

PESQUISA DE PARASITOS GASTROINTESTINAIS EM EQUINOS COM ENFOQUE NA RAÇA PURO SANGUE INGLÊS MANTIDOS EM PROPRIEDADES DE TERESÓPOLIS, RIO DE JANEIRO, BRASIL – RESULTADOS PRELIMINARES

RESEARCH FOR GASTROINTESTINAL PARASITES IN HORSES WITH A FOCUS ON THOROUGHBRED MAINTAINED ON PROPERTIES IN TERESÓPOLIS, RIO DE JANEIRO, BRAZIL – PRELIMINARY RESULTS

André Vianna Martins¹, Lucas Cavalcante de Moura², Pablo Luiz Marins Mota², Bethânia Ferreira Bastos¹, Alynne da Silva Barbosa³

¹Docente Curso de Graduação em Medicina Veterinária do UNIFESO, Teresópolis, RJ, ²Acadêmico do Curso de Graduação em Medicina Veterinária do UNIFESO, Teresópolis, RJ,

³Pesquisador voluntário do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense.

Resumo

Diferentes agentes infecciosos podem infectar os equinos, dentre estes destaca-se os helmintos pela elevada frequência de estrôngilos. A presença de parasitos pode determinar sintomas gastrointestinais que varia de leve a grave onde se destacam a diarreia e as cólicas abdominais. Este trabalho avaliou a prevalência de parasitos gastrointestinais em fezes de equinos com enfoque na raça Puro Sangue Inglês (PSI), mantidos em Centros de Treinamento em Teresópolis, Rio de Janeiro, utilizando diferentes técnicas laboratoriais. O estudo foi realizado em Centros de Treinamento de equinos da raça PSI no município de Teresópolis. O total de animais utilizado, até o momento, foi de 314 animais. As amostras fecais foram submetidas a diferentes técnicas parasitológicas incluindo as microscópicas qualitativas e quantitativas para caracterizar taxonomicamente o parasito no menor nível taxonômico possível e estimar a carga parasitária, por meio da comparação de técnicas quantitativas, da biologia molecular para caracterizar a espécie de parasito com enfoque nos estrôngilos, especialmente na espécie *Strongylus vulgaris*. Os resultados foram também encaminhados aos proprietários dos animais. Através da análise dos dados, observou-se frequência geral de cavalos positivos (72,4%), onde destaca-se a elevada presença de estrôngilos (59%) em comparação ao *Parascaris equorum* (14,8%). As diferentes soluções utilizadas nas técnicas de Mni-Flotac, nos permite comparar a sensibilidades das diferentes soluções, e através disso observar que, com a utilização da solução de sulfato de zinco d = 1.300 g /mL, o maior valor de OPG detectado foi para *Parascaris equorum* (2.595 ovos por grama de fezes). Com a solução de cloreto de sódio d = 1.200 g / mL, o maior valor obtido foi para estrôngilos (5.205 ovos por grama de fezes). Apesar de os equinos mantidos nas referidas propriedades receberem um manejo sanitário criterioso, no entanto, através das técnicas utilizadas, foi detectada, ocasionalmente, alta frequência de nematoides gastrointestinais em algumas propriedades.

Palavras-chave: Equinos; Estrôngilos; Epidemiologia.

Abstract

Different infectious agents can infect horses, among them helminths stand out due to the high frequency of strongyles. The presence of parasites can determine gastrointestinal symptoms ranging from mild to severe, with diarrhea and abdominal cramps highlighted. This work evaluated the prevalence of gastrointestinal parasites in equine feces, focusing

on the purebred English breed (PSI), maintained in Training Centers in Teresópolis, Rio de Janeiro, using different laboratory techniques. The study was carried out in Training Centers for PSI horses in the city of Teresópolis. The total number of animals used, so far, was 314 animals. The fecal samples were subjected to different parasitological techniques including qualitative and quantitative microscopic techniques to taxonomically characterize the parasite at the lowest possible taxonomic level and estimate the parasite load, through the comparison of quantitative techniques, from molecular biology to characterize the parasite species with a focus in strongyles, especially in the species *Strongylus vulgaris*. The results were also forwarded to the owners of the animals. There was a general frequency of positive horses (72.4%), which highlights the high presence of strongyles (59%) compared to *Parascaris equorum* (14.8%). The different solutions used in the Mni-Flotac techniques allow us to compare the sensitivities of the different solutions and through this to observe that, with the use of the zinc sulphate solution $d = 1,300 \text{ g / mL}$, the highest detected OPG value was for *Parascaris equorum* (2,595 eggs per gram of faeces). With the sodium chloride solution $d = 1,200 \text{ g / mL}$, the highest value obtained was for strongyles (5,205 eggs per gram of feces). Despite the fact that horses kept on these properties received careful sanitary management, however, through the techniques used, a high frequency of gastrointestinal nematodes was occasionally detected in some properties.

