

# DOSE LETAL<sub>50</sub> DE THIABENDAZOLE, EM RELAÇÃO AO PERÍODO DE INFECÇÃO POR *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* E *Trichostrongylus* spp. EM OVINOS

ANTONIO P. DE SOUZA<sup>1</sup>, MIGUEL A. ÁLVAREZ-SÁNCHEZ<sup>2</sup>, JORGE PÉREZ-GARCÍA<sup>2</sup>, FRANCISCO A. ROJO-VÁZQUEZ<sup>2</sup>

**ABSTRACT:** SOUZA, A.P. DE; ÁLVAREZ-SANCHEZ, M.A.; PÉREZ-GARCÍA, J.; ROJO-VÁZQUEZ E.A. **Lethal dose<sub>50</sub> of Thiabendazole, in relation to the period of infection by *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus* spp. in sheep.** [Dose letal<sub>50</sub> de Thiabendazole, em relação ao período de infecção por *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus* spp. em ovinos.] *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 12, n. 2, p. 49-52, 2003. Universidade do Estado de Santa Catarina-UDESC, Centro de Ciências Agroveterinárias-CAV, Av. Luiz de Camões 2090, 88500-000 Lages, SC. E-mail: a2aps@cav.udesc.br

The resistance of helminths to anthelmintics can be diagnosed by “*in vivo* and *in vitro*” techniques. The Egg Hatch Assay is a fast and economic *in vitro* technique. In the period from May to October 2002 the LD<sub>50</sub> of thiabendazole was evaluated, in relation to the period of infection of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus* spp. resistant strains, and one of *Teladorsagia circumcincta* susceptible, through Egg Hatch Assay. With strain of *Teladorsagia circumcincta*, an increase of LD<sub>50</sub> was observed from 70 to 100 days after infection, frequently causing a false positive result of resistance (LD<sub>50</sub> above 0.1ppm). The same tendency was observed with *Haemonchus contortus* from 120 to 155 days after the infection. The LD<sub>50</sub> of thiabendazole did not show significant variation in function of the time of infection for the strain of *Trichostrongylus* spp.

**KEY WORDS:** Thiabendazole, *in vitro* assay, *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus* spp.

## RESUMO

A resistência de nematóides aos anti-helmínticos pode ser diagnosticada por técnicas “*in vivo* e *in vitro*”. Entre as últimas, o Teste de Eclosão de Ovos é uma técnica mais rápida e econômica. No período de maio a outubro de 2002 avaliou-se a DL<sub>50</sub> de thiabendazole, em relação ao período de infecção de cepas de *Haemonchus contortus*, e *Trichostrongylus* spp resistentes e de, *Teladorsagia circumcincta* sensível, através do Teste de Eclosão de Ovos. Com a cepa de *Teladorsagia circumcincta* observou-se um aumento da DL<sub>50</sub> entre 70 e 100 dias após a infecção, dando muitas vezes, falso positivo de resistência (DL<sub>50</sub> superior a 0,1 ppm) e com *Haemonchus contortus* entre os dias 120 e 155 após a infecção. A DL<sub>50</sub> de thiabendazole, na cepa de *Trichostrongylus* não apresentou variação significativa em função do tempo de infecção.

**PALAVRAS-CHAVE:** Thiabendazole, avaliação *in vitro*, *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus* spp.

## INTRODUÇÃO

Entre os fatores sanitários de maior importância que afetam os animais domésticos, causando sérios prejuízos econômicos aos produtores, destacam-se as enfermidades parasitárias, sendo que as causadas por nematóides gastrointestinais estão presentes nos rebanhos em todo o mundo. O controle destas parasitoses tem sido feito quase que exclusivamente com o uso de anti-helmínticos e em muitos países, na maioria das vezes, sem uma orientação técnica adequada.

