



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

PAULA MACIEL ARRUDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE OVICIDA DE DIFERENTES FÁRMACOS EM
OVOS DE *Fasciola hepatica* COLETADOS DE BOVINOS NATURALMENTE
INFECTADOS NO PLANALTO SERRANO EM SANTA CATARINA, BRASIL**

**LAGES
2022**

PAULA MACIEL ARRUDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE OVICIDA DE DIFERENTES FÁRMACOS EM OVOS DE
Fasciola hepatica COLETADOS DE BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS NO
PLANALTO SERRANO EM SANTA CATARINA, BRASIL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV, da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Orientador: Prof. Dr. Andreas Lazaros Chryssafidis

LAGES

2022

PAULA MACIEL ARRUDA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE OVICIDA DE DIFERENTES FÁRMACOS EM OVOS DE *Fasciola hepatica* COLETADOS DE BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS NO PLANALTO SERRANO EM SANTA CATARINA, BRASIL

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV, da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Orientador: Prof. Dr. Andreas Lazaros Chryssafidis

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Andreas Lazaros Chryssafidis
UDESC/Lages-SC
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. Anderson Barbosa Moura
UDESC/Lages-SC
(Membro interno)

Prof. Dr. Luiz Daniel de Barros
UEL/Londrina-PR
(Membro externo)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, o maior agradecimento dirijo a Deus pelas bênçãos sem fim, pelas conquistas até o presente momento e por me amparar em todos os momentos dessa jornada. A Ele seja dada toda honra e glória.

À minha família, meus pais Reinaldo e Edna, e ao meu irmão Éder, por acreditarem em mim desde o momento da minha escolha e do meu sonho de ser Médica Veterinária. Quero agradecê-los por todo o suporte, motivações, amor, ensinamentos e companhia que sempre me proporcionaram, não só ao longo desse estudo como de toda a minha vida. Apesar de todas as atribulações durante este período, vocês me mantiveram de pé e me deram forças para continuar. Vocês são incríveis! O desejo do meu coração é poder retribuir tudo aquilo que vocês me deram e ensinaram. Eu amo vocês, serão pra sempre meus exemplos de vida.

Ao Pedro Henrique por todo amor, cuidado e paciência. Que mesmo de longe se fez presente, me incentivando e ajudando até em situações que pareciam ser fora do seu alcance. Você me motiva a ser melhor a todo instante.

Aos professores, pós-graduandos e estagiários, toda equipe de trabalho do Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, dirijo um agradecimento por todo empenho demonstrado na realização dos ensaios experimentais.

Em especial ao meu orientador, Prof. Andreas Lazaros Chryssafidis, por aceitar esse desafio e caminhar comigo, confiando no meu trabalho. Desejo manifestar um especial agradecimento pelo apoio constante, orientação, ensinamentos prestados, rigor científico e amizade.

Também, deixo expresso o meu reconhecimento e agradecimento especial a Josiane Matos do Frigorífico de Lages e ao Andrey do Frigorífico de Otacílio Costa pela disponibilidade, parceria e fornecimento das amostras para a realização do estudo.

A todos os meus amigos, aqueles que caminham ao meu lado desde os tempos de colégio, e também as grandes amizades que fiz durante a graduação na Universidade Estadual de Londrina. Vocês tornam os meus dias melhores, guardarei pra sempre em meu coração todos os momentos compartilhados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) por meio do Edital de Chamada Pública 027/2020 – Termo de Outorga: 2021TR793.

Por fim, agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa que permitiu dois anos de formação no Programa de Pós-Graduação e Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina.

Foram tantas pessoas que, generosamente, se dispuseram a incentivar e apoiar esse desafio. Pessoas que abriram meus caminhos, colaboraram e me ajudaram das mais diversas maneiras. As novas amizades e todo amparo recebido longe de casa. Fica aqui registrado, o meu agradecimento sincero: muito obrigada a todos vocês.

RESUMO

A fasciolose é uma importante doença zoonótica causada por *Fasciola hepatica*, que tem ampla distribuição geográfica, parasitando o fígado e canais biliares de animais de sangue quente. *F. hepatica* é um trematódeo digenético, que necessita de gastrópodes, como hospedeiros intermediários, para completar seu desenvolvimento. Animais e seres humanos se infectam pela ingestão de vegetais e água contendo a forma infectante do parasito. A fasciolose gera grande impacto econômico na produção bovina, pela redução na produtividade e condenação hepática nos abatedouros. O controle da fasciolose ainda é essencialmente baseado na aplicação de fármacos fasciolícidas nos indivíduos infectados, e a resistência anti-helmíntica é um fator que limita o sucesso do tratamento. O objetivo do presente estudo foi desenvolver um protocolo *in vitro* para a análise da atividade ovicida (AO) de fármacos comerciais, e consequente detecção de resistência anti-helmíntica em isolados de *F. hepatica*, o teste de desenvolvimento e eclosão de ovos (TDEO). Amostras de bile de bovinos parasitados por *F. hepatica* foram obtidas de abatedouros, sob inspeção pelo Serviço de Inspeção Municipal (SIM), nas cidades de Lages e Otacílio Costa, Santa Catarina, para o isolamento dos ovos. Para a realização do TDEO, a bile passava por um processo de lavagem, sendo os ovos quantificados ao final do procedimento. A amostra era separada em alíquotas de 1000 ovos, acondicionadas em frascos coletores universais com tampa. Neste estudo, foram utilizados quatro fármacos comerciais diluídos em água destilada, preparados de acordo com a dose para tratamento recomendada pelo fabricante, considerando 1 L de água equivalente a 1 kg, sendo eles: sulfóxido de albendazol (ABDZ), closantel (CSTL), nitroxinil (NTXL) e triclabendazole com fenbendazole (TBZF). As amostras foram testadas com cada fármaco em triplicatas, sendo adicionada uma triplicata de controle em cada repetição, contendo somente água destilada. Estas amostras eram incubadas a 27 °C por 28 dias. Após a incubação, os ovos foram analisados e classificados de acordo com seu grau de desenvolvimento, em “não desenvolvidos”, “embrionados” ou “eclodidos”. Eram analisados no mínimo 100 ovos em cada amostra, sendo então calculada a AO de cada fármaco. No total, foram analisadas 201 amostras. Foram identificados dois isolados resistentes a TBZF (AO < 40%), provenientes dos municípios de Lages e Capão Alto, e uma amostra com resistência indeterminada para TBZF (40% < AO < 70%), proveniente do município de Painel. O CSTL não apresentou adequada AO em nenhuma repetição. O TDEO mostrou ser uma técnica adequada para análise da resistência de *F. hepatica* aos anti-helmínticos, possibilitando obter esta informação sem a necessidade de eutanásia de um grande número de animais.