Keywords: Horses; Strongyles; Epidemiology.

Introdução

Dentre os agentes potencialmente infectantes para os equinos destacam-se os parasitos como os helmintos, que são importantes causas de morbidade podendo determinar até casos de mortalidade (Proudman e Matthews, 2000). Os helmintos que infectam esses animais compreendem a várias famílias e xgêneros distintos; dentre eles incluem-se os pequenos estrôngilos como *Cyathostomum* spp. e *Cyliscotephanus* spp., os grandes estrôngilos como *Strongylus vulgaris*, *Strongylus equinus*, *Strongylus edentatus* e *Triodontophorus* e ainda, *Parascaris equorum*, *Oxyuris equi*, *Strongyloides westeri*, *Trichostrongylus axei*, *Habronema* spp., *Disctyocaulus arnfieldi* e *Anoplocephala* spp. (Proudman e Matthews, 2000; Molento, 2005).

Esses agentes gastrintestinais podem causar problemas digestórios, que geralmente culminam em cólica e também podem contribuir para o desenvolvimento de problemas respiratórios. A severidade da cólica causada por esses agentes pode resultar em sintomas que variam de leve intensidade, determinando um desconforto abdominal, de média a elevada intensidade determinando cólicas graves que necessitam de cirurgia e que podem ser fatais para esses animais (Molento, 2005; AVMA, 2011).

Os estrôngilos, também conhecidos como ciatostomíneos, chamados vulgarmente de “pequenos vermes vermelhos” dos equinos e os grandes estrôngilos onde se inserem o gênero *Strongylus* e *Triodontophorus*. Esses

helmintos infectam os equinos após a ingestão da forma evolutiva de terceiro estágio, L3 (Shite *et al.*, 2015).

Diferentes técnicas são utilizadas para realizar o diagnóstico coproparasitológico nos animais, sendo as técnicas quantitativas utilizadas nos equinos. A funcionalidade dessas técnicas consiste em estimar a quantidade de ovos de helmintos por grama de fezes (OPG), diagnosticar o parasitismo, avaliar a terapia antiparasitária e até a resistência dos helmintos aos fármacos parasiticidas empregados (Noel *et al.*, 2017).

Das técnicas quantitativas existentes a de McMaster desenvolvida por Gordon e Whitlock em 1993 tem sido a mais amplamente utilizada em medicina veterinária (Noel *et al.*, 2017). Contudo, esta técnica possui limites de detecção de ovos. A mais recente técnica quantitativa desenvolvida foi proposta por um grupo italiano, denominada de FLOTAC. Esta tem elevada sensibilidade na determinação do OPG em amostras fecais de diferentes espécies de hospedeiros (Cringoli *et al.*, 2017). Devido ao seu nível de complexibilidade, o grupo de pesquisa conseguiu otimizar o processamento, sendo denominada de Mini – FLOTAC a simplificação dessa técnica que não necessita de centrifuga específica, requerendo menores etapas de preparação, consequentemente reduzindo o tempo de realização (Noel *et al.*, 2017).

O nível de importância que a infecção por estrôngilos possui na saúde dos equinos, faz-se

necessário o seu diagnóstico nos exames de rotina. De forma geral os ovos dos estrôngilos são característicos da Superfamília Strongyloidea. O diagnóstico realizado na rotina para diferenciar os pequenos estrôngilos dos grandes, mediante a identificação dos gêneros e espécies, tem sido realizado a partir do coprocultura, analisando a morfologia das larvas de terceiro estágio. No entanto, Bracken e colaboradores (2012) ressaltaram que a coprocultura é uma técnica que consome muito tempo, devido ao período de incubação, que leva cerca de semanas, seguido da fase de identificação das larvas no microscópio. Dessa forma deve-se pleitear o uso de técnicas mais rápidas, como a de biologia molecular, para o diagnóstico desses helmintos, com enfoque em *S. vulgaris*, pois é a espécie com maior potencial patogênico para equinos, dentro dessa Superfamília.

