

## PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE ECLODIBILIDADE DE OVOS: DIAGNÓSTICO *IN VITRO* DA RESISTÊNCIA AO ALBENDAZOL EM NEMATÓIDES GASTROINTESTINAIS

Marcela Santos Sena Martins\*  
Isabella Vilhena Freire Martins\*\*

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi padronizar, adaptar e detalhar o teste de eclodibilidade de ovos (TEO) para o diagnóstico da resistência de nematoides gastrintestinais de ovinos ao albendazol. Para a realização do teste *in vitro* foram realizados três ensaios em dois momentos (24 e 48h), executados segundo metodologia preconizada pelo Manual Prático da EMBRAPA, utilizando controle negativo com água destilada e DMSO a 0,75% e tratamento com concentrações de 600, 300, 150, 112,5, 75, 37,5, 18,75, 9,37 e 4,68 µg/mL e controle positivo albendazol 25.000 µg/mL. Seguiu-se incubação das placas em estufa com demanda bioquímica de oxigênio (DBO), mantidos à temperatura de 28°C. Após 24h e 48h de incubação foi possível observar larvas eclodidas nos grupos controle negativo e também nos grupos tratados com a concentração de 112,5 µg/mL e 75 µg/mL, respectivamente. Neste estudo não foi possível diagnosticar a resistência anti-helmíntica no TEO, devido a variáveis limitantes, como ausência de dose discriminante para o albendazol, porém foi possível a padronização, a adaptação e o detalhamento do mesmo para diagnóstico da resistência anti-helmíntica dos nematoides ao albendazol.

**PALAVRAS-CHAVE:** Benzimidazol; Helmintos; Ruminantes.

### STANDARDIZATION OF EGG HATCH ASSAY (EHA): *IN VITRO* DIAGNOSIS OF RESISTANCE TO ALBENDAZOLE IN GASTROINTESTINAL NEMATODES

**ABSTRACT:** Current analysis standardized, adapted and detailed Egg Hatch Assay (EHA) to diagnose the resistance of gastrointestinal nematodes to albendazole in sheep. Three *in vitro* assays were undertaken at 24 and 48 h, by methodology prescribed by the EMBRAPA Practical Handbook, with negative control distilled water and DMSO at 0.75% and concentration at 600, 300, 150, 112.5, 75, 37.5, 18.75, 9.37 and 4.68 µg/mL and positive control albendazole 25.000 µg/mL. Plates were incubated in buffer with BOD and maintained at 28°C. After 24h and 48h of incubation, larvae had eclosion in negative control groups and also in groups treated with 112.5 µg/mL and 75 µg/mL, respectively. It was not possible to diagnose anti-helminth resistance in EET due to limiting variables, such as the lack of discriminating dose for albendazole. The standardization, adaptation and detailing were possible to diagnose anti-helminth resistance of nematodes to albendazole.

**KEYWORDS:** Benzimidazol; Helminths; Ruminants.

### INTRODUÇÃO

O uso intensivo dos anti-helmínticos levou a um impacto positivo inicial durante um período pequeno, mas atualmente constitui a forma mais adversa de controle, se utilizada de maneira isolada (FORTES; MOLENTO, 2013), pois resulta na seleção e propagação de parasitos resistentes, favorecendo o aparecimento da resistência anti-helmíntica em vários países (KAPLAN; VIDYASHANKAR, 2012), incluindo o Brasil (AMARANTE *et al.*, 2004).

Segundo Fortes e Molento (2013), a seleção e o crescimento de populações resistentes aos principais

\* Médica Veterinária pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Mestre em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Mato Grosso do Sul, Brasil. E-mail: marcelasena2@hotmail.com

\*\* Docente Associada do Departamento de Medicina Veterinária do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Espírito Santo, Brasil.

grupos de anti-helmínticos, avermectinas, imidotiazóis e benzimidazóis (BZs), constituem um sério obstáculo à criação de ruminantes no mundo todo. Sendo assim, métodos sensíveis e eficazes na detecção e monitoramento de populações resistentes se tornam imprescindíveis, principalmente na tomada de decisão relacionada ao controle parasitário nesses animais.