Palavras-chave: *Fasciola hepatica*. Resistência. Anti-helmínticos. Atividade ovicida.

ABSTRACT

Fasciolosis is an important zoonotic disease caused by *Fasciola hepatica*, which has a wide geographic distribution, parasitizing the liver and bile ducts of warm-blooded animals. *F. hepatica* is a digenetic trematode that needs gastropods as intermediate hosts to complete its development. Animals and humans become infected by ingesting vegetables and water containing the infective form of the parasite. Fasciolosis generates a great economic impact on bovine production, due to the reduction in productivity and liver condemnation in slaughterhouses. The control of fasciolosis is still essentially based on the application of fasciocidal drugs in infected individuals, and anthelmintic resistance is a factor that limits the success of the treatment. The aim of the present study was to develop an *in vitro* protocol for the evaluation of ovicidal activity (OA) of commercial drugs, and consequent detection of anthelmintic resistance of *F. hepatica*, the egg development and hatching test (EDHT). Bile samples from cattle parasitized by *F. hepatica* were obtained from slaughterhouses, under inspection by the Municipal Inspection Service (MIS), in the cities of Lages and Otacílio Costa, Santa Catarina, for the isolation of eggs. To perform the EDHT, the bile was washed, and the eggs were quantified at the end of the procedure. The sample was separated into aliquots of 1000 eggs, placed in universal collection flasks with lids. In this study, four commercial drugs were used diluted in distilled water, prepared according to the dose for treatment recommended by the manufacturer, considering 1 L of water equivalent to 1 kg, namely: albendazole sulfoxide (ABDZ), closantel (CSTL), nitroxinil (NTXL) and triclabendazole with fenbendazole (TBZF). The samples were tested with each drug in triplicates, with a control triplicate being added to each repetition, containing only distilled water. These samples were incubated at 27 °C for 28 days. After incubation, the eggs were analyzed and classified according to their degree of development, as "undeveloped", "embryonic" or "hatched". A minimum of 100 eggs were analyzed in each sample, and the ovicidal activity of each drug was then calculated. In total, 201 samples were analyzed. Two samples resistant to TBZF (OA < 40%) were identified from the municipalities of Lages and Capão Alto, and a sample with undetermined resistance to TBZF (40% < AO < 70%), from the municipality of Painel. CSTL did not show adequate AO in any replicate. The EDHT proved to be an adequate technique for analyzing the resistance of *F. hepatica* to anthelmintics, making it possible to obtain this information without the need for euthanasia of a large number of animals.

Keywords: *Fasciola hepatica*. Resistance. Anthelmintics. Ovicidal Activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Bovinos – Santa Catarina: distribuição do rebanho – 2021 14
- Figura 2.** Ovos de *Fasciola hepatica*, com presença de opérculos, coloração amarelo castanho e 150 µm de comprimento..... 17
- Figura 3.** Ciclo biológico da *Fasciola hepatica*..... 19
- Figura 4** (A) Fígado de bovino com fasciolose seccionado pela inspeção sanitária, apresentando parasito adulto nos canais biliares (seta). (B) Exemplares de *Fasciola hepatica*..... 26
- Figura 5.** Frasco (com tampa) identificado com o número do brinco do bovino e conteúdo biliar diluído em água, distribuídos em frascos cônicos de 500 mL..... 31
- Figura 6.** Isolamento dos ovos de *Fasciola hepatica*: (A) Sedimento com ovos observados macroscopicamente; (B) Pellet ressuspenso para quantificação..... 32
- Figura 7.** Quantificação dos ovos por volume de solução: (A) Três alíquotas de 100 µL em lâminas de microscopia; (B) Contagem de ovos em cada alíquota..... 32
- Figura 8.** Amostras de ovos de *Fasciola hepatica* acondicionados em coletores universais (1000 ovos/frasco), contendo os fármacos diluídos, incubados em estufa por 28 dias, a 27ºC, sem iluminação 34
- Figura 9.** Amostras de ovos de *Fasciola hepatica* acondicionados em coletores universais (1000 ovos/frasco), contendo os fármacos diluídos, deixadas sob luz, por 24 h para eclosão dos miracídios..... 35
- Figura 10.** Fases dos ovos de *Fasciola hepatica* observadas nos controles negativos e com água destilada: (A) ovo não embrionado (seta) e embrionário contendo o miracídio; (B) ovo eclodido..... 36