METODOLOGIA

Considerações Éticas

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense (CEUA – UFF) em 04 de julho de 2019, sob o número CEUA nº 6742290519

Coleta de dados

O estudo está sendo realizado em Centros de Treinamento de equinos da raça Puro Sangue Inglês (PSI) no município de Teresópolis. Atualmente, o município conta com cerca de sete centros de treinamento, contendo um total de 600 equinos PSI. É importante ressaltar que esses equinos são destinados a corrida, dessa forma os mesmos são conduzidos toda semana para competir no Jockey clube brasileiro que fica localizado na cidade do Rio de Janeiro. Quando a competição acaba os animais voltam para os Centros de Treinamento localizados em Teresópolis. Os animais utilizados neste estudo estavam naturalmente infectados e sem tratamento com qualquer anti-helmíntico por no mínimo dois meses anteriores as coletas das amostras fecais.

Todos os proprietários ou responsáveis legais pelos equinos, como treinadores e/ou gerentes dos equinos nos Centros de Treinamento foram convidados a participar e todos aceitaram e

assinaram a documentação pertinente e foram apresentadas a CEUA da UFF. As amostras fecais dos animais que participarem do projeto foram coletadas diretamente da ampola retal por meio de luva de palpação com os animais contidos individualmente em bretes de contenção. As coletas foram realizadas pelos próprios tratadores e médicos veterinários responsáveis pelos animais, como também pelos membros participantes desse projeto. Dados referentes aos animais foram anotados em fichas técnicas, incluindo idade, sexo, raça, pelagem, número de registro no *stud book* do PSI entre outras características que os identifiquem.

Nesse mesmo dia, informações referentes ao manejo dos animais foram recuperadas por meio de um formulário semiestruturado. Essa entrevista foi preferencialmente realizada com o profissional que maneja diretamente o animal.

Técnicas coproparasitológicas qualitativas

No laboratório de Parasitologia do Curso de Medicina Veterinária do UNIFESO e no Laboratório de Parasitologia do Instituto Biomédico – UFF, as amostras fecais foram catalogadas em caderno técnico, sendo anotado o nome do animal, sexo, idade, nome do centro de treinamento e a consistência e também a coloração do material fecal. Uma porção de cada amostra foi filtrada em tamiz com gaze dobrada quatro vezes, e transferida para cálice de fundo cônico. O filtrado foi alíquotado conforme segue abaixo para realização das seguintes técnicas qualitativas:

15 ml em tubo de centrífuga de fundo cônico para realização da técnica de centrífugo-flutuação de Sheather (1923) modificada por Huber (2003);

15 ml em tubo de centrífuga de fundo cônico mantido sob refrigeração para estoque;

1,0 ml em microtubos devidamente identificados, congelados (-18°C) em freezer para estoque;

Uma parte do filtrado será deixado sedimentar em cálice de fundo cônico por 24 horas para realização da técnica de Lutz (1919).

A leitura das lâminas de microscopia obtidas de cada técnica foi realizada no microscópio óptico binocular Olympus® BX 41, inicialmente, em

aumento de 100 vezes e, para confirmação, se necessário, em 400 vezes, acoplado a câmera digital Samsung® SDC415 com *software* de captura Honestech® PVR.

Técnica coproparasitológica quantitativa de Mini – Flotac

A quantidade de ovos por grama de fezes de cada animal foi estimada por meio da técnica de Mini – Flotac segundo Cringoli *et al.* (2017) utilizando três diferentes soluções como a de flutuação de cloreto de sódio d=1,200 g/dl, a de sulfato de zinco d=1,200 g/dl e a de sulfato de zinco d=1,350 g/dl. As câmaras de Mini - Flotac contendo o material fecal foram lidas em microscópio óptico com aumento de 100x para identificar e contar ovos de helmintos. Para realizar a técnica foi utilizado o dispositivo tipo copo Fill – Flotac para herbívoros que também foi desenhado

