

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RICARDO JOSÉ CANEVER

**DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA ANTI-  
HELMÍNTICA EM CÍATOSTOMINEOS DE EQUINOS  
POR MEIO DE TESTES IN VIVO E IN VITRO.**

CURITIBA

2012

RICARDO JOSE CANEVER

**DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM CIÁTOSTOMINEOS  
DE EQUINOS POR MEIO DE TESTES IN VIVO E IN VITRO.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre, em Ciências  
Veterinárias, Programa de Pós-graduação em  
Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias,  
Área de Concentração: Medicina Veterinária  
Preventiva. Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Marcelo Beltrão Molento.

CURITIBA

2012

Canever, Ricardo José

Diagnóstico da resistência anti-helmíntica em ciatostomíneos de equinos por meio de testes in vivo e in vitro / Ricardo José Canever. Curitiba – 2012

Orientador : Marcelo Beltrão Molento

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2012.

1. Histórico ciatostomíneos; 2. Resistência anti-helmíntica em ciatostomíneos nos estados do Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais; 3 Avaliação do teste de inibição da migração em ágar com larvas de ciatostomíneos utilizando ivermectina, moxidectina, pirantel e albendazol; 4. Análise molecular do polimorfismo dos alelos 167 e 200 do gene  $\beta$ -tubulina em adultos e larvas de ciatostomíneos.

I.Molento, Marcelo Beltrão. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

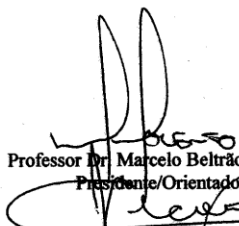
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

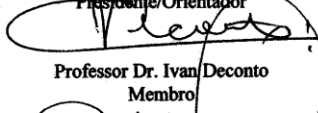


**PARECER**

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “**DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM CIÁTOSTOMINEOS DE EQUINOS POR MEIO DE TESTES IN VIVO E IN VITRO**” apresentada pelo Mestrando RICARDO JOSÉ CANEVER declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou o candidato APTO para receber o título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 23 de Março de 2012

  
Professor Dr. Marcelo Beltrão Molento  
Presidente/Orientador

  
Professor Dr. Ivan Deconto  
Membro

  
Professor Dr. Luis Antônio Sangioni  
Membro

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



Ata da Defesa de Dissertação do Candidato ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, RICARDO JOSÉ CANEVER área Ciências Veterinárias, do PPGCV realizada em 23.03.2012.

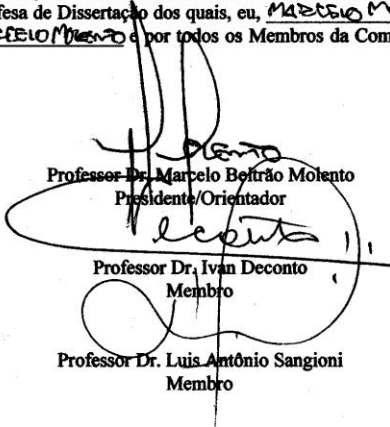
Aos vinte e três de março do ano de dois mil e doze, no Anfiteatro do Hospital Veterinário do Setor de Ciências Agrárias da UFPR, reuniu-se a Comissão Examinadora constituída pelos seguintes membros Professor Dr. Marcelo Beltrão Molento, Professor Dr. Ivan Deconto e Professor Dr. Luis Antônio Sangioni, com a finalidade de arguir o mestrando RICARDO JOSÉ CANEVER candidato ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, área Ciências Veterinárias, que ofereceu para análise da Comissão a Dissertação intitulada "DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM CIÁTOSTOMINEOS DE EQUINOS POR MEIO DE TESTES IN VIVO E IN VITRO". Abertos os trabalhos o candidato, cumprindo determinação regimental, fez uma breve exposição oral a respeito de sua Dissertação. Terminada a exposição, o Presidente Professor Marcelo Beltrão Molento declarou aberta a arguição do candidato pelos membros da banca, finalizada pelo próprio Presidente. Concluída a arguição, a Comissão Examinadora reuniu-se para avaliar o Candidato. A Comissão Examinadora considerou que a Dissertação .....

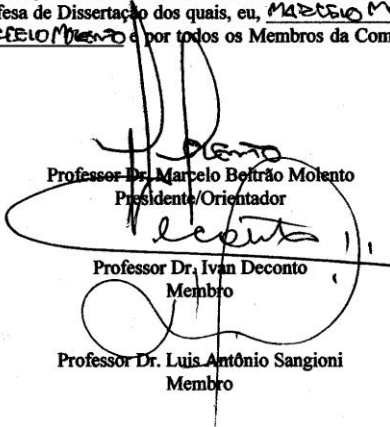
APROVADA

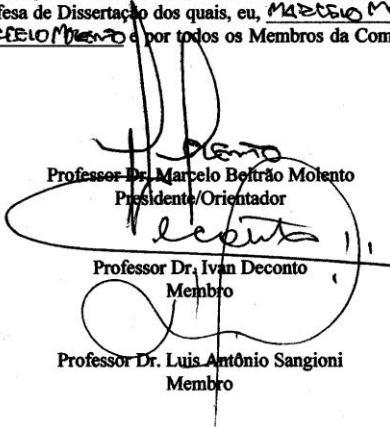
Quanto à apresentação do Candidato durante a Defesa, a Comissão Examinadora.....

APROVADO

Reabertos os trabalhos, de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE, o candidato foi considerado APROVADO para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Ciências Veterinárias, encerrando os trabalhos da Defesa de Dissertação dos quais, eu, MARCELO MOLENTO, lavrei a presente Ata que vai por mim assinada MARCELO MOLENTO e por todos os Membros da Comissão Examinadora. Curitiba, 23 de março de 2012.

  
Professor Dr. Marcelo Beltrão Molento  
Presidente/Orientador

  
Professor Dr. Ivan Deconto  
Membro

  
Professor Dr. Luis Antônio Sangioni  
Membro

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente ao professor Marcelo Molento, pelo apoio e incentivo em iniciar e continuar na vida acadêmica. Obrigado pelos ensinamentos, que se iniciaram ainda na graduação e continuou ao longo destes anos de trabalho. Obrigado pela confiança depositada e orientação profissional compartilhada nesta etapa de minha vida profissional. Espero que possamos continuar a trabalhar juntos em busca de novos desafios.

Ao professor e grande mestre Ivan Deconto, obrigado pelos ensinamentos e experiências compartilhadas ao longo destes dois anos de convívio, pela ajuda e disposição dada na execução deste projeto de pesquisa.

Ao professor Ivan Barros pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados, pela disposição em sempre estar aberto para conversar e discutir quando necessário.

Ao professor Peterson Triches, pelo apoio concedido no mestrado, e pelos ensinamentos compartilhados.

Ao professor Alexander Biondo, pelas conversas, orientações e ensinamentos ao longo destes dois anos de mestrado.

Ao professor Geraldo Alberton, pelo apoio e incentivo desde as aulas de seminários.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e me deram forças para lutar e correr atrás dos desafios. obrigado pelo incentivo, amor e carinho.

À minha esposa Lidiane, que sempre esteve comigo me apoiando e batalhando junto. Obrigado pela compreensão e principalmente pelo companherismo, você sabe o quanto foi fundamental para me ajudar a enfrentar todos os desafios.

As minhas irmãs, pelo apoio e incentivo que sempre me deram, me estimulando a buscar os desafios e lutar por eles.

Às minhas amigas de aula e laboratório, Daniele Bier e Fernanda Fortes, obrigado pela ajuda na execução do meu projeto, pelas conversas e conselhos, o apoio de vocês foi fundamental nesta jornada. Espero poder compartilhar novos desafios junto com vocês.

Aos amigos de laboratório, Fernando Kloster, Andressa Salvadori, Andrea Buzzati, Lew Kan, pela ajuda concedida na execução dos trabalhos e testes, assim como a troca de conhecimentos e experiências. Não esquecendo do companheirismo, das boas conversas e risadas que tivemos ao longo destes dois anos.

A amiga e técnica de laboratório Úrsula Yoshitani pelo apoio e ajuda concedida sempre que precisei na execução dos trabalhos e testes. Obrigado pela grande disposição que sempre teve comigo.

À Pfizer Saúde Animal (antiga Fort Dodge), pelo apoio financeiro, e em especial aos funcionários que auxiliaram na execução dos testes e envio das amostras, Carolina, Pollyana, Juliana. O auxílio de vocês foi fundamental para alcançar os resultados atingidos.

À todos os professores, funcionários da UFPR, alunos e colegas, que direta ou indiretamente, colaboraram neste projeto e no mestrado, meus sinceros agradecimentos.

Ao CNPq e CAPES, pelo incentivo ao programa de pós-graduação e a pesquisa, e apoio financeiro.

## RESUMO

As doenças parasitárias causadas por nematóides é motivo de grande preocupação nas produções animais. Ciatostomíneos, são atualmente os principais nematóides de equinos, com uma alta prevalência na grande maioria dos animais parasitados. O uso excessivo de medicamentos levou a uma situação onde a resistência anti-helmíntica está amplamente disseminada para algumas drogas em várias regiões. Métodos diagnósticos para detecção precoce da resistência são fundamentais para ajudar no manejo terapêutico racional e preservação da eficácia das drogas que ainda possuem. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia das principais drogas utilizadas atualmente em equinos e a resistência parasitária contra estes compostos. Para isto, foram realizados testes in vivo de redução na contagem de ovos nas fezes, e testes in vitro de inibição da migração larval e moleculares de reação em cadeia de polimerase e sequenciamento foram realizados com larvas de terceiro estágio (L3) obtidas por coprocultura de amostras de fezes de cavalos e ciatostomíneos adultos. Os resultados dos testes in vivo mostraram baixa eficácia do fenbendazol, com resistência presente em 100% dos haras testados, resistência ao pirantel foi encontrada em 5/11 haras testados, e resistência à ivermectina foi encontrada em apenas 1/11 haras. Os resultados dos testes in vitro de inibição da migração larvar mostraram boa aplicabilidade para detecção da resistência contra lactonas macrocíclicas e pirantel, porém baixa sensibilidade para os benzimidazóis. Os testes moleculares mostraram a presença de alelos condizentes para a resistência parasitária, principalmente para o códon 167 do gene Beta-tubulina, porém com uma baixa frequência de ocorrência. O monitoramento e a detecção da resistência são importantes ferramentas para um correto manejo de controle parasitário, e o presente estudo mostrou informações importantes que podem auxiliar no diagnóstico e correto manejo da resistência.

Palavras chave: Ciatostomíneos, resistência anti-helmíntica, drogas, equinos.



## ABSTRACT

Parasitic diseases caused by nematodes is a major concern in animal production. Cyathostomins also known as small strongyles, are currently the main horse's nematodes, with a high prevalence in the most horses parasited. The overuse of drugs led to a situation where anthelmintic resistance is widely dispersed regions. Currently, the thinking reflects on new methods of parasite control, and less use of anthelmintics, in order to delay the selection for anthelmintic resistance. Diagnostic methods for early detection of resistance are essential to help in the management therapeutic and preservation of the efficacy of the few drugs that still have. The objective of this study was to evaluate the efficacy of the main drugs used currently in horses and the parasite resistance against these compounds. For this, in vivo tests of fecal egg count reduction and vitro tests of larval migration inhibition and molecular polymerase chain reaction and sequencing were performed with third stage larvae (L3) obtained from stool of fecal samples and adults cyathostomum sp. The results of in vivo tests showed fenbendazole resistance in 100% of farms, pyrantel resistance in 5/11 of horse farms and ivermectin resistance was found only in 1/11 farm. The results of larvae inhibition tests showed great applicability to detection of resistance to the macrocyclic lactones and pyrantel, but low sensitivity to the benzimidazole. Molecular tests showed the presence of alleles suitable for parasite resistance, especially for the codon 167 of beta-tubulin gene, but with a low frequency of occurrence. The monitoring and detection of resistance are important tools for correct parasite control management, and this study showed important information that may assist in diagnosis and correct resistance management.

Keywords: Cyathostomins, anthelmintic resistance, drugs, horses.



## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – Eficácia e limite de confiança inferior de fenbendazole, pirantel, ivermectina e moxidectina contra helmintos de equinos em 11 haras de 4 estados brasileiros.....54
- TABELA 2 – Prevalência de ciatostomíneos pré e pós-tratamento obtidos por coprocultura em 11 haras de 4 estados brasileiros.....55
- TABELA 3 –  $DL_{50}$  (valores expressos em nmol) e  $R^2$  do albendazol, pirantel, ivermectina e moxidectina das amostras de larvas testadas..... 73
- TABELA 4 - Genotipagem encontrada no códon 167 e 200 do gene beta-tubulina isotipo 1 em amostras de formas adultas de ciatostomíneos de equinos.....92
- TABELA 5 - Genotipagem encontrada nas amostras de pools de larvas de ciatostomíneos no códon 167 e 200 do gene  $\beta$ -tubulina isotipo 1.....93

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CAP. 1 – REVISÃO DE LITERATURA : CIATOSTOMÍNEOS.....</b>	<b>14</b>
1.1	Introdução.....	14
1.2	Morfologia, ciclo evolutivo e epidemiologia.....	14
1.3	Patogenia.....	16
1.4	Tratamento.....	17
1.5	Controle de ciatostomíneos.....	18
1.5.1	Antiparasitários: histórico.....	18
1.5.2	Formas de Controle dos helmintos.....	23
1.5.3	Desenvolvimento da resistência anti-helmíntica.....	24
1.6	Perspectiva de desenvolvimento de produtos para helmintos.....	26
1.7	Estatégias de controle evitando a resistência em helmintos.....	28
1.8	Perspectivas.....	28
1.9	Referências.....	29
<b>2.</b>	<b>CAP. 2 – AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE FENBENDAZOL, PIRANTEL, IVERMECTINA E MOXIDECTINA CONTRA CIATOSTOMÍNEOS DE EQUINOS EM HARAS NOS ESTADOS DO PARANÁ, SÃO PAULO, RIO DE JANEIRO E MINAS GERAIS.....</b>	<b>35</b>
2.1	Introdução.....	37
2.2	Material e métodos.....	40
2.2.1	Localização e descrição dos testes.....	40
2.2.2	Questionário sobre manejo sanitário.....	41
2.2.3	Análise estatística .....	41
2.3	Resultados.....	42
2.4	Discussão.....	43
2.5	Conclusão.....	48
2.6	Referências.....	49
<b>3.</b>	<b>CAP. 3 - AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR DE CIATOSTOMÍNEOS EM ÁGAR UTILIZANDO IVERMECTINA, MOXIDECTINA, PIRANTEL E ALBENDAZOL.....</b>	<b>56</b>
3.1	Introdução.....	58

3.2	Material e métodos.....	60
3.2.1	Amostras utilizadas e padronização do teste.....	60
3.2.2	Análise Estatística.....	62
3.3	Resultados.....	63
3.4	Discussão.....	63
3.5	Conclusão.....	66
3.6	Referências.....	67
<b>4.</b>	<b>CAP.4 - ANÁLISE MOLECULAR DO POLIMORFISMO DOS ALELOS 167 E 200 DO GENE B-TUBULINA EM ADULTOS E LARVAS DE CIATOSTOMÍNEOS.....</b>	<b>74</b>
4.1	Introdução.....	76
4.2	Material e métodos.....	80
4.2.1	Amostras.....	80
4.2.2	Extração de DNA.....	80
4.2.3	Testes e Análises Moleculares.....	81
4.3	Resultados.....	82
4.4	Discussão.....	82
4.5	Conclusão.....	86
4.6	Referências.....	88
5.	Conclusões gerais.....	94
6.	Anexos.....	95

## 1. REVISÃO DE LITERATURA: CIATOSTOMÍNEOS (CYATHOSTOMUM SP.)

### 1.1 Introdução

Infecções parasitárias determinam importantes perdas econômicas na criação de equídeos tanto diretamente em animais que desenvolvem a doença de forma clínica como indiretamente por perda de condição física e performance (Barret et al., 2004). As formas de criação dos equídeos favorecem a grande incidência de infecções parasitárias, já nas primeiras semanas de vida (Molento, 2005). A fauna parasitária é vasta e compreendem várias famílias e/ou gêneros distintas, sendo os estrôngilos os principais parasitas patógenos de equinos (Urquharth et al, 2007).

### 1.2 Morfologia, ciclo evolutivo e epidemiologia

Os estrôngilos como um grupo compreendem quase a metade dos mais de 100 parasitos internos dos equinos (Krecek et al., 1987). Vivem a fase adulta do ciclo de vida no lúmen intestinal e são comumente categorizados em pequenos e grandes estrôngilos (Lyons et al., 1999). Os grandes estrôngilos compreendem os gêneros *Strongylus*, *Craterostomum*, *Oesophagodontus*, *Triodontophorus* e *Bidentostomum* (Lichtenfels et al., 1998). Os mais patogênicos são do gênero *Strongylus*, especialmente *S. vulgaris*, com grande potencial de lesões durante a fase de migração em seu ciclo de vida, especialmente em vasos mesentéricos, causando graves alterações, resultando em cólicas e dor aguda.

Os parasitos adultos apresentam dimorfismo sexual (Fig. 1), possuem tamanho de 4 a 26 mm, os ovos possuem tamanho médio de 50x90 µm e as larvas infectantes possuem oito células intestinais com formato triangular (Fig. 2) (Lichtenfels et al., 1998).

Os ciatostomíneos possuem ciclo de vida direto, sem hospedeiro intermediário (Fig. 3). Os animais se infectam após ingestão de larva de terceiro estágio (L<sub>3</sub>), que alcançam o intestino, local onde vão completar o seu desenvolvimento, com capacidade de encistar na mucosa e submucosa intestinal, e num rápido ciclo de vida, evoluem para L4 e L5, emergindo para o lúmen intestinal, passando pelas fases de jovem imaturo, e chegando a fase de adulto, começando a produzir ovos que serão eliminados pelas fezes para a pastagem dentro de 5 a 6 semanas após infecção. No ambiente, os ovos morulados desenvolvem a larva L1, que vai eclodir do ovo e evoluir de L1 até L3 no ambiente, cuja taxa de desenvolvimento é diretamente influenciada pela temperatura. Em climas quentes com média acima de 18°C, o ovo pode eclodir e produzir a L3 em 3 dias, aumentando este período durante climas mais frios. A larva L3 pode sobreviver em condições frias, podendo permanecer no ambiente por longos períodos (Corning, 2009). Em condições de clima tropical, região sudeste do Brasil, foi observado a sobrevivência de L<sub>3</sub> por períodos de até 15 semanas nas fezes e 12 semanas na gramínea durante o período seco e de 9 semanas nas fezes e 8 semanas no pasto durante o período chuvoso (Couto et al., 2009). Temperaturas mais elevadas também são responsáveis por um menor período de sobrevivência de L<sub>3</sub> por aumentar seu metabolismo e acelerar a depleção das reservas energéticas. Após a ingestão, a larva infectante desembainha e invade a mucosa do intestino grosso. Quando penetra na mucosa, a larva se protege tornando-se encistada (Fig. 4). Mais de 90% dos ciatostomíneos encistados podem tornar-se inibidos no estágio L3 de desenvolvimento, e podem ficar na parede intestinal por períodos de 4 meses até 2 anos (Proudman e Matthews, 2000).

Atualmente, a prevalência de *Strongylus spp* em cavalos reduziu muito, isto se deve ao fato do intenso controle com anti-helmíntico iniciado na década de 60. O grupo de pequenos estrôngilos (Cyathostominae), é composto por 51 espécies que podem parasitar os equinos, distribuídos em 13 grupos: *Cyathostomum*, *Coronocylus*, *Cylicodontophorus*, *Cylicocyclos*,

*Cylicostephanus*, *Skrjabinodentus*, *Tridentoinfudinbulum*, *Petrovinema*, *Poteriostomum*, *Parapoteriostomum*, *Hsiungia*, *Cylindropharynx* e *Caballonema* (Lichtenfels et al., 1998). No entanto, 10 espécies estão mais comumente presentes nos cavalos parasitados, sendo elas; *Cylicostephanus longibursatus*, *Cyathostomum catinatum*, *Cylicostephanus goldi*, *Cylicocyclus nassatus*, *Cyathostomum coronatum*, *Cylicostephanus calicatus*, *Cylicostephanus minutus*, *Cylicocyclus leptostomus*, *Cyathostomum pateratum* e *Cylicocyclus insigne* (Reinemeyer et al., 1984; Lyons et al. 1996).

No Brasil, Anjos e Rodrigues (2006) identificaram 21 espécies de ciatostomíneos recuperados de 33 cavalos necropsiados oriundos da região metropolitana do Rio de Janeiro. Destes, os 10 mais prevalentes foram: *Cyathostomum tetracanthum*, *Cylicocyclus nassatus*, *Cylicostephanus minutus*, *Cylicostephanus longibursatus*, *Cylicocyclus leptostomus*, *Cylicostephanus calicatus*, *Cylicostephanus goldi*, *Cyathostomum pateratum*, *Coronocyclus labiatus* e *Coronocyclus coronatus*, todos com prevalência acima de 45%. Os ciatostomíneos possuem distribuição mundial e afetam animais de todas as idades (Corning, 2009).

### **1.3 Patogenia**

Grande número de parasitas adultos podem causar sinais como letargia, perda de peso, debilidade e diarreia (Corning, 2009). O dano mais grave que pode ocorrer no hospedeiro durante o ciclo de vida dos ciatostomíneos, é quando milhares de larvas encistadas emergem para o lúmen intestinal simultaneamente, sendo conhecido como síndrome de migração larval, causando uma enteropatia inflamatória significativa no ceco e cólon, resultando em enterite catarral e hemorrágica, perda de peso, diarreia e cólica, podendo muitas vezes levar o animal ao óbito (Cobb e Boeckh, 2009). Normalmente potros e animais jovens apresentam maiores índices de sintomatologia. Em infecções leves, os animais podem não apresentar sinais



clínicos característicos, convivendo com uma baixa carga parasitária. Colite granulomatosa também tem sido descrita associada a larvas de pequenos estrôngilos (Love et al., 1999).

#### **1.4 Tratamento**

A maioria dos criadores de cavalos possui um elevado nível de preocupação sobre o impacto dos helmintos na saúde eqüina (Kaplan, 2002), e esta preocupação geralmente resulta em um pensamento de controle total, “estado não parasitado”, no qual o objetivo é tratar com frequência suficiente para manter a carga parasitária e a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) próximo de zero (Kaplan, 2002). A forma de controle adotado na maioria dos haras utiliza exclusivamente os compostos antiparasitários, usados geralmente de forma supressiva, em intervalos curtos entre tratamentos, de forma estratégica, com tratamento regulado com a época do ano e o aumento do número de parasitas no animal, ou curativo, onde o tratamento é utilizado quando o animal apresenta alta contagem de ovos nas fezes ou sinais clínicos (Sangster et al., 2002).

Dentre os compostos disponíveis, existem três grupos químicos distintos que são os mais utilizados: os benzimidazóis, as pirimidinas, e as lactonas macrocíclicas. Sabe-se também que a alternância entre os grupos químicos descritos acima é frequente, ocorrendo muitas vezes ao ano (Traversa, 2008).

A disseminação de populações de nematóides resistentes aos parasiticidas tornou-se uma séria ameaça para a saúde e produção animal em vários países. Muitos nematóides de importância veterinária têm características genéticas que favorecem o desenvolvimento da resistência anti-helmíntica (Hodgkinson et al, 2008).