Nos estudos de campo, os testes utilizados e preconizados pela *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (WOOD *et al.*, 1995) envolvem eutanásia de animais e, portanto, nas condições atuais, o teste de redução na contagem de ovos nas fezes (TRCOF) é a principal ferramenta usada no campo para o diagnóstico da resistência. O teste é de execução simples e pode ser realizado com todos os grupamentos de anti-helmínticos, independentemente de seu mecanismo de ação. Porém, vem recebendo críticas e sofrido alterações ao longo do tempo, sendo necessária a padronização e implementação de testes *in vitro* para melhorar a sensibilidade do diagnóstico da resistência, porém, sua disponibilidade é muito limitada, com poucos laboratórios no Brasil habilitados a realizá-los.

O teste mais comum utilizado para avaliar a eficácia dos BZs *in vitro* é o de eclodibilidade de ovos (TEO), que se baseia na incubação dos ovos do parasito em uma série de concentrações do anti-helmíntico. É utilizado principalmente para o albendazol comercial, para avaliação de seus efeitos sobre os ovos dos nematoides (FORTES; MOLENTO, 2013).

O TEO tem sido utilizado com várias modificações por alguns pesquisadores para a detecção de resistência ao grupo dos BZs, cuja ação é impedir a embriogênese e a eclosão das larvas de nematoides que tiveram contato com concentrações crescentes do fármaco (FORTES; MOLENTO, 2013). No entanto, há poucos relatos de testes *in vitro* validados até o momento, que necessitam ser mais estudados e padronizados entre os laboratórios brasileiros.

O objetivo deste trabalho foi padronizar, adaptar e detalhar o teste de eclodibilidade de ovos (TEO) para o diagnóstico da resistência de nematoides gastrintestinais de ovinos ao albendazol.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Estudo aprovado pelo protocolo 013/2014 da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo.

Foram coletadas amostras de fezes frescas de um ovino com histórico de tratamentos sucessivos com o princípio ativo albendazol. A coleta foi realizada diretamente da ampola retal utilizando sacos plásticos e encaminhados ao Laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo (HOVET-UFES), em caixa térmica para posterior análise laboratorial, utilizando a técnica McMaster (OPG) (GORDON; WHITLOCK, 1939) com determinação do grau de parasitismo e também foi realizada a coprocultura pela técnica de Roberts e O'Sullivan (1950), para identificação dos gêneros de nematoides presentes.

Para a realização do teste *in vitro* – teste de eclodibilidade de ovos (TEO) – foram utilizadas amostras de fezes frescas, imediatamente após a coleta. Foram realizados três ensaios do TEO em dois momentos diferentes (24 e 48h), utilizando diferentes amostras fecais do mesmo animal doador para cada ensaio.

Com o intuito de padronizar a técnica no laboratório, a recuperação dos ovos inicialmente seguiu a metodologia do Manual Técnico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (CHAGAS, NICIURA; MOLENTO, 2011). As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal, maceradas e acrescentadas de água morna ( $\pm 40^{\circ}\text{C}$ ), posteriormente foram filtradas em quatro peneiras granulométricas com reticulações de 980  $\mu\text{m}$ , 149  $\mu\text{m}$ , 62  $\mu\text{m}$  e 25  $\mu\text{m}$ . Os ovos retidos na última malha de diâmetro de 25  $\mu\text{m}$ , foram lavados com água destilada com auxílio de pisseta, passando o conteúdo ali retido para tubos, tipo Falcon de 50 mL, que foram centrifugados a 3.000 rpm por 05 minutos em centrífuga refrigerada a  $40^{\circ}\text{C}$  (Nova Técnica® NT 825).

Após centrifugação, descartou-se o sobrenadante, completou-se com solução de sacarose saturada para promover a suspensão dos ovos,

centrifugou-se por mais 05 minutos a 3.000 rpm, despejou-se o sobrenadante na peneira de 25 µm novamente e lavaram-se os ovos ali retidos com água destilada, posteriormente despejando num cálice de decantação por 30 minutos à temperatura ambiente.