pelo Cringoli *et al.* (2017). A partir do copo Fill – Flotac é retirado cinco gramas das amostras fecais. Neste copo é adicionado 45 mL da solução de flutuação. Após homogeneização do material, a solução fecal foi aplicada na câmara do Mini – Flotac, e passado 10 minutos, estas foram levadas para o microscópio óptico e os ovos de estrôngilos e de outros helmintos foram contados. Ao final da contagem, o valor obtido foi multiplicado pelo valor de correção, que nesse caso era cinco, para se estimar a quantidade de ovos por grama de fezes. Ao final, as contagens obtidas da mesma amostra com a solução de NaCl e com as duas soluções de sulfato de zinco foram comparadas. O número de ovos de estrôngilos em OPG de cada animal foi classificado de acordo com Rocha *et al.* (2018) em: baixa infecção (0 a 450), infecção moderada (500 a 1000) e infecção maciça (>1000).

Tabela 1. Frequência positividade para parasitas intestinais em equinos

Properties (n=547)	Strongyles	Parascaris equorum	Total
A (n = 84)	45 (53.6%)	13 (15.5%)	59 (70.2%)
B (n = 126)	101 (80.2%)	21 (16.6%)	108 (85.7%)
C (n = 49)	39 (79.6%)	10 (20.4%)	45 (91.8%)
D (n = 73)	37 (50.7%)	15 (20.6%)	53 (72.6%)
E (n = 82)	26 (31.7%)	14 (17.1%)	43 (52.4%)
F (n = 106)	56 (52.8%)	4 (3.8%)	66 (62.2%)
G (n = 22)	15 (68.2%)	4 (18.2%)	18 (18.2%)
H (n = 2)	1 (50%)	-	1 (50%)
I (n = 3)	3 (100%)	-	3
Total	323 (59%)	81 (14.8%)	396 (72.4%)

Tabela 2. Frequência de equinos positivos para parasitas intestinais de acordo com

<i>P. equorum</i>	(n=78)	(n=89)	(n=93)
5 - 499	72	84	85
500 - 999	3	3	5
1000 - 1790	3	-	2
1791 - 2530	-	2	-
2595	-	-	1
Eggs per gram of feces strongyles	Zinc sulfate (d = 1.200 g/mL) (n=260)	Zinc sulfate (d = 1.350 g/mL) (n=233)	Sodium chloride (d = 1.200 g/mL) (n=290)
5 - 499	241	221	258
500 - 1515	16	12	22
1516 - 3055	3	-	7
3056 - 5204	-	-	2
5205	-	-	1

Análise dos dados

Todas as informações recuperadas nas fichas dos equinos e com o formulário, bem como a consistência do material fecal, a coloração das

fezes e a positividade dos parasitos estão sendo tabulados em bancos de dados do Excel Microsoft Office Excel 2007, sendo posteriormente submetidos para análise estatística para avaliar a

significância parasitária em comparação com a variável analisada. Além disso, a comparação dos dados das técnicas coproparasitológicas quantitativas está sendo avaliada de acordo com o teste de McNemar e o índice Kappa. Todas as análises são realizadas no Software SPSS Statistics.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas um total de 547 amostras de fezes de equinos, sendo 520 da raça PSI alojados em seis propriedades e 27 da raça pônei alojados em três propriedades no município de Teresópolis/RJ, as quais foram submetidas às técnicas coproparasitológicas qualitativas para identificação dos parasitos e quantitativas para contagem de ovos através do aparelho de Mini-Flotac com três diferentes soluções.

Através da análise dos dados, chegamos a uma frequência geral 72,4% de cavalos positivos, onde destaca-se a elevada presença de estrôngilos (59%) em comparação ao *Parascaris equorum* (14,8%) (Tabela 1).

A média de animais parasitados encontrada neste trabalho é semelhante àquela verificada por Piccoli *et al.* (2015) com 73% de positividade de parasitos intestinais. Estes autores analisaram, por meio da técnica coproparasitológica de Willis Mollay, amostras fecais de 276 equinos, sendo 131 animais destinados a trabalho e 145 destinados a lazer de estabelecimentos particulares. O presente trabalho também trabalhou com propriedades particulares, porém de animais de corrida.