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Atividade ovicida (%) dos anti-helmínticos em ovos de *Fasciola hepatica* isolados dos Frigoríficos de Lages e de Otacílio Costa, de janeiro 2021 a março 2022..... 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Padronização dos grupos de acordo com o número de ovos isolados e fármacos utilizados	37
Tabela 2.	Comparação da atividade ovicida (%) nos tratamentos entre águas do LAPAR e Laboratório fornecedor.....	40
Tabela 3.	Atividade ovicida (%) do anti-helmíntico closantel em ovos de <i>Fasciola hepatica</i> , verificada pelo teste de desenvolvimento e eclosão de ovos (TDEO)	42
Tabela 4.	Determinação e comparação da atividade ovicida (AO) em ovos incubados de <i>Fasciola hepatica</i> em concentração descrita em literatura (0,05 nmol/ml) e concentração recomendada pelo fabricante do fármaco comercial	43
Tabela 5.	Média geral dos resultados do teste de desenvolvimento e eclosão de ovos (TDEO) de diferentes isolados de <i>Fasciola hepatica</i> , após incubação a 27 °C por 28 dias, em soluções contendo diferentes anti-helmínticos. Os valores indicam a média do percentual de todas as amostras incubadas, expressa em média ± DP.....	44
Tabela 6.	Atividade ovicida (%) de isolados que apresentaram resistência e suscetibilidade/resistência indeterminada em ovos de <i>Fasciola hepatica</i> , e investigação de autoctonia.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABZ	Albendazol
ABDZ	Sulfóxido de Albendazol
AO	Atividade Ovicida
CEUA	Comissão de Ética do Uso de Animais
CIDASC	Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina
Cm	Centímetros
CSTL	Closantel
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
Kg	Quilograma
L	Litros
LAPAR	Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias
Min	Minutos
mg	Miligramas
ml	Mililitros
ng	Nanogramas
NTXL	Nitroxinil
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SC	Santa Catarina
SIGEN	Sistema de Gestão da Defesa Agropecuária Catarinense
SIM	Serviço de Inspeção
TEC	Teste de Eficácia Controlada
TBZF	Triclabendazole + Fenbendazole
TCBZ	Triclabendazole
TDEO	Teste de Desenvolvimento e Eclosão de Ovos
TEO	Teste de Eclosão de Ovos
TRCOF	Teste de Redução da Contagem de Ovos nas Fezes
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
°C	Grau Celsius
µL	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	AGENTE ETIOLÓGICO	17
2.2	CICLO DE VIDA	18
2.2.1	Fatores Climáticos.....	19
2.3	EPIDEMILOGIA.....	20
2.4	SAÚDE PÚBLICA.....	22
2.5	IMPACTO ECONÔMICO.....	22
2.6	ASPECTOS CLÍNICOS E SINTOMATOLOGIA	23
2.7	DIAGNÓSTICO	24
2.8	CONTROLE	26
2.9	TRATAMENTO.....	27
2.10	RESISTÊNCIA	28
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4	ORIGEM DAS AMOSTRAS.....	30
4.2	ISOLAMENTO DE OVOS DE <i>Fasciola hepatica</i>	30
4.3	TESTE DE DESEVOLVIMENTO E ECLOSÃO DE OVOS (TDEO) E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE OVICIDA (AO)	33
4.4	RASTREABILIDADE INDIVIDUAL DOS ANIMAIS E LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA.....	37
4.5	ÁGUA DESTILADA	37
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	A IMPORTÂNCIA DA ÁGUA DESTILADA	39
5.2	INEFICÁCIA DO CLOSANTEL.....	40

5.3	ATIVIDADE OVICIDA (AO) DOS ANTI-HELMÍNTICOS ATRAVÉS DO TESTE DE DESENVOLVIMENTO E ECLOSÃO DE OVOS (TDEO)	42
5.3.1	Eficácia do Sulfóxido de Albendazol.....	46
5.3.2	Eficácia do Nitroxinil	47
5.3.3	Eficácia do Triclabendazole e Fenbendazole	47
5.4	DISTRIBUIÇÃO DE BOVINOS COM RESISTÊNCIA A FASCILOSE	48
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
	REFERÊNCIAS.....	53

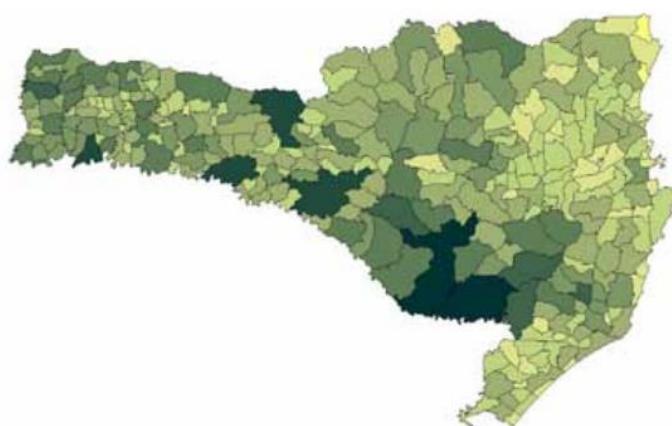
1 INTRODUÇÃO

Fasciola hepatica, é um parasito trematódeo zoonótico que causa perdas econômicas significativas na produção de ruminantes e a sua presença está associada a condições climáticas adequadas, como temperatura amena e alta umidade (AKSOY et al., 2005; ECHEVARRIA, 2004), necessitando de um hospedeiro intermediário para completar seu desenvolvimento (ALBA et al., 2018; DA COSTA et al., 2019).

O Estado de Santa Catarina (SC) está entre os cinco estados brasileiros com maior número de estabelecimentos com presença de bovinos, registrando um dos maiores crescimentos do ano de 2019 (12,63%) (EPAGRI, 2021).

A região do Planalto Serrano do Estado de Santa Catarina, é composta por 18 municípios, equivalente a 17% do território catarinense, abrigando importantes cidades como Lages, Curitibanos e São Joaquim. Toda a região apresenta consolidada tradição agropecuária, com fazendas centenárias. Em 2020, observou-se queda de 7,89% no número de bovinos abatidos no país, enquanto Santa Catarina foi um dos poucos Estados que apresentou elevação dos abates no período, com variação positiva de 12,72%. No ano de 2021, foram produzidos e destinados ao abate 766,2 mil animais (EPAGRI, 2022). A Figura 1 apresenta a distribuição do rebanho bovino catarinense em 2021, é possível observar que as cidades de Lages e São Joaquim detêm o maior número de bovinos do Estado, no qual quanto mais intensa a coloração, maior o número de animais produzidos.

