ampicilina + Sulbactam, Penicilina G, Oxacilina e Bacitracina. Vale ressaltar que quando o estoque de discos de algumas bases foi insuficiente para a realização de todos os testes, estes foram substituídos por discos de bases do mesmo grupo (Figura II.2 A e B). A leitura foi realizada 24 horas após a incubação das placas a 37°C , medindo-se os halos de inibição e comparando-os com tabelas fornecidas pelos fabricantes dos discos de antibióticos.

II.4.5 Análise estatística

Utilizou-se a estatística descritiva para analisar os resultados de frequência das bactérias e fungos isolados nas amostras de secreção auricular dos animais com e sem otite parasitária.



- **Figura II.1** Coleta de amostra de secreção auricular para análises microbiológicas (A). Visualização dos nematoides presentes na amostra coletada (B).



- Figura II.2** Teste de sensibilidade a antimicrobianos. Capela com lâmina de fluxo laminar do LAMICO, onde foram processadas as amostras (A). Placa ágar Müller Hinton com os discos de bases de antibióticos foram distribuídos uniformemente (B).

II.5 RESULTADOS

II.5.1 Resultados microbiológicos das amostras submetidas à cultura bacteriana

Os resultados dos cultivos bacterianos da secreção auricular dos animais estudados, totalizando 47 amostras, estão relacionados na Tabela II.1.

Em todas as amostras coletadas no conduto auditivo dos bovinos houve crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, em culturas puras ou em associações. Isolou-se apenas um tipo de bactéria em 15 das 24 amostras do grupo COP e em 13 das 23 amostras do grupo SOP. No total, foram 38 isolados no grupo dos animais com otite e 34 no grupo dos animais saudáveis.

Na figura II.3 detalhou-se prevalência do tipo de bactéria isolada das amostras, de acordo com as características tintoriais da parede celular. Verificou-se que o percentual de bactérias Gram-negativas foi superior ao de Gram-positivas, tanto nas amostras do grupo COP (65,8%), quanto naquelas do grupo SOP (60,0%).

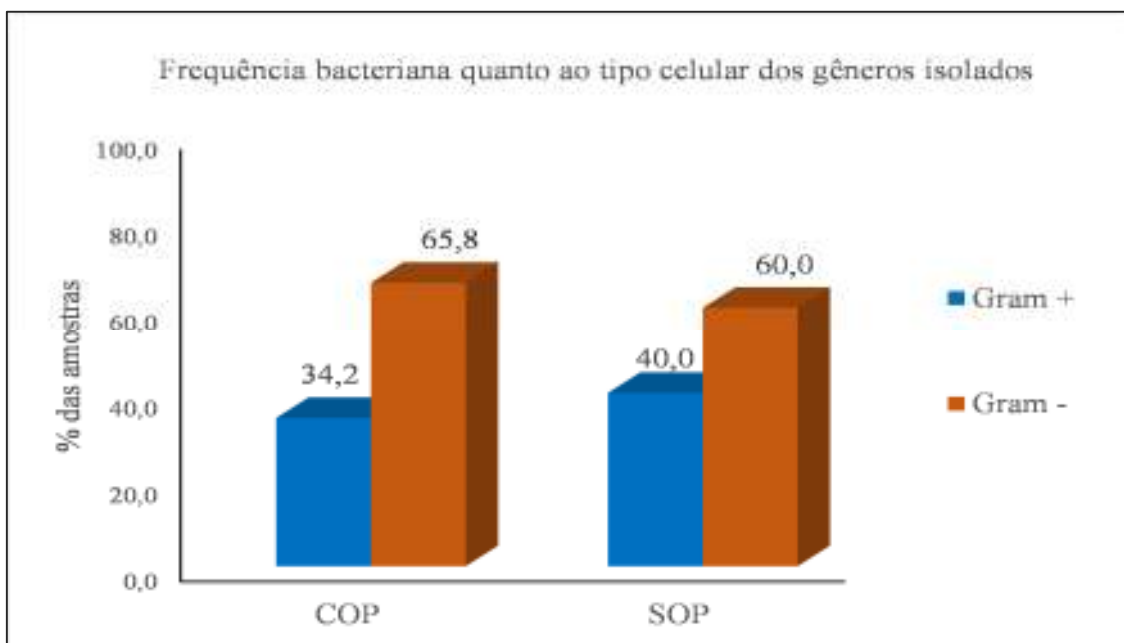


Figura II.3. Frequência de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas isoladas das amostras coletadas do CAE de animais dos grupos estudados.

Tabela II.1 Resultado do crescimento de bactérias nas amostras coletadas do conduto auditivo externo de bovinos da raça Gir, na fazenda 2, localizada no município de Itabira, MG, nos meses de julho e novembro de 2013 e janeiro e abril de 2014.

Animal	Julho 2013	Novembro 2013	Janeiro 2014	Abril 2014
1 Foca	-	-	<i>Staphylococcus coagulase</i> positiva	-
	<i>Pantoea</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	-	<i>Escherichia coli</i>
2 Feijoada	-	-	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa
	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Citrobacter</i> spp. Bacilo Gram- não fermentador <i>Pantoea</i> spp.	<i>Citrobacter</i> spp.
	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa	-	<i>Staphylococcus coagulase</i> positiva	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa
3 Iguana	-	<i>Proteus</i> spp.	<i>Citrobacter</i> spp. Bacilo Gram- não fermentador	<i>Citrobacter</i> spp.
	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa	-	<i>Staphylococcus coagulase</i> positiva	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa
4 Gama	-	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Citrobacter</i> spp.
	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa	-	<i>Staphylococcus coagulase</i> positiva	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa
5 Abdala	<i>Micrococcus</i> spp.	-	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa	-
	-	<i>Citrobacter</i> spp.	Bacilo Gram- não fermentador	<i>Escherichia coli</i>
6 Bondosa	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa	-	-	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa
	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Pantoea</i> spp.	<i>Proteus</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp. Bacilo Gram- não fermentador	-
	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa	-	<i>Staphylococcus coagulase</i> positiva	-
7 Imida	-	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa	-	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa	-
8 Bacharela	-	<i>Pseudomonas</i> spp.	Bacilo Gram- não fermentador	-
	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa	-	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa
9 Alasca	Bacilo Gram- não fermentador	<i>Shigella</i> spp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Bacilo Gram- não fermentador
	-	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa	-
10 Babete	Bacilo Gram- não fermentador	-	Bacilo Gram- não fermentador	Bacilo Gram- não fermentador
	-	-	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa
11 Interação	<i>Pantoea</i> spp.	<i>Pantoea</i> spp.	Bacilo Gram- não fermentador	Bacilo Gram- não fermentador
	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa	<i>Staphylococcus</i> spp.	-	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa
12 Madural	-	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	Bacilo Gram- não fermentador
	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa	-	-	<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa

Os animais de 1 a 6 eram parasitados pelo nematoide auricular do gênero *Rhabditis*. Os animais de 7 a 12 não apresentaram sinais clínicos de otite parasitária.

Na Tabela II.2 estão detalhados a distribuição e o percentual dos isolados encontrados nas amostras de ambos os grupos, de acordo com a presença de apenas um tipo de bactéria ou a associação de Gram-positivas e Gram-negativas. No grupo COP, identificou-se na maioria das amostras isolado exclusivo de bactérias Gram-negativas (45,8%). Nas amostras dos animais saudáveis, a maior prevalência foi da associação dos dois tipos bacterianos (43,5%).

Tabela II.2 Frequência de bactérias isoladas das amostras coletadas nos dois grupos de animais, em culturas puras e em associações, de acordo com as características tintoriais da parede celular.

Bactérias isoladas *	COP		SOP	
	Nº isolados	%	Nº isolados	%
Gram +	5	20,8	4	17,4
Gram -	11	45,8	9	39,1
Gram + e Gram -	8	33,3	10	43,5
Total	24		23	

COP = Com otite parasitária SOP = Sem otite parasitária

* Foram consideradas as bactérias isoladas em culturas puras ou em associação de diferentes gêneros.

A análise das diferenças morfológicas das bactérias isoladas nas amostras de ambos os grupos está indicada na figura II.4. O tipo mais prevalente nas amostras do grupo COP foi de bastonetes Gram-negativos fermentadores (BGNF), com 34,2% do total. Em seguida, foram isolados os bastonetes Gram-negativos não fermentadores (BGNnF) e os cocos Gram-positivos (CGP), ambos com percentual de 31,6%. Apenas uma amostra deste grupo apresentou bastonetes Gram-positivos (BGP), com percentual de 2,6% do total de amostras. Nas amostras coletadas do grupo SOP, a maior prevalência foi de BGNnF (48,6%), seguida de CGP (40%) e de BGNF, com prevalência de 11,4%. Não foram encontrados BGP neste grupo.

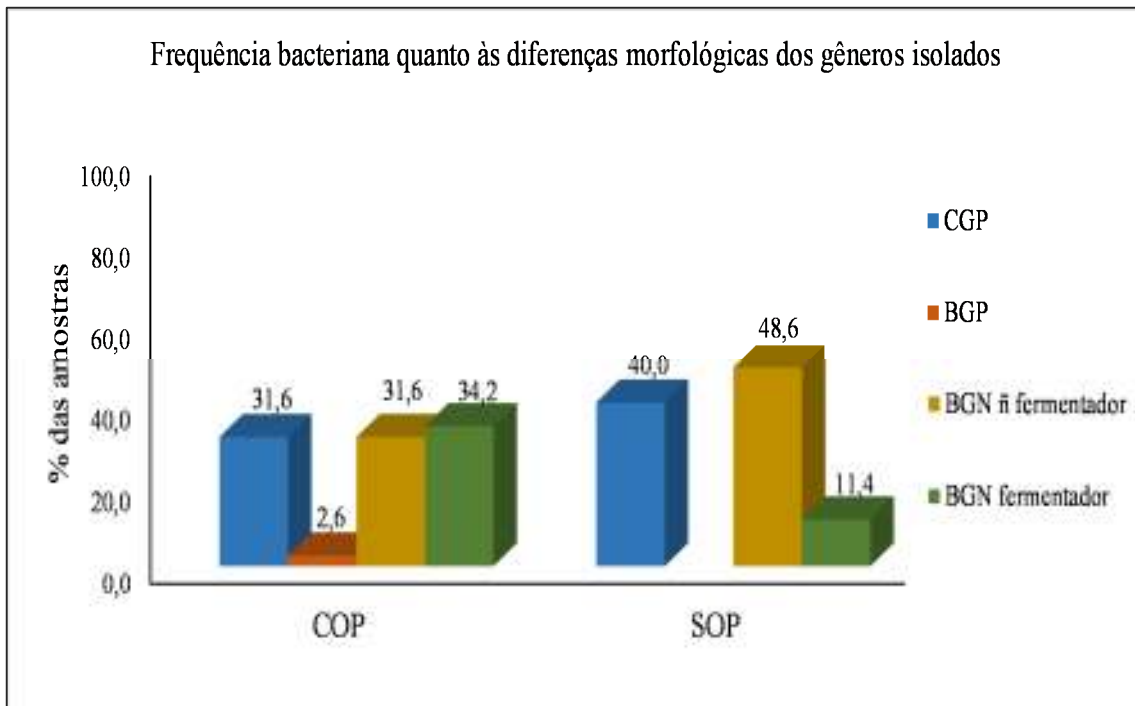


Figura II.4. Frequência de bactérias isoladas nos animais dos grupos estudados, de acordo com as diferenças morfológicas e bioquímicas.

As frequências dos diferentes gêneros de bactérias isolados nas amostras do conduto auditivo de bovinos com e sem otite parasitária estão detalhadas na figura II.5. O *Staphylococcus* foi o gênero mais encontrado nas amostras dos dois grupos (31,6% no grupo COP e 37,1% no grupo SOP). No grupo COP, a segunda maior ocorrência foi de *Pseudomonas* spp. (21,0%), seguido pelo *Citrobacter* spp. que foi isolado em 15,8% das amostras. O gênero *Pseudomonas* foi isolado em 20,0% dos animais saudáveis e *Citrobacter* spp. não foi identificado neste grupo. O gênero *Pantoea* foi encontrado em ambos os grupos, com prevalência de 7,9% no COP e de 5,7% no SOP. Os gêneros *Escherichia* e *Proteus* foram encontrados em 5,3% das amostras do grupo COP. No grupo SOP, somente o gênero *Escherichia* foi isolado em 2,9% do total de amostras. Ambos os gêneros *Micrococcus* e *Shigella* tiveram frequência de 2,9% nas amostras do grupo SOP. O gênero *Bacillus* foi isolado apenas no grupo COP em 2,9% das amostras. Finalmente as bactérias BGNnF estavam presentes em 28,6% das amostras dos animais saudáveis e em 10,5% das amostras do grupo com otite. Não foi possível a identificação em nível de gênero destas bactérias.

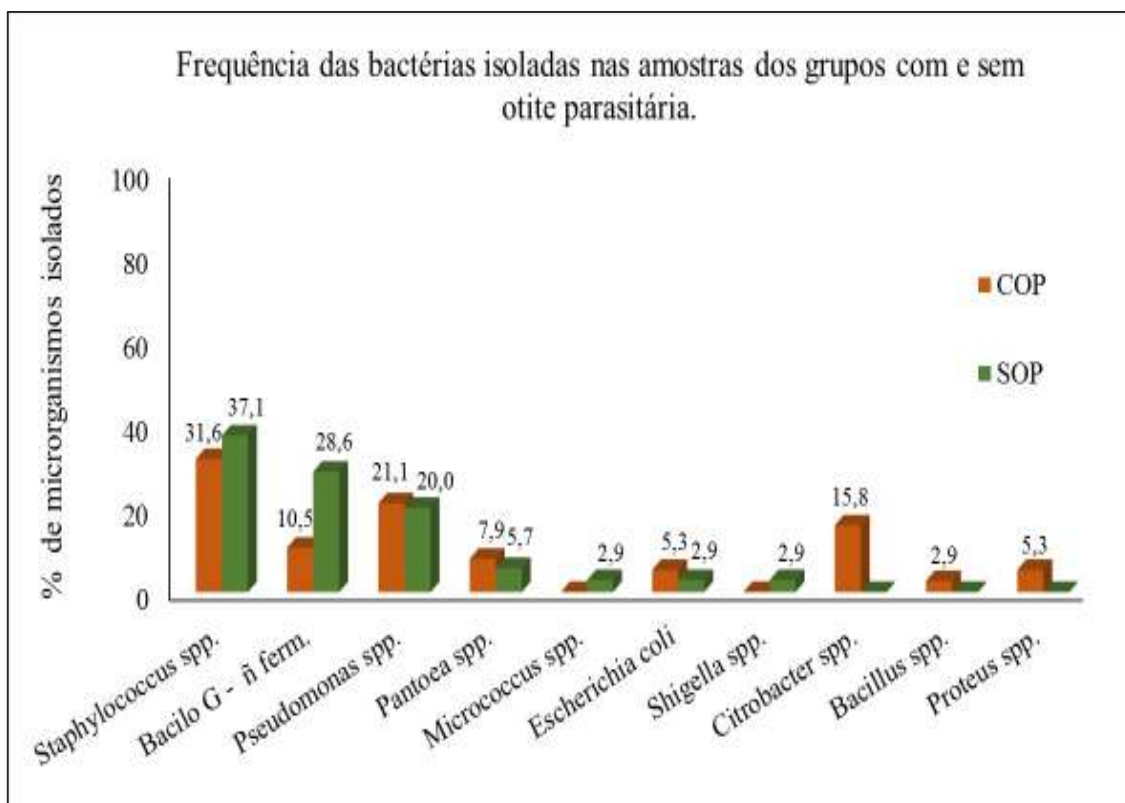


Figura II.5 Frequências dos diferentes gêneros de bactérias isoladas nas amostras coletadas do conduto auditivo dos bovinos dos grupos estudados.