A resistência aparece quando uma população de parasitos é capaz de tolerar doses de um produto que é eficaz em outras populações da mesma espécie, sendo um caráter hereditário (COLES et al., 1992). A resistência se desenvolve com relativa facilidade através de uma mutação, ou como parece ser o caso na maioria dos nematóides, é um fenômeno pré-adaptativo, ou seja, os gens que conferem a resistência estão presentes na população antes do tratamento anti-helmíntico. O processo de seleção da resistência depende de diferentes fatores associados ao hospedeiro, ao parasito, ao tipo de anti-

<sup>1</sup>Universidade do Estado de Santa Catarina-UDESC, Centro de Ciências Agroveterinárias-CAV, Av. Luiz de Camões 2090, 88500-000 Lages, SC; bolsista CAPES. E-mail: a2aps@cav.udesc.br

<sup>2</sup>Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Leon, Espanha.

helmíntico, ao manejo dos animais e as condições climáticas de cada região (JAKSON; COOP, 2000).

O método *in vitro* mais utilizado, para detectar resistência aos benzimidazóis (BZs), tem sido o Teste de Eclosão de Ovos, que tem como princípio a propriedade ovicida dos BZs e a capacidade dos ovos de cepa resistentes para embrionar e eclodir em concentrações mais altas do que as cepas sensíveis (LE JAMBRE, 1976; COLES; SIMPKIN, 1977). A inibição do desenvolvimento se observa nas fases iniciais porque quando os ovos já se desenvolveram predomina o metabolismo anaeróbico e aparece um efeito refratário à atividade ovicida dos BZs (LE JAMBRE, 1976). Por este fato a necessidade de utilizar ovos recém coletados, tem sido o principal obstáculo desta técnica (COLES; SIMPKIN, 1977). As amostras de fezes podem ser armazenadas a 4°C durante 72 horas (SMITH-BUIJS e BORGSTEEDE, 1986), ou mantê-las em anaerobiose (HUNT; TAYLOR, 1989) podendo ser mantidas assim até sete dias sem que se observe variação significativa na  $DL_{50}$  quando comparadas com ovos recém coletados. Atualmente é o método mais recomendado (COLES et al., 1992).

Uma desvantagem do Teste de Eclosão de Ovos é que os novos BZs apresentam dificuldade para o seu uso por falta de solubilidade, por isto se justifica o emprego do thiabendazole (JOHANSEN, 1989).

Outra importante variável é a relação entre o tempo transcorrido da infecção e a  $DL_{50}$ . Borgsteede e Couwenberg (1987), Maingi (1991) e Varady et al. (1995) demonstraram uma variação importante da  $DL_{50}$ , que segue um modelo parabólico em função do tempo, o que prejudica os resultados em estudos de campo.

Martin et al. (1989) verificaram que esta técnica não detecta baixos níveis de resistência, Varady et al. (1995) recomendaram utilizar prova complementar como o Teste de Redução de Ovos nas Fezes, quando a  $DL_{50}$  está ligeiramente superior ao valor que delimita resistência (0,1 ppm). Apesar de tudo, por ser uma prova rápida e econômica, vem sendo muito utilizada. Varady e Corba (1999) verificaram uma boa correlação com outras provas para detectar resistência.

Com objetivo de verificar as possíveis variações da  $DL_{50}$  de thiabendazole, durante o período de infecção por *H. contortus* resistente aos BZs, lactonas macrocíclicas (LMs) e imidazotiazóis (IMZ)

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi avaliado a  $DL_{50}$  de thiabendazole, em relação ao período de infecção de *H. contortus* resistente aos BZs, LMs, e IMZ, cepa proveniente do "Moredun Research Institute (MRI), Edinburgh, Scotland, UK;" de *Trichostrongylus* spp. resistente as LMs, cepa de campo isolada pela Universidade de Leon - Espanha e de *T. circumcincta*, sensível aos anti-helmínticos, cepa proveniente do "Servicio de Investigacion Agraria (SAI), Zaragoza, Espanha." O trabalho foi realizado no período de maio a outubro de 2000, no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Sanidade Animal, da Faculdade de Veterinária, da Universidade de Leon, Espanha.