Figura 1. Bovinos – Santa Catarina: distribuição do rebanho – 2021.



Fonte: EPAGRI, 2022.

A fasciolose gera grande impacto na saúde animal, provoca significativas perdas econômicas na produção pecuária, comprometendo diretamente o desenvolvimento econômico da fazenda, além de afetar severamente a saúde pública, visto que é uma zoonose emergente e negligenciada (ARIAS-PACHECO et al., 2020).

A região do Planalto Serrano apresenta características propícias ao desenvolvimento dos hospedeiros intermediários da *F. hepatica*, os caramujos limneídeos, como umidade e temperatura típicas do clima temperado ameno (ALBUQUERQUE et al., 2022; SILVA et al., 2020).

Informações sobre a epidemiologia do parasito e suas interações com os hospedeiros são conhecimentos necessários para o estabelecimento de um sistema de controle efetivo. A falta dessas informações pode levar ao uso inadequado de anti-helmínticos e, seu uso incorreto pode gerar uma população parasitária resistente às drogas utilizadas (ALVES; MARTINS, 2013).

Há um número limitado de anti-helmínticos disponíveis para tratar a fasciolose em ruminantes, e os benzimidazóis são os medicamentos de eleição para a grande maioria dos produtores rurais, no entanto, casos de resistência têm sido descritos em diversas partes do mundo (CANEVARI et al., 2013; HANNA et al., 2015; KELLEY et al., 2016, 2020; OLAECHEA et al., 2011; ORTIZ et al., 2013).

De acordo com as recomendações da WAAVP (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology), para avaliação de eficácia de tratamento e detecção de resistência anti-helmíntica de *F. hepatica*, a avaliação post-mortem é necessária (WOOD et al., 1995). Alguns relatos sobre resistência anti-helmíntica de *F. hepatica* utilizaram o teste de redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF) como ferramenta diagnóstica, onde a eficácia do fármaco foi estimada comparando a contagem de ovos fecais dos animais antes e após o tratamento (BABJÁK et al., 2021; MOONEY et al., 2009). Porém, para demonstrar resistência, os resultados do TRCOF devem ser comparados com o teste de eficácia controlada (TEC) *in vivo*, no qual o animal é sacrificado e contato o número de vermes adultos vivos em seu fígado (COLES et al., 2006; MCCONVILLE et al., 2009; ORTIZ et al., 2013; WOOD et al., 1995).

Recentemente, diferentes estudo vêm propondo a utilização de ensaios *in vitro* para a verificação de resistência em *F. hepatica*, pela aplicação do teste de eclosão de ovos (TEO), onde o material de um único animal pode ser utilizado para avaliação da população parasitária de um rebanho (ALVAREZ et al., 2020; CANEVARI et al.,

2013; CEBALLOS et al., 2019; CHRYSSAFIDIS et al., 2015; ROBLES-PÉREZ et al., 2014).

A partir destas considerações, para o delineamento de medidas de controle, é fundamental conhecer a eficácia dos fármacos utilizados no tratamento dos animais parasitados, identificando a presença de isolados resistentes aos anti-helmínticos, minimizando as perdas econômicas decorrentes de tratamentos ineficazes.

Assim, o presente estudo visa avaliar a atividade ovicida *in vitro* dos anti-helmínticos na inibição do desenvolvimento e ecldibilidade dos ovos de *F. hepatica* de isolados obtidos de diferentes fontes, com o propósito de desenvolver e validar um protocolo simplificado de teste de desenvolvimento e eclosão de ovos (TDEO), para detecção de isolados de *F. hepatica* potencialmente resistentes a anti-helmínticos, utilizando fármacos comerciais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

As duas espécies mais comuns implicadas como agentes etiológicos da fasciolose são *F. hepatica* e *F. gigantica* (SILES-LUCAS et al., 2021), ambas pertencentes ao filo Plathelminthes, classe Trematoda e família Fasciolidae (MAS-COMA; VALERO; BARGUES, 2019).

Estes parasitos são acelomados, pardo-acinzentados, com o corpo em forma de folha, sendo achatao dorso-ventralmente, podendo chegar a 3 cm de comprimento (FORTES, 1997). O tegumento é recoberto por espinhos que auxiliam na sua fixação nos ductos biliares, são dotados de ventosas oral e ventral, faringe, esôfago e um grande ceco intestinal. Sem a presença do anus, a excreção dos resíduos é feita através de ejeção oral (MAS-COMA; BARGUES, 1997). Os produtos de excreção/secreção liberados pelo parasito auxiliam na sua sobrevivência protegendo-o das respostas imunitárias do hospedeiro (FAIRWEATHER; BORAY, 1999).

Produz ovos grandes, casca fina, operculados, com coloração amarelo-castanho, não embrionados, medindo aproximadamente 130 a 150 µm de comprimento por 60 a 100 µm de largura (Figura 2) (FEPMVZ, 2019).

Figura 2. Ovos de *Fasciola hepatica*, com presença de opérculos, coloração amarelo castanho e 150 µm de comprimento.



Fonte: Própria autora (2021).

A oviposição ocorre no trato biliar e, com a bile, os ovos atingem o intestino e são eliminados ao meio ambiente com as fezes (MAS-COMA; BARGUES; VALERO, 2018). A forma adulta do parasito está presente nos ductos biliares mais calibrosos dos hospedeiros definitivos, nutrindo-se do conteúdo biliar, dos produtos da inflamação formada, do material necrótico e fibrose gerada. Ocasiona a destruição dos tecidos, hipertrofia dos ductos biliares, com necrose de lóbulos hepáticos e distensão da cápsula hepática (ALEIXO et al., 2015).