II.5.2 Frequência de infecções por fungos

Os resultados do crescimento de fungos nas amostras coletadas nos meses de julho e novembro de 2013 e nos meses de janeiro e abril de 2014 estão na tabela II.3. Os gêneros presentes em cada amostra também estão relacionados nesta tabela. Das 24 amostras do grupo COP, 17 delas estavam positivas para fungos e obteve-se 34 isolados. Das 23 amostras dos animais saudáveis, 11 estavam positivas e originaram 14 isolados. Em algumas amostras, os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Curvularia* e *Bipolaris* foram encontrados isoladamente. Em outras, foram isoladas associações de até quatro gêneros diferentes. Nos meses de julho de 2013 e janeiro de 2014, o CAE de todos os animais do grupo COP continham fungos. As infecções eram simples ou continham até quatro espécies distintas. Neste mesmo período foi detectada a maior incidência de espécies fungicas isoladas no grupo SOP. Entretanto nem todas as amostras foram positivas. Não foram isolados fungos nos animais de número 7, 8 e 10 no mês de julho, assim como nos animais 7 e 10, no mês de janeiro. No mês de janeiro os animais 9 e 11 apresentaram uma única espécie de fungo, enquanto na amostra do animal 12 foram encontradas duas espécies distintas. Nas amostras coletadas em novembro de 2013 e abril de 2014, em ambos os grupos, houve um predomínio de infecções simples e uma variedade de gêneros isolados.

Tabela II.3 Resultados do crescimento de fungos nas amostras coletadas nos meses de julho e novembro de 2013 e janeiro e abril de 2014.

Animal	Julho 2013	Novembro 2013	Janeiro 2014	Abril 2014
	Fungos	Fungos	Fungos	Fungos
1 Foca	<i>Aspergillus niger</i> agregados <i>Aspergillus</i> spp. <i>Cladosporium</i> spp.	-	<i>Aspergillus niger</i> agregados <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus</i> spp.	-
2 Feijoada	<i>Aspergillus versicolor</i> <i>Cladosporium</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Rodothorula</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp. <i>Cladosporium</i> spp.	-	<i>Aspergillus</i> spp.
3 Iguana	<i>Cladosporium</i> spp. <i>Rodothorula</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Aspergillus niger</i> agregados <i>Aspergillus</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Cladosporium</i> spp.
4 Gama	<i>Cladosporium</i> spp. <i>Aspergillus flavus</i> <i>Penicillium</i> spp.	-	<i>Aspergillus flavus</i>	-
5 Abdala	<i>Penicillium</i> spp.	-	<i>Aspergillus niger</i> agregados	-
6 Bondosa	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Penicillium</i> spp.	-	<i>Aspergillus niger</i> agregados <i>Aspergillus</i> spp.	<i>Aspergillus fumigatus</i>
7 Imida	-	<i>Curvularia</i> spp.	-	<i>Aspergillus</i> sexuado
8 Bacharela	-	-	<i>Aspergillus niger</i> agregado	-
9 Alasca	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Bipolaris</i> spp.	<i>Aspergillus niger</i> agregados <i>Fusarium</i> spp.	-
10 Babete	-	<i>Cladosporium</i> spp.	-	-
11 Interação	<i>Penicillium</i> spp.	-	<i>Aspergillus niger</i> agregados	-
12 Madural	<i>Aspergillus versicolor</i> <i>Aspergillus caespitosu</i>	-	<i>Aspergillus niger</i> agregados <i>Penicillium</i> spp.	-

Os animais de 1 a 6 eram parasitados pelo nematoide auricular do gênero *Rhabditis*. Os animais de 7 a 12 não apresentaram sinais de otite parasitária.

Apenas os animais 2 e 3 apresentaram infecções fúngicas nas quatro coletas, porém com diferentes gêneros. Os animais 8 e 10 foram os únicos nos quais encontrou-se fungos em apenas uma coleta e o último deles não estava presente à coleta feita em abril/2014.

Como ilustrado na figura II.6, o percentual de amostras positivas para fungos foi de 70,8% no grupo COP e de 47,8% no grupo SOP. Todas as amostras positivas para fungos estavam associadas com bactérias, caracterizando as chamadas infecções mistas.

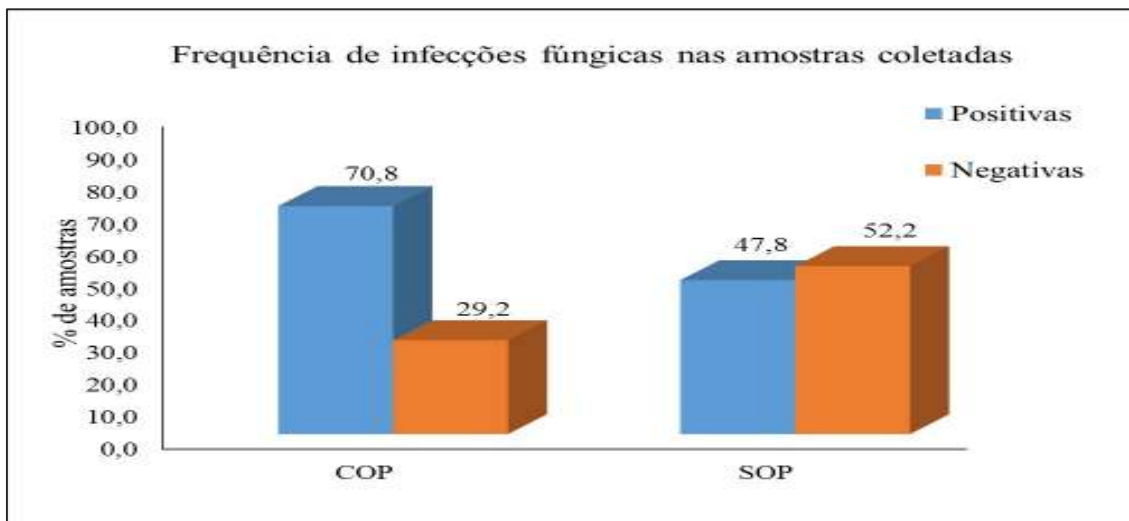


Figura II.6 Frequência de infecções fúngicas nas amostras coletadas nos animais dos grupos estudados.

A ocorrência dos diferentes gêneros de fungos nos dois grupos de animais estudados está na Figura II.7. O *Aspergillus* foi o gênero mais frequente em ambos os grupos. No grupo COP obteve-se um total de 34 isolados distintos. Destes, 58,8% eram de espécies do gênero *Aspergillus*, as quais foram detalhadas anteriormente na Tabela 3. No grupo SOP obteve-se 14 isolados fúngicos. O percentual de culturas do gênero *Aspergillus* foi de 50,0%. Os gêneros *Cladosporium* e *Penicillium* foram isolados em 17,6% das amostras do grupo COP e em 14,3% do grupo SOP. O gênero *Rodothorula* foi isolado em 5,9% das amostras dos animais com otite, não sendo encontrado nos animais sem otite. Finalmente, os gêneros *Curvularia*, *Bipolaris* e *Fusarium* estavam presentes nas amostras dos animais com otite com 7,1% de frequência.

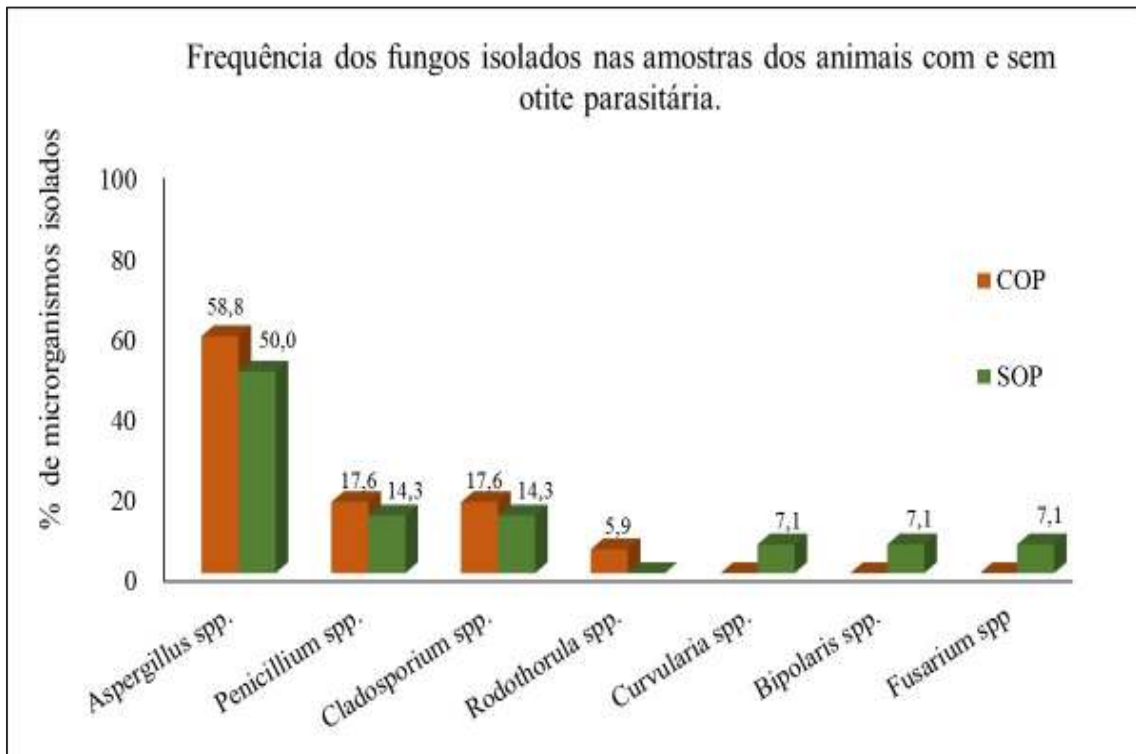


Figura II.7 Frequência dos diferentes gêneros de fungos encontrados nas amostras coletadas nos animais dos grupos estudados

II.5.3 Perfil de sensibilidade bacteriana *in vitro*

Para uma melhor visualização dos resultados do teste de sensibilidade aos antibióticos, as bactérias isoladas e avaliadas *in vitro* foram divididas em dois grupos: Gram-negativas e Gram-positivas. Os resultados obtidos das amostras coletadas nos animais dos grupos COP e SOP estão detalhados na tabela II.4.

Tabela II.4 Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, no teste de difusão com discos, em isolados bacterianos obtidos das amostras coletadas dos animais dos grupos COP e SOP nos meses de julho e novembro de 2013 e janeiro e abril de 2014.

Antimicrobianos	Isolados Gram-negativos				Isolados Gram-positivos			
	COP		SOP		COP		SOP	
	S/T	%	S/T	%	S/T	%	S/T	%
Aminoglicosídeos								
Gentamicina	20/21	95	15/17	88	13/13	100	13/14	93
Estreptomina	15/21	71	12/16	75	3/4	75	5/5	100
Neomicina	10/15	67	8/14	57	3/4	75	5/5	100
Amicacina	17/17	100	15/16	94				
Quinolonas								
Enrofloxacina	13/17	77	9/16	56	9/10	90	6/10	60
Norfloxacina	12/17	57	14/16	87			1/2	50
Ciprofloxacina	12/15	80	11/12	91	12/13	92	10/10	100
Sulfonamidas + Pirimidinas								
Sulfametoxazol + Trimetoprima	7/21	33	4/17	23	7/13	54	8/14	57
Cefalosporinas 1a geração								
Cefalexina	0/2	0			10/10	100	7/11	63
Cefalotina	1/6	17	0/1	0	10/10	100	10/12	83
Cefalosporinas 2a geração								
Cefoxitina	10/17	59	4/16	25			2/2	10
Cefalosporinas 3a geração								
Ceftiofur	9/15	60	2/15	13	10/10	100	6/10	60
Polimixinas								
Polimixina B	2/4	50	0/1	0	11/14	79	13/14	93
Cloranfenicol								
Florfenicol	4/10	40	1/5	20	4/4	100	3/3	100
Beta Lactâmicos								
Amoxicilina	0/4	0	0/1	0	4/4	100	3/3	100
Amoxicilina +Ac. Clavulânico	7/17	41	2/16	13	10/10	100	6/10	60
Ampicilina	1/10	10	1/6	17	4/4	100	3/3	100
Ampicilina + Sulbactam	5/11	46			9/10	90	5/8	62
Penicilina G	0/3	0	0/1	0	11/14	78	8/13	61
Oxacilina					4/10	40	3/9	33
Bacitracina	2/4	50	1/1	100	4/4	100	2/2	100

COP = Com otite parasitária SOP = Sem otite parasitária S = Sensível T = Testado

Os testes de sensibilidade aos antibióticos foram realizados em todos os isolados bacterianos. Verificou-se que o percentual de resistência das bactérias isoladas dos animais sadios foi semelhante (34,7%) ao daquelas isoladas dos animais com otite (31,6%).

Gram-negativas: A amicacina teve 100% e 94% de eficiência para as bactérias do grupo COP e do grupo SOP, respectivamente. A gentamicina e a ciprofloxacina também mostraram alta eficiência em ambos os grupos: 95 e 80% de eficiência para as bactérias isoladas do grupo COP e 88 e 92% para as bactérias do grupo SOP, respectivamente. A enrofloxacina foi 77% eficiente

contra as bactérias do grupo COP, enquanto aquelas do grupo SOP mostraram sensibilidade de 56%. A estreptomicina e a neomicina mostraram eficiências próximas quando foram comparados os isolados dos dois grupos de animais: 71 e 67% no COP e 75 e 57% no SOP, respectivamente. A eficiência dos antibióticos ceftiofur, a cefoxitina e a polimixina B, para as bactérias do grupo COP, foi de 60, 59 e 50%, respectivamente. Para as bactérias do grupo SOP, estes três antibióticos mostraram-se pouco eficientes. O ceftiofur e a cefoxitina mostraram eficiência de apenas 13 e 25%, respectivamente. A polimixina B não mostrou efeito algum nas bactérias do grupo SOP. A sensibilidade bacteriana aos antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, florfenicol, sulfametoxazol + trimetoprima, cefalotina e ampicilina foi inferior a 41,2% no grupo COP e ainda menor no grupo SOP (< 23,5%). Os antibióticos amoxicilina e penicilina G foram totalmente ineficientes em ambos os grupos. A ampicilina e a cefalexina, foram testadas apenas no grupo COP. A primeira apresentou eficiência de 45,5%, enquanto a segunda foi ineficiente. A bacitracina foi 100% eficiente no teste de um isolado do grupo SOP e nas bactérias do grupo COP teve 50% de eficiência, porém, à campo, não é o antibiótico de escolha para o tratamento de bactérias Gram-.