Foram infectados dois cordeiros para cada espécie de nematóide, com aproximadamente 5.000 larvas de terceiro estágio da cepa de *H. contortus*, 20.000 de *Trichostrongylus* spp e 20.000 de *T. circumcincta*. Os animais foram mantidos em estábulos em baias isoladas, onde recebiam água e alimento livre de contaminação por larvas de nematóides.

O Teste de Eclosão de Ovos foi realizado de maneira semelhante a descrita por Le Jambre (1976).

Para a análise foram coletadas até três amostras de fezes por semana. Os ovos dos nematóides foram recuperados e concentrados por passagens em peneiras com malhas de 400mm, 150mm e 63mm e coletados em uma de 37mm, seguido de flutuação em solução salina saturada e diversas lavagens em água. A concentração de ovos foi ajustada para cerca de 150 ovos/100ml de água.

Em uma placa de 24 pocinhos com capacidade superior a 2ml e fundo plano (semelhante as utilizadas para cultivo celular) foi distribuído em oito pocinhos 100ml da concentração d ovos. No primeiro pocinho foi adicionado 1900ml de água e considerado controle. A partir do segundo pocinho era adicionado 1890ml de água destilada e 10ml de thiabendazole, em cada um, nas diluições de 2ppm, 10 ppm, 16 ppm, 20 ppm, 60 ppm, 100 ppm e 140ppm. (Desta maneira, a diluição final em cada pocinho foi 200 vezes menor). Foram realizadas duas repetições

A placa foi levada a estufa a 23°C + 1°C por 48 horas. Após adicionou-se uma gota de lugol e a leitura da eclosão foi feita em microscópio invertido (Olympus CK40), contando ovos e larvas.

Os dados foram representados em gráficos de duas entradas. No eixo X foram representados os valores do logaritmo das diluições de thiabendazole e no eixo Y os valores Probit das percentagens de eclosão correspondentes a cada diluição do anti-helmíntico. Foi traçada a linha de regressão para um valor Probit de cinco, obtendo-se o valor no eixo do X, que corresponde com o logaritmo da  $DL_{50}$ . Para determinar a  $DL_{50}$  em ppm foi extraído o antilogaritmo desse valor.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de avaliação da  $DL_{50}$  de thiabendazole, utilizando o Teste de Eclosão de Ovos, sobre as cepas de *T. circumcincta*, *H. contortus* e *Trichostrongylus* spp, estão expressos nas Figuras 1, 2 e 3, respectivamente e Tabela 1.

Com a cepa de *T. circumcincta* sensível aos anti-helmínticos, observou-se um aumento da  $DL_{50}$  entre 70 e 100

Tabela 1. Média das  $DL_{50}$  de thiabendazole e dos percentuais de eclosão de larvas no grupo controle e da primeira diluição (0,01ppm) em três cepas de nematóides.

Cepa	$DL_{50}$	$DL_{50}$ corrigida	% eclosão controle	% eclosão 1ª diluição
<i>T. circumcincta</i>	0,09	0,13	86,04	81,02
<i>H. contortus</i>	0,15	0,31	79,31	82,49
<i>Trichostrongylus</i> spp.	0,07	0,15	82,26	83,31

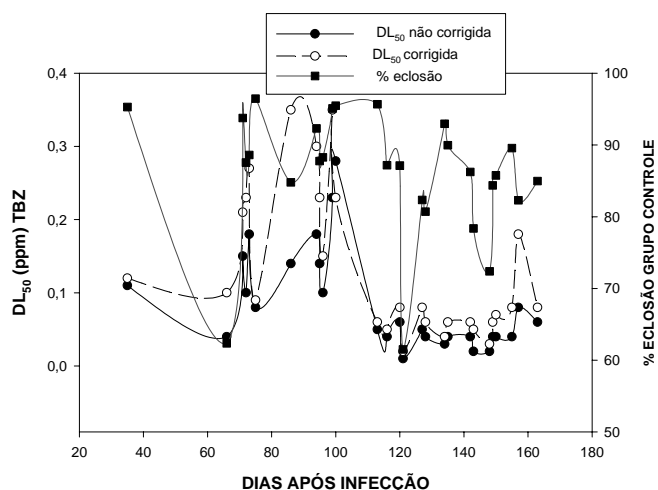


Fig. 1. Dose letal<sub>50</sub> de thiabendazole em relação ao período de infecção de *Teladorsagia circumcincta*.