Por outro lado, a frequência de cavalos parasitados por helmintos intestinais observada neste experimento foi inferior àquelas descritas por Martins *et al.* (2009) que encontraram uma positividade de 96% ao analisarem, por meio das técnicas coproparasitológicas quantitativas de Gordon e Whitlock, a infecção em 366 éguas da Raça Mangalarga Machador; e também em relação aos achados de Rosa *et al.* (2018) quando os parasitos foram evidenciados em 93,2% dos animais da raça Mangalarga Machador avaliados, utilizando a técnica quantitativa de Gordon e Whitlock modificada por Ueno e Gonçalves. O fato destes dois trabalhos terem encontrado resultados

semelhantes, mas com um percentual de positividade de parasitos gastrointestinais superior ao verificado neste estudo, pode ser explicado pelo fato de que este experimento analisou cavalos da raça Puro Sangue Inglês, em centros de treinamento onde o manejo higiênico-sanitário é criterioso, em função da elevada exigência por resultados de alto desempenho.

Martins *et al.* (2001) relataram a frequência de nematoides intestinais em 30 equinos, sendo 17 machos e 13 fêmeas originados de apreensão em logradouros públicos utilizando necropsias, recuperando estrôngilos em 54,5% dos animais avaliados e *P. equorum* em 20% deles. Apesar do presente experimento ter feito uma avaliação coproparasitológica, o mesmo encontrou presença de estrôngilos em 59% e de *Parascaris equorum* em 14,8% dos animais estudados, resultados estes semelhantes ao dos autores supracitados.

As diferentes soluções utilizadas neste experimento para as técnicas de Mini-Flotac, nos permitiu comparar a sensibilidades das diferentes soluções, e através disso observamos que, com a utilização da solução de sulfato de zinco d = 1.300 g /mL, o maior valor de OPG detectado foi para *Parascaris equorum* (2595 ovos por grama de fezes), enquanto que com a solução de cloreto de sódio d = 1.200 g / mL, o maior valor obtido foi para estrôngilos (5205 ovos por grama de fezes) (Tabela 2). Verificou-se uma maior sensibilidade desta técnica quando se utiliza a solução de NaCl, confirmando a validade dos resultados obtidos no trabalho de Castro *et al.* (2017) e também no estudo realizado nos Estados Unidos por Noel *et al.* (2017), quando nos dois experimentos foi utilizada apenas a solução de NaCl.

CONCLUSÕES

Os resultados ainda iniciais mostraram que, apesar dos equinos mantidos nas referidas propriedades receberem manejo sanitário adequado, por meio das técnicas utilizadas, foi detectada, ocasionalmente, alta frequência de nematoides gastrointestinais em algumas propriedades.

Por estes resultados preliminares observamos que a técnica de Mini-Flotac se

mostrou bastante eficaz e com extrema praticidade para sua realização, sendo uma excelente indicação para contagem de ovos por grama de fezes em equinos, especialmente com o uso da solução de cloreto de sódio, especialmente por este ser um sal mais barato do que o sulfato de zinco.