A taxa de desenvolvimento de resistência é determinada pela pressão de seleção e na medida em que os organismos sobreviventes ao tratamento passem seus genes para a próxima geração. Com a continuação da seleção e reprodução dos parasitas resistentes, a frequência de genes de resistência na população aumenta até o ponto em que o tratamento falhará (Sangster, 1999). Assim, há uma forte necessidade de desenvolver formas de diagnóstico mais precoces assim como novas abordagens para o controle de parasitas, com o objetivo de retardar o desenvolvimento de resistência e melhorar a qualidade de vida dos animais.

## **1.5 Controle de ciatostomíneos**

### **1.5.1 Antiparasitários: Histórico**

A primeira citação sobre a utilização de um anti-helmíntico foi identificado no papiro de Ebers, datado, provavelmente, de 1550 a.C., em que se descrevia o uso da infusão da casca de romeira, *Punica granatum*, para o tratamento do *helu*, helmintose comum no antigo Egito. Antes do desenvolvimento dos compostos orgânicos sintéticos, foram utilizadas no tratamento de helmintoses substâncias naturais como o óleo de chenopodium, santonina e papaína. Um dos primeiros anti-helmínticos utilizados foi o sulfato de cobre, em 1881, e mais tarde, em 1926, o tetracloreto de carbono, para o tratamento de *Fasciola hepatica* (Almeida e Aires, 2002).

No início do século XX começaram os primeiros testes e relatos de uso de anti-helmínticos. O óleo de chenopodium era recomendado por Thum em 1915 e Woolridge em 1916 para o tratamento de verminoses em equinos (Hall, 1918). O dissulfeto de carbono foi usado por Hall (1917) em um teste chamado mais tarde de teste crítico (Hall et al. 1918, 1919, Hall e Foster, 1918), e foi altamente eficaz contra larvas de *Gasterophilus sp.* O teste crítico tornou-se um método confiável de avaliação da atividade de um composto contra diversos

parasitos, especialmente em equinos. Neste teste é realizado o tratamento de um grupo de animais e após um curto período se avalia a presença de parasitos nas fezes dos animais e então é realizado a eutanásia e necropsia parasitológica dos mesmos. Os parasitos encontrados são identificados e contados para que se calcule o percentual de eficácia do composto, sendo o animal infectado o seu próprio controle. Porém este teste é pouco realizado devido à necessidade da eutanásia dos animais e raramente é realizado, sendo inviável em centros de criações de equinos.

Pela avaliação de testes críticos, Hall et al. (1918) relatou a excelente atividade do óleo de *Chenopodium* na remoção de strongilídeos de equinos. Este óleo foi destilado a partir de sementes ou parte de folhas de *Chenopodium anthelminticum*, comumente chamado de carvalho de Jerusalém (Hall e Foster, 1918). Floyd Sager (1980) relatou que muito embora o óleo de *Chenopodium* tenha sido um dos primeiros medicamentos utilizados para o tratamento de parasitos em cavalos, ele descreveu a droga como a causa de graves efeitos colaterais, como perda de peso, anorexia e adipsia durante 3 ou 4 dias após o tratamento.

Cerca de 25 produtos tornaram-se comercialmente disponíveis para o controle de parasitas internos de equinos até a década de 1990 (Drudge et al., 1981; Lyons et al., 1990) pertencentes a somente seis classes de compostos. Depois do dissulfeto de carbono que foi comercializado no início do século passado para controle de larvas de *Gasterophilus* sp. e ascarídeos, nenhum novo composto antiparasitário esteve disponível comercialmente até os anos 40.

Começando com os fenotiazínicos na década de 40' até a década de 80', novas classes de antiparasitários foram lançadas no mercado a cada 10 anos em média, incluindo as piperazinas em 1950, benzimidazóis nas décadas de 60' e 70', os organofosforados em 1960

(Triclorfom) e 1970 (diclorvós), levamisole e pirantel na década de 70' e as lactonas macrocíclicas nas décadas de 80' (ivermectina) e 90' (moxidectina).

A fenotiazina foi a droga mais comumente utilizada para o controle de strongilídeos em equinos entre 1940 e 1960 (Habermann et al. 1941; Gibson, 1953). Um segundo esquema de tratamento foi a administração de fenotiazina em baixo nível na alimentação (Dimock, 1949, Todd et al., 1950). A droga era administrada sobre a ração diariamente nos primeiros 21 dias de cada mês. Animais jovens e desmamados recebiam 1 g e os cavalos adultos 2 g/dia. O sistema de baixo nível diário, não removia infecções de strongilídeos, mas chegava a bloquear ou reduzir a transmissão, afetando a reprodução destes nematódeos. Este método de controle de strongilídeos só foi utilizado por cerca de 10 anos, entre 1940 e 1950.

Piperazinas foram os primeiros compostos a serem eficazes contra diferentes grupos de nematóides. A atividade foi encontrada contra ascarídeos, strongilídeos e *Oxyuris equi*. Entretanto, apesar da remoção de pequenos strongilídeos ser excelente, a atividade em grandes strongilídeos era baixa. Geralmente, as piperazinas eram utilizadas em uma mistura com outros compostos de maior espectro de ação. Uma mistura de piperazina e dissulfeto de carbono foi o primeiro composto parasiticida de amplo espectro para cavalos, fornecendo assim, atividade contra larvas de *Gasterophilus sp.*, ascarídeos, strongilídeos e *O. equi* (Lyons et al., 1999). Mais tarde, fenotiazina foi adicionado à mistura para aumentar a atividade contra strongilídeos, principalmente grandes estrôngilos. Esta mistura permitiu reduzir a dose dos fenotiazínicos e, portanto, reduzir o risco de intoxicação, proporcionando excelente remoção de pequenos strongilídeos resistentes a fenotiazina (Drudge, 1962).

O primeiro organofosforado comercializado foi o triclorfon, com atividade sobre *Gasterophilus sp.*, ascarídeos e *O. equi*, mas não contra strongilídeos. Para aumentar o espectro de ação deste medicamento, era misturado com fenotiazínicos, piperazina,

mebendazol, oxfendazol, e tiabendazol. Porém a margem de segurança de triclorfom era estreita, causando episódios de cólicas. Dichlorvós foi o segundo organofosforado, usado em equinos na forma peletizada. Esta formulação foi altamente ativa contra pequenos strongilídeos, incluindo as espécies resistentes ao benzimidazol, exemplo: *Gasterophilus* sp., ascarídeos, grandes strongylus e *Oxyurus* (Lyons et al. 1999).

No início da década 60', o tiabendazol foi o primeiro anti-helmíntico da classe dos benzimidazóis a ser desenvolvido (Drudge et al., 1963). Mais tarde, outros, incluindo cambendazol, fenbendazole, mebendazol, oxfendazol e oxibendazole, foram introduzidos no mercado. Na época, foram os compostos com maior atividade sobre nematóides disponíveis em um único produto. Em geral, sua atividade, além da excelente remoção dos principais nematóides, foi desejável por causa da baixa dosagem, baixa toxicidade, e adaptabilidade para diferentes formulações e métodos de administração (Lyons et al., 1999). Os benzimidazóis ligam-se à tubulina do parasito, o que resulta na sua despolimerização e, conseqüentemente, alterações dos microtúbulos, interrompendo processos vitais para a função celular, como a divisão mitótica, transporte de nutrientes e alterações na forma da célula. Ainda atuam inibindo a enzima fumarato-redutase nas reações mitocondriais, interferindo no metabolismo energético do parasito (Ayres e Almeida, 2002).

As tetraidropirimidinas foram comercializadas a partir de 1966 para o tratamento de nematódeos de ovinos e posteriormente em outras espécies animais. Três sais de Pirantel (cloridrato, pamoato, tartarato), mostraram experimentalmente serem ativos contra nematóides de equinos. Tartarato de Pirantel foi relatado em 1968, para ser ativo contra ascarídeos, *S. vulgaris*, pequenos strongilídeos e *O. equi*, porém teve baixa eficácia contra *S. edentatus* (Cornwell e Jones, 1968). O tartarato de pirantel foi utilizado em baixas doses diárias formulado na ração, e foi possível uma redução na contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de strongilídeos em potros e cavalos jovens (Herd e Majewski, 1994). Neste

modo, tartarato de pirantel era ativo contra larvas infectantes recém-ingeridas de terceiro estágio de nematódeos, grandes strongylus adultos, ciatostomíneos, ascarídeos e *Oxyuris equi* (Valdez et al., 1995). São agonistas colinérgicos, e seu mecanismo de ação promovem uma despolarização excessiva da membrana pós-sináptica e, como consequência, hiperexcitabilidade e paralisia espástica dos parasitos (Almeida e Ayres, 2002) .

Em 1981, a ivermectina, primeiro composto da classe das lactonas macrocíclicas (LM) a ser usado em equinos, foi lançada no mercado como um anti-helmíntico com maior espectro de ação comercializado até então (Scröder e Swan, 1982; Campbell, 1989). A ivermectina é a droga mais utilizada em equinos até a atualidade e ainda mantém bons níveis de eficácia, embora alguns relatos de resistência tenham sido descritos nos últimos anos (Molento, 2008; Traversa, 2009). A ivermectina se manteve como a única droga desta classe usada em equinos até a introdução da moxidectina na década de 90. O grupo das LM's apresenta vários benefícios, como dose muito baixa, baixa toxicidade e atividade sobre artrópodes e nematóides. Ivermectina foi o primeiro composto, na dose terapêutica, a ser eficaz contra estágios parenterais de grandes strongilídeos. É altamente ativa na fase luminal de pequenos strongilídeos, mas essencialmente ineficaz, mesmo em dose cinco vezes maior, contra fases encistadas destes parasitas (Klei et al., 1993; Lyons et al., 1994).

Moxidectina é uma lactona macrocíclica de segunda geração, com atividade altamente eficaz sobre artrópodes e nematóides (Monahan et al., 1996). Este composto, na dose terapêutica é bastante eficaz sobre fases encistadas de pequenos strongilídeos. Assim, a contagem de OPG de strongilídeos fica baixa por um longo período pós-tratamento, podendo chegar a períodos de 12 até 22 semanas de OPG negativo. Isto se deve por eliminação dos nematódeos adultos e das larvas encistadas na mucosa (Demeulenaere et al., 1997; Dipietro et al., 1997). Comparando o efeito de moxidectina sobre o período de reaparecimento de ovos (PRO) nas fezes em relação com ivermectina, conforme relatado por Martin-Downum et al.

(2001), a OPG pós moxidectina permaneceu baixa por 112 dias, enquanto ivermectina apresentou contagem de OPG positivo logo após o 56º dia pós tratamento.

As LM's potencializam a ação inibidora neuronal no cordão nervoso ventral dos parasitos que é mediada pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), e sobre os canais de cloro, estimulam a liberação pré-sináptica deste neurotransmissor, pelo aumento de sua ligação aos receptores pós-sinápticos. Deste modo, o canal de cloro é aberto, aumentando a condução intracelular do neurotransmissor, hiperpolarizando o neurônio e resultando na paralisia motora do tipo flácida, eliminando o parasito (Ayres e Almeida, 2002).

### **1.5.2 Formas de Controle dos helmintos**

Em 1966, uma abordagem epidemiológica para controle de parasitos em conjunto com a disponibilidade de anti-helmínticos modernos, conduziram à recomendações para tratamento de cavalos a cada 6-8 semanas (Drudge e Lyons, 1966). Os benzimidazóis haviam entrado recentemente no mercado, e com estas drogas modernas, seguras e de amplo-espectro, uma nova abordagem poderia ser tomada. O sistema foi projetado principalmente para controlar *Strongylus sp.*, especialmente *S. vulgaris* devido a sua alta patogenicidade, com base no conhecimento sobre ciclo de vida e PRO, determinando assim o intervalo de tratamento. Drudge e Lyons (1966) utilizaram as melhores evidências científicas disponíveis no momento para sugerir um protocolo que envolvesse o tratamento de todos os animais a cada dois meses ao longo do ano. Foi considerada uma sólida abordagem para o tratamento de todos os cavalos em períodos fixo durante todo o ano para suprimir a eliminação de ovos e assim reduzir a transmissão do parasita ao mínimo.

Esses autores também sugeriram a rotação entre as classes de medicamentos para garantir que todos os grupos de parasitas fossem alvo no tratamento. Este programa tornou-se amplamente adotado e foi extremamente bem sucedido na redução da morbidade e mortalidade por doenças parasitárias (Kaplan, 2002). Veterinários de equinos que conviveram com a transição para a era moderna da eficácia dos compostos anti-helmínticos perceberam uma dramática redução de casos clínicos de cólica; uma vez que a aflição comum de cólica verminótica tornou-se um evento raro (Drudge e Lyons,1977). No início dos anos 80', foi reconhecido que *S. vulgaris* foi se tornando raro e ciatostomíneos frequentemente representavam praticamente 100% da produção de ovos de parasitas de equinos em pastejo (Herd et al.,1981).

Com o advento de novas classes de medicamentos, como pirimidinas (Pirantel) na década de 70' e avermectina/milbemicinas (ivermectina e moxidectina) na década de 80' e 90', mais classes de anti-helmíntico estavam disponíveis e foram incorporados ao sistema de tratamento e rotação. As drogas disponíveis possuíam amplo espectro, de modo que o efeito da rotação não foi mais para garantir um direcionamento a todos os grupos de parasitas, mas para prevenir a resistência anti-helmíntica (Uhlinger e Kristula, 1992).

### **1.5.3 Desenvolvimento da resistência anti-helmíntica**

A resistência é a capacidade de alguns parasitos de uma população de sobreviver aos tratamentos que são geralmente eficazes contra as mesmas espécies e estágios de infecção, ou seja, alguns indivíduos de uma população parasitária possuem genes que codificam para a resistência contra determinada droga mesmo no momento de sua introdução. Portanto, a resistência é herdada e o seu desenvolvimento primeiro exige que os genes de resistência estejam presentes, e que a expressão destes genes aumente na população por seleção genética



(Hodgkinson et al., 2008). A taxa de desenvolvimento de resistência é determinada pela pressão de seleção e o avanço da resistência ocorre quando estes indivíduos sobrevivem aos tratamentos e passam seus genes para as próximas gerações. (Molento, 2005).

Os primeiros relatos de resistência anti-helmíntica foram para a droga fenotiazina no final dos anos 50 e início dos 60, primeiro em *Haemonchus contortus*, parasita de ovinos (Drudge, 1957) e, em seguida, ciatostomíneos de equinos (Poynter e Hughes, 1958; Gibson, 1960; Drudge e Elam, 1961). A rápida aceitação e uso generalizado de tiabendazol e outros anti-helmínticos benzimidazóis marcou o início da agressão química moderna sobre os helmintos. No entanto, dentro de poucos anos, a resistência ao tiabendazol foi relatada, em *H. contortus* (Conway, 1964; Drudge, 1964) e depois em ciatostomíneos (Drudge e Lyons, 1965).

Curiosamente, ensaios clínicos realizados durante 1960 e 1961 em uma propriedade em Kentucky, Estados Unidos, demonstraram que indivíduos tiabendazol-resistentes já estavam presentes nesta população de ciatostomíneos quando o tiabendazol foi usado pela primeira vez nesta fazenda (Drudge et al., 1990). Esta observação foi confirmada quando, após apenas um ano de uso, a eficácia do tiabendazol nesta fazenda havia diminuído de mais de 95% para aproximadamente 35%. Uma vez que uma grande parte da população de ciatostomíneos já era resistente à fenotiazina devido ao longo uso desta droga, suspeitou-se que fenotiazina tenha pré-selecionado para a resistência aos benzimidazóis. Essa suspeita foi apoiada por evidências bioquímicas, que sugeriram que os mecanismos de ação da fenotiazina sobre helmintos ocorre por inibição dos microtúbulos, o mesmo mecanismo descrito para benzimidazóis (Rew e Fetterer, 1986).

Em seguida surgiram relatos de resistência aos benzimidazóis em outros nematóides de ovinos, *Ostertagia circumcincta* e *Trichostrongylus colubriformis*. Estes relatos levaram a

estudos que investigaram a prevalência da resistência, que constatou, em meados de 1970, várias espécies de nematóides resistentes aos benzimidazóis em ovinos e eqüinos em todo o mundo. Esse mesmo padrão se repetiu em 1970 e 1980 na sequência da introdução das novas classes anti-helmínticas, imidazotiazole, tetrahidropirimidina, avermectinas e milbemicinas. No início da década de 1980, foram relatados parasitos com resistência a múltiplas drogas (Prichard et al., 1980; Waller e Prichard, 1986).

Chapman *et al.* (1996) relataram pela primeira vez a ocorrência de resistência de ciatostomíneos frente ao benzimidazol, a piperazina e ao pamoato de pirantel. Young e colaboradores (1999) também determinaram a redução da eficácia do fenbendazole (32%), do pirantel (93%) e a alta eficácia da ivermectina (>99 %) contra ciatostomíneos.

Somente nos últimos anos a resistência à ivermectina foi descrita em eqüinos (Molento et al., 2008; Traversa et al., 2009), após quase três décadas de uso generalizado desta droga. Um dos principais motivos pela demora no desenvolvimento da resistência neste composto pode ser explicado pelo fato de que não possui ação sobre as larvas de quarto estágio encistadas na mucosa intestinal, sendo considerada uma grande população de refúgio (Kaplan, 2002). Moxidectina ainda possui alta eficácia contra pequenos estrôngilos, porém recentemente foi relatado uma redução da eficácia e possível resistência (Molento *et al.*, 2008).

## **1.6 Perspectiva de desenvolvimento de produtos para helmintos**

Com a dependência cada vez maior das lactonas macrocíclicas para o controle parasitário de nematóides de equinos, o avanço da resistência para esta classe é inevitável. Esta situação é preocupante pois ivermectina e moxidectina são as principais drogas utilizadas no controle parasitário em cavalos e quando a resistência a estas drogas tornar-se

generalizada, o impacto clínico da doença parasitária aumentará dramaticamente. Essa preocupação está baseada no fato de que os níveis de resistência pode aumentar rapidamente e não há anti-helmínticos atualmente sendo desenvolvidos para equinos (Kaplan, 2002).

Durante os últimos 20 anos, o rápido avanço da resistência anti-helmíntica tem levado as indústrias farmacêuticas veterinárias a investir na pesquisa e desenvolvimento de novos compostos anti-helmínticos. Dos compostos químicos que têm sido pesquisados desde o descobrimento das avermectinas e milbemicinas, o mais promissor é a classe dos ciclooctadepsipeptídeos, que começou a ser pesquisado nos anos 90, sendo o PF1022A o primeiro membro da classe, um composto natural originado do fungo *Mycelia sterilia*, e posteriormente, o emodepside, que é um composto semi-sintético derivado do PF1022A (Harder e von Samson-Himmelstjerna, 2002; Harder et al., 2003). Emodepside possui ação sobre nematóides gastrintestinais, parasitos pulmonares e microfilárias. Seu mecanismo de ação difere dos demais anti-helmínticos e é sugerido que a ação ocorra por inibição neuronal e de atividade muscular dos nematóides por aumentar a permeabilidade dos canais de potássio e cálcio ativado (Martin et al., 2011). Atualmente está disponível comercialmente para uso em cães e gatos (Procox® e Profender®).

Paraherquamide, um alcalóide oxindólico e os derivados do Amino Acetonitrilo (AAD) são outros compostos em pesquisa e têm demonstrado bons resultados de eficácia contra muitas espécies de nematóides em uma variedade de hospedeiros animais (Zinser, 2002). No entanto, no presente momento, nenhuma informação pública está disponível sobre os planos para o desenvolvimento dessas drogas, e não se sabe se um novo produto será comercializado para animais de produção num futuro previsível.

## **1.7 Estratégias de controle evitando a resistência em helmintos**

A classe dos Ciatostomíneos é atualmente o principal parasito de cavalos, devido a sua alta prevalência e resistência apresentada a grande maioria dos produtos antiparasitários disponíveis no mercado. Medidas inovadoras de controle parasitário precisam ser instituídas para que a resistência anti-helmíntica seja desacelerada, e as drogas que ainda possuem eficácia sejam preservadas por um período prolongado. Estratégias sustentáveis de controle devem ser aplicadas de maneira racional, e a participação de médicos veterinários no controle parasitário é de extrema importância, levando conhecimento epidemiológicos e de controle parasitário até os produtores, visando desta maneira reduzir a dependência e o uso de anti-helmínticos no controle parasitário.

## **1.8 Perspectivas**

Sinceros esforços devem ser feitos para preservar a eficácia das poucas drogas que permanecem eficazes. Agora e no futuro, vermífugos devem ser considerados como recursos altamente valiosos e limitados. A única estratégia realista para o controle parasitário sustentável é desenvolver novas abordagens não-químicas que visam diminuir a necessidade de tratamento e usar anti-helmínticos de uma forma mais racional. Muitas abordagens estão sendo pesquisadas (Coles e Molento, 2009), mas nenhuma delas é tão eficaz como a abordagem com drogas antiparasitárias. Portanto, mesmo com o uso de manejos alternativos, ainda será necessário drogas para a terapia de salvamento, quando outras medidas de controle falharem.

## REFERÊNCIAS

- 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**. 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 2002, cap.43, p. 459-466.
- AYRES, M.C.C.; ALMEIDA, M.A.O. Agentes antinematódeos. In: Spinosa, H.S.; Górnaiak, S.L.; Bernardi, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 2002, cap.45, p. 475-489.
- BARRET, E.J.; FARLAM, J.; PROUDMAN, C.J. Field trial of the efficacy of a combination of ivermectin and praziquantel in horses infected with roundworms and tapeworms. *Veterinary Record*. 184: 323-325, 2004.
- CAMPBELL W.C. Ivermectin and Abamectin, Springer, New York, 1989.
- CHAPMAN, M.R.; FRENCH, D.D.; MONAHAN, C.M.; KLEI, T.R. Identification and characterization of a pirantel pamoate resistant cyathostome population. *Veterinary Parasitology*. 66: 205-212, 1996.
- COBB, R.; BOECKH, A. Moxidectin: A review of chemistry, pharmacokinetics and use in horses. *Parasites & Vectors*. Suppl. 2: S5 doi: 10.1186/1756-3305-2-S2-S5, 2009.
- COLES, G.; MOLENTO, M.B. 2008. How do we slow the development of ML resistance in cyathostomins? *Proceeding International Equine Parasite Drug Resistance Workshop*. 1, 19.
- CONWAY, D.P. Variance in effectiveness of thiabendazole against *Haemonchus contortus* in sheep. *Am. J. Vet. Res.* 25, 844–845, 1964
- CORNWELL, R.L.; JONES, R.M. Field trials in horses with pyrantel tartrate. *Vet. Rec.* 82, 586–587, 1968.
- COUTO, M.C.M.; QUINELATO, S.; SOUZA, T.M.; SANTOS, C.N. BEVILAQUA, C.M.L.; ANJOS, D.H.S.; SAMPAIO, I.B.M.; RODRIGUES, M.L.A. Desenvolvimento e migração de larvas infectantes de ciatostomíneos (Nematoda: Cyathostominae) em gramínea coast cross (*Cynodon dactylon*) em clima tropical, na Baixada Fluminense, RJ, Brasil. *Ver. Bras. Parasitol. Vet.* v. 18, p. 31-37, 2009.
- DEMEULENAERE, D.; VERCRUYSSSE, J.; DORNY, P.; CLAEREBOUT, E. Comparative studies of ivermectin and moxidectin in the control of naturally acquired cyathostome infections in horses. *Veterinary Records*, v.141(15), p.383-386, 1997.
- DIMOCK, W.W.. The two-gram daily dose of phenothiazine for strongylosis of the horse. *Vet. Med.* 44,99–102, 1949.
- DIPIETRO, J.A.; HUTCHENS, D.E.; LOCK, T.F. Clinical trial of moxidectin oral gel in horses. *Veterinary Parasitology*, v.72, p.167–177, 1997.
- DRUDGE, J.H. Strain variation in the response of sheep nematodes to the action of phenothiazine: II. Studies on pure infections of *Haemonchus contortus*. *Am. J. Vet. Res.* 18, 317–325, 1957.
- DRUDGE, J.H.; ELAM, G. Preliminary observations on the resistance of horse strongyles to phenothiazine. *J. Parasitol.* 47, 38–39, 1961.
- DRUDGE, J.H. Horse parasites and their control. *Southwest. Vet.* 16, 31–35, 1962.