Gram-positivas: Não houve diferenças significativas de sensibilidade destes isolados quando comparados aos resultados dos animais com e sem otite, com exceção dos antibióticos enrofloxacina, cefalexina, ceftiofur e ampicilina + sulbactam. Os antibióticos que obtiveram 100% de eficiência nos dois grupos foram a amoxicilina, a ampicilina, a bacitracina e o florfenicol. No grupo COP verificou-se 100% de eficiência dos seguintes antibióticos: gentamicina, cefalexina, cefalotina, ceftiofur e amoxicilina + ácido clavulânico. Já no grupo SOP, a estreptomicina, a neomicina, ciprofloxacina, e a cefoxitina foram 100% eficientes. No grupo COP, estes três primeiros antibióticos alcançaram 92,3%, 75,0% e 75,0% de eficiência, respectivamente. A cefoxitina não foi testada neste grupo. A ampicilina + sulbactam e a enrofloxacina apresentaram 90,0% de sensibilidade no grupo COP. No grupo SOP, estas duas bases apresentaram eficiência de 62,5% e 60,0%, respectivamente. As bactérias isoladas do grupo COP mostraram 78,6% de sensibilidade à penicilina G e polimixina B. Já no grupo SOP estes antibióticos mostraram eficiências de 61,5% e 92,9%, respectivamente. O sulfametoxazol + trimetoprima, e a oxacilina apresentaram eficiência abaixo de 60 % nos dois grupos. A norfloxacina, mostrou 50% de eficiência no grupo SOP e não foi testada nos animais do grupo COP.

II.6 DISCUSSÃO

Para uma melhor compreensão, na Figura II.8 estão resumidos os resultados deste estudo. As infecções mistas, de fungos e bactérias, foram os resultados mais prevalentes, tanto nos animais com otite (66,7%), quanto naqueles sem otite (47,8%). Além disso, é possível verificar que a associação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram mais prevalentes no grupo SOP (26,1 %) do que no grupo COP (8,3 %). Ao contrário, as amostras contendo exclusivamente bactérias Gram-negativas foram mais frequentes no grupo COP (25,0%) do que no grupo SOP (17,4%). Vale ressaltar mais uma vez, que não foram encontradas amostras infectadas exclusivamente por fungos em nenhum grupo.

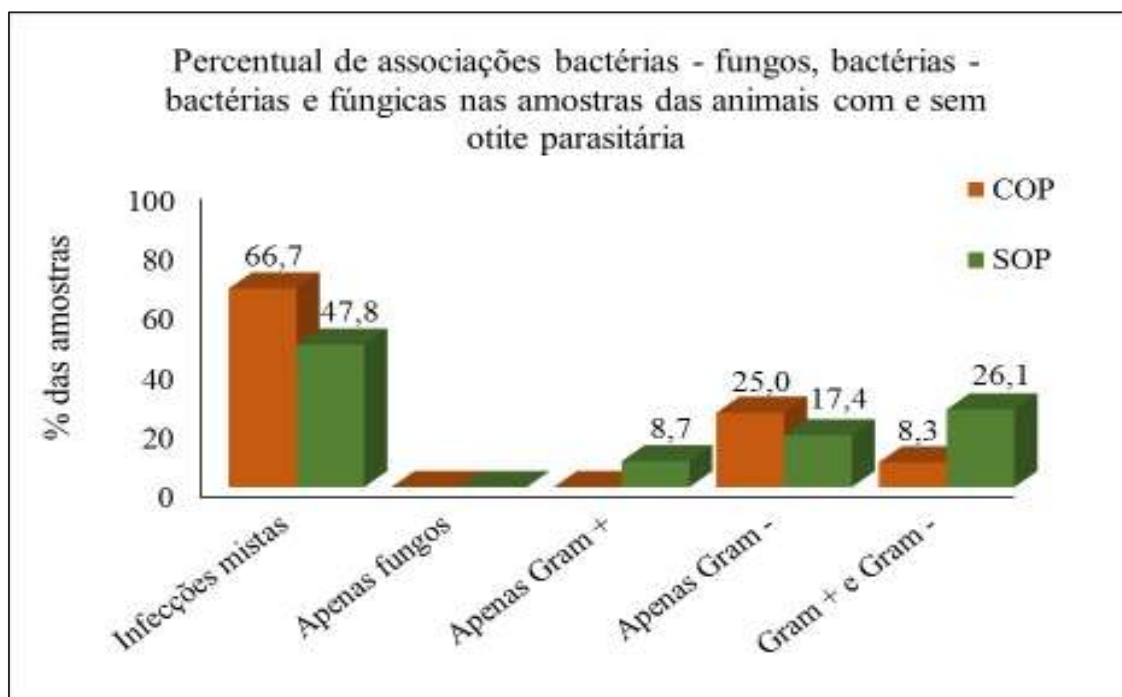


Figura II.8 Resultados das análises microbiológicas realizadas nas amostras coletadas dos animais com e sem otite parasitária.

O número de isolados bacterianos obtidos neste estudo foi de 38 nas 24 amostras coletadas dos animais com otite e de 34 nas 23 amostras daqueles sadios. Não houve diferença no total de isolados bacterianos no CAE dos animais de ambos os grupos. Quanto aos fungos, obteve-se 34 isolados em 17 amostras positivas do grupo COP e 14 em 11 amostras do grupo SOP. As amostras do grupo COP apresentaram três vezes maior quantidade de isolados fúngicos do que as amostras dos animais sadios. No entanto, vale ressaltar, que nem todas as amostras testadas foram positivas para fungos.

As análises microbiológicas mostraram que, apesar do *Staphylococcus* ter sido, individualmente, o gênero mais frequente nos dois grupos, as bactérias Gram-negativas predominaram (Figura 3). No grupo SOP a prevalência dos gêneros Gram-negativos mais prevalentes, *Pseudomonas* spp. e BGNnF, resultou no total de 48,8%. No grupo COP, além destes dois, somou-se a prevalência de 15,8% do gênero *Citrobacter*. Desta maneira, o total dos Gram-negativos mais encontrados foi de 47,4%. Os resultados de Leite *et al.* (1987) corroboram em parte o atual estudo pois as bactérias Gram-negativas também foram as mais prevalentes nos animais com otite. Porém, o percentual deste grupo de bactérias foi inferior ao encontrado no estudo atual e os bovinos estavam parasitados pelo ácaro. Além disso, os autores não avaliaram a microbiota do CAE de animais não parasitados. Msolla *et al.* (1986) e Odongo e Souza (1989), ao estudarem bovinos com otite causada pelo nematoide, encontraram os gêneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* e *Corynebacterium*. Estes autores não citaram a prevalência destas bactérias isoladamente. Al-Farwachi e Ai-Hassan (2009) isolaram cocobacilos *Pasteurella multocida* e *Mannheimia hemolytica* de bezerras com otite e *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumonia* de animais hígidos. No entanto, os animais estudados não apresentaram parasitos auriculares. Com relação à microbiota presente no CAE de pequenos ruminantes, Ali (2011)

também encontrou maior prevalência dos gêneros *Pseudomonas* e *Staphylococcus* em carneiros sadios e com otite.

De acordo com Santos (1979) e Leite *et al.* (1987) as bactérias Gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas*, *Proteus* e *Arcanobacterium* são amplamente associados a otites crônicas, causando otorrêa esverdeada e de mau odor. De maneira similar aos resultados destes autores, neste estudo as bactérias Gram-negativas foram isoladas em percentuais elevados nos animais do grupo COP. Além disso, este tipo de bactérias também foi bastante prevalente no grupo SOP. Tais resultados sugerem que as bactérias encontradas no CAE dos animais com otite pertenceriam a sua microbiota comensal. A patogenicidade destes microrganismos se daria devido às alterações locais decorrentes do processo inflamatório provocado pela presença dos nematoides. Duarte e Hamdan (2004) também associaram o aumento de temperatura e ao edema desencadeados pelas lesões causadas pelos parasitos auriculares à proliferação de microrganismos da flora auricular normal.

Com relação ao número de gêneros fúngicos que cresceram nas amostras analisadas, verificou-se que o grupo dos animais com otite apresentaram cerca de 1,5 vezes mais fungos do que o grupo dos animais sadios. No grupo COP, 70,8% das amostras estavam positivas para estes microrganismos, enquanto no grupo SOP, apenas 47,8% do total continham fungos. Estudos micológicos realizados apenas em bovinos Gir com otite por Duarte *et al.* (2001), revelaram que 75,6% das amostras estavam positivas para fungos. Este valor, calculado de um total de 45 amostras de fêmeas adultas, foi superior ao encontrado no atual estudo. Entretanto, estes autores não estudaram a microbiota de animais hígidos.

As associações de diferentes espécies ou gêneros de fungos em uma mesma amostra foram mais frequentes no grupo COP se comparado ao grupo SOP.

O gênero *Aspergillus* foi o mais frequente nas amostras dos dois grupos, representado pelas espécies *A. foetidus*, *A. versicolor*, *A. flavus*, *A. niger* agregado, *A. fumigatus* e *Aspergillus* spp. A porcentagem deste gênero no total de isolados foi de 58,8% nos animais parasitados e de 50,0% nos animais sadios. Também foram isolados os gêneros *Cladosporium* e *Penicillium*, *Rodothorula Curvularia*, *Bipolaris* e *Fusarium*, porém, em menor frequência (Figura 5). Com exceção dos dois primeiros que tiveram, cada um deles, prevalência de 17,6% no grupo COP e 14,3% no grupo SOP. Duarte *et al.* (2001) encontraram os gêneros *Aspergillus*, *Rodothorula* e *Candida* no CAE dos bovinos com otite. No entanto, o gênero mais prevalente foi *Malassezia*, isolado em culturas puras ou em associação com um ou mais fungos. Já Duarte *et al.* (2004) conseguiram isolar o gênero *Malassezia* do CAE de 38,1% bovinos sadios e de 63,3% bovinos com otite. Contrariando os estudos acima, este gênero não foi isolado em nenhuma amostra do presente estudo. Yeruham *et al.* (1999) isolaram diversas espécies de *Candida*, além das espécies *Pichia carsonii* e *Rhodotorula rubra* das orelhas de bezerros com otite. No total, foram 24 isolados fúngicos obtidos das amostras dos animais doentes. Já das amostras dos animais sadios foram obtidos apenas cinco isolados fúngicos. Apesar dos bovinos estudados não apresentarem parasitos auriculares como no estudo atual, ambos resultados foram similares com relação à presença de fungos nos animais com e sem otite.

Os fungos frequentemente estão envolvidos na etiologia das infecções do CAE dos bovinos e na maioria dos casos, associados a bactérias (Duarte e Hamdan, 2004). Os resultados do atual estudo confirmam esta afirmativa, pois nenhuma amostra apresentou unicamente fungos. Ao contrário, a associação destes microrganismos com bactérias foi o achado mais prevalente, tanto nos animais com otite parasitária (66,7%), quanto nos animais sadios (47,8%). Msolla *et al.* (1987) e Duarte e Hamdan (2004) também relataram a presença de infecções mistas nos casos

crônicos de otite parasitária em bovinos. Yeruham *et al.* (1999) também encontraram associações de bactérias e fungos nos casos de otite média e também no CAE de bezerras saudáveis. Os autores concluíram que os microrganismos isolados destes últimos poderiam ser considerados como saprófitas não patogênicos. Em outras espécies também houve relatos de associações de microrganismos nas infecções auriculares. Hayyawi (2012), ao estudar carneiros com sinais de otite externa, conseguiram isolar as espécies *Candida albicans* e *Aspergillus* spp., além de inúmeras espécies bacterianas. Em outras espécies, inclusive no Homem, as infecções mistas já foram amplamente relatadas, ocasionando doenças otológicas e comprometendo a eficiência dos protocolos de tratamento (Chengappa *et al.*, 1984; Nogueira *et al.*, 2008 e Petrov *et al.*, 2013).

As amostras do CAE analisadas neste estudo foram coletadas nos mesmos animais, a cada três meses, durante o período entre julho de 2013 e abril de 2014. Não foi aplicado nenhum produto antifúngico durante o período de coleta de amostras. No entanto, verificou-se que nos meses de julho de 2013 e de janeiro de 2014, a prevalência de fungos isolados foi significativamente maior do que nos outros dois meses, como pode ser observado na Tabela 3. Não foram encontradas evidências que pudessem explicar tais resultados.

A sensibilidade aos antibióticos foi mostrada na Tabela 4. Na metade das bases testadas, as bactérias Gram-negativas isoladas nos dois grupos de animais, apresentaram sensibilidade inferior a 50%. As bactérias Gram-positivas, mostraram sensibilidade inferior a 50% a apenas duas bases testadas. Tais resultados permitiram inferir que os isolados Gram-negativos dos animais saudáveis e com otite apresentaram maior resistência aos antibióticos do que as bactérias Gram-positivas. Apenas três antibióticos, gentamicina, ampicilina e ciprofloxacina apresentaram eficiência contra bactérias Gram-negativas acima de 80%. Por outro lado, a ampicilina apresentou o pior resultado, com apenas 10% de eficiência. Os antibióticos do grupo dos Beta-lactâmicos e o Cloranfenicol foram os menos eficientes contra as bactérias Gram-negativas, com taxa de sensibilidade inferior a 50,0%. A multirresistência das bactérias Gram-negativas foi encontrada em várias amostras analisadas neste estudo. Contrariando as expectativas prévias dos autores desse estudo, as bactérias Gram-negativas isoladas dos animais saudáveis mostraram resistência antibiótica maior do que aquelas isoladas de otites crônicas. Principalmente com relação aos beta lactâmicos, à polimixina, ao florfenicol, à enrofloxacinina e à todas as cefalosporinas. Este perfil de sensibilidade também foi encontrado com relação às Gram-positivas. Aquelas isoladas dos animais do grupo SOP foram mais resistentes as do grupo COP. Este foi o caso da gentamicina, da enrofloxacinina, das cefalosporinas, da amoxicilina + ácido clavulânico, da ampicilina + sulbactam, da penicilina G e da oxacilina. Estes resultados poderiam ser atribuídos ao uso indiscriminado de antibióticos de largo espectro para o tratamento de infecções bacterianas durante a vida dos animais deste rebanho.