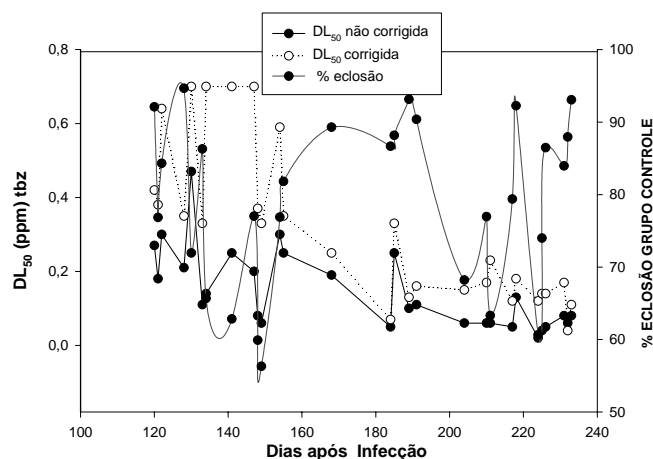


Fig. 2. Dose letal<sub>50</sub> de thiabendazole em relação ao período de infecção por *Haemonchus contortus*.

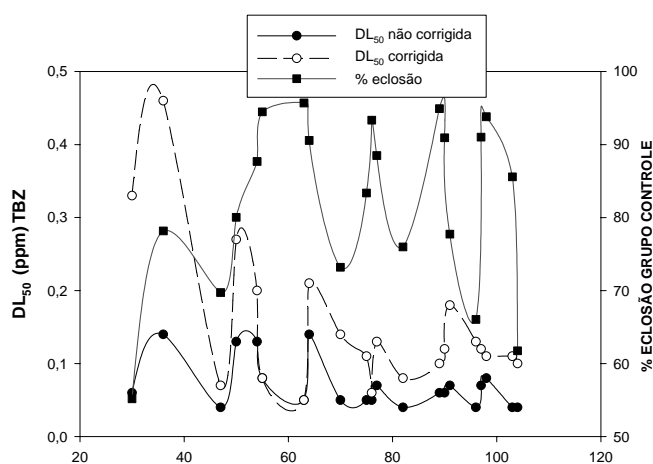


Fig. 3. Dose letal<sub>50</sub> de thiabendazole em relação ao período de infecção de *Trichostrongylus* spp.

dias após a infecção, dando muitas vezes, falso positivo de resistência (DL<sub>50</sub> superior a 0,1 ppm) Figura 1. Esses resultados estão de acordo com Borgsteede e Couwenberg (1987). Maingi (1991) e Varady et al. (1995) demonstraram uma variação importante da DL<sub>50</sub>, que segue um modelo parabólico em função do tempo de infecção. Por esse motivo, para aplicação do teste a campo, no caso de detectar resistência a este parasito, poderia se recomendar repetir o teste 30 dias mais tarde.

O efeito parabólico do aumento da DL<sub>50</sub> de thiabendazole parece estar presente também em *H. contortus* resistente aos anti-helmínticos, pois na Figura 2 observa-se DL<sub>50</sub> maior entre os dias 120 e 155 após a infecção. No entanto, neste trabalho, com esta cepa, não foi avaliado a DL<sub>50</sub> no início da infecção. A DL<sub>50</sub> não corrigida pelo grupo controle, a partir do dia 155, apresentou na maioria das vezes resultados falsos negativos de resistência, o que reforça a recomendação de Varady et al. (1995) de utilizar prova complementar como o Teste de Redução de Ovos nas Fezes, quando a DL<sub>50</sub> está ligeiramente superior ao valor que delimita resistência (0,1ppm).