- DRUDGE J.H.; SZANTO J.; WYANT Z.N.; ELAM G. Critical tests of thiabendazole as an anthelmintic in the horse. *Am J Vet Res.* 24:1217–1222, 1963.
- DRUDGE, J.H. Field studies on parasite control in sheep: comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. *Am. J. Vet. Res.* 25, 1512–1518, 1964.
- DRUDGE J.H.; LYONS E.T. Newer developments in helminth control and *Strongylus vulgaris* research. Proc. 11 th Ann. Mtg. AAEP, Miami Beach, FL, p. 381-389, 1965.
- DRUDGE J.H.; LYONS E.T. Control of Internal Parasites of the Horse, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 148 378-383, 1966.
- DRUDGE J.H.; LYONS E.T. Methods in the evaluation of antiparasitic drugs in the horse, *Am. J. Vet. Res.* 38: 1581-1586, 1977.
- DRUDGE, J.H.; LYONS, E.T.; TOLLIVER, S.C. Parasite control in horses: a summary of contemporary drugs. *Vet. Med./Sm. Anim. Clin.* 76, 1479–1489, 1981.
- DRUDGE J.H.; LYONS E.T.; TOLLIVER S.C.; FALLON E.H. Phenothiazine in the origin of benzimidazole resistance in population-B equine strongyles, *Vet. Parasitol.* 35: 117-130, 1990.
- GIBSON, T.E. The effect of repeated anthelmintic treatment with phenothiazine on the faecal egg counts of housed horses, with some observations on the life cycle of *Trichonema* spp. in the horse. *J. Helminthol.* 27, 29–40, 1953.
- GIBSON, T.E. Some experiences with small daily doses of phenothiazine as a means of control of strongylid worms in the horse. *Vet. Rec.* 72, 37–41, 1960.
- HABERMANN, R.T., HARWOOD, P.D., HUNT, W.H. Critical tests with phenothiazine as an anthelmintic in horses. *N. Am. Vet.* 22, 85–92, 1941.
- HALL, M.C. Notes in regard to bots, *Gastrophilus* spp. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 52, 177–184, 1917.
- HALL, M.C.; FOSTER, W.D. Efficacy of some anthelmintics. *J. Agric. Res.* 12, 397–447, 1918.
- HALL, M.C.; WILSON, R.H.; WIGDOR, M. The anthelmintic treatment of equine intestinal strongylidosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 54 (new series 7), 47–55, 1918.
- HALL, M.C.; SMEAD, M.J.; WOLF, C.F. Studies on anthelmintics. II. The anthelmintic and insecticidal value of carbon bisulphide against gastro-intestinal parasites of the horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 55 (new series 8), 543–549, 1919.
- HARDER, A.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Cyclooctadepsipeptides – a new class of anthelmintically active compounds. *Parasitol. Res.* 88, 481–488, 2002.
- HARDER, A. Cyclooctadepsipeptides – an anthelmintically active class of compounds exhibiting a novel mode of action. *Int. J. Antimicrob. Agents* 22, 318–331, 2003.
- HERD R.P.; MILLER T.B.; GABEL A.A. A field evaluation of pro-benzimidazole, benzimidazole, and non-benzimidazole anthelmintics in horses, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179: 686-691, 1981.
- HERD, R.P.; MAJEWSKI, G.A. Comparison of daily and monthly pyrantel treatment in yearling thoroughbreds and protective effect of strategic medication of mares on their foals. *Vet. Parasitol.* 55: 93-104, 1994.

HODGKINSON J.E.; CLARK H.J.; KAPLAN R.M.; LAKE S.L.; MATTHEWS J.B. The role of polymorphisms at beta tubulin isotype 1 codons 167 and 200 in benzimidazole resistance in cyathostomins. *International Journal for Parasitology*.38:1149-1160, 2008.

KAPLAN, R. M. Anthelmintic resistance in nematodes of horses. *Veterinary Research*. 33, 491–507, 2002.

KLEI, T.R.; CHAPMAN, M.R.; FRENCH, D.D.; TAYLOR, H.W. Evaluation of ivermectin at an elevated dose against encysted equine cyathostome larvae. *Vet. Parasitol.* 47, 99–106, 1993.

KRECEK, R.C.; MALAN, F.S.; REINECKE, R.K.; DE VOS, V. Nematode parasites from Burchell's zebras in South Africa. *J. Wildf. Dis.* 23, 404–411, 1987.

LICHTENFELS, J.R.; KHARCHENKO, V.A.; KRECEK, R.C.; GIBBONS, L.M. An annotated checklist, by genus and species, of 93 species level names for 51 recognized species of small strongyles (Nematoda: Strongyloidea: Cyathostomina) of horses, asses and zebras of the world. *Vet. Parasitol.* 79, 65–79, 1998.

LOVE, S.; MURPHY, D.; MELLOR, D. Pathogenicity of cyathostome infection. *Veterinary Parasitology*. v.31, n.85, p.113–122, 1999.

LYONS, E.T.; DRUDGE, J.H.; TOLLIVER, S.C.; GRANSTROM, D.E. Anthelmintic resistance in equids. Resistance of Parasites to Antiparasitic Drugs Round Table Conf., VIIth Int. Cong. Parasitol., Paris, 1990, MSD Agvet, Rahway, NJ, pp. 67–80, 1990.

LYONS, E.T.; SWERCZEK, T.W.; TOLLIVER, S.C.; DRUDGE, J.H.; STAMPER, S.; GRANSTROM, D.E.; HOLLAND, R.E. A study of natural infections of encysted small strongyles in a horse herd in Kentucky, *Vet. Med.* 89, 1146–1149; 1152–1155, 1994.

LYONS, E.T., TOLLIVER, S.C., DRUDGE, J.H., STAMPER, S., SWERCZEK, T.W., GRANSTROM, D.E. A study (1977-1992) of population dynamics of endoparasites featuring benzimidazole resistant small strongyles (Population S) in Shetland ponies. *Vet. Parasitol.* 66, 75–86, 1996.

MARTIN, R.J.; BUXTON, S.K.; NEVEU, C.; CHARVET, C.L.; ROBERTSON, A.P. Emodepside and SL0-1 potassium channels: A review. *Exp. Parasitol.* Doi: 10.1016/j.exppara.2011.08.012, 2011.

MOLENTO M. B. Resistência parasitária em helmintos de equinos e propostas de manejo. *Ciência Rural*. 35: 1469-1477, 2005.

MOLENTO M.B.; ANTUNES J.; BENTES R.N. COLES G.C. Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. *Vet Rec.* 162(12):384-5, 2008.

MONAHAN, C.M.; CHAPMAN, M.R.; TAYLOR, H.W.; FRENCH, D.D.; KLEI, T.R. Comparison of moxidectin oral gel and ivermectin oral paste against a spectrum of internal parasites of ponies with special attention to encysted cyathostome larvae. *Vet. Parasitol.* 63, 225–235, 1996.

POYNTER, D.; HUGHES, D.L. Phenothiazine and piperazine, an efficient anthelmintic mixture for horses. *Vet. Rec.* 70, 1183–1188, 1958.

PRICHARD, R. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Aust. Vet. J.* 56, 239–251, 1980.

- PROUDMAN, C.J.; MATTHEWS, J.B. Control of intestinal parasites in horses. In Practice. 22: 90-97, 2000.
- REINEMEYER, C.R.; SMITH, S.A.; GABEL, A.A.; HERD, R.P. The prevalence and intensity of internal parasites in horses in the U.S.A. *Vet. Parasitol.* 15: 75—83, 1984.
- REW R.S.; FETTERER R.H. Mode of action of antinematodal drugs. In: Campbell RC, Rew RS (eds) *Chemotherapy of parasitic diseases*. Plenum, New York, pp 321–337, 1986.
- SAGER, F., 1980. Col. Sager, Practitioner. In: Tobey, M.C. (Ed.), *The Blood-Horse*, Lexington, KY. 160 p., 1980.
- SANGSTER, N.C. Pharmacology of anthelmintic resistance in cyathostomes: will it occur with the avermectin/milbemycins? *Vet. Parasitol.* 85: 189-204, 1999.
- SANGSTER, N.; BATTERHAM, H.; CHAPMAN, D.; DURAISINGH, M.; LE JAMBRE, L.; SHIRLEY, M.; UPCROFT, J.; UPCROFT P. Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. *International Journal for Parasitology.* 32: 637-653, 2002.
- SCHRÖDER, J.; SWAN, G.E. Ivermectin as an antiparasitic agent in horses. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 53: 127-128, 1982.
- TODD, A.C.; HANSEN, M.F.; WYANT, Z.N.; KELLEY, G.W.; CROWDUS, D.H. Continuous low-level versus periodic phenothiazine therapy for thoroughbred yearlings, Ky. *Agr. Exp. Sta. Bul. No. 545*, 8 pp, 1950.
- TRAVERSA, D. The little-known scenario of anthelmintic resistance in equine cyathostomes in Italy. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1149: 167–169, 2008.
- TRAVERSA D.; SAMSON-HIMMELSTJERNA G.V.; JANINA D.; PIERMARINO M.; SCHÜRMAN S.; BARNES H.; OTRANTO D.; PERRUCCI S.; REGALBONO A.F.; PAOLA B.; BOECKH A.; COBB R. Anthelmintic resistance in cyathostomin populations from horse yards in Italy, United Kingdom and Germany. *Par & Vectors. Suppl 2: S2*, 2009.
- UHLINGER C.A.; KRISTULA M. Effects of alternation of drug classes on the development of oxibendazole resistance in a herd of horses. *J Am Vet Med Assoc.* 201:51-55, 1992.
- URQUHARTH, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. *Parasitologia Veterinária*.; 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007.
- VALDEZ, R.A.; DIPIETRO, J.A.; PAUL, A.J.; LOCK, T.F.; HUNGERFORD, L.L.; TODD, K.S. Controlled efficacy study of the bioequivalence of Strongid® C and generic pyrantel tartrate in horses. *Vet. Parasitol.* 60, 83–102, 1995.
- WALLER, P.J.; PRICHARD, R.K. Drug resistance in nematodes. In *Chemotherapy of Parasitic Diseases* (Campbell, W.C. and Rew, R.S.eds), pp. 339–362, 1986.
- YOUNG, K.E., GARZA, V., SNOWDEN, K., DOBSON, R., POWELL, D., CRAIG, T.M. Parasite diversity and anthelmintic resistance in two herds of horses. *Veterinary Parasitology.* 85: 205–214, 1999.
- ZINSER, E.W. Anthelmintic paraherquamides are cholinergic antagonists in gastrointestinal nematodes and mammals. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 25, 241–250, 2002.



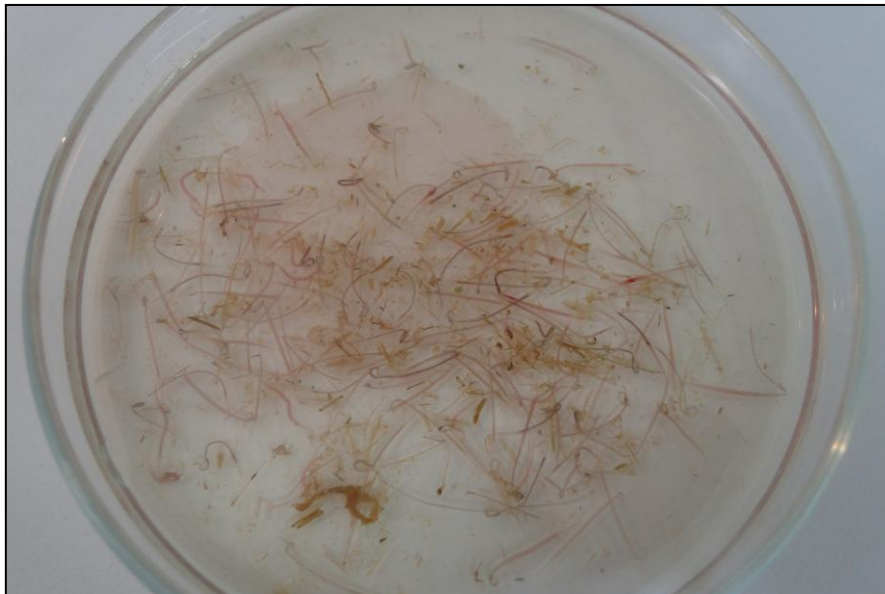


FIGURA 1 – CIATOSTOMÍNEOS ADULTOS RECUPERADOS DO CÓLON DE CAVALO ADULTO.  
FONTE: RICARDO CANEVER



FIGURA 2 - CÍATOSTOMINEO NA FASE DE L<sub>3</sub> RECUPERADO POR MEIO DE COPROCULTURA.  
FONTE: PROFESSOR MARCELO B. MOLENTO.

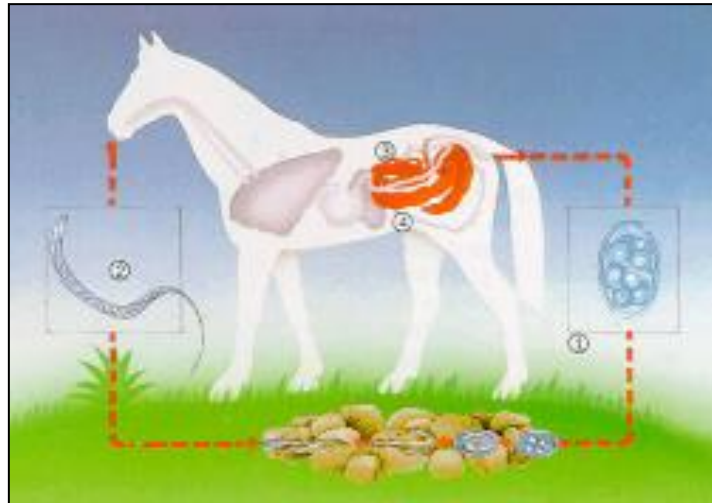


FIGURA 3 – CICLO BIOLÓGICO DOS CIATOSTOMÍNEOS.  
FONTE: WWW.ES.MERIAL.COM



FIGURA 4 – LARVAS ENCISTADAS NA SUB-MUCOSA DO CÓLON  
DE CAVALO ADULTO.

FONTE: RICARDO CANEVER

## **2. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE FENBENDAZOL, PIRANTEL, IVERMECTINA E MOXIDECTINA CONTRA CIATOSTOMÍNEOS DE EQUINOS EM HARAS NOS ESTADOS DO PARANÁ, SÃO PAULO, RIO DE JANEIRO E MINAS GERAIS.**

### **RESUMO**

A resistência anti-helmíntica em populações de nematódeos de interesse veterinário tornou-se motivo de grande preocupação devido à necessidade no tratamento das doenças parasitárias. Ciatostomíneos resistentes às principais classes de drogas antiparasitárias tem sido relatado em vários países. Este estudo teve o objetivo de avaliar a eficácia das principais drogas antiparasitárias utilizadas contra pequenos estrôngilos de equinos. Um total de 498 cavalos oriundos de 11 haras, localizados no estado do Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, foram tratados com ivermectina, moxidectina, pamoato de pirantel e febendazol. Foi utilizado o teste de redução na contagem de ovos nas fezes para calcular a eficácia dos compostos. O febendazol apresentou baixa eficácia em 100% dos haras testados (11/11), o pirantel teve resistência em cinco haras (5/11), a ivermectina teve resistência em um haras (1/11). A resistência múltipla de três classes de anti-helmíntico foi encontrada em um haras (1/11). Os resultados mostraram a ineficácia do febendazol e a ampla resistência ao pirantel. O grupo das lactonas macrocíclicas ainda possui alta eficácia na grande maioria dos haras, porém a resistência a ivermectina foi claramente evidenciada. O manejo relatado pelos responsáveis reflete o uso continuado de produtos químicos como maneira central de controle dos parasitos, demonstrando a necessidade de reavaliar os métodos de controle parasitário adotados nos haras para retardar a disseminação da resistência e preservar a eficácia das drogas disponíveis.

## ABSTRACT

The increase of the anthelmintic resistance in the last years in nematode population of veterinary interest became a major concern. The purpose of the present study was to evaluate the efficacy of the main anthelmintic drugs used in horses and the anthelmintic resistance in small strongylus. In the total 498 horses from 11 horse farms, located in the states of Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro and Minas Gerais, in Brazil, were treated with ivermectin, moxidectin, pyrantel and febendazole, and was used the faecal egg count reduction test to determine the efficacy of each one it in all the horse farms. Anthelmintic resistance was found to febendazole in 100% of horse farms (11/11), pyrantel was resistant in five horse farms (5/11), ivermectin had resistant in one horse farm (1/11). Multiple resistance to 3 drugs classes was found in one horse farm (1/11). The results showed that resistance to febendazole is widespread, the efficacy of pyrantel is in a critical situation, and that macrocyclic lactones still have high efficacy on most farms, but the resistance to ivermectin was found causing concern.

## 2.1 Introdução

Helmintos intestinais são considerados importantes causas de doença em equinos. Desses parasitas, o grupo pertencente à subfamília Cyathostominae (Nematoda, Strongylida) é o mais comum que parasita cavalos. Esses nematóides, também chamados de pequenos estrôngilos, consistem de um complexo grupo de 51 espécies, embora os equinos tendam a abrigar apenas algumas espécies mais comuns (Matthews *et al.*, 2004). *Cyathostomum catinatum*, *Cyathostomum pateratum*, *Coronocylus coronatus*, *Coronocylus labiatus*, *Coronocylus labratus*, *Cylicocylus nassatus*, *Cylicocylus leptostomus*, *Cylicocylus insigne*, *Cylicostephanus longibursatus*, *Cylicostephanus goldi*, *Cylicostephanus calicatus* e *Cylicostephanus minutus*, são as espécies mais prevalentes, compreendendo cerca de 99% do total da carga de ciatostomíneos (Lichtenfels, 1998). De acordo com Kaplan (2002) as espécies *Cylicostephanus longibursatus*, *Cyathostomum catinatum* e *Cylicocylus nassatus* frequentemente apresentam cerca de 70-80% de prevalência em cavalos parasitados.

Ciatostomíneos são parasitas do ceco e cólon, possuem ciclo de vida direto, passam por uma fase histotrófica na mucosa intestinal, podem ser extremamente patogênicos e altos níveis de infecção resultam em sinais clínicos como letargia, perda de peso, cólica, diarreia, podendo prosseguir até o óbito (Klei & Chapman, 1999; Love *et al.*, 1999). O dano devastador mais comumente encontrado ocorre quando as larvas se desenvolvem para o quarto estágio, emergem através da parede intestinal e continuam sua evolução até a fase adulta no lúmen intestinal, podendo um enorme número de larvas emergirem em massa. Esta condição, conhecida como "ciatostominose larval", pode causar sérios danos à parede intestinal, resultando em diarreia, cólicas potencialmente graves, e uma taxa de mortalidade elevada (Corning, 2009).

O controle parasitário em cavalos geralmente é realizado de modo supressivo, com vários tratamentos ao longo do ano, e utilizando drogas que fazem parte das três principais classes de anti-helmínticos de uso em eqüinos, os benzimidazóis, as tetrahidropirimidinas e as lactonas macrocíclicas (Traversa, 2008).

Nos últimos anos, a disseminação de populações de nematóides resistentes aos parasiticidas tornou-se uma séria ameaça para a saúde, bem-estar e produção animal em muitas áreas do mundo (Molento, 2009). Ciatostomíneos resistentes a anti-helmínticos têm se tornado um grande problema em medicina equina, onde estratégias de tratamento supressivo e o abuso no uso de anti-helmínticos resultaram na seleção de parasitas resistentes às drogas, principalmente *Parascaris sp.* e pequenos estrôngilos (Kaplan, 2002). A taxa de desenvolvimento da resistência é determinada pela pressão de seleção, na medida que poucos organismos sobreviventes ao tratamento passem seus genes para a próxima geração. Este processo ocorre de maneira gradativa e acredita-se que quanto maior a eficácia da droga, mais acentuado será o processo de seleção por organismos homozigotos resistentes (Molento, 2005). Com a continuação da seleção e reprodução dos parasitas resistentes, a frequência de genes de resistência na população aumenta até o ponto em que o tratamento falhará. Este ponto não pode ser imediatamente reconhecido, entretanto é justo afirmar que a resistência às drogas demonstradas por tais organismos é uma adaptação evolutiva que põe em risco todo e qualquer agente parasiticida independente de seu mecanismo de ação (Shoop et al., 1993; Sangster, 1999).

Testes *in vitro* e moleculares para diagnóstico de resistência anti-helmíntica avançaram muito nos últimos anos (Stratford et al., 2011; Matthews et al., 2012), mas ainda não são uma realidade para levantamento da resistência em nível de campo. Testes *in vivo* continuam sendo a principal ferramenta para ajudar a determinar a eficácia de drogas antiparasitárias e determinar o nível de resistência. O teste crítico é considerado padrão ouro

para diagnosticar resistência a anti-helmínticos e é realizado por meio da contagem de parasitos encontrados após o tratamento. No entanto, estes dados somente podem ser obtidos com a realização da eutanásia do animal, o que torna esse teste inviável na situação de campo (Kaplan, 2004).

Devido a esta inviabilidade em realizar o teste crítico, o teste de redução na contagem de ovos por grama de fezes (TRCOF), tornou-se amplamente utilizado para avaliar o percentual de eficácia dos produtos comerciais. A Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária (WAAVP) através do Comitê de Orientação de Parasitas de Equinos, define o TRCOF como um teste prático de padrão ouro para definição de resistência no campo, porém ressaltam as variações e falta de padrão no desenho do estudo, análise e interpretação de dados. Entre os fatores que podem complicar a interpretação do TRCOF se considera que: o grupo experimental tende a ser pequeno, a contagem de animais com OPG zero ou baixo valor pré-tratamento é comum, a distribuição de contagem de OPG é muito variável, e que as práticas de manejo entre as propriedades podem ser muito diferentes. Estes fatores podem ser superáveis, desde que levados em consideração, eliminando as possíveis causas de erro e utilização de métodos estatísticos adequados para a análise do TRCOF (Kaplan, 2008). Dargatz et al. (2000) sugeriu que os valores de OPG individuais devem ser transformados em médias do grupo para que os dados se aproximem de uma distribuição normal. Usando este método, ele sugere que um nível de redução de 95% fixado para benzimidazóis e lactonas macrocíclicas e 90% para pirantel é indicativo de resistência.

O objetivo do estudo abordado neste capítulo foi determinar a eficácia de quatro drogas anti-helmínticas de uso oral em equinos contra nematóides intestinais mais especificamente os ciatostomíneos, em haras localizados em diferentes regiões brasileiras e estabelecer uma correlação entre os resultados encontrados e o manejo utilizado nestas propriedades.