Entretanto, esse protocolo foi repetido em sete ensaios, e em nenhum deles os ovos foram recuperados com sucesso. Diante deste fato, como alternativa optou-se seguir a fase de recuperação dos ovos de nematoides gastrintestinais de acordo com Coles *et al.* (1992), modificado por Bizimenyera *et al.* (2006).

Portanto, as amostras fecais foram novamente coletadas, diluídas em água morna, evitando-se estresse térmico, lavadas em quatro peneiras com diferentes reticulações (980 µm, 149 µm, 62 µm e 25 µm) e recuperadas da última malha de 25 µm. O conteúdo foi transferido para tubo tipo Falcon de 50 mL e centrifugado com água destilada, descartou-se o sobrenadante e completou-se com concentrações diferentes de sacarose (20%, 30%, 60%), formando gradientes de concentrações em diferentes fases, que posteriormente foram centrifugados, coletados os ovos com auxílio de pipeta automática (LabMate® 100–1000 µL), transferidos para um novo tubo tipo Falcon de 15 mL e acrescentado água destilada para retirar o excesso da sacarose e promover a limpeza dos mesmos.

Após o processo de centrifugação, concentraram-se os ovos em apenas um nível, que foi no halo formado entre a solução de fezes, água e ovos com a solução a 20% de sacarose. Com essa modificação foi possível visualizar macroscopicamente uma massa branca de ovos, que foram pipetados e repassados para tubos Falcon de 15 mL. Após a recuperação dos ovos, foram adicionados a cada poço, 500 µL de água contendo em média 100 ovos, estimados em três alíquotas de 10 µL. Do momento da coleta das fezes até o término da preparação das placas, não foi ultrapassado mais que 03 horas de manipulação, evitando, assim, a inviabilização dos ovos.

Em seguida, nos mesmos poços que foram distribuídos os ovos, adicionaram-se 500 µL da

solução tratamento. O anti-helmíntico sulfóxido de albendazol, solução injetável (1mL/ 40 kg), produto Voss Rico® (Ouro Fino) foi diluído em DMSO a 0,75% e água destilada e posteriormente fracionado em nove concentrações seriadas (600; 300; 150; 112,5; 75; 37,5; 18,75; 9,37 e 4,68 µg/ mL) de acordo com o recomendado pelo Manual Prático da EMBRAPA (CHAGAS; NICIURA; MOLENTO, 2011).

Para o controle positivo, a dose máxima do fármaco utilizada foi de 25.000 µm/ mL na qual nenhum ovo ficaria viável e para os controles negativos, DMSO 0,75% e água destilada foram utilizados na mesma quantidade.

Para a execução do teste foi utilizada a metodologia preconizada pelo Manual Prático da EMBRAPA e os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração do fármaco, controle negativo e controle positivo, utilizando-se placa de cultivo celular (24 poços).

Seguiu-se incubação das placas em estufa com demanda bioquímica de oxigênio (D.B.O), mantidos à temperatura de 28°C. Dos seis ensaios realizados, a leitura de três deles foi realizada após 24 horas de incubação e de outros três ensaios com 48 horas de incubação. A leitura foi realizada em microscópio invertido (Zeiss®), modelo Axiovert 40 CFL, em aumento de 10x. As larvas eclodidas e os ovos foram analisados e quantificados.

Os dados foram compilados em planilhas do *Microsoft Excel* e analisados por estatística descritiva mediante ao cálculo de eficácia do teste *in vitro*, segundo Coles *et al.* (1992). A taxa de eclodibilidade no teste *in vitro* foi expressa em percentual pela seguinte fórmula: taxa de eclodibilidade (%) = [número de larvas / (número de ovos + larvas) x 100]. Foi utilizado o teste “t” de *Student* para comparação entre as médias nos dois momentos de observação (24 e 48h), usando nível de significância de 5% no programa Biostat 5.0.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado de OPG referente ao exame de triagem (anterior ao protocolo experimental) foi positivo para ovos do tipo *Strongyloidea* e também para ovos do gênero *Strongyloides*. De acordo com Ueno e Gonçalves (1998), infecções mistas em ovinos são consideradas moderadas quando o número de OPG é superior a 1.000, o que já pode ser sugestivo de tratamento, a depender de outros fatores, como estado nutricional e clínico do animal.