2.2 CICLO DE VIDA

O hospedeiro intermediário que participa do ciclo biológico da *Fasciola hepatica* são os moluscos pertencentes à família Lymnaeidae (MAS-COMA; BARGUES; VALERO, 2005). Algumas espécies de moluscos já foram identificadas no Brasil como hospedeiro intermediário de *F. hepatica*: *Pseudosuccinea columella*, *G. viatrix* e *L. cubensis*, *L. rupestris* (HÉLIO et al., 2015; MEDEIROS, 2014; PARAENSE, 1982; UETA, 1976).

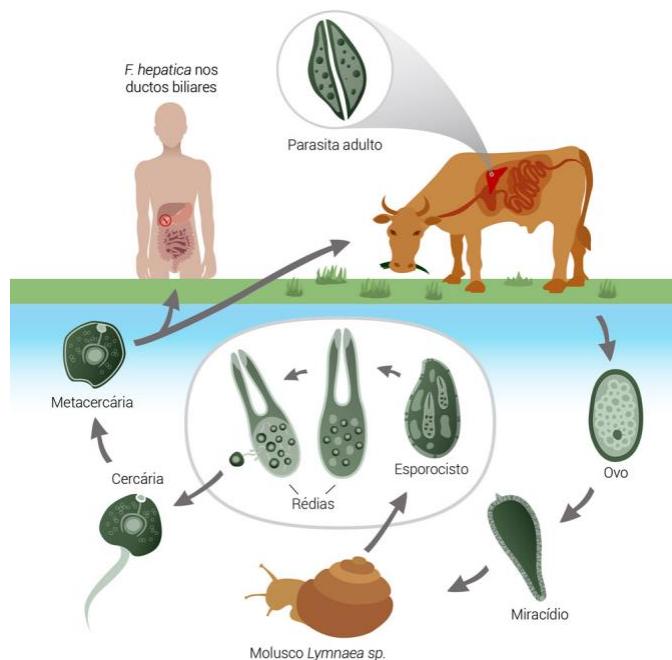
A presença do molusco é fundamental para o estabelecimento da fasciolose. Podem ser encontrados em córregos de águas límpidas, de correnteza fraca, em solos argilosos, aderidos em grimpas e pedras, canais de irrigação com pouca água e em lodos e brejos (ABÍLIO; WATANABE, 1998; ECHEVARRIA, 2004; MEDEIROS et al., 2014). A criação de animais infectados nessas áreas propicia que a fasciolose complete seu ciclo evolutivo e consequente contaminação humana (TEIXEIRA; QUEVEDO; QUEVEDO, 2020).

O parasito possui oito fases evolutivas divididas entre os hospedeiros definitivos e intermediários, sendo: ovo, miracídio, esporocisto, rédea, cercária, metacercária, parasito jovem e adulto (MAS-COMA; BARGUES, 1997).

Fasciola hepatica possui um ciclo complexo por conter vários estágios, dois hospedeiros (definitivo e intermediário) e um veículo (plantas aquáticas). Os ovos não embrionados são liberados nos ductos biliares pela vesícula biliar e excretados nas fezes. Estes ovos se desenvolvem na água, formando o embrião que se torna a primeira fase larval do parasito, o miracídio. Os miracídios são liberados na água após um estímulo luminoso pós-chuva e buscam os caramujos limneídeos, que os penetram através do tegumento. No caramujo, os parasitas passam por diferentes estágios de desenvolvimento, cada miracídio se transforma em um esporocisto, e este

contém células germinativas que irão gerar várias (5 a 8) rédeas. As rédeas posteriormente migram dentro do caramujo e se desenvolvem, gerando múltiplas cercárias. Desta multiplicação um miracídio pode dar origem até quatro mil cercárias. As cercárias são liberadas e nadam até plantas aquáticas, onde se encistam nas folhas e caules como metacercárias. Desta maneira, a fasciolose é adquirida pela ingestão de plantas contendo a metacercária encistada. Dentro do hospedeiro, após a ingestão, elas se desencistam no duodeno, perfuram a parede intestinal e migram pela cavidade peritoneal até o parênquima hepático, atingindo os ductos biliares após algumas semanas, onde se transformam em adultos, eliminando os ovos e fechando o ciclo (Figura 3). O período desde a ingestão de metacercárias até a presença de ovos nas fezes é de 10 a 12 semanas (ALVES; MARTINS, 2013; ECHEVARRIA, 2004; JOHN et al., 2019; MAS-COMA; BARGUES, 1997; MITCHELL, 2002; TESSELE; BRUM; BARROS, 2013).

Figura 3. Ciclo biológico da *Fasciola hepatica*.



Fonte: Telesse, 2013.

2.2.1 Fatores Climáticos

A fasciolose tem alta frequência no Sul do Brasil. A ocorrência dessa parasitose está ligada aos fatores climáticos propícios ao desenvolvimento dos moluscos vetores, principalmente, as temperaturas amenas, alta umidade, com chuvas prolongadas de

verão e presença de áreas alagadas e banhados (ALEIXO et al., 2015).

O Estado de Santa Catarina proporciona um habitat favorável às espécies de moluscos, e este conjunto de fatores é fundamental para o desenvolvimento de grandes quantidades de metacercárias, necessárias para que ocorram altas taxas de infecção da doença (ALEIXO et al., 2015; BENNEMA et al., 2014).

Em material divulgado pelos serviços estaduais de saúde de Santa Catarina, a fasciolose não é identificada na região do Planalto Serrano, sugerindo que o trematódeo e seus hospedeiros estariam restritos à região litorânea (AGUDO-PADRÓN; VEADO; SAALFELD, 2013). Existem estudos recentes, indicando a ocorrência de casos autóctones de fasciolose bovina em municípios da Mesorregião Serrana (AMÉRICO et al., 2022).

Entretanto, não se sabe o grau de resistência, tampouco se há resistência a antiparasitários em *F. hepatica* desta região.