Poucos artigos sobre análise de sensibilidade aos antibióticos em bovinos foram encontrados na literatura. A maioria dos estudos refere-se a cães ou outros animais domésticos. Um dos trabalhos sobre uso de antibiótico em bovinos com otite foi aquele desenvolvido por Yeruham *et al.* (1999). Eles testaram a sensibilidade aos antibióticos de isolados de *Pasteurella haemolytica* e *P. multocida* em um surto de otite média de bezerras leiteiras. Estas bactérias, não isoladas nas amostras do estudo atual, apresentaram alta susceptibilidade à ampicilina, gentamicina e enrofloxacinina. A estreptomicina e a penicilina mostraram eficiências inferiores a 50%. Estes resultados reforçam a necessidade da realização do teste de sensibilidade aos antibióticos, antes do início de tratamento contra a otite, causada por parasitos ou não.

No estudo conduzido por Ali (2011) isolou-se *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* do conduto auditivo de carneiros com otite externa. A primeira espécie bacteriana foi altamente resistente à ampicilina, ao cloranfenicol e à eritromicina e sensível à ciprofloxacina e

ao norfloxacin. Já a segunda, também foi sensível aos dois últimos antibióticos e também à eritromicina e resistente à ampicilina e ao cloranfenicol. Tais resultados corroboram em parte o estudo atual que demonstrou a resistência das bactérias Gram-negativas encontradas nos animais com otite à ampicilina e sensibilidade à Ciprofloxacina. No entanto estas bactérias só apresentaram 57% de sensibilidade à Norfloxacin. Quanto às bactérias Gram-positivas, elas também foram sensíveis à ampicilina e à ciprofloxacina, mas apresentaram apenas 50% de sensibilidade à norfloxacin.

As bactérias Gram-positivas isoladas de cães com otite por Petrov *et al.* (2013), mostraram alta sensibilidade às combinações de β -lactâmicos e também aos aminoglicosídeos, à gentamicina, à ampicilina e à tobramicina, com percentagem de sensibilidade entre 74% e 91%. Além disso, os estafilococos apresentaram sensibilidade entre 40% e 68% ao cloranfenicol e à enrofloxacin, respectivamente. Com relação às bactérias Gram-negativas, o comportamento frente aos β -lactâmicos variou de acordo com as espécies, sendo que a *P. aeruginosa* foi altamente resistente. Por outro lado, esta espécie foi sensível à enrofloxacin e à polimixina B e resistente ao Cloranfenicol, à tetraciclina, à lincomicina e à estreptomicina. Mesmo levando-se em consideração que estes estudos foram realizados com cães, é possível perceber algumas similaridades dos resultados com os do estudo atual. As bactérias Gram-positivas isoladas dos animais com otite também foram altamente sensíveis aos aminoglicosídeos e aos β -lactâmicos, com exceção à oxacilina, com sensibilidade de 40%. E ainda, mostraram sensibilidade alta ao cloranfenicol, às cefalosporinas e às quinolonas. As bactérias Gram-negativas também foram bastante resistentes aos β -lactâmicos, às cefalosporinas em especial às de 1ª geração, como já era esperado. Quanto ao cloranfenicol a porcentagem de resistência foi a mesma. Em relação à enrofloxacin, as bactérias deste estudo mostraram uma sensibilidade de 77%, ligeiramente maior do que os 68% encontrados no estudo de Petrov (2013).

Oliveira *et al.* (2012) estudaram 616 cães com otite: Os isolados foram sensíveis principalmente para norfloxacin (89,6%), gentamicina (83,3%), ofloxacin (80,2%), tobramicina (74,3%), ciprofloxacina (73,2%) e enrofloxacin (69,4%). Em contraste, a maior resistência foi observada com o uso da neomicina (30,8%) e cefalexina (27,6%). A ocorrência de resistência múltipla a três ou mais e a cinco ou mais dos antimicrobianos utilizados foi observada em respectivamente, 34,9 e 15,5% dos isolados. No atual estudo, as bactérias isoladas do grupo COP também foram sensíveis à gentamicina, à ciprofloxacina e à enrofloxacin e resistentes à cefalexina. Porém, a sensibilidade à neomicina foi superior aos deste estudo (67,0 e 30,8%, respectivamente).

Ao estudar o perfil da sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do CAE de cães com otite, Santos (2007) verificou sensibilidade do gênero *Staphylococcus* acima de 94% à cefalexina e de 70,5% à gentamicina. Porém com relação à *Pseudomonas* spp. estes antibióticos mostraram taxas de resistência de 85,7%. Este gênero mostrou sensibilidade de 28,6% a ciprofloxacina e a norfloxacin. No atual estudo, a sensibilidade das bactérias gram-positivas à cefalexina e à gentamicina foi de 100%. Contrariando o estudo citado acima, a sensibilidade deste grupo de bactérias à gentamicina foi de 100% e das Gram-negativas foi de 95%. A sensibilidade destas bactérias à ciprofloxacina e à norfloxacin foi de 80,0 e 57,0%, respectivamente.

II.7 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi analisado o perfil microbiológico do conduto auditivo externo de 12 bovinos da raça Gir, seis deles parasitados por nematoides auriculares e seis sadios. Baseando-se nos resultados obtidos e nas respectivas discussões, pode-se concluir que:

- Todas as amostras coletadas no CAE apresentaram crescimento bacteriano e o *Staphylococcus* e o *Pseudomonas* foram os gêneros mais frequentes;
- As amostras dos animais parasitados pelo nematoide apresentaram mais fungos do que as amostras dos animais saudáveis, porém, o gênero fúngico mais prevalente, em ambos os grupos, foi o *Aspergillus*.
- Os resultados do teste de sensibilidade aos antimicrobianos mostrou altas taxas de multirresistência das bactérias Gram-negativas de ambos os grupos de animais.

II.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A alta frequência de infecções mistas aliada à susceptibilidade variável dos isolados aos antimicrobianos são consideradas como agravantes da otite parasitária. Entretanto, a semelhança do perfil microbiológico do CAE dos animais doentes e saudáveis sugere ser verdadeira a hipótese de que a inflamação local causada pelo parasita auricular levaria a microbiota comensal a se tornar patogênica. Aquelas espécies bacterianas mais adaptadas à ambientes quentes e úmidos passariam a proliferar intensamente e a ganhar o espaço de outras menos eficientes. Portanto, deve-se considerar a possibilidade de modificação do microambiente local afim de inviabilizar o desenvolvimento do parasito. Esta poderia ser uma alternativa ao uso indiscriminado de antibióticos ou antifúngicos contra os agentes das infecções secundárias. Estudos mais aprofundados poderiam ser conduzidos utilizando-se produtos antiinflamatórios ou que promovessem a desidratação da mucosa local após a eliminação dos parasitos auriculares.

Os resultados do teste de sensibilidade aos antibióticos reforçam a necessidade do uso racional dos antibióticos na prática terapêutica veterinária. Deve ser considerada, principalmente, a utilização sem critérios técnicos de medicamentos convencionais contendo antibióticos cujas bases têm mostrado altas taxas de resistência no campo.

III. CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UM PROTOCOLO DE CONTROLE CONTRA PARASITOS AURICULARES EM UM REBANHO BOVINO DA RAÇA GIR

RESUMO

Avaliou-se neste estudo um protocolo de controle de parasitos auriculares em um rebanho composto por 32 animais da raça Gir de idade variada, de ambos os sexos. O protocolo, que teve início em janeiro de 2013 e duração de um ano, consistiu na utilização mensal de um antiparasitário tópico, à base de organofosforado, no pavilhão auricular dos bovinos. O objetivo foi interromper o ciclo dos parasitos auriculares no hospedeiro e a eliminação tanto das infestações pré-existentes quanto das reinfestações. Antes do início do protocolo as orelhas dos animais foram inspecionadas e classificadas quanto à presença e aspecto da secreção auricular. Foi feito o lavado auricular para diagnóstico da carga parasitária do ácaro e para a classificação qualitativa da infecção pelo nematoide. Outros dois lavados foram realizados em julho de 2013 e em janeiro de 2014 e comparados com os resultados iniciais, para avaliar a eficiência do protocolo. O protocolo de controle avaliado neste estudo mostrou-se ineficiente no combate às infestações pelo nematoide. Ao final dos 12 meses, o número de orelhas parasitadas permaneceu o mesmo do início do experimento. Além disso, verificou-se o agravamento das otites pré-existentes. Quanto ao ácaro, houve a diminuição significativa do número de orelhas parasitadas e na carga parasitária do parasito, sem, contudo, levar à eliminação completa da infecção.

Palavras chave: Parasitos auriculares, bovino, protocolo de controle, organofosforado, Gir.

ABSTRACT

An ear parasites control protocol in a Gyr herd consisting of 32 animals of varying age, of both sexes, was evaluated in this study. This protocol, which consisted of an antiparasitic topic organophosphate-based, was used monthly in the ear of the cattle. The tests were performed from January 2013 to January 2014. The aim of this treatment was to interrupt the cycle of ear parasites in the host and the elimination of pre-existing infestations and of the re-infestations. Before start treatments, the animal ears were inspected and classified according to the presence and appearance of ear secretions. Washing of the ear canals for diagnosis of parasite load mite and for the qualitative classification of nematoide infection were performed. To evaluate the protocol efficiency, other two washings were carried out in July 2013 and January 2014 and compared with the initial results. The control protocol evaluated in this study was not effective in combating infestations by nematode. At the end of 12 months, the number of parasitized ears remained the same as the beginning of the experiment. Furthermore, the pre-existing ear infections became stronger. About the mite, there was a significant decrease in the number of infested ears and the parasite load. However, there was not the complete eliminations of the infection.

Keywords: Parasites ear canal, bovine, control protocol, organophosphate, Gyr

III.1 INTRODUÇÃO

A otite parasitária que acomete bovinos da raça Gir causa inúmeros prejuízos e é considerada um problema sanitário grave que pode inviabilizar a criação destes animais. Os agentes etiológicos são nematoides da família Rhabditiidae, responsáveis por sinais clínicos da doença e ácaros do gênero *Railiattia*. O controle efetivo da parasitose, a despeito da variedade de protocolos terapêuticos já testados, ainda não foi alcançado. Não existe no mercado nenhuma formulação química específica para o controle das parasitoses auriculares de bovinos. Este estudo avaliou a utilização mensal e sistemática de um antiparasitário tópico no pavilhão auricular dos bovinos, com o objetivo de interromper o ciclo dos parasitos auriculares e a eliminação tanto das infestações pré-existentes quanto das reinfestações.

III.2 OBJETIVOS

- Avaliar a carga parasitária de ácaros e o grau de infecção de nematoides no conduto auditivo externo de um rebanho de bovinos da raça Gir, com o auxílio de lavado auricular.
- Avaliar a eficiência de um protocolo de controle dos parasitos auriculares, utilizando um produto, manipulado em forma de pasta, contendo o organofosforado triclorfon.

III.3 REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil ocupa 20,8% da extensão territorial das Américas e 47,7% da América do Sul. A área destinada a pastagens corresponde a 21% do território nacional. A agropecuária cresce a cada ano e atualmente o país é o terceiro maior produtor mundial de leite. Segundo o IBGE (2012), a produção leiteira foi de 32 bilhões de litros em 2011 e, estima-se que está em ascensão. Dentre todas as raças especializadas, destaca-se a raça Gir. Os animais, desta raça, à semelhança de todos os zebuínos, são resistentes a parasitos e a doenças de clima tropical (Gasparin, 2007). Tais características fazem com que seja considerada a melhor opção para criadores que optem por sistemas de produção sustentáveis, com a utilização de animais puros ou originários do cruzamento com outras raças.

Apesar das qualidades inerentes aos animais da raça, um aspecto importante observado em rebanhos de bovinos Gir, e que pode inviabilizar a sua criação, é a ocorrência frequente de otite parasitária. A doença apresenta-se tanto sob a forma de casos isolados como doença de rebanhos (Leite *et al.* 1993). Ela pode ser causada por nematoides e ácaros e, secundariamente, por bactérias e fungos, apresentando-se de forma subclínica, aguda e crônica (Leite *et al.*, 1994). A otite causada por nematoides, que ocorre exclusivamente nesta raça, está relacionada a sinais clínicos que vão de leves, em animais acima de 18 meses, a muito graves, em adultos (Leite, 2010).

O agente etiológico mais frequentemente encontrado nos animais desta raça são os nematoides do gênero *Rhabditis*, cujo primeiro relato no Brasil foi feito por Martins Jr. *et al.* (1971). Os estudos clínicos e epidemiológicos realizados por este autor e por Leite *et al.* (1993), citaram prevalências do parasito acima de 90% em animais adultos. Por sua vez, Vieira *et al.* (1998), estudando otites clínicas em bovinos da raça Gir no estado de Goiás, encontraram 78% de positividade por *Rhabditis* sp em um total de 255 animais. Em Minas Gerais, Duarte *et al.* (2001a) relataram uma prevalência de 60,1% em animais adultos e com chifres. No município de Vassouras, Rio de Janeiro, Verocai *et al.* (2007), examinando 87 vacas puras da raça Gir que apresentavam otite clínica, diagnosticaram 100% de positividade em ambos os condutos auditivos. Um estudo atual, realizado por Leite *et al.* (2013) em um rebanho de 64 animais,

encontrou o nematoide em 52,2% em vacas, em 22,2% em novilhas acima de 24 meses e em 13,0% de bezerras acima de 15 meses.

A susceptibilidade dos animais da raça Gir à otite por nematoides está relacionada à conformação cranial, aos chifres e aos pavilhões auriculares. Estas características predispõem a elevação da umidade e da temperatura no conduto auditivo externo (CAE), favorecendo a sobrevivência do nematoide no local (Duarte *et al.*, 2001a; Campos *et al.*, 2009). Até o momento não foram encontradas referências na literatura a respeito desta parasitose em raças bovinas de orelhas curtas. O processo inflamatório causado pelo complexo parasitário/infeccioso, provoca desconforto ao animal, e não raras vezes, o quadro evolui para otite média e interna, podendo evoluir para o óbito (Leite *et al.*, 1994; Vieira *et al.*, 1998, Duarte e Hamdan, 2004). O sinal clínico mais característico, encontrado nos bovinos cronicamente infestados, é a presença de secreção auricular amarelada, repleta de parasitos e com odor pútrido.