Na leitura da coprocultura foi observado infecção mista com predominância dos gêneros *Haemonchus* sp. e *Trichostrongylus* sp., com percentual de 49% e 51%, respectivamente. Esses resultados foram semelhantes aos resultados obtidos por Gugel *et al.* (2012) em Santa Catarina, por Sczesny–Moraes *et al.* (2010) no Mato Grosso do Sul e por Silva *et al.* (2010) no Mato Grosso, este último com relato de que em 100% das coproculturas, as infecções por esses dois gêneros prevaleceram em cerca de 50%.

Para o diagnóstico preciso da resistência parasitária nesse animal buscou-se a realização do teste *in vitro*, no qual foi observado que ao inserir três concentrações distintas de sacarose (20%, 30%, 60%), e não apenas uma concentração como no teste preconizado pela EMBRAPA, o diferencial foi a promoção dos diferentes gradientes formados, que por diferença de densidade, atuaram na flutuação dos ovos em um único ponto. Esta fase fez toda diferença na recuperação e viabilidade dos ovos, já que quando realizado seguindo as recomendações da EMBRAPA os ovos não foram passíveis de recuperação, pois se perdiam durante os processos de flutuação e decantação.

Apesar de o Manual Prático da EMBRAPA (CHAGAS; NICIURA; MOLENTO, 2011) indicar o uso de peneiras com reticulações de 1 mm, 105 µm, 53 µm e 25 µm, neste estudo utilizando outras três peneiras com reticulações distintas das recomendadas (980 µm, 149 µm e 62 µm), não foram observados prejuízos na recuperação dos ovos, é importante frisar que a utilização da última peneira que possui abertura de 25

µm, onde os ovos ficam retidos é fundamental.

Foi avaliado o percentual médio da eclosão das larvas nos três ensaios e indica-se a leitura dos ensaios após 24h de incubação dos ovos, pois a média dos controles negativos (água destilada e DMSO 0,75%) assim como das concentrações 4,68, 9,37, 18,75 µg/mL foram mais baixas após 48h de incubação, sendo recuperadas poucas larvas independentemente do tratamento (Tabela 1). Vale ressaltar que os resultados foram significativamente diferentes no primeiro e terceiro ensaios ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 1.** Percentual médio de eclosão de larvas de nematoides gastrintestinais dos ensaios realizados com 24h e 48h após a incubação dos ovos

Tratamento	24h	48h
Controle – (Água destilada)	71,55	44,19
Controle – (DMSO 0,75%)	82,76	53,00
4,68 µg /mL	71,02	39,08
9,37 µg /mL	80,29	44,10
18,75 µg /mL	54,90	31,29
37,5 µg /mL	32,58	1,55
75 µg /mL	1,02	0,21
112,5 µg /mL	0,17	0,00
150 µg /mL	0,00	0,00
300 µg /mL	0,00	0,00
600 µg /mL	0,00	0,00
Controle + (albendazol 25mg/mL)	0,00	0,00

Fonte: (MARTINS; MARTINS, 2016).

Segundo Samson–Himmelstjerna *et al.* (2009), ocasionalmente larvas não eclodem em poços de controle. As razões não são certas, por isso recomenda-se aceitar apenas os testes em que a taxa de eclosão em ambos os poços de controle seja de pelo menos 70%. No presente estudo isso não ocorreu com 48h.

Quanto à avaliação da resistência dos nematoides ao albendazol nesse estudo, não foi possível determinar devido à falta de literatura sobre a dose de eficácia *in vitro*, também denominada de dose discriminante. Nos estudos *in vitro*, segundo Coles *et al.*

(2006), a dose discriminante é a que impede a eclosão de 99% das larvas. Neste estudo, considerando a avaliação após 24h de incubação, a dose discriminante foi 112,5 µg/mL, porém nenhum estudo na literatura consultada apresenta ou discute esse valor.