A DL<sub>50</sub> de thiabendazole, na cepa de *Trichostrongylus* spp. resistente às LMs, porém sensível ao thiabendazole, não apresentou variação significativa em função do tempo de infecção. Ao contrário do que ocorreu com *H. contortus*, a DL<sub>50</sub> corrigida apresentou, na maioria das vezes resultado falso positivo de resistência (Figura 3), por este motivo, também é recomendado utilizar o Teste de Redução de Ovos nas Fezes, como prova complementar se os resultados estiverem ligeiramente inferior a 0,1ppm.

De uma maneira geral, quando se corrigiu o percentual de eclosão pelo grupo controle, aumentou a DL<sub>50</sub>. O aumento foi mais intenso quando o percentual de eclosão do grupo controle foi menor do que o da primeira diluição.

Na Tabela 1, verifica-se a média das DL<sub>50</sub> e dos percentuais de eclosão nas três cepas de nematóides.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORGSTEEDE, F.H.; COUWENBERG, T. Changes in LC<sub>50</sub> *in vitro* egg development assay during the patent period of *Haemonchus contortus* in sheep. *Research in Veterinary Science*, v.42, n. 3, p. 413-414, 1987.
- COLES, G. C.; SIMPKIN, K. G. Resistance of nematode eggs to the ovicidal activity of benzimidazoles, *Research in Veterinary Science*, v. 22, n. 3, p. 386-387, 1977.
- COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, J. P. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, v. 44, n. 1-2, p.35-44, 1992.
- HUNT, R. K.; TAYLOR, M. A. Use of the egg hatch on sheep faecal samples for the detection of benzimidazole resistant nematodes. *Veterinary Record*, v. 12, n.7, p. 153-154, 1989.
- JACKSON, F.; COOP, R. L. The development of anthelmintic

- resistance in sheep nematodes. *Parasitology*, v. 120, p, S95-S107, 2000 Supplement.
- JOHANSEN, M. V. An evaluation of techniques used for the detection of anthelmintic resistance in nematode parasites of domestic livestock. *Veterinary Research Communications*, v. 13, n. 6, p. 455-466, 1989.
- LE JAMBRE, L. F. Egg hatch as an in vitro assay of thiabendazole resistance in nematodes. *Veterinary Parasitology*, v. 2. N. 4, p. 385-391, 1976.
- MAINGI, N. Variations in  $LC_{50}$  in the egg hatch assay for anthelmintic resistant trichostrongylid nematode parasites in sheep. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, v. 39, n. 3, p. 167-172, 1991.
- MARTIN, P. J.; ANDERSON, N.; JARRET, R. G. Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction test and *in vitro* assays. *Australian Veterinary Journal*, v. 66, n. 8, p. 236-240, 1989.
- SMITH-BUIJS, M. C.; BORGSTEEDE, F. H. Effect of cool storage of faecal samples containing *Haemonchus contortus* eggs on the results of an in vitro egg development assay to the test anthelmintic resistance. *Research in Veterinary Science*, v. 40, n. 1, p. 4-7, 1986.
- VARADY, M.; PRASLICKA, J.; CORBA, J. The evaluation of in vivo faecal egg count reduction test and in vitro egg hatch test for detection of benzimidazole resistance in sheep nematodes. *Helminthologia*, v.32, n. 4, p. 225-228, 1995.
- VARADY, M.; CORBA, J. Comparison of six in vitro test in determining benzimidazole and levamisole resistance in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* of sheep. *Veterinary Parasitology*, v. 80, n. 3, p. 239-249, 1999.

Recebido em 12 de fevereiro de 2003.

Aceito para publicação em 30 de outubro de 2003.