



AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA ABENZIMIDAZÓIS EM EQUINOS ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA FAMEZ

Giulia OrnellasFuzaro Scaléa¹, MarianaGreendeFreitas², Fernando de Almeida Borges³.

¹Graduanda em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – FAMEZ / UFMS. E-mail: giulia_scalea@hotmail.com

²Mestranda em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – FAMEZ / UFMS. E-mail: marigreenf@hotmail.com

³Professor Doutor da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – FAMEZ / UFMS. E-mail: fernando.borges@ufms.br

Resumo: A utilização de anti-parasitários de maneira supressiva resultou na seleção de helmintos cada vez mais resistentes. Este trabalho tem por objetivo avaliar a resistência anti-helmíntica a benzimidazóis dos equinos atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Uma das formas de diagnosticarmos a resistência são os testes *in vitro*, e para o seguinte trabalho utilizamos sete equinos, os quais foram coletados fezes para realizar o teste de eclodibilidade larval, que foi realizado com o tiabendazole nas concentrações de 0,5; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025; 0,01; 0,005; 0,002 e 0,001 µg/ml e mantidos por 24 horas a 27°C na estufa B.O.D. Foi realizada uma regressão não linear para calcular a concentração efetiva de 50% (CE50) e foi calculado também o fator de resistência de todos os isolados. Os animais 1, 2, 3, 4, 5, 6, e 7 apresentaram os seguintes valores de CE50: 0,002747; 0,005623; 0,02689; 0,02623; 0,007356; 0,01364; 0,02664, respectivamente. Frente a esses resultados obtidos, conclui-se que há presença de resistência a benzimidazóis nos equinos atendidos no hospital da FAMEZ.

Palavras-chave: ciatostomíneos; eclodibilidade; *in vitro*; verminose.

ASSESSMENT OF ANTIHELMINTIC RESISTANCE TO BENZIMIDAZOLIS IN EQUINE ATTENDED AT VETERINARY HOSPITAL OF FAMEZ

Abstract: The use of suppressive anti-parasitic agents resulted in the selection of increasingly resistant helminths. This work aims to evaluate the anthelmintic resistance to benzimidazoles of equines treated at the veterinary hospital of the Federal University of Mato Grosso do Sul. One of the ways to diagnose resistance is the *in vitro* tests, and for the following work we used seven equines, which were collected feces to perform the larval hatchability test, which was performed with thiabendazole at concentrations of 0.5; 0.3; 0.2; 0.1; 0.05; 0.025; 0.01; 0.005; 0.002 and 0.001 µg / ml and maintained for 24 hours at 27 ° C in the oven B.O.D. A nonlinear regression was performed to calculate the effective concentration of 50% (EC 50) and the resistance factor of all isolates was calculated. Animals 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 had the following EC 50 values: 0.002747; 0,005623; 0.02689; 0.02623; 0,007,356; 0.01364; 0.02664, respectively. With these results, it is concluded that there is presence of benzimidazole resistance in equines treated at FAMEZ hospital.

Keywords: cystostomies; hatchability; *in vitro*; verminose.

Introdução

A fauna parasitária de um equino pode ser constituída por diversos gêneros distintos, entretanto, o principal do trato gastrointestinal são os ciatostomíneos. Durante o ciclo de vida dos ciatostomíneos ocorre a síndrome da migração larval, correspondente ao momento quando as larvas encistadas na



mucosa emergem para o lúmen intestinal simultaneamente, este evento acarreta em danos como enterites, perda de peso, cólica, diarreia e muitas vezes o óbito (Cobb e Boeckh, 2009).

Existem dois grupos químicos que são frequentemente utilizados para o tratamento: os benzimidazóis e as lactonasmacrocíclicas. Os benzimidazóis foram lançados no mercado entre as décadas de 60 e 70, e foram os primeiros a possuírem ação ovicida, ou seja, agem contra todas as fases dos parasitas (Almeida & Ayres, 2011). As formas de controle mais utilizadas são, normalmente, supressivos que atingem seis tratamentos ao longo do ano (Honer&Bianchin, 1995). Tais tratamentos têm como consequência a seleção de parasitas resistentes e então, a aparição de resistência ao medicamento torna-se inevitável. É considerado como resistência quando doses de drogas que seriam letais para os parasitas de uma mesma espécie, são toleradas normalmente. Esta mutação é considerada uma característica genética (Stone, 1972).