REFERÊNCIAS

- AVMA – American Veterinary Medical Association. Internal parasites in horse. Schaumburg: 9-10, 2011.
- Bevilaqua, C.M.L.; Rodrigues, M.; Concordet, D. Identification of infective larvae of some common nematode Strongylids of horses. *Revue de Medicine Veterinaire*. 144 (12): 989-995, 1993.
- Bracken, M.K.; Wohlk, C.B.M; Petersen, S.L.; Nielsen, M.K. Evaluation of conventional PCR for detection of *Strongylus vulgaris* on horse farms. *Veterinary Parasitology*. 184: 387-391, 2012.
- Bonesi, G.L.; Biondi, G.F.; Mattos, C.S.; Sturion, T.T.; Okano, W. Ocorrência de lesões hepáticas provocadas por larvas de *Strongylus* spp.. Diagnosticadas no exame *post mortem* de equídeos abatidos em Apucarana, Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*. 29(2): 379-386, 2008.
- Castro, L.L.D.; Abrahão, C.L.H.; Buzatti, A.; Molento, M.B.; Bastiamentto, E.; Rodrigues, D.S.; Lopes, L.B.; Silva, M.X.; Freitas, M.G.; Conde, M.H.; Borges, F.A. Comparison of McMaster and Mini Flotac fecal egg counting techniques in cattle and horses. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 10:132-135; 2017.
- Cringoli, G.; Maurelli, M.P.; Levecke, B.; Bosco, A.; Vercruysse, J.; Utzinger, J.; Rinaldi, L. The Mini – Flotac technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals. *Nature Protocols*. 12 (9): 1723- 1732, 2017.
- Ferreira, G.M.S.; Dutra, F.A.F.; Filho, E.F.A.; Santos, A.C.G. Parasitismo gastrointestinal e hematologia em equinos e asininos da mesorregião da aglomeração urbana, São Luís, Maranhão. *Archives of Veterinary Science*. 19 (2): 22-30, 2014.
- Huber, F.; Bonfim, T.C.; Gomes, R.S. Comparação da eficiência da técnica de sedimentação pelo formaldeído-éter e da técnica de centrífugo-flutuação modificada na detecção de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de bezerros. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 12 (2): 135-137, 2003.
- Lutz, A. O *Schistosomum mansoni* e a shistosomatose segundo observações feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 11(1):121-155, 1919.
- Madeira de Carvalho, L.M; Fazendeiro, M.I.; Afonso-Roque, M.M. Estudo morfométrico das larvas infectantes (L3) dos strongilídeos (Nematoda: Strongylidae) dos equídeos. 3. Conclusões, perspectivas futuras e proposta de chave de identificação de alguns nemátodes gastrintestinais mais comuns dos equídeos em Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa*. 15 (2): 59 – 65, 2008.
- Martins, I.V.F.; Correia, T.R.; Souza, C.P.; Fernandes, J.I.; Sant’Anna, F.B.; Scott, F.B. Frequência de nematoides intestinais de equinos oriundos de apreensão, no estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 10 (1): 37-40, 2001.
- Martins, I.V.F.; Verocai, G.G.; Correia, T.R.; Melo, M.P.S.R.; Pereira, M.J.S.; Scott, F.B.; Grisi, L. Survey on control and management practices of equine helminthes infection. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 29(3):253-257, 2009.
- Molento, B.M. Resistência parasitária em helmintos de equídeos e propostas de manejo. *Ciência Rural*. 35(6): 1469-1477, 2005.
- Nascimento, A.G.C.R.; Marchesan, A.L.; Xavier, B.L.S.; Fausto, R.F.; Almeida, K.M.; Sato, M.O. Ocorrência de nematoides em equídeos na Região Norte do Estado de Tocantis, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 17(1): 178-181, 2008.
- Nielsen, M.K., Monrad, J., Olsen, S.N. Prescription-only anthelmintics – A questionnaire survey on strategies for surveillance and control of equine strongyles in Denmark. *Veterinary Parasitology*. 135:47–55. 2006.
- Nielsen, M.K., Peterson, D.S., Monrad, J., Thamsborg, S.T., Olsen, S.N., Kaplan, R.M. Detection and semi-quantification of *Strongylus*

vulgaris DNA in equine faeces by real-time PCR. *International Journal Parasitology*. 38: 443–453, 2008.

Noel, M.L.; Scare, J.A.; Belaw, J.L.; Nielsen, M.K. Accuracy and precision of Mini-Flotac and McMaster techniques for determining equine strongyle egg counts. *Journal of Equine Veterinary Science*. 48: 182-187, 2017.

Piccoli, C.; Marques, S.M.T.; Appel, G.; Silveira, G.B.; Loos, D.E.; Mattos, M.J.T. Helmintos intestinais em cavalos de trabalho e de lazer de Porto Alegre/RS. 3(1): 56-64, 2015.

Proudman, C.; Mathews, J.; Control of Intestinal parasites in horses. *In Practice*. 20(2): 90-97, 2000. Roberts FHS; O’Sullivan P.J. Methods for egg and larval cultures for Strongyles infesting the gastro – intestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*. 1(1):99-102, 1050.

Rosa, H.F.M.; Garcia, A.M.; Daher, D.O.; Lima, I.G.; Félix, M.B.; Capellari, L.A.; Ferreira, F.; Rocha, C.M.B.M. Factors associated with the prevalence of helminths in Mangalarga Machador horses in southern of Minas Gerais, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 38 (6): 1097 – 1104, 2018.

Santos, D.W.; Madeira de Carvalho, L.M.; Molento, M.B. Identification of third stage larval types of cyathostomins of equids: an improved perspective. *Veterinary Parasitology*. 260: 49–52, 2018.

Sheather, A. L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technic. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*. 36: 266-275, 1923.