## 2.2 Material e métodos

### 2.2.1 Localização e descrição dos testes

O estudo foi realizado em onze haras, sendo quatro no estado do Paraná (Campina Grande do Sul, Porto Amazonas, São José dos Pinhais), três em São Paulo (Bauru, Brotas, São José do Rio Pardo), dois em Minas Gerais (Inconfidentes, Inhaúma) e dois no Rio de Janeiro (Maricá, Teresópolis). O experimento foi realizado no período de fevereiro a dezembro de 2010, período no qual foi realizada uma triagem em 694 cavalos, sendo selecionado um total de 498. Foram selecionados machos e fêmeas com idade superior a 12 meses, considerados saudáveis no exame físico e com contagem de OPG para estrongilídeos igual ou superior a 100.

Foi avaliada a eficácia de quatro drogas anti-helmínticas de três classes diferentes, fenbendazol (Panacur®), pirantel (Strongid®), ivermectina (Eqvalan®) e moxidectina (Equest®), para uso oral em equinos. O teste de redução na contagem de ovos nas fezes (TRCOF) foi utilizado para cálculo de eficácia dos produtos. Em uma primeira etapa, denominado dia -10, foi realizado exame coproparasitológico em todos os cavalos, determinando o número de ovos por grama de fezes (OPG) utilizando a técnica de McMaster modificada (Gordon & Whitlock, 1939) com limite de detecção de 25 ovos e cada amostra foi realizada em duplicata (Fig. 5 e 6). Os animais que se enquadraram nos requisitos descritos foram randomizados em 4 grupos (A, B, C, D) com no mínimo 8 animais por grupo. As drogas foram sorteadas aleatoriamente para os grupos em cada haras. Na etapa seguinte, denominado dia 0, os animais foram tratados, cada grupo com a respectiva droga sorteada, na dose recomendada pelo fabricante. O procedimento foi realizado por médico veterinário e novas amostras de fezes foram examinadas para determinar o resultado da OPG no momento do tratamento, servindo de parâmetro para posterior análise do TRCOF. Na terceira etapa,



realizada 14 dias após o tratamento, denominado dia +14, novas amostras de fezes foram coletadas para determinar os valores de OPG. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal do Paraná.

Coproculturas foram realizadas com amostras de fezes pré e pós-tratamento, para determinar a prevalência de ciatostomíneos em cada haras. Aproximadamente 50 gramas de fezes de cada amostra foi acondicionada em um recipiente de vidro junto com amostras do mesmo grupo (pool), foram incubadas a 28° C e com aproximadamente 70% de umidade relativa por 8 dias (Fig. 7). As amostras foram recuperadas através do método de Baerman e identificadas de acordo com chaves de identificação (Fig. 8) (Bevilaqua et al., 1993).

### **2.2.2 Questionário sobre manejo sanitário**

Um questionário (anexo 1) foi aplicado em cada haras para avaliar as formas de controle parasitário adotadas na propriedade e com isto estabelecer uma relação entre as estratégias utilizadas nos haras com resistência e dos haras com menores índices de resistência determinado através do TRCOF.

### **2.2.3 Análise estatística**

O TRCOF foi realizado com os resultados das amostras processadas no dia 0 e no dia +14 e foram analisados através da planilha RESO (Wursthorn e Martin, 1990). A resistência ao fenbendazol, ivermectina e moxidectina foi considerada quando a redução de OPG foi menor que 95% e o limite de confiança inferior (LCI) foi menor que 90%. A resistência ao pirantel foi considerada quando a redução foi menor que 90% e o LCI foi menor que 80%. A suspeita de resistência foi determinado se apenas uma das duas situações descritas acima foi

encontrada. Estes valores foram baseados nas determinações recomendadas por Dargatz et al. (2000), Pook et al. (2002), Kaplan e Nielsen (2010).

### 2.3 Resultados

Considerando os valores de redução de ovos e intervalos de confiança inferior, todos os haras apresentaram resistência ao febendazol, com resultados de eficácia variando de 0 a 61%. A resistência ao pirantel foi determinada em 5 dos 11 haras estudados (5/11) com variação de eficácia de 59 a 99%. Resistência a ivermectina ocorreu em 1 haras (1/11) e 3 haras tiveram redução da eficácia (3/11) com variação de 89 a 100% de eficácia. A resistência a moxidectina não foi encontrada, porém valores de eficácia inferior a 100% foi encontrado em 5 haras. Os resultados de eficácia em todos os haras estão descritos na tabela 1.

A resistência a múltiplas drogas, isto é, quando existe resistência contra mais de um composto anti-helmíntico, ocorreu em 5 haras (5/11), onde todos mostraram resistência ao fenbendazol e ao pirantel e em um haras ainda ocorreu resistência a um terceiro composto, ivermectina.

Nos haras onde foi encontrada resistência a múltiplas drogas, os dados de manejo mostraram uma correlação positiva de intervalos de tratamento inferior a 2 meses, tratamento de todos animais ao mesmo tempo. A propriedade não realizava rotação de pastagem/piquetes e novos animais eram introduzidos ao plantel imediatamente após aquisição.

Os dois haras (SP2 and RJ2) onde foi encontrada resistência somente ao fenbendazol e alta eficácia do pirantel, o principal manejo estratégico era tratar os animais com intervalos maiores, acima de 90 dias, e no haras SP2 o tratamento era realizado somente em alguns animais do rebanho, baseado em estratégias e OPG. Nessa propriedade os animais de

diferentes categorias eram mantidos em pastagens separadas. No haras RJ2 os animais recém-adquiridos eram tratados e mantidos isolados por pelo menos cinco dias antes de serem incorporados ao plantel. Os dados coletados dos outros haras descreveram manejos estratégicos semelhantes seguindo claramente esquemas de tratamento supressivo para controle e erradicação parasitária, tratando todos os animais ao mesmo tempo e com intervalo variando entre 2 a 3 meses entre tratamentos.

A identificação das larvas L3 obtidas através da coprocultura mostrou que os ciatostomíneos eram a maioria dos estrongilídeos presentes, com 94% de média entre os haras no pós-tratamento. Valores apresentados na Tabela 2.

## **2.4 Discussão**

A resistência aos benzimidazóis está amplamente disseminada, assim como verificado neste estudo, em que a resistência ao fenbendazol ocorreu em todos os haras testados. Em Kentucky (EUA), pesquisas com populações de ciatostomíneos foram realizadas por mais de 40 anos e os primeiros relatos de pequenos estrôngilos resistentes primeiramente a fenotiazina e em poucos anos após ao tiabendazol, foram apresentados ainda na década de 60' (Drudge e Elam, 1961; Drudge et al., 1963; Drudge e Lyons, 1965). Ao longo das quatro décadas de pesquisa, outros estudos foram publicados abordando a resistência desta população de ciatostomíneos contra benzimidazóis e outras drogas, como piperazina e pirantel (Drudge et al., 1984; Drudge et al., 1988; Drudge et al., 1991; Tolliver et al., 1993) e ainda estudos com estes parasitos mostrou a influência que a fenotiazina teve na seleção de populações resistentes aos benzimidazois (Drudge et al., 1990). Lyons et al. (2007) descreveram uma série de testes críticos realizados entre 1991 e 2001 na Universidade de Kentucky (EUA) e relataram a permanência da baixa eficácia do tiabendazol após mais de 20 anos sem uso em um grupo de cavalos, mostrando que não houve aumento da susceptibilidade neste lote

mesmo após longo período sem a administração de tiabendazol, enquanto em outro lote testado em que houve continuação da pressão de seleção com tiabendazol a eficácia foi reduzida comparada ao lote anterior. Os autores relataram a baixa eficácia de fenbendazol e fenotiazina, enquanto pirantel, oxfendazol e oxbendazol tiveram alta eficácia sobre ciatostomíneos. Na Alemanha, Drogemuller et al. (2004) realizaram 45 TRCOF com fenbendazol aumentando gradativamente a dosagem de 7,5 a 30 mg/kg e em todos os resultados a eficácia foi menor que 90%, sugerindo resistência. Wirtherle et al. (2004) relataram resistência ao fenbendazol em 10 haras testados. No Reino Unido, Alemanha e Itália, a resistência ao fenbendazol também foi relatada por Traversa et al. (2009). Na Suécia, a resistência ao fenbendazol foi encontrada em 76,92% dos haras testados (Lind et al., 2007). Samson Himmelsterjna et al. (2002) relataram resistência em três propriedades testadas com fenbendazol usando TRCOF, com médias de eficácia de 27, 26,5 e 83,9% no Chile. No Brasil, a baixa eficácia de benzimidazóis contra ciatostomíneos foi descrito anteriormente por Luz Pereira (1994) em três haras no Paraná. Otto et al. (2008) relataram baixa eficácia do fenbendazol (84%) usando TRCOF em um centro de criação de equinos no Rio Grande do Sul e Molento et al. (2008) também relataram falha no tratamento e controle de ciatostomíneos com benzimidazol em um haras no Paraná.

No presente estudo, a eficácia ao pirantel teve uma ampla variação entre os haras (59-99%), entretanto a resistência ao pirantel ocorreu em cinco haras localizados nos estados do Paraná (2/11), Minas Gerais (2/11) e São Paulo (1/11), não sendo encontrada no Rio de Janeiro. A eficácia do pirantel contra ciatostomíneos não foi muito alta mesmo quando o produto foi introduzido no mercado, e apresentou variação de 94-100% (Lyons et al., 1974), desta forma a definição de resistência deve ser mais conservadora, considerando o estado de resistência quando os valores de redução da OPG estiverem abaixo de 90%. A resistência ao pirantel também foi descrita na Dinamarca (Craven et al., 1998; Nielsen, 2009), nos EUA

(Chapman et al., 1996; Kaplan et al., 2004), no Reino Unido (Coles et al., 1999; Traversa et al., 2009), no Brasil (Molento et al. 2008) e na Itália e Alemanha (Traversa et al., 2009).

A resistência às lactonas macrocíclicas, encontrada neste estudo em um haras contra ivermectina e ainda a redução de eficácia encontrada em 3 haras para ivermectina e em um haras para moxidectina, geram grande preocupação, pois são compostos de uma única classe de drogas e que ainda possuem alta eficácia contra ciatostomíneos em vários outros locais. Muitos autores relataram a continuação da alta eficácia das LM em TRCOF (Otto et al. 2008; Slocombe et al., 2008; Nielsen, 2009; Traversa et al., 2009), porém, alguns estudos mostraram ciatostomíneos resistentes contra as LM's (Trawford et al., 2005; Molento et al., 2008; Traversa et al., 2009).

A resistência a múltiplas drogas (RMD) ocorre quando existe resistência contra duas ou mais drogas e é uma situação preocupante, pois reduz o arsenal de anti-helmínticos eficazes disponíveis para controle parasitário. A RMD em parasitos torna limitante o uso de alguns fármacos, reduzindo significativamente a possibilidade de sucesso no tratamento, pois existe um número limitado de compostos antiparasitários disponíveis para tratamento de cavalos. No presente estudo, 5 haras (45,5%) tiveram RMD para duas classes de anti-helmíntico e em um haras (9,1%) a situação encontrada foi mais crítica, com RMD para três classes de drogas. Considerando ainda que a baixa eficácia, evidenciado em três compostos, pode ser sugestivo de um início de processo de resistência, a situação de RMD poderá, em breve, piorar a situação em mais 3 haras. Outros estudos realizados com as principais classes de anti-helmíntico, também mostraram RMD, inclusive contra LM's.

Molento et al (2008) relataram falha no controle de ciatostomíneos em uma propriedade no Brasil, com resultados mostrando resistência ao febendazol, pirantel, ivermectina, moxidectina e abamectina. Traversa et al. (2009) também tiveram RMD em um estudo na Europa, onde houve resistência no tratamento com febendazol em 38% dos haras

testados na Itália, 82,4% no Reino Unido e 84,6% na Alemanha, resistência ao pamoato de pirantel em 30% dos haras testados na Itália, 18,2% no Reino Unido e 20% na Alemanha e resistência a ivermectina que ocorreu em 1,7% e 9,1% dos haras na Itália e Reino Unido. A moxidectina obteve 100% de eficácia em todos os haras da Itália e Reino Unido e somente um cavalo na Alemanha a eficácia foi menor do que 100%.

Apesar de a ivermectina e moxidectina ainda possuir alta eficácia contra ciatostomíneos e conseqüentemente redução na contagem de OPG, uma redução da atividade tem sido observada nos últimos anos. Esta redução refere-se ao período de reaparecimento de ovos (PRO) nas fezes, que no início da comercialização destas drogas, possuíam um efeito residual longo, permanecendo a OPG negativa por períodos aproximados de 8 semanas para ivermectina e de 12-22 semanas para a moxidectina (Boersema et al. 1996; DiPietro et al., 1997; Demeulenaere et al., 1997). O maior período para reaparecimento de ovos (PRO) pós tratamento com moxidectina se deve ao efeito contra larvas L4 encistadas na mucosa intestinal (Cobb e Boeckh, 2009). Estudos recentes têm mostrado a diminuição destes intervalos e em alguns casos o PRO chegaram a ocorrer com 4 semanas após o tratamento com estas drogas (Samson-Himmelstjerna et al., 2007; Lyons et al., 2008; Molento et al 2008; Rossano et al., 2010; Lyons et al., 2011). Testes críticos mostraram uma redução de atividade da ivermectina contra formas imaturas de pequenos estrôngilos no lúmen intestinal, e desta forma estaria acelerando o processo de retorno de população parasitária adulta no lúmen intestinal, com a maturação das larvas sobreviventes ao tratamento (Lyons et al., 2009). Lyons et al. (2010) determinaram uma redução da atividade da moxidectina contra formas imaturas de ciatostomíneos (L4), que variou de 82 a 99% de redução, enquanto os adultos foram removidos de >99 a 100%. Da mesma forma, larvas imaturas sobreviventes teriam um rápido desenvolvimento e após um breve período estariam eliminando ovos. Quanto a eficácia

da moxidectina sobre larvas encistadas na mucosa intestinal, ainda não existe informações relatando alteração na sua capacidade de remoção.

Embora a resistência a uma ou mais drogas seja resultado de uma somatória de fatores, o foco no manejo na criação de equinos deve abordar o uso de estratégias sustentáveis de controle com o objetivo de reduzir a pressão de seleção sobre a população parasitária. O tratamento que permita um manejo racional no controle de parasitoses, com consequente redução na pressão de seleção para a resistência deve ser a base para um programa moderno. Manter a alta eficácia das drogas que ainda possuem é o maior desafio no controle parasitário e para isto algumas medidas de manejo podem auxiliar, principalmente buscando a manutenção de uma população de “refúgia” na propriedade (Molento, 2005). O tratamento supressivo realizado pelos dois haras que tiveram RMD, no qual se baseia em intervalos de 8 semanas e tratando todos os animais plantel ao mesmo tempo, deve ser considerado insustentável. O tratamento seletivo, no qual somente os animais com OPG positivo e com resultado acima de um determinado valor de corte são tratados, é uma excelente estratégia para reduzir a frequência de tratamentos e a pressão de seleção para resistência, ficando uma parte do plantel sem tratamento, ajudando na manutenção de refúgia na propriedade (Nielsen et al, 2006). Ainda o principal desafio é orientar médicos veterinários sobre os resultados positivos que podem ser alcançados com o monitoramento da eficácia de drogas baseado em testes como o TRCOF, com o objetivo de identificar e manter a eficácia das drogas e adotar práticas de manejo que podem favorecer a população de refugia (Molento, 2005).

O tratamento seletivo adotando o ponto de corte de OPG superior a 200 para potros e 500 para cavalos adultos deve ser disseminado (Coles e Molento, 2008), desta forma é possível manter um aumento da refugia no haras e diminuir a pressão de seleção em parasitos resistentes. No entanto existe pouca evidência avaliando os efeitos a longo prazo dos benefícios do tratamento seletivo e existe uma preocupação sobre a possibilidade de *S.*

*vulgaris* tornar-se mais prevalente nos animais que recebem pouco ou nenhum tratamento devido ao seu constante OPG baixo ou negativo (Nielsen, 2009).

Uma possível redução na seleção da resistência foi demonstrado por Larsen et al. (2011) através do tratamento seletivo na Dinamarca, onde a legislação autoriza o tratamento anti-helmíntico somente com prescrição emitida por Médico Veterinário. Ainda é indicado a realização de testes de eficácia de drogas nas propriedades, a rotação de pastagem, o pastejo com diferentes espécies animais, redução da superlotação em piquetes, se deve evitar alimentar os animais diretamente no solo, promover a remoção e compostagem de fezes dos piquetes e o manejo de quarentena com os novos animais adquiridos (Brady e Nichols, 2009; Nielsen et al., 2010).

## **2.5 Conclusão**

Ciatostomíneos resistentes aos principais compostos anti-helmínticos utilizados em equinos foram encontrados neste estudo, com a eficácia totalmente comprometida do fenbendazol e parcialmente reduzida do pirantel. As lactonas macrocíclicas ainda possuem alta eficácia na maioria dos haras, porém com redução da eficácia encontrada em algumas propriedades, mostrando que o processo de resistência a esta classe de drogas está começando a ocorrer. Os dados encontrados reforçam a necessidade de mudança nos atuais manejos de controle parasitário de equino, para que a eficácia das drogas seja preservada.



## REFERÊNCIAS

- BEVILAQUA, C.M.L.; RODRIGUES, M. L.; CONCORDET, D. Identification of infective larvae of some common nematode strongylids of horses. *Revue de Médecine Veterinaire*, v.12, p.989-995, 1993.
- BOERSEMA, J.J.; EYSKER, M.; MAAS, J.; VAN DER AAR, W.M. Comparison of the reappearance of strongyle eggs in foals, yearlings, and adult horses after treatment with ivermectin or pyrantel. *The Veterinary Quarterly*, v.18, p.7-9, 1996.
- BRADY, H. A.; NICHOLS, W. T. Drug resistance in equine parasites: an emerging global problem. *Journal of equine veterinary science*, v.29, n.5, p.285-296, 2009.
- CHAPMAN, M.R.; FRENCH, D.D.; MONAHAN, C.M.; KLEI, T.R. Identification and characterization of a pirantel pamoate resistant cyathostome population. *Veterinary Parasitology*, v.66, p.205-212, 1996.
- COBB, R.; BOECKH, A. Moxidectin: a review of chemistry, pharmacokinetics and use in horses. *Parasites & Vectors*, 2(Suppl 2):S5, doi:10.1186/1756-3305-2-S2-S5, 2009.
- COLES, G.C.; BROWN, S.N.; TREMBATH, C.M. Pyrantel resistant strongyles in racehorses. *Veterinary Records*, v.145:408, 1999.
- CORNING S. Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. *Parasites & Vectors*, 2 Suppl 2:S1, 2009.
- CRAVEN, J.; BJORN, H.; HENRIKSEN, S.A.; NANSEN, P.; LARSEN, M.; LENDAL, S. Survey of anthelmintic resistance on Danish horse farms using 5 different methods of calculation faecal egg count reduction. *Equine Veterinary Journal*, v.30, p.289-293, 1998.
- DEMEULENAERE, D.; VERCRUYSSSE, J.; DORNY, P.; CLAEREBOUT, E. Comparative studies of ivermectin and moxidectin in the control of naturally acquired cyathostome infections in horses. *Veterinary Records*, v.141(15), p.383-386, 1997.
- DIPIETRO, J.A.; HUTCHENS, D.E.; LOCK, T.F. Clinical trial of moxidectin oral gel in horses. *Veterinary Parasitology*, v.72, p.167-177, 1997.
- DROGEMULLER, M.; KLAUS, F.; SCHNIEDER, T.; SANSOM-HIMMELSTJERNA. Effect of repeated benzimidazole treatments with increasing dosages on the phenotype of resistance and the beta-tubulin codon 200 genotype distribution in a benzimidazole-resistant cyathostomin population. *Veterinary Parasitology*, v.123, p.201-213, 2004.
- GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of the Council of Science and Industry Research in Australia*, v.12, p.50-52, 1939.
- KAPLAN, R.M. Anthelmintic resistance in nematodes of horses. *Veterinary Research*. v.33, p.491-507, 2002.
- KAPLAN, R.M.; KLEI, T.R.; LYONS; E.T.; LESTER; G.; COURTNEY, C.H.; FRENCH, D.D.; TOLLIVER, S.C.; VIDYASHANKAR, A.N.; ZHAO Y. Prevalence of anthelmintic resistant cyathostomes on horse farms. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.225(6), p.903-10, 2004.

- KAPLAN, R.M. Biological considerations in evaluating drug efficacy and resistance in equine strongyle parasites using fecal egg count data. In: Proceedings International Equine Parasite Drug Resistance Workshop. University of Copenhagen, Denmark.p.14-15, 2008.
- KLEI, T.R.; CHAPMAN, M.R. immunity in equine cyathostome infections. *Veterinary Parasitology*. v.31, n.85, p. 123-133, 1999.
- LARSEN, M.L.; RITZ, C.; PETERSEN, S.T.; NIELSEN, M.K. Determination of ivermectin efficacy against cyathostomins and *Parascaris equorum* on horse farms using selective therapy. *The Veterinary Journal*, v.188, p.44-47, 2011.
- LOVE, S.; MURPHY, D.; MELLOR, D. Pathogenicity of cyathostome infection. *Veterinary Parasitology*. v.31, n.85, p.113–122, 1999.
- LYONS, E.T.; TOLLIVER, S.C.; COLLINS, S.S. Study (1991 to 2001) of drug-resistant Population B small strongyles in critical tests in horses in Kentucky at the termination of a 40-year investigation. *Parasitology Research*, v.101, p.689-701, 2007.
- LYONS, E.T.; TOLLIVER, S.C.; IONITA, M.; LEWELLEN, A.; COLLINS, S.S. Field studies indicating reduced activity of ivermectin on small strongyles in horses on a farm in Central Kentucky. *Parasitology Research*, v.103, p.209–215, 2008.
- LYONS, E.T.; TOLLIVER, S.C.; COLLINS, S.S. Probable reason why small strongyle EPG counts are returning “early” after ivermectin treatment of horses on a farm in Central Kentucky. *Parasitology Research*, v.104, p.569–574, 2009.
- LYONS, E.T.; TOLLIVER, S.C.; KUZMINA, T.A.; COLLINS, S.S. Critical tests evaluating efficacy of moxidectin against small strongyles in horses from a herd for which reduced activity had been found in field tests in Central Kentucky. *Parasitology Research*, v.107, p.1495–1498, 2010.
- LYONS, E.T.; TOLLIVER, S.C.; COLLINS, S.S. Reduced activity of moxidectin and ivermectin on small strongyles in young horses on a farm (BC) in Central Kentucky in two field tests with notes on variable counts of eggs per gram of feces (EPGs). *Parasitology Research*, v.108, p. 1315-1319, 2011.
- MATTHEWS J.B., HODGKINSON J.E., DOWDALL S.M.J., PROUDMAN C.J. Recent developments in research into the Cyathostominae and *Anoplocephala perfoliata*. *Veterinary Research* . 35: 371-381, 2004.
- MATTHEWS, J.B.; McARTHUR, C.; ROBINSON, A.; JACKSON, F. The in vitro diagnosis of anthelmintic resistance in cyathostomins. *Vet. Parasitol.* v. 185, p. 25-31, 2012.
- MOLENTO, M. B. Resistência parasitária em helmintos de equinos e propostas de manejo. *Ciência Rural*. v. 35, p. 1469-1477, 2005.
- MOLENTO, M.B.; ANTUNES, J.; BENTES, R.N.; COLES, G.C. Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. *Veterinary Records*, v.162(12), p.384-385, 2008.
- MOLENTO, M.B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. *Vet. Parasitol.* v. 163, p. 229-234, 2009.
- NIELSEN, M.K.; HAANING, N.; OLSEN, S.N. Strongyle egg shedding consistency in horses on farms using selective therapy in Denmark. *Veterinary Parasitology*, v.135, p. 333-335, 2006
- NIELSEN, M.K. Restrictions of anthelmintic usage: perspectives and potential consequences. *Parasites & Vectors*, 2(Suppl 2):S7, doi:10.1186/1756-3305-2-S2-S7, 2009.