Por sua vez, as infestações auriculares por ácaros do gênero *Railletia* acometem todas as raças de bovinos, com distribuição mundial e foram descritas pela primeira vez há mais de um século (Nunes e Nunes, 1975). São conhecidas três espécies deste gênero, sendo a *R. auris* (Leidy, 1872; Trouessart, 1902) específica de bovinos, a *R. flechtmanni*, também encontrada em búfalos (Santos e Faccini, 1996), enquanto a *R. caprae* que tem especificidade pelos pequenos ruminantes (Costa *et al.*, 1992). De acordo com Nunes e Nunes (1975), Leite (1989) e Faccini *et al.* (1992) o número de ácaros por ouvido pode variar de um a mais de 160. As infestações sub-clínicas são comuns e não costumam ser diagnosticadas devido ao tamanho do ácaro, ao comprimento do CAE dos bovinos e à localização do parasito no hospedeiro (Leite *et al.* 1989a). As taxas de prevalência da infecção podem chegar 100% segundo estudos de Faccini *et al.* (1992), realizados em diversos estados brasileiros. Araújo Filho *et al.* (1996) e Boa-Morte e Oliveira (2008) encontraram infestações em 45,2% a 100% dos rebanhos. Elas ocorrem preferencialmente em animais das raças Nelore e Guzerá e em menor número nos bovinos Gir, Indubrasil, Holandês e mestiços (Leite, 1989).

Não foram encontradas na literatura, referências de casos de otites sintomáticas relacionadas exclusivamente à *Railletia* em animais da raça Gir. Segundo Nunes (1977), a *R. auris* não escava túneis na epiderme e alimenta-se apenas de cerúmen e restos celulares. Porém, suas quelíceras e patas provocam lesões na mucosa do CAE e membrana timpânica, culminando com o desencadeamento de um quadro inflamatório local (Ferry *et al.*, 2011). Este aspecto clínico embasaria a hipótese de que a presença do ácaro, aliadas à anatomia das orelhas dos bovinos Gir, criariam um microambiente propício à infecção pelo nematóide *Rhabditis* (Leite, 1989).

Com relação à infecção de ambos os parasitos, Nunes *et al.* (1980) encontraram apenas um animal duplamente parasitado, em um total de 60 bovinos. Por sua vez, Brito *et al.* (2005) e Leite *et al.* (2013), encontraram cerca de 6% de infestações mistas.

O diagnóstico da rhabditiose se faz pela observação, a olho nu, da movimentação dos nematoides coletados com uma zaragatoa e colocados em um frasco transparente (Leite *et al.*, 1994). As infestações subclínicas são diagnosticadas lavando-se o canal auditivo com água destilada, soro fisiológico ou álcool boricado a 3% (Facuri Filho *et al.*, 1990; Leite, 2010). Esta técnica também é utilizada para o diagnóstico da presença do ácaro (Leite *et al.* 1989b), que se localiza profundamente no CAE, próximo à membrana timpânica.

Protocolos de tratamento e prevenção da otite causada por nematoides em bovinos ainda não foram completamente elucidados. Além disso, estudo conduzido por Leite *et al.* (2012) mostrou que os criadores de bovinos da raça Gir não fazem distinção entre protocolos de prevenção e de tratamento da doença. Uma grande variedade de produtos já foi utilizada sem, contudo, haver

relatos de cura definitiva (Vieira *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2006). Alguns autores, porém, apesar de não conseguirem a cura definitiva da doença, têm relatado resultados positivos. Leite (2010), ao fazer 8 lavados sequenciais do CAE utilizando solução de hipoclorito de sódio a 0,025% e álcool-éter (1:1), conseguiu eliminar o nematoide em todos os animais tratados. No entanto, após um ano, alguns deles apresentaram sinais de otite e a presença de nematoides. E ainda, o tratamento foi considerado pelos autores como inviável para a realização em grandes rebanhos devido ao longo tempo necessário para sua realização. Por sua vez, Teschner *et al.* (2014) trataram com sucesso um homem com diagnóstico positivo para otite desencadeada por nematoides utilizando lavado auricular com álcool. Campos *et al.* (2009) obtiveram bons resultados aplicando moxidectina 10% por via subcutânea, acompanhada da aplicação tópica de uma solução a base de triclorfon. Porém, a recidiva ocorreu 30 dias após o final do tratamento.

Os melhores resultados no controle da parasitose, até o momento, foram alcançados utilizando-se produtos à base de organofosforados, em especial, o triclorfon. Eles atuam como inibidores da enzima acetilcolinesterase e interferem na neurotransmissão das terminações nervosas colinérgicas. O parasito morre devido à disfunção do sistema nervoso (Baldani, *et al.*, 1999). Os organofosforados foram amplamente utilizados na década de 1950 como ectoparasiticidas e posteriormente como anti-helmínticos. Eles são potencialmente tóxicos para os seres vivos e em especial para parasitos, sejam eles, sarnas, piolhos, moscas, ácaros ou vermes (Booth e McDonald, 1992). Estudos relatam a sua eficiência sobre parasitos do conduto auditivo ou da pele. Uma solução otológica, à base de Diazinon à 1%, foi utilizada em cães infestados por ácaros do gênero *Otodectes*, durante sete dias consecutivos, com eficácia de 100% (Souza *et al.*, 2006). Além da eficiência do triclorfon a 6% no tratamento de lesões de pele causadas pela *Stephanofilaria*, Miyakawa *et al.* (2012) destacaram a praticidade da aplicação da pasta e o baixo custo do tratamento. O estudo conduzido por Bello *et al.* (2008) mostrou o controle efetivo da infecção auricular pelo carrapato *Dermacentor nitens* em equinos com a aplicação bimensal de uma pasta à base de triclorfon.

A importância da raça Gir para o setor produtor de leite do Brasil demonstra a necessidade da criação de um protocolo de controle eficaz da otite parasitária. Até o momento não existe no mercado nenhuma formulação química específica contra os parasitos auriculares de bovinos. Em especial, um produto que seja seguro, de fácil aplicação e de custo acessível. Neste estudo avaliou-se a utilização mensal e sistemática de um antiparasitário de uso tópico no pavilhão auricular dos bovinos. O objetivo foi interromper o ciclo de ambos os parasitos auriculares e a eliminação tanto das infestações pré-existentes quanto das reinfestações.

III.4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram estudados os 32 bovinos da raça Gir, de ambos os sexos e com idades variando de sete meses a sete anos, pertencentes ao rebanho fazenda 2, localizada em Itabira, Minas Gerais.

III.4.1 Inspeção dos animais e classificação das orelhas de acordo com a presença e o aspecto da secreção auricular

O estudo teve início em janeiro de 2013, com a inspeção dos animais, analisando sua condição física e o estado nutricional. Em seguida, os mesmos foram contidos em brete de madeira e, utilizando-se um cabresto de corda, foi feita a imobilização da cabeça, de maneira que as orelhas ficassem livres. O pavilhão auricular e o conduto auditivo externo foram avaliados para a presença, localização e aspecto da secreção auricular. De acordo com estes parâmetros, as orelhas foram categorizadas de acordo com os critérios descritos na tabela III.1.

Esta classificação foi utilizada nas análises estatísticas que avaliaram a correlação entre a presença do nematoide e do ácaro com a secreção auricular visualizada no CAE dos animais. Além disso, estes dados, somados aos resultados do diagnóstico parasitológico cuja metodologia será descrita a seguir, permitiram classificar os animais quanto ao grau da otite apresentada e serviram como referência da evolução do tratamento.

Tabela III.1 Classificação auricular de acordo com a presença, localização e aspecto da secreção encontrada no pavilhão auricular e no CAE dos animais estudados (Figura III.1 A - B - C).

Classificação das orelhas	Características do CAE e do pavilhão auricular
S- Sem secreção	CAE e pavilhão auricular sem secreção, limpo ou contendo apenas cerúmen de coloração marrom.
S+ Secreção moderada	Presença de secreção de cor amarela clara, fluida, visível apenas na porção inicial do CAE.
S++ Secreção abundante	Presença de secreção de cor amarela clara, com odor característico, localizada na porção inicial do CAE e no terço inicial do pavilhão auricular.

III.4.2 Coleta de material para diagnóstico parasitológico

O diagnóstico para a verificação da presença dos parasitos auriculares (ácaros e nematoides) foi feito utilizando-se a técnica preconizada por Leite *et al.* (1989b), com as variações sugeridas por Leite (2010). Foi utilizada uma seringa automática com capacidade de 30ml¹, acoplada a uma ponteira plástica de micropipeta descartável, a qual foi introduzida, delicadamente no CAE. Posteriormente foi feita a lavagem sob pressão do CAE de ambas as orelhas injetando 60ml de água destilada, em dois fluxos. O material resultante foi coletado, com o auxílio de um funil de boca larga posicionado logo abaixo do pavilhão auricular, em um tubo plástico de fundo cônico tipo Falcon com capacidade de 60ml (Figura III.1D). Os tubos contendo o material do lavado auricular foram identificados com o número do animal e o lado de cada orelha. Foram armazenados em temperatura ambiente e imediatamente transportados à Escola de Veterinária da UFMG e processados no mesmo dia.

¹ Seringa dosadora para aplicação de ACATAK Pour On® - Novartis



Figura III.1 (A - B - C) Imagens das orelhas dos bovinos sem secreção auricular (S-), presença moderada de secreção (S+) e presença de secreção abundante (S++); coleta do lavado auricular para diagnóstico parasitológico (D); observação do material coletado com o auxílio de microscópio estereoscópico (E); (F - G) aplicação da pasta antiparasitária.

No laboratório de parasitoses (LP), o material foi vertido em placa de Petri (100x20), em cujo fundo foram traçadas linhas. O lavado auricular foi observado com o auxílio de microscópio estereoscópico (Metrimpex PZO-Labimex) para a presença de parasitos (Figura III.1E). Procedeu-se a contagem do número de ácaros obtendo-se a carga parasitária (CP) presente em cada orelha e a CP média entre os animais positivos. A fase do ciclo do parasito ou o sexo não foram avaliados. Quanto ao nematoide, realizou-se a classificação qualitativa da infecção tendo como referência a classificação sugerida por Leite *et al.* (2013): a secreção auricular foi avaliada no momento da coleta e classificada de acordo com a tabela III.1. Para quantificar o número de nematoides encontrados no CAE foram utilizados os seguintes critérios:

- Amostra negativa (-);
- Amostra com até 50 espécimes (P+);
- Amostra com 51 a 100 espécimes (P++);
- Amostra com mais de 100 espécimes (P+++).

A tabela III.2 foi então elaborada com os quatro diferentes graus de otite encontrados nos animais estudados.

Tabela III. 2 Classificação da otite parasitária bovina, de acordo com a presença, quantidade e o aspecto da secreção auricular e a presença de nematoides.

Classificação da otite		Descrição dos sinais e achados clínicos
Grau 0	Ausente	Ausência de secreção auricular (S-) e de nematoides (-);
Grau 1	Subclínica	Ausência de secreção auricular (S-) e presença de até 50 espécimes de nematoides (P+);
Grau 2	Leve	Presença de secreção auricular (S+) e presença de 51 a 100 espécimes de nematoides (P++);
Grau 3	Moderada	Presença de secreção auricular abundante (S++) e de mais de 100 espécimes de nematoides (P+++).

Leite et al. (2013)

A categorização dos graus de otite foi utilizada na avaliação da eficiência do protocolo de tratamento testado neste estudo. Foram realizados três diagnósticos parasitológicos durante o período do estudo com os seguintes objetivos:

- **Diagnóstico 1** - Em janeiro de 2013 - Avaliação inicial da infecção de parasitos auriculares presente no CAE dos animais, antes do tratamento;
- **Diagnóstico 2** - Em julho de 2013 - Primeira avaliação da eficiência do protocolo de controle das parasitoses auriculares, após seis meses de tratamento;
- **Diagnóstico 3** - Em janeiro de 2014 - Avaliação final da eficiência do protocolo de controle das parasitoses auriculares, após 12 meses de tratamento.

III.4.3 Protocolo de controle da otite parasitária

O protocolo de controle da otite parasitária foi iniciado em janeiro de 2013. Foi aplicado um produto antiparasitário à base do organofosforado triclorfon, manipulado na forma de pasta² (Bello *et al.*, 2008), no pavilhão auricular e conduto auditivo, antímero direito e esquerdo, de todos os animais.

Os resultados do diagnóstico 1 mostraram não haver diferença significativa entre as infestações encontradas nas orelhas do lado direito e do lado esquerdo, tanto com relação ao nematoíde quanto ao ácaro (Kruskal Wallis, $p=0,61$, com nível de significância de 9%). Desta maneira, cada orelha foi considerada como amostra independente, mesmo pertencendo a um mesmo animal, de acordo com Sampaio (2007).

O protocolo de controle foi estabelecido em ambas as orelhas de todo o rebanho, totalizando 64 amostras. Os resultados do diagnóstico 1, realizado nas orelhas ainda sem tratamento, foram utilizados como grupo controle (GC) para as análises estatísticas feitas ao final do experimento.

Foram aplicados manualmente 20 gramas da pasta antiparasitária em todo o pavilhão auricular e também na porção distal do CAE das orelhas (Figura III.1 F - G). Esse tratamento foi realizado mensalmente e os animais foram mantidos no manejo normal da fazenda. Nos meses em que não foi feito o lavado para diagnóstico parasitológico, foram realizadas as aplicações tópicas da pasta e a avaliação visual do pavilhão auricular e do CAE para verificar a presença de secreção.

III.4.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas de acordo com Sampaio (2007) com o auxílio do programa estatístico InfoStat versão 2013. A comparação entre a infecção das orelhas de cada animal foi feita utilizando-se o teste de Kruskal Wallis.

A eficiência do protocolo de controle foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney, com nível de significância de 5%. Comparou-se os resultados dos diagnósticos parasitológicos 1, 2 e 3, considerando-se a infecção inicial (diagnóstico 1) como grupo controle (GC). Foi utilizada a dispersão de frequência dos dados categorizados apenas das orelhas que estavam parasitadas.

O teste de Spearman foi utilizado para análise de correlação entre as características da secreção auricular e a infecção por cada um dos parasitos.

III.5 RESULTADOS

Os resultados obtidos nos três diagnósticos parasitológicos realizados nas orelhas dos bovinos nos meses de janeiro e julho de 2013 e janeiro de 2014 são apresentados na tabela III.3. No início deste estudo, dos 32 animais do rebanho da fazenda 1, 46,9% estavam parasitados pelo nematoíde e 52,4% pelos ácaros auriculares, em infestações simples ou mistas;

Em dezembro de 2013 quatro animais do plantel (1 vaca e 3 bezerras) foram vendidos e saíram do experimento, portanto o número de orelhas (n) analisadas no diagnóstico 3 passou a ser 56.

² Formulação experimental – Depósito pedido de patente nº: 01409000335 CTIT/UFMG

Tabela III.3 Resultados dos diagnósticos parasitológicos e das inspeções visuais feitos nos animais estudados feitos em janeiro de 2013, julho de 2013 e janeiro de 2014.