2.3 EPIDEMIOLOGIA

A fasciolose pode ser enquadrada em duas descrições de enfermidades: doença transmitida por vetor, dada a necessidade do molusco para o desenvolvimento do parasito; e doença transmitida por alimento e água, devido à característica transmissão da doença por vegetais infestados por metacercárias (MAS-COMA; BARGUES; VALERO, 2018).

Amplamente distribuída no mundo todo, a *F. hepatica* é uma infecção parasitária generalizada no gado. Em rebanhos da Austrália, onde a alta pluviosidade e um clima ameno são adequados para o principal hospedeiro intermediário *Austropeplea tomentosa*, estima-se elevada perda econômica e resistência anti-helmíntica (KELLEY et al., 2020, 2021; LAMB et al., 2021). Na Europa, *F. hepatica* está principalmente associada a doenças em ovinos, bovinos e caprinos. Presentes em terras baixas, a infecção raramente é relatada em regiões montanhosas (BEESLEY et al., 2017; CAMINADE et al., 2018; RINALDI et al., 2015; ROLDÁN et al., 2020).

Na Argentina, a prevalência de fasciolose em bovinos, com base na presença de ovos nas fezes, pode chegar a 77% (BEESLEY et al., 2021; MORIENA; RACIOPPI; ALVAREZ, 2004).

Fasciola hepatica é a única espécie encontrada no Brasil e amplamente

distribuída em todos os continentes, exceto na Antártica, enquanto *F. gigantica* está localizada nos trópicos da África e Ásia (MAS-COMA, 2005; TOLAN, 2011). A ocorrência da doença está especialmente ligada a presença do molusco da família Lymnaeidae, que atua como hospedeiro intermediário do agente e assim, completa seu ciclo, infectando uma ampla gama de hospedeiros (ALEIXO et al., 2015).

No território brasileiro, o habitat ideal para os moluscos limneídeos é dado principalmente por canais de drenagem ou irrigação com águas de curso lento ou remansos com pequena enseada tranquila, áreas com pastagens alagadas, pantanosas ou inundadas间断地, e que oferecem locais apropriados para a presença e proliferação dos moluscos, com fácil acesso para os animais do rebanho (BENNEMA et al., 2014).

A permanência dos moluscos em pequenos sítios de sobrevivência, com a chegada da estação de chuva, pode ser aumentada e a disseminação pelas águas de enchentes facilita a formação de novos criadouros, e posterior distribuição para outras regiões pela instalação da fasciolose no novo local e movimentação dos animais entre as propriedades rurais, visto que a disseminação da *F. hepatica* depende destes fatores (DUTRA et al., 2010).

No contexto da atividade pecuária mundial o início da expansão da fasciolose animal tem relação direta com a exportação e importação de animais, bem como o fluxo de animais de regiões endêmicas para regiões onde antes a enfermidade não era relatada (ALBUQUERQUE et al., 2022; SERRA-FREIRE; NUERNBERG, 1992).

Embora a doença ocorra em todo o país, é hiperendêmica em bovinos no Sul do Brasil. Entre os estados com as maiores perdas, relacionadas à diminuição do peso da carcaça e condenações de fígado, estão Rio Grande do Sul, Espírito Santo e Santa Catarina, respectivamente (MOLENTO et al., 2018). Em estudo realizado pelo Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LAPAR) do CAV/UDESC, investigando a ocorrência e distribuição de casos autóctones de fasciolose bovina na Mesorregião Serrana, comprovou-se a prevalência da doença em diversos municípios e um alto índice de positividade em animais abatidos nos frigoríficos regionais. Os municípios de Painel, Capão Alto, Lages e Bocaina do Sul apresentaram a maior prevalência dos casos autóctones (AMÉRICO et al., 2022).

2.4 SAÚDE PÚBLICA

Fasciola hepatica é uma doença zoonótica com distribuição mundial (ALEIXO et al., 2015). A fasciolose já é considerada uma enfermidade de impacto na saúde pública e atualmente a Organização Mundial da Saúde (OMS) inclui a doença na lista das DTN (Doenças Tropicais Negligenciadas), entre o grupo das trematodíases transmitidas por alimentos, é caracterizada por ser normalmente diagnosticada na espécie humana apenas como um achado clínico (MAS-COMA; BARGUES; VALERO, 2018). Os casos humanos comumente estão associados a ingestão de plantas de áreas alagadas (DOS SANTOS; VIEIRA, 1965).

Nos casos humanos crônicos, seu diagnóstico é confirmado pela visualização direta de ovos do parasita no exame de fezes, por teste positivo para antígenos de *F. hepatica* nas fezes, ou pela observação direta de parasitas por colangiografia retrógrada endoscópica ou cirurgia. Em casos agudos, reações sorológicas como immunoblotting ou detecção de antígenos do parasita no sangue são úteis (YOKANANTH et al., 2005).

Muitas drogas têm sido usadas para tratar a fasciolíase em pacientes humanos. O triclabendazol para uso humano é atualmente a droga de escolha (MAS-COMA; BARGUES; VALERO, 2005), entretanto, podem ser usadas outras drogas, como Praziquantel, Deidroemetina e Albendazol (IGREJA; GONÇALVES; BARRETO, 2004; LUZ et al., 1999; NEVES, 1991). Em casos mais graves, a abordagem cirúrgica é utilizada no tratamento humano (CORAL; MASTALIR; MASTALIR, 2007; MEZZARI et al., 2000).

A alta diversidade de fontes de infecção e sua heterogeneidade em diferentes países estão por trás da grande heterogeneidade epidemiológica da fasciolose humana (MAS-COMA; BARGUES; VALERO, 2018).

2.5 IMPACTO ECONÔMICO

Na fasciolose sua maior importância se deve às enormes perdas econômicas mundiais geradas na pecuária, estimada em mais de US\$ 3,2 bilhões/ano (MEHMOOD et al., 2017). A fasciolose dificilmente causa a morte dos bovinos infectados, induzindo os pecuaristas a não considerá-la um problema, ou até mesmo não havendo conhecimento da mesma, descobrindo somente no momento do abate

(MAS-COMA, 2005). Mas todavia, gera prejuízos indiretos, prejudica o fígado e interfere no metabolismo, comprometendo a performance produtiva e reprodutiva do rebanho, além do prejuízo quando há condenação do fígado na linha de inspeção (DA COSTA et al., 2019).