NIELSEN, M.K.; FRITZEN, B.; DUNCAN, J.L.; GUILLOT, J.; EYSKER, M.; DORCHIES, P.; LAUGIER, C.; BEUGNET, F.; MEANA, A.; LUSSOT-KERVERN, I.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G. Practical aspects of equine parasite control: a review based upon a workshop discussion consensus. *Equine Veterinary Journal*, v.42(5):460-468, 2010.

OTTO, M.A.; GALLIO, .M.I.; BELMONTE, C.; FERNANDES, F.; GASPARY, J.; GAMA, Johanna; DOTTO3 Felipe; MONTEIRO, S.G. Eficácia de antiparasitários no controle de helmintoses em cavalos mantidos em campo nativo na região central do rio Grande do sul, brasil. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 35°, 2008, Gramado, RS, anais, 486-3, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2008.

ROSSANO, M.G.; SMITH, A.R.; LYONS, E.T. Shortened strongyle-type egg reappearance periods in naturally infected horses treated with moxidectin and failure of a larvicidal dose of fenbendazole to reduce fecal egg counts. *Veterinary Parasitology*, v.173(3-4), p.349-52, 2010.

SANGSTER, N.C. Pharmacology of anthelmintic resistance in cyathostomes: will it occur with the avermectin/milbemycins? *Veterinary Parasitology*, v.85, p.189-204, 1999.

SHOOP, W.L.; HAINES, H.W.; MICHAEL, B.F.; EARY, C.H. Mutual resistance to avermectins and milbemycins: oral activity of ivermectin and moxidectin against ivermectin-resistant and susceptible nematodes. *Veterinary Records*, v. 133, p.445-447, 1993.

SLOCOMBE, J.O.; COTÉ, J.F.; GANNES, R.V. The persistence of benzimidazole-resistant cyathostomes on horse farms in Ontario over 10 years and the effectiveness of ivermectin and moxidectin against these resistant strains. *Canadian Veterinary Journal*. V.49, p.56-60, 2008.

STRATFORD, C.H.; MCGORUM, B.C.; PICKLES, K.J.; MATTHEWS, J.B. An update on cyathostomins: anthelmintic resistance and diagnostic tools. *Equine Vet. J.* v. 43, Suppl. 39, p. 133-139, 2011.

TRAVERSA, D. The little-known scenario of anthelmintic resistance in equine cyathostomes in Italy. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1149, p.167-169, 2008.

TRAVERSA, D.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.V.; JANINA, D.; PIERMARINO, M.; SCHÜRMAN, S.; BARNES, H.; OTRANTO, D.; PERRUCCI, S.; REGALBONO, A.F.; PAOLA, B.; BOECKH, A.; COBB, R. Anthelmintic resistance in cyathostomin populations from horse yards in Italy, United Kingdom and Germany. *Parasites & Vectors*. Suppl 2: S2, 2009.

TRAWFORD, A.F.; BURDEN, F.A.; HODGKINSON, J. Suspected moxidectin resistance in cyathostomes in two donkey herds at The Donkey Sanctuary, UK. *Proceedings 20th International Conference World, Association for Advanced Veterinary Parasitology*, 20:196, 2005.

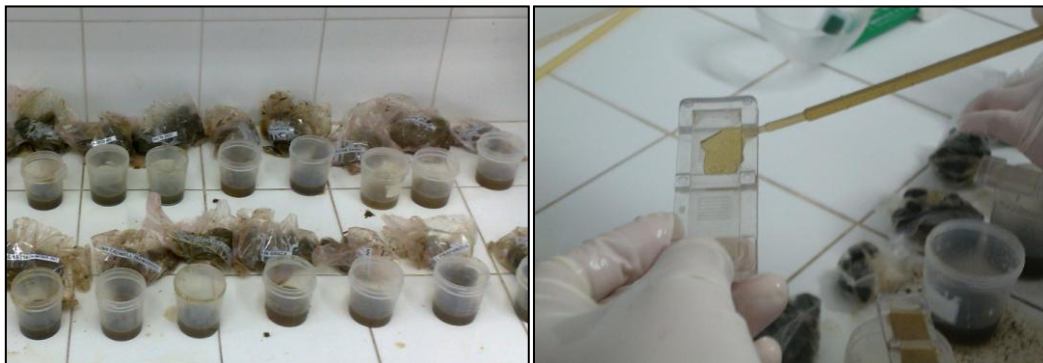
VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G; von WITZENDORFF, C.; SIEVERS, G.; SCHNIEDER, T. Comparative use of faecal egg count reduction test, egg hatch assay and beta-tubulin codon 200 genotyping in small strongyles (cyathostominae) before and after benzimidazole treatment. *Veterinary Parasitology*, v.108, n.3, p.227-235, 2002.

VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; FRITZEN, B.; DEMELER, J.; SCHURMAN, S.; ROHN, K.; SCHNIEDER, T.; EPE, C. Cases of reduced cyathostomin egg-reappearance

period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. *Veterinary Parasitology*, v.144, p.74–80, 2007.

WIRTHERLE, N.; SCHNIEDER, T.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Prevalence of Benzimidazole resistance on horse farms in Germany. *Veterinary Record: Journal of the British Veterinary Association*, v.154, p.39-41, 3p, 2004.

WURSTHORN, L.; MARTIN, P. RESO, Faecal Egg Count Reduction Test (FECRT) Analysis Program. 2.01. Parkville, CSIRO, Animal Health Research Laboratory, Australia, 1990.



FIGURAS 5 E 6 – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FEZES PARA ANÁLISE DE OPG.

FONTE: RICARDO CANEVER / FERNANDO KLOSTER.



FIGURAS 7 E 8 – COPROCULTURAS E BAERMANIZAÇÃO PARA RECUPERAÇÃO DE LARVAS.

FONTE: RICARDO CANEVER / FERNANDO KLOSTER.

TABELA 1 – EFICÁCIA E LIMITE DE CONFIANÇA INFERIOR DE FENBENDAZOL, PIRANTEL, IVERMECTINA E MOXIDECTINA CONTRA HELMINTOS DE EQUINOS EM 11 HARAS DE 4 ESTADOS BRASILEIROS.

Haras	Percentual de eficácia e interval de confiança inferior (%)							
	FBZ	LCL	PYR	LCL	IVC	LCL	MOX	LCL
<b>MG1</b>	14	-52	66	20	99	96	96	88
<b>MG2</b>	61	-24	89	50	96	69	100	100
<b>PR1</b>	-65	-230	94	84	100	98	99	97
<b>PR2</b>	-18	-210	59	-103	89	41	100	100
<b>PR3</b>	-285	-768	93	81	99	87	98	91
<b>PR4</b>	-56	-488	79	-45	96	86	99	94
<b>SP1</b>	12	-63	96	83	99	96	100	100
<b>SP2</b>	29	-51	99	96	98	96	100	98
<b>SP3</b>	-249	-631	69	-44	100	100	100	100
<b>RJ1</b>	40	-49	94	82	100	98	98	93
<b>RJ2</b>	48	-4	97	92	100	100	100	98
<b>Variação</b>	0-61		59-99		89-100		96-100	

TABELA 2 – PREVALÊNCIA DE CIATOSTOMÍNEOS PRÉ E PÓS-TRATAMENTO OBTIDOS POR COPROCULTURA EM 11 HARAS DE 4 ESTADOS BRASILEIROS.

Porcentagem de larvas pré e pós-tratamento (%)					
Haras	<i>ciatostomíneos</i>	<i>S. vulgaris</i>	<i>S.edentatus</i>	<i>S.equinus</i>	Outras sp.
<b>MG1</b>	88 / 93	5 / 5	3 / 2	0 / 0	4 / 0
<b>MG2</b>	96 / 100	3 / 0	1 / 0	0 / 0	0 / 0
<b>PR1</b>	100 / 100	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
<b>PR2</b>	93 / 99	7 / 1	0 / 0	0 / 0	0 / 0
<b>PR3</b>	76 / 84	5 / 7	7 / 9	0 / 0	12 / 0
<b>PR4</b>	85 / 92	9 / 8	0 / 0	0 / 0	6 / 0
<b>SP1</b>	92 / 94	8 / 6	0 / 0	0 / 0	0 / 0
<b>SP2</b>	100 / 100	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
<b>SP3</b>	91 / 96	4 / 3	2 / 1	3 / 0	0 / 0
<b>RJ1</b>	88 / 94	6 / 4	5 / 2	1 / 0	0 / 0
<b>RJ2</b>	90 / 94	4 / 3	5 / 3	1 / 0	0 / 0

### **3. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR DE CIATOSTOMÍNEOS EM ÁGAR UTILIZANDO IVERMECTINA, MOXIDECTINA, PIRANTEL E ALBENDAZOL.**

#### **Resumo**

Ciatostomíneos são os mais prevalentes nematódeos de equinos, podendo ser encontrado em 100% de potros e na grande maioria dos animais adultos. O controle parasitário é importante para evitar perdas e queda de desempenho destes animais. Ciatostomíneos resistentes a múltiplas drogas tem sido relatado em muitos locais, e a dependência de lactonas macrocíclicas como única classe de drogas que garanta um tratamento eficaz está ocorrendo na maioria dos haras. Com o uso de tratamentos supressivos, a seleção de parasitos resistentes tende a aumentar, e como a detecção da resistência para um composto, seja de forma empírica ou através de testes como o TRCOF, é observada tardiamente, ou seja, quando a resistência já se encontra em altos níveis, torna-se necessário a utilização de testes diagnósticos para uma detecção mais precoce. O objetivo deste estudo foi avaliar os resultados obtidos por meio do teste de inibição da migração de larvas em ágar, utilizando 4 compostos anti-helmíntico, ivermectina, moxidectina, pirantel e albendazol. Os testes foram realizados com cultura de larvas obtidas de 10 diferentes haras, e que tiveram apenas ciatostomíneos na identificação das larvas obtidas por meio de coprocultura. Os resultados mostraram boa sensibilidade na detecção da dose letal 50% ( $DL_{50}$ ) com as lactonas macrocíclicas e pirantel, porém os resultados com albendazol tiveram grande variação e a maioria dos resultados com valores de  $R^2 < 0.90$ , mostraram baixa especificidade do teste para esta droga.



### Abstract

Cyathostomins are the most prevalent nematodes of horses and can be found in 100% of foals and the great majority of adult horses. The parasite control is important to avoid losses and declines in performance. Cyathostomins resistant to multiple drugs has been reported in many countries, and the dependence of macrocyclic lactones as a single class of drug to ensure an effective treatment is occurring in a great number of horse farms. Using suppressive treatment, the resistance selection tends to increase, and as the detection of resistance usually seen later, when the resistance has already been found at high levels, it needs the use of diagnostic tests for an early detection. The objective of this study was to evaluate the results obtained by agar larvae migration inhibition test, using four drugs, ivermectin, moxidectin, pyrantel and albendazole. The testes were performed with larva's obtained by culture of feces of samples from ten different horse farms, and that only cyathostomins were found in the cultures. Results showed good sensitivity in detecting lethal dose 50% to the macrocyclic lactones and pyrantel, but the albendazole results had wide variation and the most results had  $R_2$  values  $< 0.90$ , and showed low specificity of the test for this drug.

### 3.1 Introdução

Ciatostomíneos, também conhecidos como pequenos estrôngilos, são os principais e mais prevalentes helmintos patógenos de equinos (Love et al., 1999). Estão amplamente disseminados, sendo reportado mundialmente a ocorrência, estando a grande maioria dos equinos parasitados por este grupo de parasitos, e os animais mais novos geralmente são mais susceptíveis a um alto grau de infecção (Corning, 2009). A atenção aos pequenos estrôngilos tornou-se maior nas últimas décadas, após um controle intenso dos grandes estrôngilos, que até então eram responsáveis pelos quadros mais graves de cólica parasitária, e com o uso supressivo dos compostos anti-helmínticos, a partir da década de 1960 com os benzimidazóis, a prevalência dos grandes estrôngilos reduziu muito, e desde então, o foco sobre os pequenos estrôngilos aumentou, devido a alta prevalência e a uma capacidade de sobrevivência aos tratamentos antiparasitários (Kaplan, 2002). A resistência anti-helmíntica dos ciatostomíneos frente às principais drogas de controle parasitário representa uma ameaça ao controle destes nematódeos de equinos. A resistência anti-helmíntica foi restrita aos benzimidazóis até a década de 1990, e atualmente está amplamente disseminada e reportada (Drudge e Elam, 1961; Drudge et al., 1963; Drudge e Lyons, 1965; Drudge et al., 1988; Drudge et al., 1991; Tolliver et al., 1993; Samson et al., 2002; Kaplan et al., 2004; Drogemuller et al., 2004; Wirtherle et al., 2004; Lind et al., 2007; Lyons et al., 2007; Molento et al., 2008; Slocombe et al., 2008; Traversa et al., 2009).

Os sais de pirantel ainda possuem boa eficácia sobre os pequenos estrôngilos, porém nas últimas duas décadas tem sido descritos vários relatos de resistência (Chapman et al., 1996; Craven et al., 1998; Coles et al., 1999; Young et al., 1999; Kaplan et al., 2004; Molento et al., 2008; Nielsen, 2009; Traversa et al., 2009). Atualmente a principal classe de drogas utilizada no controle parasitário em equinos são as lactonas macrocíclicas. Ivermectina e moxidectina possuem alta eficácia sobre os ciatostomíneos, eliminando formas maduras e

imaturas do lúmen intestinal, e ainda as larvas encistadas na mucosa com o uso de moxidectina (Kaplan, 2002). Relatos de pequenos estrôngilos resistentes as LM's foram reportados nos últimos anos (Trawford et al., 2005; Molento et al., 2008; Traversa et al., 2009), que, apesar de serem poucos, geram muita preocupação, pois são as drogas que possuem a melhor eficácia no controle destes nematóides, e caso a resistência a estas drogas avance, o controle parasitário de equinos poderá estar ameaçado, já que não existem no mercado novos produtos antiparasitários.

O monitoramento da eficácia das bases químicas é fundamental para um programa de controle parasitário na propriedade, mas infelizmente são pouco realizados por proprietários de cavalos. Raras são as propriedades que realizam tal monitoramento, e geralmente quando a utilizam estão ligadas a pesquisas científicas, não existindo o interesse de saber a real eficácia dos medicamentos na propriedade. Apenas quando o tratamento começa a falhar, ou seja, quando a eficácia da droga na propriedade já está reduzida, e a resistência já esta ocorrendo em níveis consideráveis, é que o interesse em testes e alternativas de controle é despertado em proprietários e responsáveis pelo manejo sanitário. A maior dificuldade na realização dos testes de eficácia baseia-se na dificuldade e custos de execução, pois o único teste prático a nível de campo é o teste de redução na contagem de ovos nas fezes (TRCOF), no entanto não existe padrão para o desenho de estudo, análise dos dados ou interpretação dos dados para o TRCOF, conseqüentemente não existe um padrão para diagnóstico de resistência (Kaplan, 2008). Ainda existe as variações que a análise de OPG pode gerar, como a eliminação de ovos pelas fêmeas não é suficiente para correlacionar com a carga parasitária real, a distribuição não uniforme de ovos nas amostras de fezes, e a distribuição variável de parasitos nas populações de hospedeiros (Eysker e Ploeger, 2000; Vidyashankar et al., 2007). Porém é possível minimizar tais variações fazendo grupos de tratamentos e ajustando as médias de tratamento do grupo, desta forma o TRCOF pode ser uma ferramenta para estimar a eficácia

das drogas na propriedade e a presença de resistência anti-helmíntica, levando em consideração o percentual de redução e o intervalo de confiança para cada droga testada (Dargatz *et al.*, 2000; Kaplan, 2008). Outro ponto importante é que o TRCOF detecta a resistência tardiamente, ou seja, quando mais de 25% da população parasitaria já carrega alelos da resistência (Martin *et al.*, 1989). Devido a esta variedade de fatores, têm sido buscado o desenvolvimento e padronização de novos métodos para o diagnóstico de resistência, que possam detectar precocemente este fenômeno, e que sejam de fácil aplicabilidade.

Testes *in vitro* como o teste de eclodibilidade de ovos, teste de desenvolvimento larval e o teste de inibição da migração de larvas são ferramentas que podem auxiliar no diagnóstico da resistência contra os compostos antiparasitários. Testes *in vitro* têm sido utilizados principalmente em nematóides de ruminantes, especialmente de ovinos, que são os hospedeiros que apresentam helmintos com maior índice de resistência múltipla às drogas (Gill *et al.*, 1995; Várady e Corba, 1999), e também foram testados e utilizados nos demais ruminantes domésticos (Demeler *et al.*, 2010a; Demeler *et al.*, 2010b). Porém com nematóides de equinos, existem poucos estudos mostrando a utilização de métodos *in vitro* auxiliando no diagnóstico de resistência, e com o avanço da resistência perante outras classes de drogas como as LM's, torna-se fundamental a padronização de testes e resultados para auxiliar na detecção precoce da resistência.

O objetivo deste estudo foi avaliar o teste de inibição da migração de larvas em ágar como ferramenta para o diagnóstico de resistência em ciatostomíneos contra as principais drogas de uso em equinos.

## **3.2 Material e métodos**

### **3.2.1 Amostras utilizadas e padronização do teste**

As larvas de terceiro estágio (L3) utilizadas nos testes foram obtidas através de coproculturas com amostras de fezes provenientes de 10 diferentes haras do estado do Paraná, São Paulo e Rio de Janeiro. Para triagem das amostras de fezes foram realizados testes de OPG, e as amostras com resultado positivo para estrombilídeos foram acondicionadas em um recipiente de vidro para cada hara, mantidas em estufa com temperatura controlada a 28°C, umidade de 70%, durante 8 dias. Após este período as larvas foram recuperadas utilizando o método de Baerman, e identificadas de acordo com as chaves descritas por Bevilaqua et al. (1993). Somente as coproculturas que tiveram 100% de ciatostomíneos identificados foram utilizados nos testes. As amostras não foram testadas anteriormente para detecção de resistência para as drogas utilizadas neste experimento.

Os compostos testados foram: ivermetina, moxidectina, pamoato de pirantel e albendazol. Cada droga foi testada em 7 diferentes concentrações, e cada concentração foi testada em triplicata. Para cada teste, um controle positivo sem a presença de algum composto, foi realizado em triplicata, acondicionado em placa de cultura separada. As concentrações foram preparadas dissolvendo o volume corresponde à concentração desejada de cada droga em DMSO (volume final de 5%) e água destilada. As larvas foram desembainhadas previamente com 0,3% de hipoclorito de sódio antes de serem acondicionadas juntamente às drogas. Os compostos dissolvidos foram acondicionados em placas de cultura de 24 poços (Fig.9). Em cada poço foi adicionado 400 larvas infectantes e a droga dissolvida juntamente com DMSO e água destilada o suficiente para completar 1 ml. Um controle positivo foi realizado para cada teste, em placa separada, contendo apenas água destilada, DMSO e larvas. Na seqüência as placas foram incubadas em estufa com temperatura controlada de 28°C durante 6 horas, após este período em cada poço foi adicionado 1 ml de agar gel a temperatura média de 40°C, e na seqüência o volume de 2 ml de cada poço foi transferido para o interior de anéis de PVC preparados previamente dentro de

uma placa de petri, com 20 ml de água destilada congelada, duas malhas de plástico com medidas de 100 e 50  $\mu\text{m}$  sobrepostas sob o anel de PVC, no centro da placa de petri (Fig. 10). Após transferir o volume de 2 ml com as larvas, droga dissolvida e ágar gel para as placas de petri, uma para cada poço, estas permaneceram incubadas em estufa a 28°C por mais 18 horas, durante este período uma lâmpada incandescente de 60 watts ficou ligada 30 centímetros abaixo das placas de petri, para estimular a migração das larvas (Fig. 11).

Ao fim das 18 horas de incubação, as malhas e o anel de PVC foram removidos da placa de petri, e a água remanescente transferida para tubos Falcon, que foram centrifugados e o sobrenadante removido até ficar o volume final de 10 ml, após os tubos foram agitados em vórtex para homogeneização, e 3 alíquotas de 1 ml de cada tubo foram aspiradas e transferidas para microtubos de 1,5 ml. Os microtubos foram centrifugados e o volume de 150  $\mu\text{l}$  do fundo do microtubo foi aspirado e analisado em microscópio, para contagem das larvas. A quantidade de larvas encontradas em cada microtubo foi multiplicado pelo fator 10, correspondente a fração de amostra pipetada do tubo falcon.

### **3.2.2 Análise Estatística**

Os dados obtidos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism®. A curva de dose-resposta foi gerada por meio de regressão não linear e os dados foram transformados em logaritmos. Foram obtidos os valores da concentração de eficácia 50% ( $CE_{50}$ ), intervalo de confiança de 95% e  $R^2$ . Os testes que apresentaram migração maior que 90% para o grupo controle foram incluídos para análise e valores de  $R^2$  abaixo de 0.90 foram considerados de baixa significância.

### **3.3 Resultados**

Os resultados dos testes realizados com albendazol teve ampla diferença da  $DL_{50}$ , variando de 3 nMol a 20 nMol entre as cinco amostras testadas e três testes tiveram valores de  $R^2 < 0.90$ . Pirantel teve uma variação de 2,4 a 11,4 nMol para atingir a  $DL_{50}$ , porém todos os testes tiveram  $R^2 > 0.90$ . Ivermectina e moxidectina tiveram uma menor variação e valores mais próximos da  $DL_{50}$  entre os testes, variando de 0,43 a 0,57 nMol e 0,4 a 1,2 nM, e somente um teste de ivermectina teve  $R^2 < 0.90$ . Os valores da  $DL_{50}$  e  $R^2$  para cada fármaco está apresentado na tabela 3.

As figuras 12 a 15 mostram os gráficos com as curvas dose-resposta para cada droga testada com as respectivas 5 amostras de larvas. A tabela 3 mostra os valores de  $DL_{50}$  e  $R^2$  de cada droga testada.

### 3.4 Discussão

Devido a atual situação de aumento da resistência anti-helmíntica contra as principais drogas mais comumente utilizadas, torna-se necessário a padronização e utilização de testes com boa sensibilidade e aplicabilidade para diagnóstico da resistência em helmintos de importância veterinária (Kaplan, 2004). Testes *in vitro* capazes de detectar a resistência parasitária tem sido descritos nos últimos anos e estão sendo testados em diferentes laboratórios distribuídos em diversos países. O teste de eclodibilidade de ovos foi testado para ser utilizado na rotina diagnóstica da resistência, e resultados satisfatórios foram obtidos testando benzimidazóis, enquanto as LM's não tiveram bom resultado, por não apresentar atividade ovicida (Samson-Himmelstjerna et al, 2009). Os testes *in vitro* são alternativas mais econômicas comparadas aos testes *in vivo*, com possibilidade de testar uma ampla variação de concentração dos fármacos. A vitalidade em forma de desenvolvimento, motilidade ou comportamento de migração é mensurado e usado para gerar valores dose-resposta. Desta

forma tais testes podem ser excelentes ferramentas para detectar a resistência anti-helmíntica em níveis baixos e tão cedo quanto possível, ainda podendo revelar quais drogas ainda possuem eficácia contra determinadas populações parasitárias (Demeler et al, 2010b).