Nome do Animal	Idade* (anos)	Diagnóstico 1**						Diagnóstico 2						Diagnóstico 3					
		Nematoide		Ácaro		Secreção		Nematoide		Ácaro		Secreção		Nematoide		Ácaro		Secreção	
		OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE
Domada	8,2	-	-	6	-	-	-	++	-	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Foca	7,4	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++
Feijoadá	7,2	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	++	++
Gaiata	6,2	-	-	3	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Iguana	5,0	++	+++	-	-	++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	++	++
Gama	6,6	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	++	-	-	+++	++	+++	+++	-	-	++	++
Abdala	6,3	++	+	-	-	++	-	++	++	-	-	+++	-	+++	++	-	-	++	-
Itálico	5,9	+	+	3	2	-	-	-	-	-	2	-	-	+	-	11	-	-	-
Interação	5,9	-	-	8	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Babete	5,7	-	-	5	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Imida	5,6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Bacharela	5,3	+	+	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alasca	4,3	-	+++	14	-	-	+	-	-	3	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Jagunço	2,0	-	-	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bonita	3,4	-	-	-	2	-	-	-	++	-	1	-	-	-	+	-	-	-	++
Bondosa	3,1	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	++	-	-	++	-	+++	+++	-	-	++	++
Carinhosa	3,1	-	+	-	1	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Caxambu	3,1	-	++	17	-	-	++	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Celena	2,6	-	-	-	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
Madra	2,6	+	+	3	-	-	-	-	-	5	-	++	-	+++	+++	-	-	++	++
Calista	2,5	+	+	2	5	-	-	+	-	3	-	-	-	+++	++	-	-	++	-
Madural	2,4	-	-	4	-	-	-	+	++	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Eva	1,0	-	-	2	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esmeralda	0,8	+	+	4	4	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eleita	0,6	++	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eldorado	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Encantada	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enfeitado	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enduro	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Elevo	0,2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Elegante	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-
Eldorado	0,2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total de ácaros				75	32					18	12					14	2		

*A idade dos animais foi calculada no início do experimento.

**Diagnóstico 1 = Janeiro 2013 (GC)

Diagnóstico 2 = Julho de 2013

Diagnóstico 3 = Janeiro de 2014.

As cruzes representam a classificação qualitativa das infestações pelo nematoide e a presença e quantidade de secreção auricular.

Na tabela III.4 são observados os resultados das distribuições e os percentuais de orelhas parasitadas pelo nematoide e a distribuição dos graus de otite verificados nos animais nos meses de janeiro e julho de 2013 e em janeiro de 2014. Em janeiro de 2013 (diagnóstico 1) o nematoide foi diagnosticado em 45,3% das orelhas estudadas. Destas, 15 apresentaram otite de grau 1, quatro de grau 2 e 10 de grau 3. No diagnóstico 2, quando foi realizada a primeira avaliação do protocolo de controle verificou-se um percentual de 31,3% de orelhas parasitadas. Foram encontradas cinco orelhas de grau 1, nove de grau 2 e seis de grau 3. Por ocasião do diagnóstico 3, vinte e cinco orelhas (44,6%) estavam parasitadas. Foram encontradas nove orelhas com otite de grau 1, duas orelhas de grau 2 e 14 orelhas de grau 3.

Tabela III.4. Distribuição da infecção pelo nematoide e os graus de otite das orelhas parasitadas, nos meses de janeiro/2013, julho/2013 e janeiro/2014.

Orelhas	Distribuição da infestação					
	Diagnóstico 1 *		Diagnóstico 2		Diagnóstico 3	
	n=64		n=64		n=56	
	n ^o	%	n ^o	%	n ^o	%
Parasitadas	29 ^a	45,3	20 ^a	31,3	25 ^a	44,6
Grau 1	15	51,7	5	25,0	9	36,0
Grau 2	4	13,8	9	45,0	2	8,0
Grau 3	10	34,5	6	30,0	14	56,0
Não parasitadas	35	54,7	44	55,4	31	55,4

*Grupo controle (pré tratamento)

Teste de Mann-Whitney ($P > 0,05$). Valores seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância.

Na tabela III.5 estão relacionados os resultados das distribuições e os percentuais de orelhas parasitadas pelo ácaro e a carga parasitária média encontrada nos meses de janeiro e julho de 2013 e em janeiro de 2014. O ácaro foi encontrado parasitando 40,6% do total de orelhas (26/64), com carga parasitária média de 4,1 ácaros/orelha diagnóstico 1. No diagnóstico 2 foram encontradas 11 orelhas parasitadas (17,2%), com CP média de 2,7 ácaros por orelha. No diagnóstico 3, os animais parasitados foram cinco, 8,9% do total. A CP média foi de 3,2 ácaros/orelha

Tabela III.5. Distribuição da infecção pelo ácaro *Raillietia* sp. e média da carga parasitária (CP) encontrada nas orelhas, nos meses de janeiro/2013, julho/2013 e janeiro/2014.

Orelhas	Distribuição da infestação					
	Diagnóstico 1 *		Diagnóstico 2		Diagnóstico 3	
	n=64		n=64		n=56	
	n ^o	%	n ^o	%	n ^o	%
Parasitadas	26 ^a	40,6	11 ^b	17,2	5 ^b	8,9
Não parasitadas	38	59,4	53	82,8	51	91,1
Média CP	4,1		2,7		3,2	

*Grupo controle (pré tratamento)

Teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$). Valores seguidos por letras diferentes diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância.

A pasta parasiticida testada para o controle da otite parasitária aderiu bem às superfícies cutâneas do pavilhão auricular dos bovinos. Foi possível constatar visualmente a presença de resíduos após 30 dias da aplicação. No decorrer do experimento não foram observadas alterações clinicocomportamental nos bovinos.

III.6 DISCUSSÃO

Os resultados do primeiro diagnóstico parasitológico mostrou que 46,9% (15/32) dos animais do rebanho estavam parasitados pelo nematoide auricular. Vinte e nove (45,3%) das orelhas estavam positivas, destas, 15 apresentaram otite de grau 1, quatro de grau 2 e 10 de grau 3. O resultado do diagnóstico 2 mostrou um decréscimo no número de orelhas parasitadas, passando de 29 para 20, porém sem diferença significativa. Observou-se uma mudança na distribuição nos graus de otite em que os casos de otite de grau 1 diminuíram, as de grau 2 aumentaram e as orelhas que apresentaram otite de grau 3 diminuíram de 10 para seis. Após 12 meses de tratamento o percentual de orelhas positivas era semelhante ao do início do estudo (44,6%). Verificou-se que o número de orelhas com otite subclínica voltou a subir, o que pode ser explicado pelo menor número de orelhas que apresentaram otite de grau 2. Porém o que sugeriu um agravamento dos sinais clínicos de otite no rebanho foi o aumento de casos de otite de grau 3, que passaram de seis para 14.

Os resultados deste estudo sugerem que o protocolo de controle avaliado neste estudo mostrou-se ineficiente no combate às infestações pelo nematoide. Apesar do número de orelhas parasitadas terem diminuído após seis meses de tratamento, não houve diferença significativa ($p > 0,05$). Além disso, ao final de 12 meses o número de orelhas positivas manteve-se semelhante àquele do início do experimento e não foram observados casos de eliminação do parasito. O aumento do número de orelhas apresentando otite de grau 3 permitem inferir que a doença se agravou naqueles animais que anteriormente apresentavam a doença de graus 1 ou 2. Estes resultados estão de acordo com as observações de Duarte e Hamdan (2004), de que a otite parasitária, se não for tratada adequadamente, pode evoluir, com o agravamento dos sinais clínicos.

Apesar de não terem sido encontrados na literatura registros de cura desta parasitose auricular, alguns tratamentos estudados mostraram melhores resultados do que o estudo atual. Jibbo (1966) citou o uso de produtos a base de BHC (Hexaclorociclo-hexano) e de DDVP

(diclorvós) com resultados positivos na eliminação da otite causada pelo nematoide, no entanto, salientou a necessidade de novos tratamentos nos casos de reinfestações. Rescidivas são achados frequentes como salientou Campos *et al.* (2009) ao utilizar uma solução tópica a base de trichlorfon associada à moxidectina 10%. No entanto a eficiência deste tratamento não impediu a rescidiva da doença após 30 dias da alta clínica do animal. Odongo e D'Souza (1989) relataram eficácia de 75% na utilização de uma solução contendo o organofosforado e oxitetraciclina no controle dos nematoides auriculares em bovinos. Vale ressaltar que este tratamento previa três aplicações tópicas com intervalos de duas semanas. Apenas no estudo de Vieira *et al.* (2001) verificou-se a ineficiência da aplicação única de uma pasta contendo organofosforado e dimetilsulfóxido no tratamento da otite causada por nematoides.

Os resultados deste estudo sugerem que o princípio ativo da pasta antiparasitária não tenha atingido as porções mais profundas do CAE mantendo, portanto, uma carga parasitária suficiente para a reprodução ativa do nematoide. Além disso, o parasito é conhecido pela preferência por local úmido e com temperatura acima de 38°C, portanto, supõe-se que o protocolo de controle manteve as características do CAE, permitindo a manutenção do microambiente auricular com condições favoráveis para o desenvolvimento da parasitose.

Quanto à infecção pelo ácaro, no início deste estudo, 59,4% dos animais (19/32) estavam parasitados, em apenas uma orelha ou em ambas. Este percentual foi superior ao encontrado por Leite (1989) e Leite (2010), que relataram 42,% de animais positivos em rebanhos da raça Gir.

Das 64 orelhas analisadas, verificou-se que antes do tratamento, 26 estavam parasitadas e a CP média encontrada foi de 4,1 ácaros/orelha. Após seis meses de tratamento, houve a diminuição significativa no número de orelhas parasitadas ($p=0,0068$). E ao final do estudo, no diagnóstico 3, verificou-se que 91,1% dos animais estavam livres do parasito, porém a CP média havia aumentado para 3,2 ácaros/orelha, devido à coleta de 11 ácaros em um animal (Tabela I.5). Esta foi a maior CP encontrada no diagnóstico 3, porém inferior àquela observada no diagnóstico 1 de 17 ácaros por orelha (Tabela I.3).

Estes resultados poderiam ser atribuídos tanto a uma ação direta do organofosforado sobre os ácaros presentes nos bovinos, como também à um fator repelente àqueles indivíduos do ambiente externo, fato ainda não descrito na literatura. De acordo com Costa *et al.* (1992) o adulto jovem deste parasito é bastante ativo. Ele sai do CAE do bovino, desce ao chão à procura de novo hospedeiro, onde se alimenta e faz o acasalamento e a deposição dos ovos. A fase de protonífa ocorreria no meio ambiente. Portanto, os resultados obtidos neste estudo poderiam sugerir que os ácaros que conseguiram deixar o conduto auditivo de um bovino tratado, teriam dificuldade em infestar a orelha de outro hospedeiro nas mesmas condições. Apesar da diminuição significativa no número de orelhas parasitadas, esperava-se que, após um ano de tratamento, a infecção pelo ácaro fosse completamente eliminada. No entanto, credita-se a persistência da parasitose à localização do ácaro no CAE. É possível supor que alguns parasitos adultos, que normalmente são pouco ativos, permaneceram sobre a superfície do tímpano, sem contato com a pasta, passando a ser então, fonte de reinfestações.

A presença de secreção auricular mostrou correlação positiva com a parasitose pelo nematoides e negativa com a presença do ácaro do gênero *Raillietia*. Estes resultados corroboram o estudo de Leite *et al.* (1989a) e Leite (2010) que citaram casos de infestações do ácaro em animais Gir sem a presença de sinais clínicos.

No atual estudo, não foram utilizados antibióticos, fungicidas ou mesmo anti-inflamatórios para o tratamento dos casos considerados mais graves, como preconizado por Duarte e Hamdan (2004). A inspeção visual do pavilhão auricular e do CAE, somada ao resultado obtido no

primeiro diagnóstico parasitológico, realizados em janeiro de 2013, demonstraram que os animais parasitados apresentaram graus de otite entre 0 e 3. De acordo com Leite (2010), apenas os animais que apresentassem otite de grau 4 (grave) ou 5 (muito grave) deveriam ser tratados, de forma sistêmica, com antibióticos e anti-inflamatórios. Portanto, utilizou-se unicamente o antiparasitário tópico em todos os animais, tanto naqueles não parasitados como nos animais positivos, independente do grau de otite que apresentassem. O objetivo foi avaliar a eficiência do antiparasitário como método de controle da otite parasitária e também como ferramenta de prevenção de infestações de ambos os parasitos auriculares.

A escolha do produto utilizado no controle da otite parasitária foi pautada em estudos que indicaram a eficiência do princípio ativo utilizado (organofosforado) no controle de helmintos e ácaros (Booth e McDonald, 1992) em diferentes espécies de animais domésticos. Souza et al (2006) estudou a utilização do organofosforado Diazinon a 1% e obteve 100% de eficácia em otites de cães causadas por Otodectes. Bello *et al.* (2008) conseguiram controlar a infecção natural por *A. nitens* nos pavilhões auriculares e nos divertículos nasais de equinos, utilizando uma pasta carrapaticida à base de triclorfon. Miyakawa *et al.* (2012) utilizaram uma pasta a base de triclorfon a 6% para tratar lesões de pele causadas por *Stephanofilaria*.

Segundo Ayres e Almeida (2006), os organofosforados, em especial o triclorfon, quando utilizados na concentração usada neste estudo, não deixam resíduos no leite e não são tóxicos para os animais. As afirmações de Booth e McDonald (1992) corroboraram a última afirmação ao destacarem a maior susceptibilidade aos organofosforados apresentada pelos parasitos em relação aos seus hospedeiros, tornando possível a utilização segura destes compostos como antiparasitários em animais domésticos. Portanto, acredita-se que mesmo que todo o fármaco utilizado neste estudo fosse absorvido, a quantidade seria insuficiente para causar efeitos tóxicos e deixar resíduos no leite ou na carne.

Outros critérios importantes para a escolha do produto utilizado no protocolo de controle foram a facilidade do preparo, a praticidade e a rapidez da aplicação do mesmo. A pasta não apresentou odor desagradável e não houve mudança de aspecto durante o tratamento. A preparação da mistura do triclorfon em pó com os outros produtos da pasta foi simples e fácil. Os componentes da mistura têm baixo custo e são facilmente encontrados no comércio especializado. O custo completo do protocolo foi calculado em R\$ 28,00/por animal. Além disso, o manejo mensal dos animais tornou-os ainda mais dóceis, entrando no brete com facilidade e permitindo a aplicação do produto sem demonstrar qualquer reação agressiva.