No Brasil, o número de fígados descartados e a redução de peso das carcaças dos animais resultam em uma perda econômica de aproximadamente US\$ 210 milhões/ano. Os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina apresentam o primeiro e o terceiro maiores prejuízos, US\$ 147,4 e 24,6 milhões/ano, respectivamente, devido a fasciolose bovina (MOLENTO et al., 2018; SILVA et al., 2020).

Um estudo realizado na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, no período de 2009 a 2014, verificou que foram condenados 5363 fígados, totalizando 28.423,90 kg da víscera, gerando um prejuízo de US\$ 74.754,86, o que representou US\$ 13,94 por animal, no qual este valor refere-se apenas às perdas causadas pelo descarte dos fígados, sem incluir as perdas produtivas ao longo da vida do animal infectado (TEIXEIRA; QUEVEDO; QUEVEDO, 2020).

2.6 ASPECTOS CLÍNICOS E SINTOMATOLOGIA

A patogenia e a sintomatologia clínica variam de acordo com a fase de desenvolvimento do parasita no fígado, carga parasitária e a espécie de hospedeiro envolvido (AMARANTE; RAGOZO; SILVA, 2015).

Está baseada na sua capacidade de lesionar o fígado desde o momento da sua penetração, prosseguindo até o estágio adulto. Nesses casos, as lesões histológicas caracterizam-se por hepatite hemorrágica, colangite hiperplásica e fibrose, respectivamente (RIET-CORREA et al., 2001). Nas infestações graves, há uma destruição do tecido hepático ocasionando danos extensos e hemorragias que podem ser fatais (LÓPEZ-VILLACÍS et al., 2017).

A patogenia pode ser dividida em duas etapas: a primeira etapa corresponde as lesões geradas pelas formas imaturas no parênquima hepático, e a segunda corresponde à presença dos vermes adultos na luz dos ductos biliares. A forma aguda da doença raramente é observada em bovinos, acometendo principalmente ovinos (AMARANTE; RAGOZO; SILVA, 2015).

As lesões hepáticas geradas pela migração das formas jovens também servem

como porta de entrada para infecções por *Clostridium haemolyticum*, causando a hemoglobinúria baciliar (HB), doença considerada letal para o rebanho (ALMEIDA et al., 2012).

Na infecção aguda, pode ocorrer dor abdominal, febre alta, diarreia, apatia, fraqueza, falta de apetite, morte dos animais, dentre outros (FORTES, 1997; RIET-CORREA et al., 2001). A infecção crônica é a forma mais comum da doença, pode ser assintomática ou se apresentar com anemia, perda de peso, queda na produção e produtividade, evoluindo para lesões irreversíveis no parênquima hepático com condenação do fígado no abate (AMARANTE; RAGOZO; SILVA, 2015).

2.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico da fasciolose é difícil visto que, essa parasitose causa em seus hospedeiros sinais inespecíficos como, perda de peso, palidez de mucosa, apatia, taquicardia, redução na produção de lã, carne e leite, interferência na fertilidade, infecções secundárias e diversos outros sintomas (ECHEVARRIA, 2004; FORTES, 1997). Para isso, o histórico prévio, o tipo de clima prevalente da região e a ocorrência sazonal, norteiam para uma suspeita e o diagnóstico deve estar associado a exames laboratoriais. Dessa forma, existem algumas técnicas diagnósticas para confirmar a presença da infecção por *F. hepatica*, que são elas: pesquisa de ovos nas fezes, sorologia, inspeção *post mortem*, técnicas imunológicas e moleculares. Algumas delas, não são empregadas como diagnóstico de rotina (AKSOY et al., 2005; FAIRWEATHER, 2011; SILES-LUCAS et al., 2021; UENO; GONÇALVES, 1998).

No exame coproparasitológico é realizado a pesquisa de ovos nas fezes através da sedimentação ou pela técnica de quatro tamises (ALMEIDA et al., 2012). Visualiza-se o sedimento sob um estereomicroscópio, cautelosamente, por um técnico experiente para que nenhum ovo seja desconsiderado. Atualmente, há diversos protocolos de sedimentação descritos. Métodos que incluem tamises são amplamente utilizados em muitas regiões (ABIDU et al., 1996; FARIA; CURY; LIMA, 2008; GIRÃO; UENO, 1985; KLEIMAN; PIETROKOVSKY; GIL, 2005; MARTINS et al., 2008).

Como alternativa para melhorar a técnica e aumentar a sensibilidade do teste, é possível utilizar o dobro da quantidade de amostra empregada nos protocolos descritos na sedimentação, distribuindo o sedimento em duas placas de Petri, corado com Azul de Metileno 1% para a leitura em estereomicroscópio (AMÉRICO et al.,

2022).

No entanto, este método só é eficiente na fase crônica da doença, quando o animal estiver parasitado por fascíolas adultas. Se a técnica for realizada no momento em que os parasitas ainda estão em amadurecimento, não haverá ovos a serem detectados. Da mesma forma, a presença de poucos adultos no fígado do indivíduo, dificulta o diagnóstico e a detecção de ovos nas fezes (ALEIXO et al., 2015; NOVOBILSKÝ et al., 2016; SILES-LUCAS et al., 2021).