O teste de inibição da migração larval foi padronizado anteriormente para detecção da resistência em nematóides de ruminantes, testando amostras susceptíveis e resistentes as LM's (Demeler et al, 2010a). O objetivo principal do teste é determinar o efeito, via impedimento da motilidade, de produtos antiparasitários em larvas de terceiro estágio e o resultado permite discutir o estado de tolerância para determinado produto (Chagas et al., 2011). Os resultados destes testes utilizando isolados de *Haemonchus contortus* susceptíveis e resistentes à ivermectina mostrou grande diferença na DL<sub>50</sub> destas amostras, necessitando de uma concentração oito vezes maiores para alcançar a DL<sub>50</sub> dos isolados resistentes em relação aos susceptíveis nesta espécie de nematóide. Neste mesmo estudo comparou amostras de *Cooperia oncophora* susceptíveis e resistentes a ivermectina, e também foi necessário uma concentração oito vezes maior para atingir a DL<sub>50</sub> nas amostras resistentes.

A resistência as LM's em ciatostomíneos possuem uma menor ocorrência comparado com os nematóides de ruminantes, especialmente de ovinos. Os dados obtidos com as lactonas macrocíclicas neste estudo mostrou que uma baixa concentração destas drogas foram suficiente para inibir a migração de 50 % das larvas de cada teste, e ainda uma baixa variabilidade ocorreu entre as amostras testadas com ivermectina e moxidectina, sugerindo com estes resultados a boa aplicabilidade que o teste pode representar para a detecção da resistência às lactonas em ciatostomíneos. Robinson et al. (2008) também relataram inibição da migração de larvas com baixas concentrações de ivermectina e moxidectina com populações de ciatostomíneos susceptíveis. As lactonas macrocíclicas agem na atividade faríngea, paralisando os músculos que controlam a faringe, além de causar paralisia somática da musculatura, que inibe a motilidade dos nematóides (Gill et al., 1995). Isso indica



que o teste de migração de larvas pode oferecer uma noção do estado da resistência a esse grupo químico (Chagas et al., 2011). O teste de migração de larvas permite a observação de larvas aptas a atravessar uma malha (Rabel et al., 1994) e o uso associado com ágar gel como barreira torna-se muito eficiente na detecção da resistência às LM's (D'Assonville et al., 1996).

Os resultados encontrados nos testes com albendazol tiveram uma grande variação na concentração de eficácia sobre 50% das larvas, e não foi possível obter um padrão para determinação da  $DL_{50}$  no teste de inibição da migração de larvas em ágar. Analisando o objetivo do teste e a forma com que a inibição da migração ocorre, ou seja, as larvas infectantes L3 utilizadas no teste não precisam se alimentar e portanto a ação do teste ocorre por efeito da paralisia imediata da musculatura corporal das larvas, deste modo o teste de inibição da migração é uma boa ferramenta para detectar resistência contra as lactonas macrocíclicas, mas não contra benzimidazóis, devido ao mecanismo de ação esperado da droga (Rothwell e Sangster, 1993). Testes com tiabendazol mostraram que possui pouca ou nenhuma influencia sobre musculatura somática em larvas de terceiro estágio de ruminantes, *Cooperia e Ostertagia*, demonstrando a falta de um efeito inibitório sobre a migração de larvas, mesmo em concentrações mais elevadas de tiabendazol, sendo considerado inadequado para a detecção da resistência através deste teste (Demeler et al, 2010b). Neste estudo os resultados da inibição da migração com albendazol não manifestaram um padrão de resultado e mesmo em concentrações muito elevadas não impediram a migração das larvas. Desta forma, testes in vitro mais adequados para a detecção de resistência contra os benzimidazóis é o teste de eclodibilidade de ovos (Samson-Himmelstjerna et al., 2009) e o teste de desenvolvimento larval (Tandon e Kaplan, 2004).

Os resultados dos testes com pirantel mostrou uma  $DL_{50}$  de 2,4 a 11,4 nMol em populações de ciatostomíneos susceptíveis. Em todos os testes o  $R^2$  foi superior a 0,90. Os

resultados mostraram uma boa aplicabilidade do teste com o pirantel. A ação nicotínica sobre a junção neuromuscular causando a paralisia espástica pode ser uma das hipóteses dos resultados relatados, porém outros testes serão necessários para estabelecer um parâmetro comparativo do teste de migração em ágar com esta droga, assim como parâmetros em populações resistentes.

### **3.5 Conclusão**

O teste de inibição da migração de larvas pode ser uma boa ferramenta para detecção da resistência anti-helmíntica em ciatostomíneos frente as lactonas macrocíclicas, porém os valores de referência para o teste precisam de um maior refinamento e o estabelecimento de parâmetros sugestivos de resistência estabelecidos com populações de ciatostomíneos resistentes à ivermectina e moxidectina, sendo portanto novos estudos necessários para esta definição. Os resultados encontrados utilizando benzimidazol neste estudo e relatados por outros autores mostraram que o teste de inibição da migração de larvas não serve de parâmetro para detecção da resistência anti-helmíntica aos benzimidazóis. Os resultados dos testes com pirantel mostraram uma possível aplicabilidade para detecção da resistência, porém novos testes para refinar os parâmetros serão necessários.

## REFERÊNCIAS

- BEVILAQUA, C.M.L.; RODRIGUES, M. L.; CONCORDET, D. Identification of infective larvae of some common nematode strongylids of horses. *Revue de Medicine Veterinaire*, v.12, p.989-995, 1993.
- CHAGAS, A.C.S.; NICIURA, S.C.M.; MOLENTO, M.B. Manual prático: Metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes. *Embrapa Informação Tecnológica*. v.1, p.40-46, 2011.
- CHAPMAN, M.R.; FRENCH, D.D.; MONAHAN, C.M.; KLEI, T.R. Identification and characterization of a pirantel pamoate resistant cyathostome population. *Veterinary Parasitology*. 66: 205-212, 1996.
- COLES, G.C.; BROWN, S.N.; TREMBATH, C.M. Pyrantel-resistant large strongyles in racehorses. *Vet. Rec.* v. 145, p. 408, 1999.
- CORNING S. Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. *Parasites & Vectors*, 2 Suppl 2:S1, 2009.
- CRAVEN, J.; BJORN, H.; HENRIKSEN, S.A.; NANSEN, P.; LARSEN, M.; LENDAL, S. Survey of anthelmintic resistance on Danish horse farms, using 5 different methods of calculating faecal egg count reduction. *Equine Vet. J.* v. 30, p. 289-293, 1998.
- D'ASSONVILLE, J.A.; JANOVSKY, E.; VERSLEY, A. In vitro screening of *Haemonchus contortus* third stage larval for ivermectin resistance. *Vet. Parasitol.* v. 61, p. 73-80, 1996.
- DARGATZ, D.A.; TRAUB-DARGATZ, J.L.; SANGSTER, N.C. Antimicrobial and anthelmintic resistance. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* v.16, p. 515-536, 2000.
- DEMELER, J.; KÜTTLER, U.; EL-ABDELLATIC, A.; STAFFORD, K.; RYDZIKE, A.; VARADY, M.; KENYON, F.; COLES, G.; HÖGLUND, J.; JACKSON, F.; VERCRUYSSSE, J.; SAMSON HIMMELSTJERNA, G.von. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. *Vet. Parasitol.* v. 174, p. 58-64, 2010a.
- DEMELER, J.; KÜTTLER, U.; SAMSON HIMMELSTJERNA, G.von. Adaptation and evaluation of three different in vitro tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle. v. 170, p. 61-70, 2010b.
- DROGEMULLER, M.; KLAUS, F.; SCHNIEDER, T.; SANSOM-HIMMELSTJERNA. Effect of repeated benzimidazole treatments with increasing dosages on the phenotype of resistance and the beta-tubulin codon 200 genotype distribution in a benzimidazole-resistant cyathostomin population. *Veterinary Parasitology*, v.123, p.201-213, 2004.
- DRUDGE, J.H.; ELAM, G. Preliminary observations on the resistance of horse strongyles to phenothiazine. *J. Parasitol.* 47, 38-39, 1961.
- DRUDGE J.H.; SZANTO J.; WYANT Z.N.; ELAM G. Critical tests of thiabendazole as an anthelmintic in the horse. *Am J Vet Res.* 24:1217-1222, 1963.
- DRUDGE J.H.; LYONS E.T. Newer developments in helminth control and *Strongylus vulgaris* research. Proc. 11 th Ann. Mtg. AAEP, Miami Beach, FL, p. 381-389, 1965.
- DRUDGE, J.H. Benzimidazole resistance of equine strongyles. *Equine Vet. J.* v. 20, p. 146-147, 1988.

- DRUDGE, J.H.; LYONS, E.T.; TOLLIVER, S.C. Resistance of population-B equine strongyles to thiabendazole, oxfendazole, and phenothiazine (1981 to 1987). *Am. J. Vet. Res.* v. 52, p. 1308-1312, 1991.
- EYSKER, M.; PLOEGER, H.W. Value of present diagnostic methods for gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Parasitology*. v.120, S109-S119, 2000.
- GILL, J.H. REDWIN, J.M.; VANWYK, J.A.; LACEY, E. Avermectin inhibition of larval development *Haemonchus contortus* – effects of ivermectin resistance. *Int. J. Parasitol.* v.25, p. 463-470, 1995.
- KAPLAN, R.M. Anthelmintic resistance in nematodes of horses. *Veterinary Research*. v.33, p.491–507, 2002.
- KAPLAN, R.M.; KLEI, T.K.; LYONS, E.T. Prevalence of anthelmintic resistant cyathostomes on horse farms. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 225, p. 903-910, 2004.
- KAPLAN, R.M. Biological considerations in evaluating drug efficacy and resistance in equine strongyle parasites using fecal egg count data. In: *Proceedings International Equine Parasite Drug Resistance Workshop*. University of Copenhagen, Denmark.p.14-15, 2008.
- LIND, E.O.; UGGLA, A.; PETER, W.; HÖGLUND, J. Larval development assay for detection of anthelmintic resistance in cyathostomins of Swedish horses. *Veterinary Parasitology*. V.128, p. 261-269, 2005.
- LIND, E.O.; KUZMINA, T.; UGGLA, A.; WALLER, P.J.; HÖGLUND, J. A field study on the effect of some anthelmintics on cyathostomins of horses in Sweden. *Vet. Res. Commun.* v.31, p. 53-65, 2007.
- LOVE, S.; MURPHY, D.; MELLOR, D. Pathogenicity of cyathostome infection. *Veterinary Parasitology*. V.31, p.113–122, 1999.
- LUZ-PEREIRA, A.B.; CAVICHIOLL, J.H.; GUIMARAES, J.S.; BATINSTON, A.; GUSMAO, R.A.M. Eficácia a campo do mebendazole, oxibendazole, pamoato de pirantel e doramectin contra pequenos strongilídeos (Cyathostominae) de equinos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* v. 3, p. 93-97, 1994.
- LYONS, E.T.; TOLLIVER, S.C.; COLLINS, S.S. Study (1991 to 2001) of drug-resistant Population B small strongyles in critical tests in horses in Kentucky at the termination of a 40-year investigation. *Parasitology Research*, v.101, p.689-701, 2007.
- MARTIN, P.J.; ANDERSON, N.; JARRET, R.G. Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and in vitro assays. *Australian Vet. J.* v.66, p. 236-240, 1989.
- MOLENTO, M.B.; ANTUNES, J.; BENTES, R.N.; COLES, G.C. Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. *Veterinary Records*, v.162(12), p.384-5, 2008.
- NIELSEN, M.K. Restrictions of anthelmintic usage: perspectives and potential consequences. *Parasites & Vectors*, 2(Suppl 2):S7, doi:10.1186/1756-3305-2-S2-S7, 2009.
- RABEL, B.; MCGREGOR, R.; DOUCH, P.G.C. Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. *Int. J. Parasitol.* v.24, p.671-676, 1994.
- ROBINSON, A.; McARTHUR, C.; BURDEN, F.; GOSS, L.; TRAWFORD, A.; JACKSON, F.; MATTHEWS, J.B. Use of the larval migration inhibition assay to investigate suspected macrocyclic lactone resistant cyathostomin populations. In: *Proceedings International Equine Parasite Drug Resistance Workshop*. University of Copenhagen, Denmark.p.24, 2008.

ROTHWELL, J.T.; SANGSTER, N.C. An in vitro assay utilizing parasitic larval *Haemonchus contortus* to detect resistance to closantel and other anthelmintics. *Int. J. Parasitol.* v. 23, p. 573-578, 1993.

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G; von WITZENDORFF, C.; SIEVERS, G.; SCHNIEDER, T. Comparative use of faecal egg count reduction test, egg hatch assay and beta-tubulin codon 200 genotyping in small strongyles (cyathostominae) before and after benzimidazole treatment. *Veterinary Parasitology*, v.108, n.3, p.227-235, 2002.

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. von; COLES, G.C.; JACKSON, F.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F.; CIRAK, V.Y.; DEMELER, J.; DONNAN, A.; DORNY, P.; EPE, C.; HARDER, A.; HÖGLUND, J.; KAMINSKY, R.; KERBOEUF, D.; KÜTTLER, U.; PAPADOPOULOS, E.; POSEDI, J.; SMALL, J.; VARADY, M.; CERCRUYSSSE, J.; WIRTHERLE, N. Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. *Parasitol. Res.* V.105, p. 825-834, 2009.

SLOCOMBE, J.O.D.; COTÉ, J.F.; GANNES, R.V.G. The persistence of benzimidazole-resistant cyathostomes on horse farms in Ontario over 10 years and the effectiveness of ivermectin and moxidectin against these resistant strains. *Can. Vet. Journal.* V. 49, p. 56-60, 2008.

TANDON, R.; KAPLAN, R.M. Evaluation of a larval development assay (DrenchRite) for the detection of anthelmintic resistance in cyathostomin nematodes of horses. *Vet. Parasitol.* v. 121, p.125-142, 2004.

TOLLIVER, S.C.; LYONS, E.T.; DRUDGE, J.H.; STAMPER, S.; GRANSTROM, D.E. Critical tests of thiabendazole, oxibendazole, and oxfendazole for drug resistance of population-B equine small strongyles (1989 and 1990). *Am. J. Vet. Res.* v. 54, p. 908-913, 1993.

TRAVERSA, D.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.V.; JANINA, D.; PIERMARINO, M.; SCHÜRMAN, S.; BARNES, H.; OTRANTO, D.; PERRUCCI, S.; REGALBONO, A.F.; PAOLA, B.; BOECKH, A.; COBB, R. Anthelmintic resistance in cyathostomin populations from horse yards in Italy, United Kingdom and Germany. *Parasites & Vectors.* Suppl 2: S2, 2009.

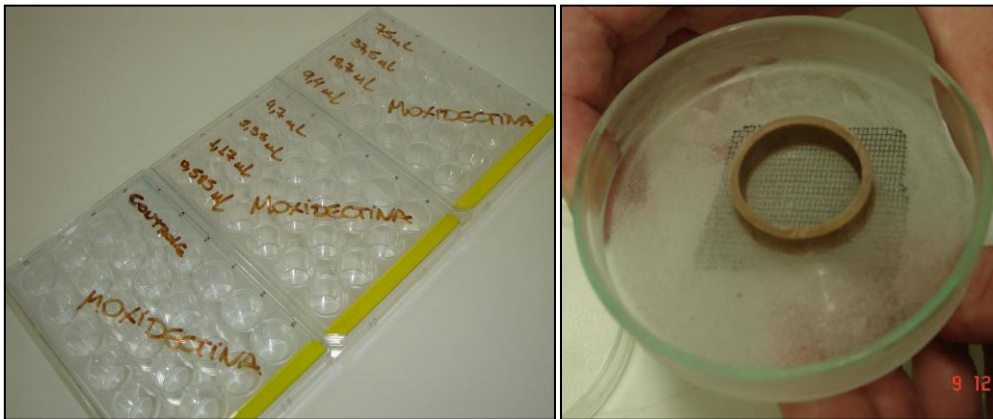
TRAWFORD, A.F.; BURDEN, F.A.; HODGKINSON, J. Suspected moxidectin resistance in cyathostomes in two donkey herds at The Donkey Sanctuary, UK. *Proceedings 20th International Conference World, Association for Advanced Veterinary Parasitology*, 20:196, 2005.

VARADY, M.; CORBA, J. Comparison of six in vitro tests in determining benzimidazole and levamisole resistance in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* in sheep. *Vet. Parasitol.* v. 80, p. 239-249, 1999.

VIDYASHANKAR, A.N.; KAPLAN, R.M.; CHAN, S. Statistical approach to measure the efficacy of anthelmintic treatment on horse farms. *Parasitology.* v.134, p.2027-2039, 2007.

WIRTHERLE, N.; SCHNIEDER, T. SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. von. Prevalence of benzimidazole resistance on horse farms in Germany. *Vet. Rec.* v. 154, p. 39-41, 2004.

YOUNG, K.E., GARZA, V., SNOWDEN, K., DOBSON, R., POWELL, D., CRAIG, T.M. Parasite diversity and anthelmintic resistance in two herds of horses. *Veterinary Parasitology.* 85: 205–214, 1999.



FIGURAS 9 E 10 - PLACAS DE 24 POÇOS E PLACA DE PETRI UTILIZADAS NOS TESTES DE MIGRAÇÃO EM ÁGAR.  
 FONTE: FERNANDO KLOSTER / RICARDO CANEVER.



FIGURA 11 - TESTE ACONDICIONADO EM PLACAS DE PETRI E INCUBADO EM ESTUFA B.O.D.  
 FONTE: FERNANDO KLOSTER.

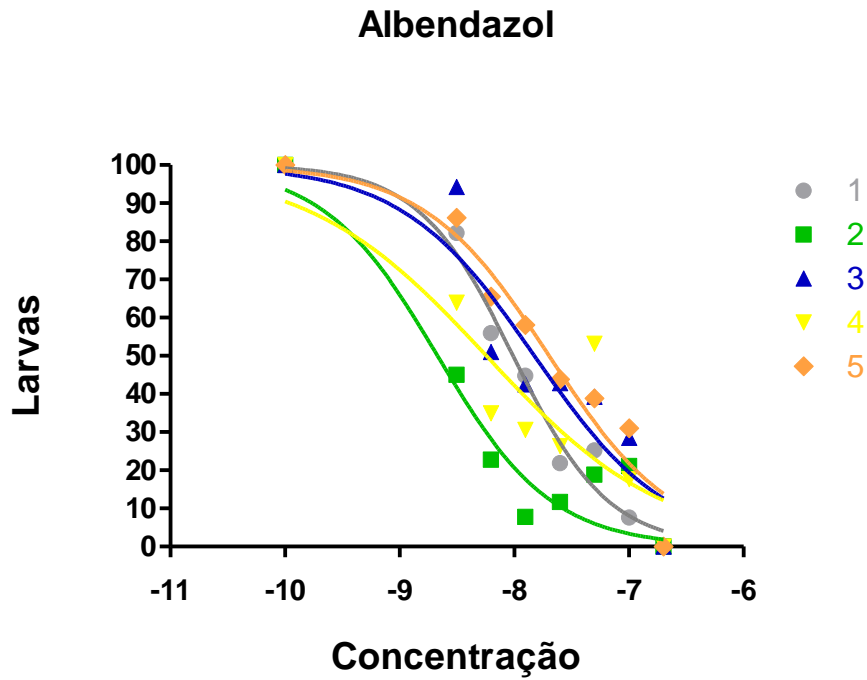


FIGURA 12 - CURVA DOSE-RESPOSTA APRESENTADA PARA O ALBENDAZOL COM AS RESPECTIVAS 5 AMOSTRAS TESTADAS.

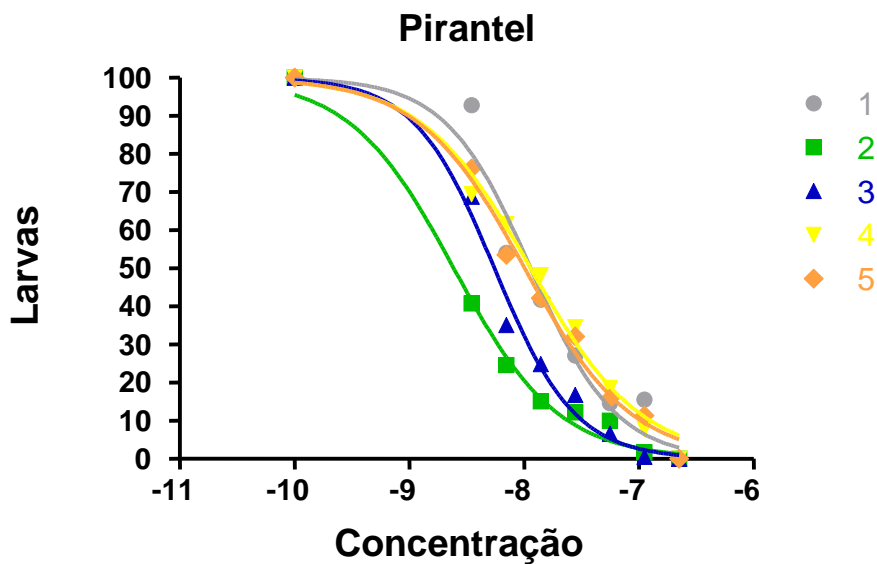


FIGURA 13 - CURVA DOSE-RESPOSTA APRESENTADA PARA O PIRANTEL COM AS RESPECTIVAS 5 AMOSTRAS TESTADAS.

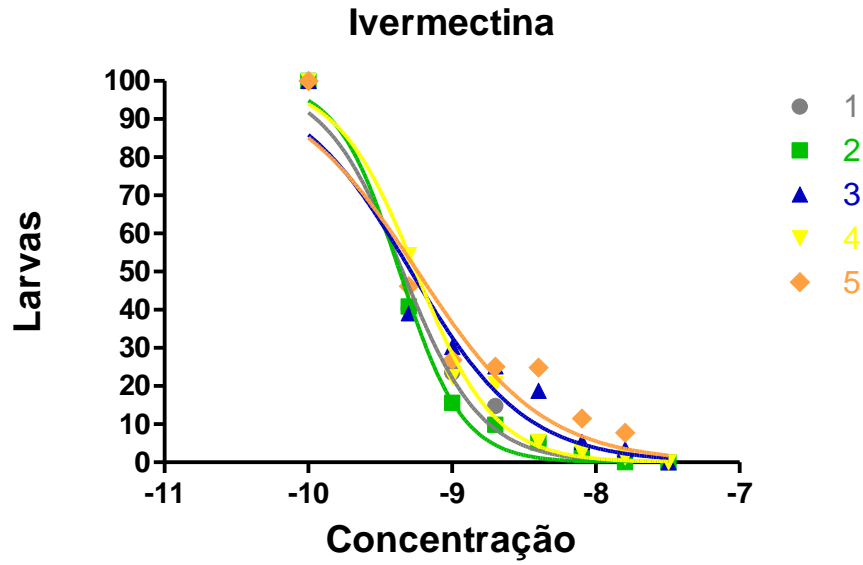


FIGURA 14 - CURVA DOSE-RESPOSTA APRESENTADA PARA A IVERMECTINA COM AS RESPECTIVAS 5 AMOSTRAS TESTADAS.