III.7 CONCLUSÕES

- A avaliação inicial do grau de parasitismo auricular do rebanho estudado mostrou que 46,9% dos animais estavam parasitados pelo nematoide e 59,4% pelo ácaro;
- O protocolo de controle avaliado não foi eficiente no controle do nematoide auricular e não impediu o agravamento dos sinais clínicos de otite desencadeada por este parasito;
- A utilização mensal do produto no CAE dos animais diminuiu significativamente o número de orelhas parasitadas pelo ácaro, porém não foi eficiente para eliminar a parasitose do rebanho.

III.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo demonstraram a dimensão das parasitoses auriculares em um rebanho bovino da raça Gir em que cerca da metade dos animais estavam parasitados pelo ácaro ou pelo nematoide. Apesar das aplicações sistemáticas do produto antiparasitário, os resultados alcançados foram insatisfatórios levando à conclusão que os estudos não podem cessar. Novos produtos, com a utilização de protocolos acessíveis aos produtores rurais, devem ser analisados visando diminuir os prejuízos causados pela otite parasitária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCGIL. 2013. *Prova nacional de produção de leite - Gir leiteiro sustentável*. Disponível em: <http://www.girleiteiro.org.br/sustentavel2.php?id=c4ca4238a0b923820dce509a6f75849b>. Acessado em: 06/08/2014.
- ABDALLA, M. S., PEIXOTO, T. C., ALVES, P. A. M., FRANÇA, T. N., BRITO, M. F. Aspectos anátomo-patológicos da otite causada por *Rhabditis* sp em bovinos no estado do Rio de Janeiro, Brasil. In: Conbravet 2008. Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0743-1.pdf>. Acesso em: 03/02/2014.
- AHN YK, CHUNG PR, LEE KT. *Rhabditis* sp infected cases in rural schoolchildren. *Korean Journ. of Parasitol.* 23: p. 1-6, 1985.
- AL-BANNA, L., PLOEG, A.T., WILLIAMSON *et al.* Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. *J. Nematol.*, v. 36, p. 142-146, 2004.
- AL-FARWACHI, M.I. E AI-HASSAN, M.M. Clinical and microbiological study of otitis externa in sheep. *Iraq. Journ. Vet. Scien.*, v. 22, n. I, p. 43-48, 2008.
- AL-FARWACHI, M.I. E AI-HASSAN, M.M. Study of some aspects of otitis externa in calves in Mosul city. *Iraq. Journ. Vet. Scien.*, v. 23, n. I, p. 69-74, 2009
- ALI, S.A. Microbiological study of otitis externa in sheep in Diwaniya City. Al-Qadisiya. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 10, n. 1, p. 32-35, 2011.
- ANDERSON, R.V.; SUDHAUS, W. Description of *Rhabditis (Pellioiditis) dolichuroides* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae) from Kenya. *Can. J. Zool.*, v. 63, n. 7, p. 1711-1715, 1985.
- ANDRÁSSY, I. *A taxonomic review of the suborder Rhabditina (NEMATODA: SERCENENTIA)*. O.R.S.T.O.M., Paris, 1983. 242p.
- ARAUJO FILHO, R.S.; VIANNA, S.S.S.; PERREIRA, J.R. Aspectos epidemiológicos de *Raillietia auris* (Leidy, 1872) Trouessart, 1902 (mesostigmata: Raillietidae), no Vale do Paraíba e Região Serrana, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 5, n. 1, p. 33-38, 1996.
- ASBIA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. Index ASBIA. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/index2012.pdf>. Acessado em: 28/08/2013, 2012.
- ASBIA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. Índex ASBIA. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/index2012.pdf>. Acessado em: 28/08/2013. 2013.
- ASCOM SEAPA. *Valor Bruto da Produção de leite em Minas Gerias deve alcançar R\$ 6,7 bilhões*. 2014. Disponível em: <http://www.diariodearaxa.com.br/Noticia/Agronegocio/2014/5/13747.aspx>. Acessado em: 15/07/2014.
- ASIF, M.; PRASSAD, J.S.; KHAN, R. *et al.* A revision of the genus *Metarhabditis* (Nematoda: Rhabditidae) with description of the three known species, a key to the identification of congeners and discussion of the relationships. *Journ. of Natural Hist.*, v. 47, n. 41-42, p.2599-2622, 2013.

- AYRES, M. C. C.; ALMEIDA, M. A. O. Considerações gerais sobre os anti-helmínticos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. (Ed.). *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 4. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006. p. 519-526.
- BALDANI, J.I.; AZEVEDO, M.S.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; BALDANI, V.L.D. e DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E. e CARVALHO, J.G., eds. *Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas*. Viçosa, SBCS/UFLA/DCS, 1999. p.621-666.
- BELLO, A.C.P.P.; CUNHA, A.P.; LEITE, R.C. *et al.* Controle de *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) em equinos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 17, n. 1, p. 59-63, 2008.
- BOA MORTE, M.; OLIVEIRA, F. C. Infecção por parasitas do gênero *Raillietia* em bovinos (*Bos taurus indicus*): Fatores de risco relacionados à raça e conformação da orelha. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 15, 2008, Curitiba, PR. ANAIS ... Curitiba, 2008.
- BOOTH, Nicholas H. & McDONALD, Leslie E. *Farmacologia e Terapêutica em Veterinária*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1992. 740p.
- BRASIL. 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio: Brasil 2012/2013 a 2022/2023 / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. - Brasília: Mapa/ACS, 2013. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/projecoes%20-%20versao%20atualizada.pdf. Acessado em: 15/06/2014.
- BRITO, S.S.; LIMA, M.M.; FAUSTINO, M.A.G. *et al.* Otite parasitária em bovinos na Estação Experimental João Pessoa (EEJP) – EMEPA – Paraíba. *Ciênc. Vet. Trop.*, v. 8, n. 1,2 e 3, p. 84-87, 2005.
- CAMPOS, D. M. B.; ARAÚJO, J. L. B.; VIEIRA, M. C. M. *et al.* Um caso de parasitismo por *Rhabditis* sp. em criança natural de Goiânia, Goiás, Brasil. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.*, v. 35, n. 5, p. 519-522. 2002.
- CAMPOS, S. B. S.; SERODIO, J. J.; BRAZIL, D. S. *et al.* Evolução clínica, diagnóstico, tratamento e achados de necropsia da otite parasitária por *Rhabditis* sp. em touro da raça Gir - Relato de caso. Anais do VIII Congresso brasileiro de Buiatria. *Ciênc. Anim. Brasil*. v. 1. 2009.
- CARTA, L.K; OSBRINK, W. *Rhabditis rainai* n. sp. (Nematoda: Rhabditida) associated with the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Nematot.*, v. 7, n. 6, p. 863-879, 2005.
- CARTER, G. R. *Diagnostic procedures in veterinary microbiology*. 3a ed., Springfield, USA: Charles C. Thomas, I11, 1979. 484p.
- CHENGAPPA, M.M.; MADDUX, R.L.; GREER, S.C. *et al.* Isolation and identification of yeasts and yeastlike organisms from clinical veterinary sources. *J. Clin. Microbiol.*, v. 19, n. 3, p. 427-428, 1984.
- CONSOLI, E.A.; OLIVEIRA, S.A.; HAKAKAVA, R. *et al.* Desenvolvimento de diagnóstico molecular para identificação de *Pratylenchus jaehni*. *Nemat. Brasil.*, v. 36, n. 3-4, p. 62-70, 2012.

COSTA, A. L.; LEITE, R. C.; FACCINI, J. L. H. Preliminary investigations on transmission and life cycle of the ear mites of the genus *Raillietia trouessart* (Acari: Gamasuda) parasites of cattle. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 87, n. 1, p. 97-100, 1992.

DE MAN, J.G. *Onderzoekingen over vrij in de aarde levende nematoden*. Tijdschr. Ned. Dierk. Ver., v. 2, p. 78-196. 1876.

DUARTE, E.R.; MELO, M.M.; HAHN, R.C.; HAMDAN, J.S. Prevalence of *Malassezia* spp. in the ears of asymptomatic cattle and cattle with otitis in Brazil. *Medic. Mycol.*, v. 37, n. 3, p. 159-162. 1999.

DUARTE, E.R.; MELO, M.M.; HAMDAN, J.S. Epidemiological aspects of bovine parasitic otitis caused by *Rhabditis* spp. and/or *Raillietia* spp. in the state of Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasit.*, v. 101, n.1, p. 45-52, 2001a.

DUARTE, E.R.; RESENDE, J. C.; ROSA, C. A *et al.* Prevalence of yeasts and mycelial fungi in bovine parasitic otitis in the state of Minas Gerais, Brazil. *J. Vet. Med. B.*, v. 48: p. 631-635, 2001b.

DUARTE, E.R.; HAMDAN, J.S. Otitis in Cattle, an Aetiological Review. *J. Vet. Med. B.*, v. 51, p. 1-7, 2004.

DUNE, A. C. C.; MOMO, C.; BECHARA, G. H. Abscesso cerebelar secundário à otite média em bovino - Relato de caso. In: CONGRESSO PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 6, 2004, Santos - SP. Disponível em: <http://www.spmv.org.br/conpavet2004/trabalhos-buiatria072.htm>. Acesso em 16/06/2014.

FACCINI, J.L.H.; FONSECA, A.H.; COSTA, A.L. *et al.* Distribuição geográfica e prevalência das espécies do Gênero *Raillietia* Trouessart em bovinos no Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 1, n. 2, p. 109-110, 1992.

FACURI FILHO E. J; GUIMARAES, A. M.; OLIVEIRA, P.R.; *et al.* Ocorrência de otite parasitária em um rebanho da raça Gir, no município de Betim, Minas Gerais. In: CONGRESSO MINEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 4, 1990, Belo Horizonte. *ANAIS...* Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG. 95 p., 1990.

FELSENSTEIN, J., CHURCHILL, G. A. A hidden Markov model approach to variation among sites in rate of evolution. *Molec. Biology and Evol.*, v. 13, p. 93-104, 1996.

FERRY, F. R. A.; FACCINI, J. L. H.; INADA, T. *The role of ear mites of the genus Raillietia (Acari: Raillietiidae) in otitis of domestic ruminants*. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 31, n.11, p. 981-984. 2011.

FLOYD, R.; ABEBE, E.; PAPERT, A. *et al.* Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molec. Ecol.*, v. 11, p. 839-850, 2002.

FORLANO, M.; GÓMEZ, M.; RONDON, M. 2014. Otitis bovina por *Rhabditis* sp. em um rebanho gyr em el município Urdaneta Edo Lara. Disponível em: <http://www.ucla.edu.ve/dveterin/jornadas/jornadasperinscripciones2014/~OTITIS%20BOVINA%20CAUSADA%20POR%20Rhabditis%20sp%20LARA.pdf>. Acesso em: 27/02/2015.

GASPARIN, G. 2007. *Mapeamento de QTL para resistência a parasitos e características de crescimento nos cromossomos cinco e sete de uma população experimental F2 de bovinos Gir x Holandês*. 81 f. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos. UFSCar. São Carlos - SP. Disponível em:

http://www.bdt.d.ufscar.br/htdocs/tedeSimplificado//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=1631. Acessado em: 16/01/2015.

HAYYAWI, S. M. Comparison of microbial isolates isolated from external ear canal of sheep and their susceptibility to antibiotics. In: VETERINARY SCIENTIFIC CONFERENCE, 11^a, 2012, *Anais...* p. 41- 48.

INFOSTAT STUDENT VERSION. 2013. Disponível em: <http://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=37>. Acesso em 01/02/2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). 2012. Disponível em: <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?views=noticias&id=1&>. Acessado em 20/09/2013.

JENSEN, R.; PIERSON, R.E.; WEIBEL, J.L. *et al.* 1982. Middle ear infection in feedlot lambs. Disponível em: <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?views=noticias&id=1&>. Acessado em 20/09/2013.

JIBBO, J. M. C. *Bovine parasitic otitis. Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, v. 14, p. 59-63, 1966.

JUBB, T.F.; VASSALLO, R. L.; WROTH, R.H. Suppurative otitis in cattle associated with ear mites (*Raillietia auris*). *Aust. Vet. J.* v. 70, n. 9, p. 354-5, 1993.

KIONTKE, K., SUDHAUS, W. 2006. Ecology of *Caenorhabditis* species. Available at WormBook (ed.) The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.37.1, Disponível em: <http://www.wormbook.org>. Acessado em: 11/04/2014.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. *Koneman. Microbiological diagnosis: Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana. 2008. 1691p.

LEDIC, I. L. *O Gir leiteiro “puro”- Uma realidade na América Latina*. 2013. Disponível em: <http://girbrasilartigos.blogspot.com/2010/01/o-gir-leiteiro-puro-uma-realidade-na.html>. Acesso em 10/11/2013.

LEITE, P. V. B. *Dinâmica da infecção, abordagem semiológica e tratamento das infestações por Rhabditis spp. e Raillietia spp. em bovinos Gir. Minas Gerais. 2010*. 60 f. Dissertação de mestrado em Ciência Animal. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte - MG.

LEITE P.V.B.; CUNHA L.M.; OLIVEIRA P.R.; LEITE L.B.; LEITE R.C. Farmers' perception about parasitic otitis in Gyr breed from three states of Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* v. 32, n. 9, p. 855-858, 2012.

LEITE, P. V. B.; LEITE, L. B.; CUNHA, A. P. *et al.* Clinical aspects and dynamics of auricular parasitosis in Gir cattle. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 33, n. 3, p. 319-325, 2013.

LEITE, R. C. NUNES, V. A.; FACCINI, J. L. H. *et al.* Aspectos clínicos da railietiose bovina. *Arq. Univ. Fed. Rural.* v. 12, n. 1-2, p. 83-91, 1989a.

LEITE, R. C. *Railietiose bovina*. 1989b. 24 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária) Instituto de Biologia da UFRRJ. Rio de Janeiro - RJ.

LEITE, R. C.; FACCINI, J. L. H.; COSTA, A. L. Avaliação de uma técnica in vivo para medir a infecção por ácaros do gênero *Raillietia* Trouessart (Acari) em bovinos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 84, n. 4, p. 309-311, 1989c.