A avaliação dessa resistência pode ser feita por testes *in vitro*, *in vivo* e moleculares. Para os benzimidazóis o teste *in vitro* de eclodibilidade larval é o mais bem padronizado e que pode ser utilizado a campo para equinos (Coles et al., 2006).

Este trabalho tem por objetivo avaliar a resistência anti-helmíntica abenzimidazóis em equinos atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (FAMEZ), utilizando para isso, o teste *in vitro* de eclodibilidade larval.

Material e Métodos

Seleção dos animais

Foram selecionados sete equinos que estavam internados no hospital veterinário da FAMEZ no período de 05 de julho de 2017 a 22 de outubro de 2017, todos procedentes de Campo Grande-MS. A princípio, as fezes foram coletadas diretamente da ampola retal do animal nomeadamente este de entrada na internação do hospital, e foram mantidas em temperatura ambiente e em anaerobiose, não excedendo três horas para o início do teste. Após a coleta, foi feita a contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) pela técnica de Mini Flotac, como descrita por Barde et al., 2013, e a coprocultura, como descrita por Roberts & O'Sullivan, 1950. Foram retirados os animais com o OPG baixo e dada continuidade com os demais.

Teste de eclodibilidade

Foi executada a recuperação de ovos como já descrita por Coles et al. (1992), modificado por Bizimenyera et al. (2006) e os testes de eclodibilidade larval (TEO) foram realizados segundo metodologia preconizada por Chagas et al. (2010). Para a utilização no teste, foi efetuada a diluição do tiabendazole P.A. (Sigma- Aldrich Brasil Ltda, São Paulo- SP) em dimetil sulfoxido (DMSO, Sigma) e em água destilada, nas concentrações de 0,5; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025; 0,01; 0,005; 0,002 e 0,001 µg/ml, respectivamente.

Foram depositados 10 µl em três poços de cada uma dessas concentrações, a placa de cultivo possui um total de 24 poços, ou seja, são necessárias duas placas para as concentrações e uma para o controle. Somados com o tiabendazole, foram depositados 900 µl de água destilada e 100 µl de ovos contendo em média 100 ovos. Já o controle foi executado com apenas três poços contendo 910 µl de água destilada e 100 µl de ovos contendo em média 100 ovos. Por último, as placas foram colocadas na estufa B.O.D (Biochemical Oxygen Demand, Tecnal®, TE 391) por 24 horas a 27°C. Após esse período, os ovos e larvas foram quantificados em microscópio invertido e registrados em fichas individuais. Foram considerados como resistentes os isolados que apresentaram eclodibilidade na concentração 0,1 µg/ml, segundo Coles et al., 2006.

Análise estatística

O percentual de eclodibilidade foi calculado de acordo com a fórmula descrita por Coles et al., 2006: $[(\text{número de larvas} / (\text{número de ovos} + \text{larvas}) \times 100)]$, a concentração efetiva de 50% (CE50) é o valor necessário para inviabilizar 50% dos ovos e foi calculada pela equação $Y = 100 / (1 + 10^{((\text{Log CE50} - X) * \text{Hill Slope}))}$ em que $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{Log CE50} - X) * \text{Hill Slope}))}$, respectivamente. Por fim, o fator de resistência que demonstra a intensidade da resistência de um determinado isolado foi calculado pela fórmula $\frac{\text{CE50 do isolado pesquisado}}{\text{CE50 do isolado sensível}}$. Para o isolado ser considerado sensível, essa divisão deve ser menor ou igual a um. Estas análises estatísticas foram realizadas empregando o programa GraphPad Prism®.