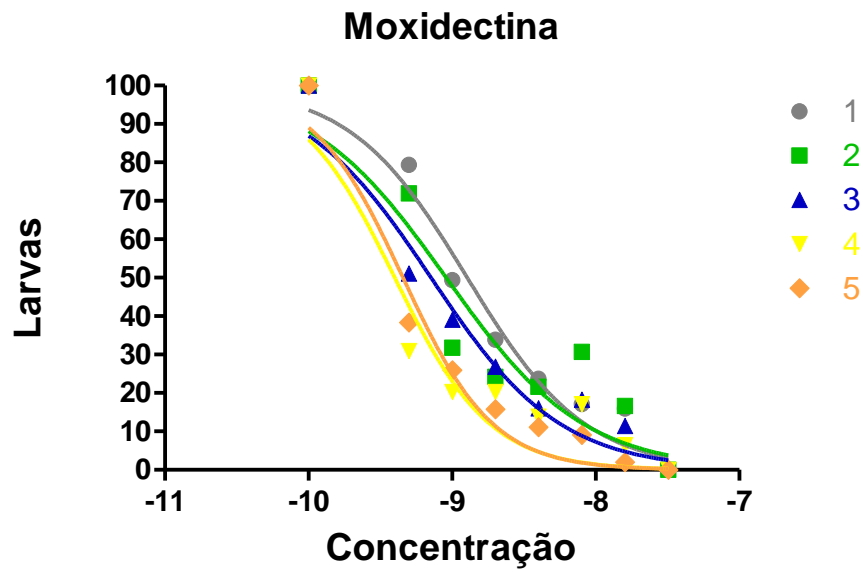




FIGURA 15 - CURVA DOSE-RESPOSTA APRESENTADA PARA A MOXIDECTINA COM AS RESPECTIVAS 5 AMOSTRAS TESTADAS.

TABELA 3 – DL<sub>50</sub> (VALORES EXPRESSOS EM NMOL) E R<sup>2</sup> DO ALBENDAZOL, PIRANTEL, IVERMECTINA E MOXIDECTINA DAS CINCO AMOSTRAS DE LARVAS TESTADAS.

DROGAS	AMOSTRAS				
	1	2	3	4	5
<b>Albendazol</b>	9,7	2,1	14,9	5,7	20,1
<b>R<sup>2</sup></b>	0.97	0.81	0.82	0.69	0.90
<b>Pirantel</b>	11,4	2,4	5,5	11,4	10,1
<b>R<sup>2</sup></b>	0.94	0.97	0.96	0.94	0.98
<b>Ivermectina</b>	0,45	0,43	0,52	0,56	0,57
<b>R<sup>2</sup></b>	0.97	0.97	0.92	0.95	0.90
<b>Moxidectina</b>	1,2	0,9	0,71	0,40	0,45
<b>R<sup>2</sup></b>	0.95	0.85	0.93	0.90	0.95

#### **4. ANÁLISE MOLECULAR DO POLIMORFISMO DOS ALELOS 167 E 200 DO GENE B-TUBULINA EM ADULTOS E LARVAS DE CIATOSTOMÍNEOS.**

##### **Resumo**

Ciatostomíneos são conhecidos atualmente como os principais parasitas de equídeos, com grande prevalência nos haras e fazendas de criação de equinos, podendo ser encontrados na grande maioria dos animais em pastejo. Ciatostomíneos resistentes aos benzimidazóis estão amplamente disseminados e foram relatados em vários países. Apesar de fazer mais de cinco décadas desde o início do uso dos benzimidazóis e primeiros relatos de resistência a esta classe, os mecanismos moleculares de resistência aos benzimidazóis ainda não foram completamente elucidados, e até o momento o principal mecanismo encontrado refere-se as mutações encontradas no gene  $\beta$ -tubulina dos indivíduos resistentes em relação aos indivíduos susceptíveis. O objetivo deste estudo foi avaliar o polimorfismo em larvas e adultos de ciatostomíneos nos códons 167 e 200 do gene  $\beta$ -tubulina. Foi encontrado maior ocorrência de heterozigosidade no códon 167 em relação ao códon 200 em adultos e larvas de ciatostomíneos. Nenhum indivíduo homocigoto resistente foi encontrado neste estudo. Os resultados coincidem com outros autores que encontraram maior índice de mutação no códon 167, que pode sugerir como o principal mecanismo de resistência aos benzimidazóis.

Palavras chave: Pequenos estrôngilos, resistência parasitária, diagnóstico molecular.

### **Abstract**

Cyathostomins are known today as the main parasites of horses, with a high prevalence in horse farms. Cyathostomins resistant to benzimidazole are widely disseminated and were reported in several countries. Despite making more than five decades since the beginning of the use of benzimidazole and first reports of resistance, the molecular mechanisms of benzimidazole resistance has not been fully elucidated, and so far, the main mechanism found refers to the mutations found in the  $\beta$ -tubulin gene of resistant and susceptible individuals. The objective of this study was to evaluate the polymorphism in larvae and adults of cyathostome in codon 167 and 200  $\beta$ -tubulin gene. We found a higher incidence of heterozygosity at codon 167 to codon 200 at codon 167 and 200 in adults and larvae. No individuals homozygous resistant strain was found in this study. The results agree with other authors who found a higher rate of mutations at codon 167, which may suggest the main mechanism of resistance to benzimidazoles.

**Keywords:** Cyathostomins, anthelmintic resistance, molecular diagnosis

## 4.1 Introdução

Ciatostomíneos são os mais prevalentes parasitos de equinos, estando presentes na maioria dos cavalos. Este complexo grupo de nematódeos é composto por mais de 50 espécies, porém aproximadamente 10 espécies estão comumente presentes nos animais parasitados (Lyons et al., 1996). Os ciatostomíneos possuem ciclo de vida direto e os animais se infectam após ingestão de larvas infectantes (L<sub>3</sub>), que irão passar um período na mucosa intestinal, evoluindo para L<sub>4</sub> e L<sub>5</sub> e no lúmen intestinal evoluem para jovens imaturos e posteriormente adultos (Love et al., 1999). O dano mais grave causado por este grupo de parasitos ocorre quando milhares de larvas que estão encistadas na mucosa intestinal emergem através da mucosa intestinal para a luz do órgão, conhecido como síndrome de migração larval, ocasionando uma enterite catarral e consequentemente quadros de cólica, diarreia, perda de peso, podendo evoluir para o óbito em até 50% dos animais (Giles et al., 1985).

A atenção ao grupo dos pequenos estrôngilos aumentou muito após o controle e redução da prevalência dos grandes estrôngilos com o uso dos anti-helmínticos modernos e de amplo espectro, que ocorreu após a introdução dos benzimidazóis no mercado e o tratamento intensivo dos animais (Kaplan, 2002). O controle epidemiológico dos ciatostomíneos é difícil devido à presença de várias espécies, a habilidade da larva de entrar em hipobiose na mucosa intestinal e devido ao aumento dos níveis de resistência anti-helmíntica (Lichtenfels et al., 1998; Lake et al., 2004, Molento et al. 2008).

A resistência anti-helmíntica aos benzimidazóis está amplamente disseminada na maioria dos nematódeos dos animais domésticos, e em muitos países mais de 90% das propriedades estudadas apresentaram sinais de resistência (Kaplan et al., 2004). Ciatostomíneos resistentes aos benzimidazóis foram relatados desde a década de 60', e

algumas drogas desta classe como o fenbendazol, possui pouca ou nenhuma eficácia em muitos lugares (Drudge et al., 1963; Drudge e Lyons, 1965; Lyons et al., 1999; Kaplan, 2002; Lyons et al., 2007, Molento et al., 2008; Traversa et al., 2009).

Parasitas resistentes já estão presentes em uma população desde a introdução do primeiro tratamento com a droga, porém em números muito reduzidos em proporção à quantidade de indivíduos, e o tratamento intensivo favoreceu a seleção e propagação destes indivíduos por seleção genética. O aumento e a disseminação da resistência nesses nematódeos se deve ao uso intensivo e contínuo das drogas antiparasitárias, que favoreceram a seleção de organismos resistentes, ou seja, ocorreu uma seleção genética de parasitos que apresentavam genes que favorecem a resistência e impedem a atuação da droga nestes indivíduos (Molento, 2005).

O diagnóstico atualizado da eficácia dos produtos é fundamental para um controle parasitário eficaz. O teste de redução na contagem de ovos nas fezes (TRCOF) é uma boa ferramenta para detecção fenotípica, porém é laborioso e demorado, além de detectar apenas quando mais de 50% da população já possui alelos resistentes (Martin et al., 1989), porém não permite a quantificação de indivíduos resistentes. Testes moleculares capazes de detectar alelos específicos para a resistência a partir de DNA isolados de amostras de parasitos pode melhorar a sensibilidade de detecção e ser uma boa ferramenta para diagnóstico rápido e precoce da resistência (Samson-Himmelstjerna e Blackhall, 2005).

Apesar de fazer mais de 50 anos desde os primeiros relatos de ciatostomíneos benzimidazóis resistentes, os estudos para determinar os mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência continuam avançando e até o momento os dados encontrados refletem sobre alterações na estrutura primária da  $\beta$ -tubulina (Kaplan, 2002; Lake et al., 2009). Acredita-se que o principal mecanismo de resistência aos benzimidazóis envolve o

modo de ação das drogas, quando o benzimidazol liga-se com alta afinidade à  $\beta$ -tubulina, que é um componente dos microtúbulos, em vários organismos (Blackhall et al., 2006; Lubega e Prichard, 1990). A diminuição do efeito dos benzimidazóis sobre os microtúbulos foi associado à diminuição da ligação de alta afinidade dos benzimidazóis com a  $\beta$ -tubulina (Lubega e Prichard, 1991). Portanto, uma alteração na proteína alvo que resulta em uma redução na ligação dos benzimidazóis parece ser o mecanismo de resistência em nematódeos (Blackhall et al., 2006). Especificamente, mutações pontuais no gene  $\beta$ -tubulina isotipo 1 pode levar a substituições de aminoácidos nos códons 167, 198 e 200 da proteína e têm sido associado com a resistência em nematódeos. O polimorfismo que ocorre especificamente em um único nucleotídeo destes códons tem sido utilizado para detectar populações resistentes (Samson-Himmelstjerna et al., 2007).

Os estudos de biologia molecular associados à resistência iniciaram-se com nematódeos de ruminantes, principalmente com *Haemonchus contortus*, no qual foi evidenciado o polimorfismo em um nucleotídeo (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) primeiramente no códon 200 do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1, observando uma substituição nos indivíduos resistentes de Phe (fenilalanina) para Tyr (tirosina), uma transversão de TTC para TAC no códon. Esta mutação também foi relacionada com a resistência fenotípica em *Caenorhabditis elegans* (nematoda de vida livre) e foi associada a resistência aos benzimidazóis em populações de *H. contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* e *Teladorsagia circumcincta* (Geary et al., 1992; Kwa et al., 1994; Kwa et al., 1995; Elard et al., 1995; Prichard, 2001). Posteriormente a substituição de Fenilalanina por Tirosina também foi encontrada no códon 167, primeiro em *H. contortus*, porém com uma menor prevalência comparado ao códon 200 (Prichard, 2001). Mais recentemente um terceiro local de mutação associado à resistência ao benzimidazol foi identificado no códon 198, também em *H. contortus* (Ghisi et al. 2007). A organização genômica completa que corresponde ao isotipo 1

do gene da  $\beta$ -tubulina em *H. contortus* foi reportado por Pape et al. (1999), com tamanho de 2652 pb. A  $\beta$ -tubulina é conhecida por ser uma proteína altamente conservada, e foi demonstrada a presença dos isótipos 1 e 2, em estudos realizados com cDNA de *Cyc. nassatus* e *H. contortus* (Kaplan et al., 1999), porém foi encontrado diferenças na organização genômica entre os dois isotipos (Clark et al., 2005). A  $\beta$ -tubulina possui 448 aminoácidos na sua estrutura e a sequência do isótipo 1 de *H. contortus*, *T. circumcincta*, *T. colubriformis* e *C. nassatus* quando alinhadas conferem identidade semelhante superior a 95% (Samson-Himmelstjerna et al., 2007).

O polimorfismo TTC/TAC que leva a substituição de fenilalanina por tirosina no códon 200 da  $\beta$ -tubulina pode não ser a única causa da resistência em ciatostomíneos de equinos (Blackhall et al., 2006). A genotipagem de populações de ciatostomíneos benzimidazóis-resistentes por PCR alelo-específico não conseguiu encontrar alta frequência correspondente ao polimorfismo TAC no códon 200 (Samson-Himmelstjerna, 2001). Foi observado que a mesma transversão TTC/TAC no códon 167 do gene  $\beta$ -tubulina isótipo 1 pode ser o principal mecanismo da resistência aos benzimidazóis em ciatostomíneos (Silvestre e Cabaret, 2002). Diferenças estatísticas foram encontradas em populações de ciatostomíneos fenbendazol-susceptível e fenbendazol resistente em ambos os códons, com uma diferença mais significativa observada no códon 167 em organismos fenbendazol-resistentes (Hodgkinson et al., 2008).

A avaliação da presença de SNP's específicos para a resistência aos benzimidazóis em populações de ciatostomíneos pode ser uma ferramenta para diagnosticar a resistência parasitária em populações no Brasil. Então, o objetivo deste estudo foi determinar a presença de polimorfismo nos códons 167 e 200 do gene  $\beta$ -tubulina isotipo 1 em ciatostomíneos adultos e de pool de larvas, determinando a presença e prevalência da transversão que caracteriza resistência aos benzimidazóis.

## **4.2 Material e métodos**

### **4.2.1 Amostras**

Os espécimes de ciatostomíneos adultos foram recuperados do ceco e cólon de um cavalo jovem necropsiado proveniente do município de São José dos Pinhais, PR. O haras participou do estudo de diagnóstico de resistência apresentado no Capítulo 2 e apresentou 0% de eficácia de fenbendazol. As larvas foram recuperadas por meio de coproculturas realizadas com amostras de fezes encaminhadas ao Laboratório de Doenças Parasitárias, do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná, provenientes de 10 haras localizados nos estados do Paraná, Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro, com resultados de resistência ao fenbendazol por meio do teste de redução na contagem de ovos nas fezes (TRCOF). As amostras foram acondicionadas em recipientes de vidro e mantidas em estufa em temperatura controlada de 28°C e 70% de umidade durante 8 dias. As larvas foram então recuperadas por meio do método de Baerman e identificadas de acordo com chaves de identificação (Bevilaqua et al., 1993).

### **4.2.2 Extração de DNA**

O DNA de 20 parasitos adultos e 10 pools de larvas foram extraídos utilizando o método fenol-clorofórmio. Previamente à extração, as larvas e adultos foram mantidos em solução com água destilada e hipoclorito de sódio, para limpeza e remoção da cutícula. Na sequência o pool de larvas e os adultos foram macerados em nitrogênio líquido e o material macerado recuperado com água livre de nucleases. O processo de digestão foi realizado com um mix de solução contendo Tris-HCl pH 7,5 (1 M), EDTA pH 8,0 (0,5 M), NaCl (5 M), SDS (20%), DTT (1 M) e Proteinase K (20 mg/ml), adicionado em microtubos com o material macerado, incubados a 56°C durante 18 horas em termobloco. Após isso, uma



solução de fenol:clorofórmio:isoamil (25:24:1) foi adicionado nos microtubos, homogeneizados e centrifugados para separação das fases, sendo a fase aquosa transferida para um novo microtubo e adicionado isopropanol 100%, homogeneizado e centrifugado novamente, após foi desprezado o sobrenadante. O material foi lavado com etanol 70%, centrifugado e descartado o sobrenadante. O pellet foi seco em temperatura ambiente com o microtubo invertido sobre papel filtro e o DNA ressuspenso em 20 µl de água livre de nucleases e incubado a 37°C durante 30 minutos em termobloco.

#### 4.2.3 Testes e Análises Moleculares

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para amplificação das regiões dos códons 167 e 200 do gene da β-tubulina isotipo 1. Foram utilizados primers isotipo-específico descrito por Blackhall et al. (2011). Para o códon 167 foi utilizado o par de primers forward: 5'-GCTAACTCACTCACTTGGAGGA-3' e reverse: 5'-CTTTGGTGAGGGAACAACG-3' e para o códon 200 foi utilizado o par de primers forward: 5'-TACAATGCTACCCTATCCGTTTCAT-3' e reverse: 5'-GAAGTGAAGACGAGGGAATGGA-3'.

Cada reação foi realizada com tampão buffer 10X, 250 nM, primer forward e reverse, 200 µM dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 unidade Taq DNA polimerase e 2 µl de DNA Genômico. PCRs foram realizadas em termociclador Techne TC-312 (Cambridge, UK), usando o protocolo: 94°C durante 5 minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos, seguido de uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Uma amostra de 8 µl de cada reação foi utilizada para análise por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,4% corado com SYBR<sup>®</sup> Safe DNA Gel Stain. As amostras de PCR foram coradas com Blue

Orange Loading Dye 6X. Após a eletroforese, o gel foi visualizado através de transiluminador para identificação de bandas.

As ampliações dos códons 167 e 200 obtidos por meio de PCR, foram purificados utilizando o kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System, e sequenciadas utilizando a plataforma ABI3130 (Life Technologies) no Laboratório de Genética da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG. O resultado do sequenciamento foi analisado e alinhado utilizando o programa livre Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 5 (Tamura et al. 2011).

### **4.3 Resultados**

A visualização em gel de agarose mostrou a amplificação de todos os produtos de PCR, adultos e larvas, para os códons 167 e 200 do gene da  $\beta$ -tubulina isotipo 1.

Todas as amostras apresentaram sequências de aminoácidos correspondentes a fenilalanina (TTC) nos códons 167 e 200, porém algumas amostras de adultos apresentaram pico duplo na expressão do nucleotídeo no códon 167 (6/20) e no códon 200 (2/20) que corresponde com indivíduos heterozigotos (TTC/TAC). No pool de larvas, todas as amostras apresentaram um pico duplo no códon 167 e em 7 amostras houve heterozigose no códon 200. A figura 16 mostra a visualização de bandas de DNA amplificadas em gel de agarose. Um exemplo do sequenciamento com pico duplo é apresentado na figura 17 e os genótipos de adultos e larvas estão descritos na tabela 4 e 5.

### **4.4 Discussão**

O entendimento do mecanismo da resistência em helmintos é fundamental para o avanço na pesquisa de controle com medicamentos antiparasitários. A análise genotípica do polimorfismo que ocorre no gene  $\beta$ -tubulina confere com as alterações fenotípicas encontradas em organismos resistentes ao tratamento com benzimidazol (Samson-Himmelstjerna et al., 2006). Desta forma, o uso de marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) que conferem com a característica genotípica de parasitos resistentes oferece um meio de detectar a resistência aos benzimidazóis em populações de ciatostomíneos em equinos (Samson-Himmelstjerna et al., 2007).

Inicialmente os estudos sobre a resistência aos benzimidazóis em ciatostomíneos concentraram-se na análise genotípica do polimorfismo no códon 200 (Pape et al. 1999; Samson-Himmelstjerna et al., 2001; Pape et al., 2002) , com base nas mesmas características apresentadas por nematóides de pequenos ruminantes, como *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus colubriformis*, onde foi demonstrado um aumento na expressão de tirosina (TAC) no códon 200 do gene  $\beta$ -tubulina. Os autores então definiram esse diagnóstico primário para a determinação da resistência (Kwa et al., 1994; Elard e Humbert, 1999; Samson-Himmelstjerna, 2002a). Estudos realizados com populações de ciatostomíneos benzimidazóis-susceptíveis e resistentes, foram realizados para tentar estabelecer os mecanismos da resistência nestas espécies avaliando o polimorfismo no códon 200 e na população de ciatostomíneos susceptíveis, sendo encontrado 80% carregando genes homozigotos característicos de susceptibilidade (TTC/TTC), 17% de heterozigotos (TTC/TAC) e 3 % de homozigotos resistentes TAC/TAC. Entretanto, a população resistente, oriunda de cavalos naturalmente infectados e tratados com doses crescentes de fenbendazol, para aumentar a seleção destes organismos, revelou após o tratamento que 42,3% foram homozigotos susceptíveis TTC/TTC, 55,8% foram heterozigotos TTC/TAC e apenas 1,9% foram homozigotos resistentes TAC/TAC, mostrando um aumento na população heterozigota,

porém uma redução na população homozigota resistente. Os autores concluíram que o polimorfismo do códon 200 não teria sido a única razão para o desenvolvimento da resistência aos benzimidazóis em pequenos estrôngilos (Samson-Himmelstjerna et al., 2002a). Portanto o polimorfismo TTC/TAC no códon 200 do gene  $\beta$ -tubulina isotipo 1 em ciatostomíneos tem correlação com a resistência aos benzimidazóis, porém não é o principal mecanismo relacionado com a resistência como em trichostrongilídeos de ovinos (Drogemuller et al., 2004). Neste estudo os dados obtidos da genotipagem do códon 200 mostrou consistentemente menor ocorrência do potencial de polimorfismos por apresentar um maior número de amostras homozigotas TTC em relação ao códon 167, em parasitos adultos e pools de larvas.

Drogemuller et al. (2004) compararam todo o gene  $\beta$ -tubulina de populações de ciatostomíneos susceptíveis com populações resistentes, avaliando cada possível ponto de mutação de aminoácidos ao longo do gene, comparando a sequência de aminoácidos de 6 espécies de ciatostomíneos, *Cylicocycclus nassatus*, *C. pateratum*, *C. coronatum*, *C. catinatum*, *Cylicostephanus longibursatus* e *Cylicostephanus goldi*, isolados de uma população benzimidazol-resistentes com 4 espécies benzimidazol-susceptíveis, *C. nassatus*, *C. coronatum*, *C. pateratum*, e *C. catinatum*. A comparação revelou diferenças em 11 posições de aminoácidos. A mutação de fenilalanina para tirosina na posição 167 foi observada em todas as 6 espécies isoladas da população resistente, sugerindo o seu envolvimento como principal mecanismo na resistência aos benzimidazóis. Clark et al. (2005) analisaram o polimorfismo nos isotipos 1 e 2 da  $\beta$ -tubulina e também encontraram o códon 167 da sequência da  $\beta$ -tubulina isotipo 1 de *C. catinatum* como o único SNP associado a resistência aos benzimidazóis. Outros estudos seguiram focando o polimorfismo no códon 167 e 200 do gene  $\beta$ -tubulina, comparando a genotipagem de ciatostomíneos susceptíveis e resistentes aos benzimidazóis. A mutação fenilalanina/tirosina envolvendo ambos os códons 167 e 200 do gene

$\beta$ -tubulina isotipo 1 em indivíduos resistentes foi encontrado por Hodgkinson et al. (2008) e Lake et al. (2009) com diferença altamente significativa na expressão do códon 167 em indivíduos resistentes, caracterizando então esse como o principal SNP envolvendo a resistência aos benzimidazóis e podendo ser utilizado como diagnóstico de triagem para o estudo de populações em indivíduos e em pool de fezes oriundo de Haras ou Centro de Criação/treinamento.