- LEITE, R.C.; LEITE, R.C.; FACCINI, J.L.H. The diagnosis and treatment of bovine parasitic otitis caused by rhabditiform nematodes. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 3, n. 1, p. 69-70, 1994.
- LEITE, R. C. NUNES, V. A.; COELHO A. M. B.; CHQUILOFF *et al.* Patologia da infecção do ouvido de bovinos por *Raillietia auris* (Leidy, 1872) Trouessart, 1902 (Acari, Mesostigmata). II Achados bacteriológicos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 39, n.2, p. 325-332, 1987.
- LEITE, R.C.; NUNES, V.A.; NUNES, I. *et al.* Otite parasitária por nematoides rhabditiformes: Aspectos epidemiológicos e clínicos. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 15, n. 2, p. 49-51, 1993.
- LEYDY, J. *On a mite in the ear of the ox.* Proc. Acad. Nat. Sci. Phila., USA. p. 9, 1872.
- MARTINS JR., W.; NUNES, I.J.; RIBEIRAL, L.A. *et al.* Nota sobre a ocorrência da família *Rhabditidae* (Nematoda: *Rhabditida*) relacionados com otite em bovinos na região geoeconômica de Brasília - DF. *Ciênc. e Cult.*, v. 23, p. 248-249, 1971.
- MARTINS JR., W. *Rhabditis (Rhabditis) freitasi* sp. n. e *Rhabditis (Rhabditis) costai* sp. n. (Nematoda – Rhabditidae) isolados de otite bovina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 80, n. 1, p. 11-16, 1985.
- MCKEAND, J.B. Molecular diagnosis of parasitic nematodes. *Parasitol.* v. 117, p. 87-96, 1988.
- MIYAKAWA, V. I.; REIS, A. C. F.; LISBÔA, J. A. N. Comparação entre protocolos de tratamento para estefanofilariose em vacas leiteiras. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 1, p. 343-350, 2012.
- MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidose no Brasil. *Rev. Serv. Esp. Saúde Pública*, v. 1, p. 507-624. 1948.
- MORISITA T. Classification of the nematodes of the genus *Rhabditis* found in human stool. *In: 14th Nippon Kiseushiu Gakkai Nishinippon Taikai Kiji*, p. 47, 1958.
- MRÁÈEK, Z., K.B NGUYEN, P. TAILLER *et al.* *Steinernema sichuanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae) a new species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan, east Tibetan Mts., China. *Journ. Invert. Pathol.*, v. 93: p. 157-169, 2006.
- MSOLLA, P.; SEMUGURUKA, W.D.; KASUKU, A.A., SHOO, M.K. Clinical observations on bovine parasitic otitis in Tanzania. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* v. 25: p. 15-18, 1993.
- NICHOLAS, K. B., NICHOLAS, H. B. JR., DEERFIELD II, D. W. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBnet News* v. 4: n.14, 1997.
- NOGUEIRA, J. C. R.; DINIZ, M. F. F. M.; LIMA, E. O. *et al.* Identificação e susceptibilidade antimicrobiana de microrganismos obtidos de otite externa aguda *Rev. Brasil. Otorrinol.* v. 74, n. 4, p. 7-8, 2008.
- NUNES, V. A. Patologia da infecção do ouvido de bovinos por *Raillietia auris* (Leidy, 1872) Trouessart, 1902 (Acari – Mesostigmata). 1977. 52 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- NUNES, V. A.; NUNES, I. J. Técnica de exame “*post-mortem*” do sistema auditivo, aplicada ao estudo de otites em bovinos. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v. 27, n. 2, p.155-61, 1975.
- NUNES, V. A.; NUNES, I.J.; SANTOS, M.N. *et al.* Patologia da infecção do ouvido de bovinos por *Raillietia auris* (LEIDY, 1872) TROUESSART, 1902 (Acari – Mesostigmata). Aspectos macroscópicos. *Arq. Esc. Vet. UFMG*. v. 32., n. 3 , p. 229-234, 1980.

- ODONGO, M. O.; D'SOUZA C.F. Prevalence and treatment of bovine parasitic otitis in Olkarkar group ranch of Kajiado district, Kenya. *Bull. Anim. Health. Prod. Afr.*, v. 37, p. 191-194, 1989.
- OLIVEIRA, C.M.G.; BESSI, R.; HAKAKAVA, R. *et al.* Técnicas moleculares e microscopia eletrônica de varredura no esclarecimento da posição taxonômica da população K5 de *Pratylenchus* sp. *Nemat. Brasil.*, v. 35, p. 1-2, 2011a
- OLIVEIRA, C.M.G., EULALIO, J., BESSI, R., HAKAKAVA, R. Caracterizações Morfológica e Molecular de *Bursaphelenchus fungivorus* (Nematoda: Aphelenchida), detectado pela primeira vez no Brasil. *Nemat. Brasil.*, v. 35, p. 3-4, 2011b.
- OLIVEIRA C.M.G., MACHADO, A.C.Z., KUBO, R.K. *et al.* Diagnose de *Aphelenchoides fragariae* e *Pratylenchus* spp. pela aplicação da tecnologia do código de barras do DNA. *Nematol. Brasil.*, v. 33, p. 218-225, 2009.
- OLIVEIRA, C.M.G., MONTEIRO, A.R.; BLOK, V.C. Morphological and molecular diagnostics for plant-parasitic nematodes: working together to get the identification done. *Trop. Plant. Pathol.* v. 36, n. 2, p. 065-073, 2011c
- OLIVEIRA V.B.; RIBEIRO, M.G.; ALMEIDA, A.C.S.; PAES *et al.* Etiologia, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e aspectos epidemiológicos na otite canina: estudo retrospectivo de 616 casos. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina., v. 33, n. 6, p. 2367-2374, 2012.
- PARK, H.W.; KIM, H.H.; YOUN, S.H. *et al.* Biological control potentials of insect-parasitic nematode *Rhabditis blumi* (Nematoda: Rhabditida) form major cruciferous vegetable insect pests. *Appl. Entomol. Zool.*, v. 47, p. 389-397, 2012.
- PETROV, V.; MIHAYLOV, G.; TSACHEV *et al.* Otitis externa in dogs: microbiology and antimicrobial susceptibility. *Rev. Méd. Vét.*, v. 164, n. 1, p. 18-22, 2013.
- PILA, J. *Panorama da produção de leite no Brasil e no mundo*. Disponível em: 20/04/2013. www.scotcunconsultoria.com.br/noticias/artigos/20440/panorama-da-producao-de-leite-nobrasil-e-no-mundo.htm. Acesso em: 20/04/2013.
- PIRES, F. *Minas Gerais é o maior produtor de leite do Brasil*. Disponível em 20/04/2013. www.rankingbrasil.com.br/recordes/materiais/06rp/minas. Acesso em: 20/04/2013.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Fungi and Food Spoilage*. New York. Springer. 2009. 519p.
- POINAR Jr, G. O. *Rhabditis adenobia* sp. n. (Nematoda: Rhabditidae) from the colleterial glands of *Oryctesmonoceros* L. and other tropical Dynastid beetles (Coleoptera: Scarabaeidae). *Proc. Helminth Soc. Wash.*, v. 38, p. 99-108. 1971.
- POWERS, T. Nematode molecular diagnosis: from bands to barcodes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v. 42, p. 367-383.2004.
- POWERS, T. O., TODD, T. C.; BURNELL, A. M. *et al.* The internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *F. Nematol.*, v.29, p. 441-450, 1997.
- RENTERO, N. *Leite puxa as vendas de sêmen*. Disponível em: 03/06/2013. http://www.asbia.org.br/?empresa/noticias_ler,53. Acesso em: 03/06/2013.
- ROSEMBERG, G. AND STÖBER, M. Órgãos do sentido. In: DIRKSEN, H.; GRÜNDER, D.; STÖBER, M. *Exame clínico dos bovinos*. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1993. pp. 363-373.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANOATIS, T. Composition of the electrophoresis buffer. In: FORD, N.; NOLAN, C.; FERGUSON, M. AND OCKLER, M. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (USA), 1989, p. 66-67.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007. 211 p.
- SANTOS, J. A. Ouvidos e Anexos. In: *Patologia especial dos animais domésticos: mamíferos e aves*. Capítulo - 2 ed. Rio de Janeiro: Interamericana. p. 621-628. 1979.
- SANTOS, M.; STILWELL, G.; GONÇALVES, S.; LIMA, M.S. Diagnóstico de otite no ouvido médio/interno numa vitela Holstein por Tomografia Axial Computadorizada (TAC). *Rev. Port. Ciênc. Vet.*, v. 100, n.555-556, p. 223-225, 2005.
- SANTOS, R. R. Sensibilidade in vitro da microbiota da orelha de cães com otite externa a cinco antimicrobianos. *Acta Sci Vet.*, v. 35, n. 2, p. 433-435. 2007
- SANTOS, R. S.; FACCINI, J. L. H. Duration of development and longevity of *Raillietia auris* (Leidy) and *R. flechtmani* (Faccini, Leite and Costa) (Acari: Gamasida). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 5, n. 2, p. 85-86. 1996.
- SANTOS, S.B.; NASCIMENTO, E. R.; FACCINI, J.L. H. *et al.* Potentially pathogenic Brazil. *Journ. of Microbiol.*, v.40, p. 455-457. 2009.
- SCOTT, F.B.; VEROCAI, G.G.; CORREIA, T.R.; MELO, R.M.P.S.; ALVES, P.A.M. Eficácia de dois tratamentos no controle da otite parasitária bovina causada por nematoides rhabditiformes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14, 2006, Ribeirão Preto. *Anais...* Jaboticabal: CBPV, 2006. P. 295.
- SILVESTRE, A.; HUMBERT, J. F. A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites. *Exp. Parasitol.*, v. 95, n. 4, p. 271-276. 2000.
- SISSON, S.; GHANDHI, S. S. Generalidades sobre órgãos sensoriais e tegumento comum - Ouvido. In: GETTY, R. *Anatomia dos animais domésticos*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986. p. 1128-1131.
- SOLÉ-CAVA, A. Código de barras de DNA: o rabo que abana o cachorro. *Ciênc. Hoje*. Jan. /fev. 2008.
- SOUZA, C. P.; VEROCAI, G. G.; CORREIA, T. R.; MELO, R. M. P. S.; CAVALCANTI, M. C. H.; SCOTT, F. B. Eficácia do diazinon em uma formulação de uso otológico no tratamento da sarna otodécica em cães. *Parasitol. Latinoam.*, v. 61, p. 176-178, 2006.
- STEPHEN, D.; ALLEN WILLIAM, M.; JANDA PAUL, C.; SCHRECKENBERGER WASHINGTON; C. WINN. *Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.1760p.
- STOECKLER, M.; WAGGONER, P.E.; AUSUBEL, J.H. 2005. *O código de barras da vida. Objetivos, justificativas e resultados*. Disponibilidade: <http://phe.rockefeller.edu/barcode/docs/BLIllustrated24jan04book%20v1-3%20Portugues%2021june07.pdf>. Acesso em: 12/03/2015.
- STRIMMER, K.; VON HAESLER, A. Quartet puzzling, a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Molecular Biology and Evolution*. v. 13, p. 964-969, 1996.

- SUDHAUS, W. Zur Systematik, Verbreitung, Ökologie und Biologie neuer und wenig bekannter Rhabditiden (Nematoda). 2 Teil. *Zool. Jahrb. (Syst.)*, v.101, p.417-465. 1974.
- SUDHAUS W. Check list of species of *Rhabditis* sensu lato (Nematoda: Rhabditidae) discovered between 1976 and 1986. *Nematologica*, v. 37, p. 229-236, 1991.
- SUDHAUS, W. Preadaptive plateau in Rhabditida (Nematoda) allowed the repeated evolution of zooparasites, with an outlook on evolution of life cycles within Spiroascarida. *Palaeodiversity*, v. 3, p. 117-130, 2010
- SUDHAUS W. Phylogenetic systematisation and catalogue of paraphyletic “Rhabditidae” (Secernentea, Nematoda). *J Nematode Morphol Syst.*, v. 14, p. 113–178, 2011.
- SUDHAUS, W., KIONTKE, K. Phylogeny of *Rhabditis* subgenus *Caenorhabditis* (Rhabditidae, Nematoda). *J. Zoo. Syst. Evol. Research.*, v.34, p. 217-233, 1996.
- TAHSEEN, Q.; HUSSAIN, A.; TOMAR, V. *et al.* Description of *Metarhabditis andrassyana* gen. n., sp.n. (Nematoda: Rhabditidae) from India. *Int. J. Nematol.*, v. 14, p. 163-168. 2004.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.*, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.
- TAYLOR, M.A; COOP, R.L.; WALL, R.L. *Parasitologia Veterinária*. 3^a. Rio de Janeiro: Guanabara, 2009.726p.
- TESCHNER, M.; WÜRFEL, W.; SEDLACEK, L.; *et al.* Outer ear canal infection with *Rhabditis* sp. nematodes in a human. *Journ. of Clinic Microbiol.*, v.52, n.5, p. 1793–1795, 2014.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface, flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research, Oxford*, v. 24, p. 4876-4882, 1997.
- TOMAZINI, M.D.; AGUILLERA, M.M.; RODRIGUES, R.C.D.; BESSI, R.; HAKAVA, R., OLIVEIRA, C.M.G. Análises biométrica e molecular de isolado brasileiro de *Rhabditis rainai* (Nematoda: Rhabditida). *Nematol. Brasil.*, v. 37, p. 1-2, 2013.
- TROUESSARTH, E. Note sur le *Gamasus auris* (Leidy, 1872) type d’un genre nouveau (Raillietia). *Bull. Soc. Zool., France*, v.27, p. 231-233.
- VEROCAI, G. G.; FERNANDES, J. I.; CORREIA, T. R. *et al.* Otite parasitária bovina por nematoides rhabditiformes em vacas Gir no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Ver. Bras. Parasitol. Vet.* v.16, n.2, p.105-107. 2007.
- VIEIRA, M.C.M.; SILVA, L.A.F.; BORGES, N. C.; ARAUJO, J.L.B.; SANTIN, A. P. I.; SILVA, E.V. Estudo da prevalência de otites clínicas por *Rhabditis* sp. em bovinos da raça Gir no estado de Goiás. *Anais Esc. Agron. e Vet.*, v. 28, n. 2, p. 19-29, 1998.
- VIEIRA, M.C.M.; SILVA, L.A.F.; ARAUJO, J.L.B.; ANDRADE, M.A.; FIORAVANTI, M.C.S; SILVA, E.V. Parasitic otitis by rhabditiform nematode in Gir cattle: evaluation of treatments. *Ciênc. Anim. Brasilei.*, v. 2, n. 1, p. 51-53. 2001.
- VICENTE, J. J.; RODRIGUES, H. O.; GOMES, D. C. & PINTO, R. M. Nematoides do Brasil. Parte V. Nematoides de mamíferos. *Revta Bras. Zool.*, v.14, n. 1, p. 1-452. 1997.
- YERUHAM, I.; ELAD, D.; LIBERBOIM, M. Clinical and microbiological study of an otitis media outbreak in calves in a dairy herd. *J. Vet. Med. B.*, v. 46, p. 145-150, 1999.

YERUHAM, I.; ELAD, D. Acute bilateral suppurative otitis media in a dairy cow. *Can. Vet. J.*, v. 45, n. 9, p. 779, 2004.

WILLIAMS, B.D.; SCHRANKS, B.; HUYNH, C.; SHOWNKEEN, R., WATERSTONW, R.H. A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. *Genetics*, v.131, p. 609-624, 1994.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L., MILLER, W. "A greedy algorithm for aligning DNA sequences". *Journ. of Computat. Biol.*, 7v., n. 1-2, p. 203-14, 2000.