Foi utilizado um isolado sensível para o cálculo do fator de resistência com CE50 de 0,017, o mesmo foi coletado de um equino que se encontrava no hospital veterinário da FAMEZ durante esse período, e foi diagnosticado sensível através do teste de eclodibilidade larval obedecendo aos mesmos critérios dos isolados descritos.

Resultados e Discussão

No teste de eclodibilidade larval os animais 1, 4, 5, 6 e 7 apresentaram presença de larvas na concentração de 0,2 µg/mL e o animal 3 na concentração de 0,5 µg/mL, sendo considerados resistentes segundo Coles et al, (2006). Por fim, o animal 2 foi o único considerado sensível visto que a presença de larvas foi apenas na concentração de 0,05 µg/mL. Na avaliação dos resultados da coprocultura os Ciatostomíneos estão presentes em 90% ou mais do total das amostras. Os resultados da CE50, o fator de resistência e a eclodibilidade larval na concentração de 0,1 µg/mL estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. CE50, fator de resistência e eclodibilidade na concentração de 0,1 µg/mL dos sete equinos atendidos no Hospital Veterinário da FAMEZ em Campo Grande- MS.

Animal	CE50 (µg/mL)	Intervalo de confiança (95%)	Fator de Resistência	Eclodibilidade na concentração 0,1 µg/mL (%)
1	0,002747	0,002004 – 0,003765	0,16158824	2,31
2	0,005623	0,004114 – 0,007686	0,33076471	0,00
3	0,02689	0,02365 – 0,03056	15,8176471	7,49
4	0,02623	0,02433 – 0,02829	1,54294118	4,31
5	0,007356	0,005858 – 0,009236	0,43270588	11,39
6	0,01364	0,01230 – 0,01512	0,80235294	0,80
7	0,02664	0,02385 – 0,02844	1,56705882	7,08

Visto tais resultados no teste de eclodibilidade larval, foi percebido que os parasitas resistentes são encontrados nos animais atendidos no hospital veterinário da FAMEZ e de acordo com Kaplan et. al. 2004, essa resistência aos benzimidazóis está amplamente disseminada entre os nematódeos dos animais domésticos. Porém, se for avaliado apenas o percentual de eclodibilidade na concentração de 0,1 µg/mL somente o animal 2 seria considerado sensível, mas com o valor calculado do fator de resistência é percebido que os animais 1, 5, 6 também são considerados sensíveis, já que esse valor é menor que um.

É notável o elevado valor do fator de resistência do animal 3, sendo assim necessita de uma dose aproximadamente 15 vezes maior do que a normal para ter o efeito adequado, demonstrando a elevada resistência deste isolado encontrado no hospital veterinário da FAMEZ.

Conclusões

Com o presente estudo foi possível demonstrar que existe resistência dos ciatostomíneos benzimidazóis nos equinos atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

Literatura Citada

- ALMEIDA, M.A.O.; AYRES, M.C.C. Considerações gerais sobre os anti-helmínticos. In Spinosa, H.S.; Górnaiak, S.L.; Bernardi, M.M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 5. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 2011, cap.45, p. 517-530. COBB, R.; BOECKH, A. Moxidectin: a review of chesmitry, pharmacokinetics and use in horses. Parasites e Vectors. Suppl. 2: S5 doi:10.1186/1756-3305-2-S2-S5, 2009.
- COLES, C. G., BAUER, C., BORGSTEEDE, F. H. M., GEERTS, S., KLEI, T. R., Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Veterinary Parasitology, 44, 35-44.



- HONER, M. R.; BIANCHIN, I. Verminose equina: sugestões para um melhor controle em animais de fazenda. Comunicado Técnico, n. 28, 4 p. EMBRAPA – CNPGC. Campo Grande, 1995. Disponível em: <http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/cot/COT28.html>
- KAPLAN, R. M.; KLEI, T. K.; LYONS, E. T.; Prevalence of anthelmintic resistant ciathostomes on horse farms. J. Am. Vet. Med. Assoc. v. 225, p. 903-910, 2009.
- STONE, B.F. The genetics of resistance by ticks to acaricides. Australian Veterinary Journal. v. 48, p. 345-350, 1972.