No presente estudo, os genótipos encontrados nos parasitos adultos foram apenas homozigotos susceptíveis (TTC/TTC) e heterozigotos (TTC/TAC) nos aminoácidos que representam a característica susceptível ou resistente aos benzimidazóis. A expressão de heterozigotos foi maior para o códon 167, ocorrendo em 6 ciatostomíneos adultos e no códon 200. Apenas 2 parasitos heterozigotos foram encontrados. Estes resultados condizem com as características relatadas pelos autores citados anteriormente e por Blackhall et al. (2011), que encontraram maior ocorrência do polimorfismo TTC/TAC no códon 167 em relação ao códon 200 em populações de ciatostomíneos resistentes. Ainda no presente estudo não foi encontrado nenhum indivíduo homozigoto resistente (TAC/TAC). Isto pode ter ocorrido devido ao baixo número de amostras analisadas ( $n=20$ ), ou devido ao fato de que os parasitos utilizados não foram pré-selecionados para a característica de resistência fenotípica, como realizado em outros estudos (Samson-Himmelstjerna et al., 2002a; Drogemuller et al., 2004; Hodgkinson, 2008; Lake et al, 2009; Blackhall et al., 2011). Os autores acima analisaram a genotipagem de populações resistentes pré-selecionadas com tratamentos prévios para descrever o mecanismo da resistência. Portanto, o nosso estudo analisou a distribuição dos alelos de ciatostomiíneos adultos obtidos de um cavalo que estava em pastejo contínuo em uma propriedade que já havia sido testada para a resistência ao fenbendazol 12 meses antes conforme descrito anteriormente. O animal não recebeu nenhum tratamento anti-helmíntico prévio com benzimidazol e ficou 120 dias sem nenhum tratamento anti-helmíntico antes da

recuperação dos parasitos. Desta forma, o animal ingeriu do pasto larvas infectantes que continham características da herdabilidade genética para resistência, mas também larvas de uma ampla população em refúgio que possivelmente continham genes homozigotos susceptíveis.

Os resultados encontrados na genotipagem de pools de larvas, demonstraram que todas as amostras continham heterozigose TTC/TAC no códon 167, enquanto 60% das amostras foram heterozigotas no códon 200. Blackhall et al. (2011) também encontraram uma maior frequência do polimorfismo TAC no códon 167, em comparação com o códon 200 de ciatostomíneos resistentes, enquanto os pools de amostras susceptíveis apresentaram apenas alelos TTC. Estes resultados podem ser atribuídos ao fato de que essas amostras foram obtidas de animais que receberam tratamento anti-helmíntico frequente, ou seja, possuíam herdabilidade genética de parasitos adultos sobreviventes ao tratamento e de novos parasitos adquiridos por ingestão de L<sub>3</sub> no pasto. Desta forma, a população de L<sub>3</sub> que foi estudada possuía grande variabilidade genética, e como as extrações de DNA dos pools foram realizadas com aproximadamente 300 larvas por amostra, a expressão genética dentro da amostra foi significativamente alta, com a possibilidade de amplificação de uma grande variedade de DNA e conseqüentemente a amplificação de amostras com maior ocorrência dentro da população das amostras.

#### **4.5 Conclusão**

Os genótipos encontrados nesse estudo revelou uma baixa ocorrência de parasitos adultos com potencial de mutação para o aminoácido tirosina correspondente com a característica para resistência aos benzimidazóis, porém a análise de vários indivíduos na mesma amostra através de pool de larvas revelou o grande potencial de mutação para tirosina,

principalmente no códon 167. Foi demonstrado também a alta prevalência de heterozigose que ocorre quando o tratamento anti-helmíntico é frequente e as amostras de DNA são obtidas imediatamente após. Assim como descrito por outros autores, o códon 167 mostrou maior ocorrência de TAC em relação ao códon 200, condizendo como principal local de mutação para resistência, sendo possível sua utilização como SNP de diagnóstico.

## REFERÊNCIAS

- BLACKHALL, W.J.; DROGEMULLER, M.; SCHNIEDER, T.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Expression of recombinant  $\beta$ -tubulin alleles from *Cylicocyclus nassatus* (Cyathostominae). *Parasitology Research*. V. 99, p. 687-693, 2006.
- BLACKHALL, W.J.; KUZMINA, T.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. von.  $\beta$ -tubulin genotypes in six species of cyathostomins from anthelmintic-naïve Przewalski and benzimidazole-resistant brood horses in Ukraine. *Parasitol. Res.* DOI: 10.1007/s00436-011-2426-0, 2011.
- DROGEMULLER, M.; SCHNIEDER, T.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Beta-Tubulin complementary DNA sequence variations observed between cyathostomins from benzimidazole-susceptible and resistance populations. *Journal of Parasitology*. V. 90, p. 868-870, 2004.
- DRUDGE J.H.; LYONS E.T. Newer developments in helminth control and *Strongylus vulgaris* research. Proc. 11 th Ann. Mtg. AAEP, Miami Beach, FL, p. 381-389, 1965.
- DRUDGE J.H.; SZANTO J.; WYANT Z.N.; ELAM G. Critical tests of thiabendazole as an anthelmintic in the horse. *Am J Vet Res*. 24:1217–1222, 1963.
- ELARD, L.; COMES, A.M.; HUMBERT, J.F. Sequences of beta-tubulin cDNA from benzimidazole-susceptible and –resistant strains of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. *Mol. Biol. Biochem*. V. 79, p. 249-253, 1995.
- ELARD, L.; HUMBERT, J.F. Importance of the mutation of amino acid 200 of the isotype 1 beta-tubulin gene in the benzimidazole resistance of the small ruminant parasite *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitology Research*. V. 85, p. 452-456, 1999.
- GEARY, T.G.; NULF, S.C.; FAVREAU, M.A.; TANG, L.; PRICHARD, R.K.; HATZENBUHLER, N.T.; SHEA, M.H.; ALEANDER, S.J.; KLEIN, R.D. Three beta-tubulin cDNAs from the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol*. V. 50, p. 295-306, 1992.
- GHISI, M.; KAMINSKY, R.; MÄSER, P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Veterinary Parasitology*. V. 144, p. 313-320, 2007.
- GILES, C.J.; URQUHART, K.A.; LONGSTAFFE, J.A. Larval cyathostomiasis (immature trichonema-induced enteropathy): a report of 15 clinical cases. *Equine Veterinary Journal*. V. 17, p. 196-201, 1985.
- KAPLAN, R.M.; GOODMAN, D.; TOLLIVER, S.C.; LYONS, E.T. Characterization of two  $\beta$ -tubulin genes from *Cylicocyclus nassatus* (Cyathostominae) that correspond to the *Haemonchus contortus* isotype-1 and isotype-2  $\beta$ -tubulin genes. *Proceedings 44<sup>th</sup> Annual Mtg Am. Assoc. Veterinary Parasitologists*. New Orleans, p. 81, 1999.
- Kaplan 2004 – prevalence of anthelmintic resistance in cyathostomes in horse farms
- KAPLAN, R.M. Anthelmintic resistance in nematodes of horses. *Veterinary Research*. v.33, p.491–507, 2002.



- KWA, M.S.G.; VEENSTRA, J.G.; ROOS, M.H. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. *Mol. Biochem. Parasitol.* V. 63, p. 299-303, 1994.
- KWA, M.S.G.; VEENSTRA, J.G.; VAN DIJK, M.; ROOS, M.H. Beta-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* V. 246, p. 500-510, 1995.
- LAKE, S.L.; MATTHEWS, J.B.; KAPLAN, R.M.; HODGKINSON, J.E. Determination of genomic DNA sequences for beta-tubulin isotype 1 from multiple species of cyathostomin and detection of resistance alleles in third-stage larvae from horses with naturally acquired infections. *Parasites & Vectors. Suppl 2: S6*, DOI: 10.1186/1756-3305-2-S2-S6
- LICHTENFELS, J.R.; KHARCHENKI, V.A.; KRECEK, R.C.; GIBBONS, L.M. An annotated checklist by genus and species of 93 level names for 51 recognised species of small strongyles (Nematoda: Strongyloidea: Cyathostominae) of horses, asses and zebras of the world. *Veterinary Parasitology.* V. 79, p. 65-79, 1998.
- LOVE, S.; MURPHY, D.; MELLOR, D. Pathogenicity of cyathostome infection. *Veterinary Parasitology.* v.31, n.85, p.113-122, 1999.
- LUBEGA, G.W.; PRICHARD, R.K. Specific interaction of benzimidazole anthelmintics with tubulin: high-affinity binding and benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* V. 38, p. 221-232, 1990.
- LUBEGA, G.W.; PRICHARD, R.K. Beta-tubulin and benzimidazole resistance in the sheep nematode *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* V. 47: 129-137, 1991.
- LYONS, E.T., TOLLIVER, S.C., DRUDGE, J.H., STAMPER, S., SWERCZEK, T.W., GRANSTROM, D.E. A study (1977-1992) of population dynamics of endoparasites featuring benzimidazole resistant small strongyles (Population S) in Shetland ponies. *Vet. Parasitol.* 66, 75-86, 1996.
- LYONS, E.T.; TOLLIVER, S.C.; COLLINS, S.S. Study (1991 to 2001) of drug-resistant Population B small strongyles in critical tests in horses in Kentucky at the termination of a 40-year investigation. *Parasitology Research*, v.101, p.689-701, 2007.
- MARTIN, P.J.; ANDERSON, N.; JARRETT, R.G. Detecting benzimidazole resistance with fecal egg count reduction tests and in vitro assays. *Australian Veterinarian Journal.* V.66, p. 236-240, 1989.
- MOLENTO M. B. Resistência parasitária em helmintos de equinos e propostas de manejo. *Ciência Rural.* V.35, p. 1469-1477, 2005.
- MOLENTO M.B.; ANTUNES J.; BENTES R.N. COLES G.C. Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. *Vet Rec.* 162(12):384-5, 2008.
- PAPE, M.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. von; SCHNIEDER, T. Characterisation of the beta-tubulin gene of *Cylicocyclus nassatus*. *Int. J. Parasitol.* V. 29, p. 1941-1947, 1999.
- SANSON-HIMMELSTJERNA, G. von; HARDER, A.; PAPE, M.; SCHNEIDER, T. Novel small strongyles (cyathostominae) beta-tubulin sequences. *Parasitology Research.* V. 87, p. 122-125, 2001.
- SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. von; PAPE, M.; WITZENDORFF, C. von, SCHNIEDER, T. Allele-specific PCR for the beta-tubulin codon 200 TTC/TAC polymorphism using single adult and larval small strongyle (cyathostominae) stages. *J. Parasitol.* V. 88, p. 254-257, 2002.

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. von; WITZENDORFF, C. von; SIEVERS, G.; SCHNIEDER, T. Comparative use of faecal egg count reduction test, egg hatch assay and beta-tubulin codon 200 genotyping in small strongyles (cyathostominae) before and after benzimidazole treatment. *Vet. Parasitol.* V. 108, p. 227-235, 2002

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; BLACKHALL, W.J. Will technology provide solutions for drug resistance in veterinary helminths? *Veterinary Parasitology.* V.132, p. 223-239, 2005.

SILVESTRE, A.; CABARET, J. Mutation in position 167 of isotype 1 beta-tubulin gene of trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? *Mol. Biochem. Parasitol.* V. 120, p. 297-300, 2002.

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. Biology Evol.* v.28, p. 2731-2739, 2011.

TRAVERSA D.; SAMSON-HIMMELSTJERNA G.V.; JANINA D.; PIERMARINO M.; SCHÜRMAN S.; BARNES H.; OTRANTO D.; PERRUCCI S.; REGALBONO A.F.; PAOLA B.; BOECKH A.; COBB R. Anthelmintic resistance in cyathostomin populations from horse yards in Italy, United Kingdom and Germany. *Par & Vectors.* Suppl 2: S2, 2009.

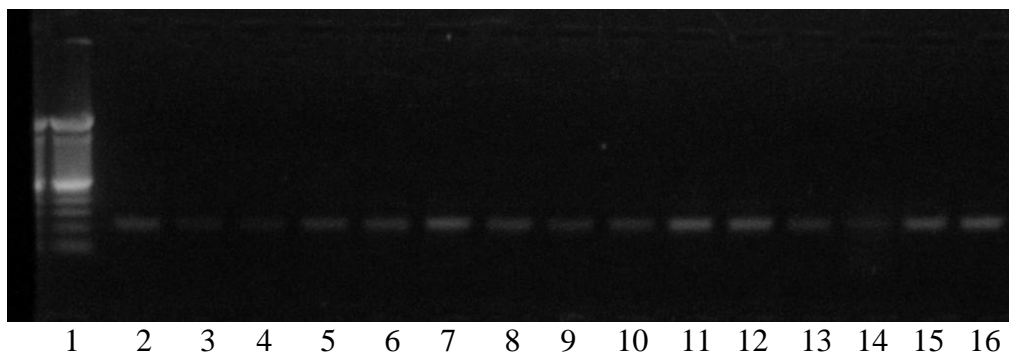


FIGURA 16 - BANDAS DE DNA DE CIATOSTOMÍNEOS DE APROXIMADAMENTE 220 PB AMPLIFICADAS E VISUALIZADAS EM GEL DE AGAROSE 1,5%. COLUNA 1: MARCADOR MOLECULAR DE 100 PB, COLUNAS 2 A 10 REPRESENTAM AMOSTRAS DE ADULTOS E DA 11 A 16 DE POOL DE LARVAS.

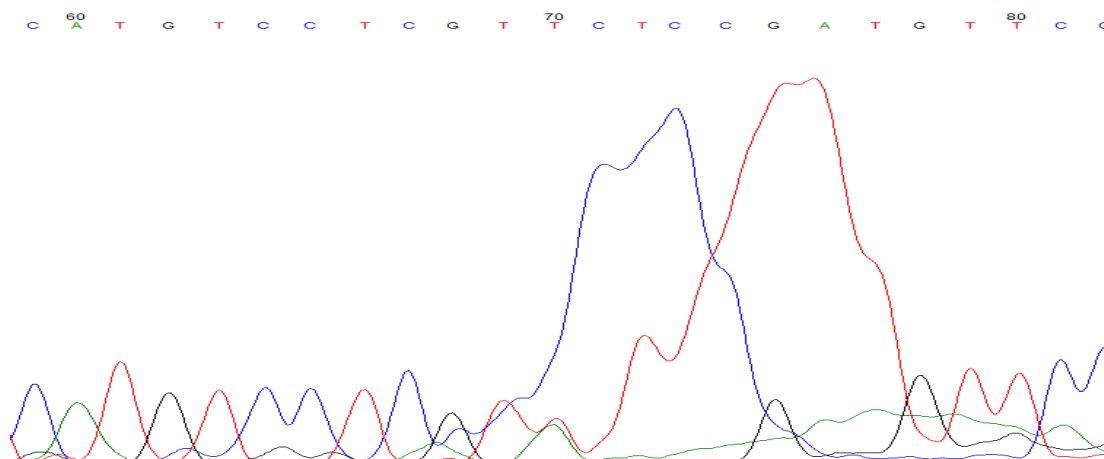


FIGURA 17 - APRESENTAÇÃO DE PICO DUPLO ENCONTRADO NO ALINHAMENTO DO CÓDON 167 DO GENE B-TUBULINA ISOTIPO 1, CARACTERÍSTICO DE HETEROZIGOSE QUE OCORRE NO NUCLEOTÍDEO 70.

TABELA 4 - GENOTIPAGEM ENCONTRADA NO CÓDON 167 E 200 DO GENE BETA-TUBULINA ISOTIPO 1 EM AMOSTRAS DE FORMAS ADULTAS DE CIATOSTOMÍNEOS DE EQUINOS.

<b>Amostra</b>	<b>Códon 167</b>	<b>Códon 200</b>
<b>1</b>	TTC/TTC	TTC/TTC
<b>2</b>	TTC/TTC	TTC/TTC
<b>3</b>	TTC/TTC	TTC/TTC
<b>5</b>	TTC/TTC	TTC/TTC
<b>6</b>	TTC/TTC	TTC/TTC
<b>7</b>	TTC/TAC	TTC/TTC
<b>8</b>	TTC/TTC	TTC/TTC
<b>9</b>	TTC/TAC	TTC/TTC
<b>10</b>	TTC/TTC	TTC/TTC
<b>11</b>	TTC/TTC	TTC/TTC
<b>12</b>	TTC/TTC	TTC/TTC
<b>13</b>	TTC/TTC	TTC/TTC
<b>14</b>	TTC/TTC	TTC/TTC
<b>15</b>	TTC/TAC	TTC/TTC
<b>16</b>	TTC/TAC	TTC/TTC
<b>17</b>	TTC/TAC	TTC/TTC
<b>18</b>	TTC/TTC	TTC/TTC
<b>19</b>	TTC/TAC	TTC/TAC
<b>20</b>	TTC/TTC	TTC/TAC

TABELA 5 - GENOTIPAGEM ENCONTRADA NAS AMOSTRAS DE POOLS DE LARVAS DE CIATOSTOMÍNEOS NO CÓDON 167 E 200 DO GENE B-TUBULINA ISOTIPO 1.

<b>Amostras</b>	<b>Códon 167</b>	<b>Códon 200</b>
<b>1</b>	TTC/TAC	TTC/TAC
<b>2</b>	TTC/TAC	TTC/TAC
<b>3</b>	TTC/TAC	TTC/TAC
<b>5</b>	TTC/TAC	TTC/TAC
<b>6</b>	TTC/TAC	TTC/TAC
<b>7</b>	TTC/TAC	TTC/TTC
<b>8</b>	TTC/TAC	TTC/TAC
<b>9</b>	TTC/TAC	TTC/TTC
<b>10</b>	TTC/TAC	TTC/TTC

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

A resistência anti-helmíntica em ciatostomíneos está amplamente disseminada para os benzimidazóis. Os sais de pirantel ainda podem ser uma boa opção de uso, porém deve-se atentar a realidade de que a situação atual pode estar desfavorável para esta classe em alguns locais, portanto o diagnóstico de eficácia deveria ser ideal para uma avaliação pré-tratamento. As lactonas macrocíclicas continuam sendo a melhor opção de tratamento para cavalos, porém nota-se que o uso indiscriminado está levando esta classe no caminho da resistência.

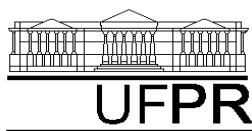
Os testes de diagnóstico de resistência para as drogas poderá ser uma ótima ferramenta para controle de eficácia e monitoramento da resistência na rotina terapêutica. Os testes aqui relatados poderão ser padronizados e refinados para ajudar neste procedimento de monitoramento de eficácia das drogas, e desta forma poderá ser possível estabelecer estratégias de controle parasitário, pensando em preservar os princípios que ainda possuem alta eficácia.

Os testes *in vitro* são promissores para o uso na rotina diagnóstica, pelos bons resultados, facilidade e baixo custo.

Porém vale ressaltar que tão importante quanto estabelecer o diagnóstico da resistência e o mecanismo da resistência para as drogas, é também mudar a visão sobre a estratégia de tratamento desatualizada que são aplicadas rotineiramente no campo. Uma estratégia racional, principalmente reduzindo o tratamento supressivo deverá ser o foco de todo e qualquer programa antiparasitário, e juntamente com alternativas de controle e o monitoramento da eficácia, poderá desta forma retardar o avanço do processo de resistência.

## 6. ANEXOS

### 6.1 Questionário aplicado a campo



**MONITORAMENTO DE RESISTÊNCIA PARASITÁRIA  
EM EQUINOS DA GRANDE CURITIBA**



1. Nome propriedade: \_\_\_\_\_ (OPCIONAL)

2. Nome proprietário: \_\_\_\_\_  
(OPCIONAL)

3. Município:

4. Endereço:

#### PROPRIEDADE E REBANHO:

1. Tipo de estabelecimento:

Centro Hípico

Estábulo

Propriedade rural privada

Centro de pesquisas

2. Área total da propriedade:

3. Área de pastagem:

4. Há quanto tempo atua na atividade:

5. Quais culturas existem na propriedade:  Eqüinos  Ovinos  Caprinos  Bovinos  Aves  Suínos

6. Sobre os eqüinos:

RAÇA	Número de Fêmeas	Número de Machos	Número de prenhes	Número de Potros	TOTAL
<b>TOTAL</b>					

7. Animais ficam estabulados?  Sim  Não  Apenas noite (semi-estabulados)

8. Número de piquetes:                      Dimensões:

9. Há remoção de fezes dos piquetes?

- Não
- Remoções irregulares
- Uma vez por mês
- Duas vezes por mês
- A cada quinze dias
- Semanalmente
- Duas vezes por semana

10. Há fertilização da pastagem?  Sim  Não

11. Qual o tipo de fertilizante utilizado?

- Minerais/ Inorgânicos
- Estercos
- Chorume
- Outros – Quais? \_\_\_\_\_

12. No caso do uso de esterco de eqüinos, realiza a compostagem antes de lançar as fezes no pasto?

Sim  Não

13. Há sinais de problemas com vermes na pastagem?  Sim  Não



14. Há desinfecção dos estábulos?  Sim  Não

15. Qual é a frequência de retirada de esterco do estábulo/baia?  Diariamente  Períodos Irregulares

16. Dividem pasto com outras espécies:

Sim - Quais? \_\_\_\_\_  Não

17. Existe qualquer tipo de ordem de utilização dos piquetes de acordo com as categorias animais?

Uso de mesmo piquete para éguas lactantes e seus potros por anos consecutivos?

Rodízio de piquetes?

Não existe ordem de utilização de piquetes.

18. Protocolo com animais recém adquiridos:

Tratados assim que chegam na propriedade e isolados por \_\_\_\_\_ dias.

Apenas isolados por \_\_\_\_\_ dias.

São misturados ao restante do plantel sem tratamento.

Outro: \_\_\_\_\_

19. Já foi observado qualquer tipo de parasita nos animais ou em suas fezes?

Sim  Não

20. Quais os pastos predominantes na propriedade? \_\_\_\_\_

21. A maior parte do tempo o pasto é mantido:  Alto (acima de 30 cm)  Baixo

### MEDICAÇÃO ANTIPARASITÁRIA

1. Quando é feita a vermifugação dos animais?

Todos os animais do rebanho na mesma ocasião

Somente alguns animais ou lotes

2. Qual a frequência de aplicação de vermífugos utilizada?

Mensal  Anual

A cada 2 meses  Sempre que necessário com base em exames de fezes

A cada 3 meses  Em animais com sinais clínicos de verminose

- A cada 4 meses
- Estratégica (ex. éguas antes do parto e potros no desmame)
- Semestral
- Não utilizo vermífugo
- Outra: \_\_\_\_\_

**3. É feito o controle da quantidade de vermes após a aplicação?**

- Sim – Como? \_\_\_\_\_
- Não

**4. Já foi realizado qualquer tipo de teste de eficácia de produtos a fim de avaliar a resistência dos parasitos, na propriedade?**

- Sim
- Não

**5. Qual o principal produto utilizado na propriedade?**

- ABAMECTINA GEL COMP.
- IVERMECTINA OURO FINO PASTA
- IVERMECTINA GEL COMP.
- CENTURION
- EQUEST
- PADOCK PLUS NF
- EQVALAN GOLD
- EQVALAN PASTA
- PANACUR® COMPOSTO
- IVERM
- IVERMIC T
- PADOCK GEL
- PADOCK PLUS
- PANACUR®
- PANACUR® 10%
- PANACUR® PASTA
- SUPERHORSE GOLD
- Outros:

**6. Quando troca de vermífugo?**

- A cada vermifugação
- De acordo com teste de eficácia do vermífugo
- Quando o produto não faz mais efeito
- De acordo com orientação do veterinário
- Sem critério

**7. Como escolhe o medicamento antiparasitário?**

- Indicação do técnico Veterinário
- Balconista de agropecuária ou Cooperativa
- Pelo melhor preço
- Vendedor na fazenda
- Propaganda (revista, TV, folder, etc)