Uma provável sugestão para estudos posteriores seria consultar em literatura qual a concentração em nível plasmático do albendazol após metabolização no fígado depois do tratamento oral do animal a ser testado, e a partir desse valor, seriam concentrações inferiores e superiores a esta para serem testados no TEO. Muitos trabalhos relatam doses discriminantes apenas para o tiabendazol (ALBONICO *et al.*, 2005; SAMSON–HIMMELSTJERNA *et al.*, 2009), porém para o albendazol as concentrações são apenas descritas no Manual da Embrapa, mas sem determinação da dose discriminante.

Alguns fatores em investigação, e que podem influenciar os resultados obtidos com o TEO, incluem: o método de dissolução da solução tratamento (DMSO ou água); diferentes fontes de água utilizada (destilada, deionizada ou água de torneira) e grau de limpeza dos ovos (presença de detritos) (COLES *et al.*, 2006).

A maioria dos autores sugere correlacionar o TRCOF com o TEO e futuramente utilizar apenas o TEO para detecção da resistência. Entretanto, diante do exposto, é necessária a padronização do teste nos diferentes laboratórios brasileiros.

#### 4 CONCLUSÕES

Neste estudo não foi possível diagnosticar a resistência anti-helmíntica dos nematoides gastrintestinais ao albendazol no TEO, devido à falta de informação sobre a dose discriminante. Porém, foi possível a padronização, a adaptação e o detalhamento do teste. Para esses testes *in vitro*, muitos ensaios devem ser reproduzidos a fim de se definir um procedimento operacional padrão com as possíveis interpretações quanto às variáveis que influenciam negativamente a execução do teste.

#### REFERÊNCIAS

- ALBONICO, M. *et al.* Development of the egg hatch assay for detection of anthelmintic resistance in human hookworms. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 7, p. 803–811, 2005.
- AMARANTE, A. F. T. *et al.* Resistance of Santa Inês, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 2, p. 91–106, 2004.
- BIZIMENYERA, E. S. *et al.* E. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3, p. 336–343, 2006.
- BRASIL, Portaria SDA nº 48, de 12 de maio de 1997. **Aprova como anexo o Regulamento Técnico a ser observado na produção, no controle e no emprego de antiparasitários de uso veterinário.** Legislação relacionada aos produtos de uso veterinário. Brasília, 2012.
- 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, Brasília, DF, 2011. 153 p.
- COLES, C. G. *et al.* The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 3, p. 167–185, 2006.
- COLES, G. C. *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, n. 3, p. 35–44, 1992.
- FORTES F. S.; MOLENTO M. B. Resistência anti-helmíntica em nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1391–1402, 2013.

GORDON, H. M. C.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of Commonwealth Science and Industry Research Organization**, v. 12, n. 1, p. 50–52, 1939.

*Recebido em: 30/09/2019*

*Aceito em: 04/11/2019*

GUGEL, M. *et al.* Prevalência de endoparasitas em ovinos no oeste de Santa Catarina: resultados preliminares. **Synergismus Scientifica**, v.7, n.1, p.1–3, 2012.

KAPLAN, R. M.; VIDYASHANKAR, A. N. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 12, p. 70–78, 2012.

ROBERTS, F. H. S.; O’SULLIVAN, J. P. Methods for egg count sand larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 1, p. 99–102, 1950.

SAMSON–HIMMELSTJERNA, G. *et al.* Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. **Parasitology Research**, v. 105, n. 2, p. 825–834, 2009.

SCZESNY–MORAES, E. A. *et al.* Resistência anti-helmíntica de nematóides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 229–236, 2010.

SILVA, M. R. L. *et al.* Parasitas gastrintestinais de ovinos criados na região de Rondonópolis–MT. **Revista Biodiversidade**, v. 9, n. 1, p. 67–73, 2010.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para Diagnóstico das Helmintoses de Ruminantes**. 4. ed., Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1998. 55p.

WOOD, I. B. *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology**, v. 58, n. 3, p. 181–213, 1995.