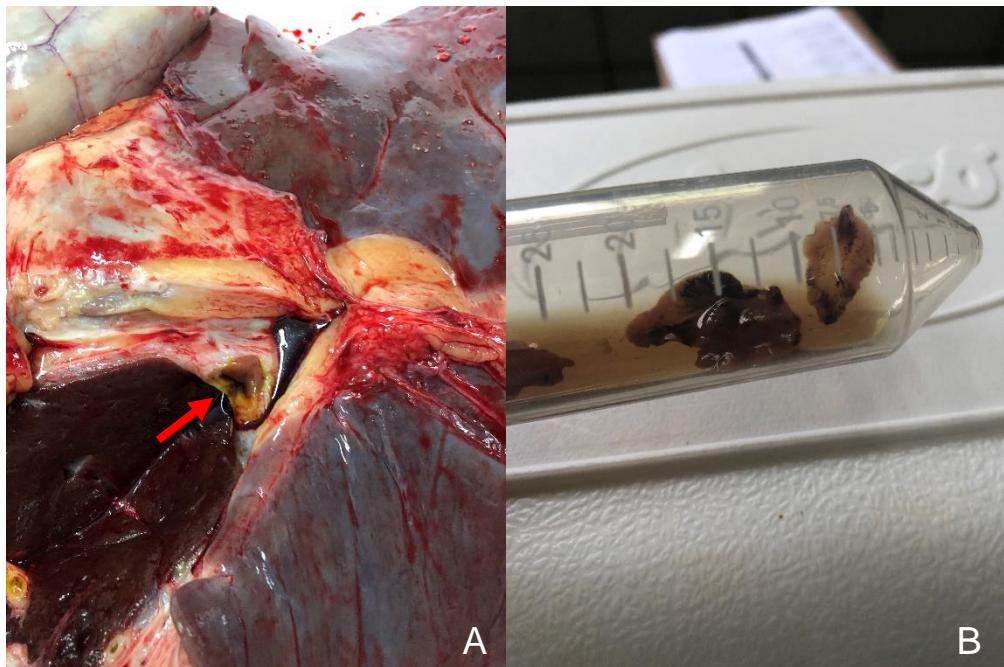
Outro detalhe é que os ovos de *F. hepatica* podem ser vistos nas fezes por algumas semanas após tratamentos anti-helmínticos eficazes, pois podem ser armazenados na vesícula biliar por várias semanas, mesmo após a remoção dos vermes adultos (SARGISON, 2012).

Os testes imunológicos, como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), são utilizados para detecção de anticorpos específicos contra *F. hepatica*, o que representa uma importante contribuição para uma identificação rápida e em grande escala de animais infectados, além disso, é capaz de detectar estágios iniciais da doença. Entretanto, estudos demonstram que os níveis de IgG podem persistir por até 12 semanas pós-tratamento anti-helmínticos nos animais, o que ocasiona uma não distinção entre infecção ativa e infecção precedente (SÁNCHEZ-ANDRADE et al., 2000).

Os achados de necropsia são fundamentais para o diagnóstico. Segundo o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), na inspeção *post mortem* nos matadouros, são examinados todos os órgãos e tecidos, imediatamente após o abate. Na inspeção e exame do fígado, se observada a presença de parasitas adultos de *F. hepatica*, o órgão se torna impróprio para consumo, e é descartado e condenado na linha de inspeção (Figura 4). Mesmo sem a presença do parásito adulto, somente com a presença de lesões associadas a fasciolose, como espessamento por fibrose, calcificação dos ductos biliares, exsudato marrom escuro, pus, fragmentos e flocos de bile, ocasionam a condenação do órgão (BRASIL, 1952, 1971, 1997).

O aspecto do órgão pode ser observado de modo característico e não anatômico, o que leva à sua condenação nos frigoríficos e consequente perda econômica aos produtores rurais. Quando o animal apresentar caquexia, carcaças e vísceras são condenados (SOUZA et al., 2017).

Figura 4. (A) Fígado de bovino com fasciolose seccionado pela inspeção sanitária, apresentando parasito adulto nos canais biliares. (B) Exemplares de *Fasciola hepatica*.



Fonte: Própria autora (2021).

2.8 CONTROLE

O controle da fasciolose animal é realizado principalmente pelo tratamento químico dos animais parasitados, com o uso de anti-helmínticos, para eliminação dos vermes e interrupção do ciclo. Também é desejável a identificação de pastagens contaminadas, barrando o acesso dos animais a estas áreas, além do controle de vetores do local (FAIRWEATHER, 2011).

Para que o controle da fasciolose seja eficiente há necessidade do uso de medidas integradas, como: reduzir as infecções nos hospedeiros definitivos, reduzir a população de hospedeiros intermediários e manejo (ALVES; MARTINS, 2013; ECHEVARRIA, 2004).

O sistema de pastagem é outro fator a se considerar, em razão de que um manejo bem estruturado é base para todo programa de controle. Pastagens partilhadas com ovinos podem constituir uma fonte contínua de contaminação, uma vez que também são hospedeiros definitivos (AMARANTE, 2004). A proximidade do hospedeiro com áreas alagadas e, canais de irrigação aumenta o risco de exposição

e infecção por *F. hepatica*; as cercas podem desempenhar um papel fundamental na redução do acesso dos rebanhos a essas áreas de alto risco (KELLEY et al., 2021; ROBERTS; SUHARDONO, 1996).

A redução da população de hospedeiros intermediários através de métodos químicos, físicos e biológicos é a maneira ideal de controle efetivo da doença, no entanto, sabe-se que os moluscicidas acarretam prejuízos ao meio ambiente (ALVES; MARTINS, 2013; CANTANHEDE et al., 2010).

2.9 TRATAMENTO

O controle de helmintos parasitas se baseia principalmente no uso de drogas anti-helmínticas, administradas como terapêutica ou de maneira profilática (AMARANTE, 2004). Diversas drogas podem ser utilizadas para o tratamento da fasciolose, e muitos medicamentos atuam no sistema nervoso do parasita (LANUSSE; PRICHARD, 1993).

Deve-se ter cautela na utilização de drogas antiparasitárias quando avaliar a questão dos resíduos nas carcaças e no leite, pois estes produtos são direcionados à alimentação humana (ECHEVARRIA, 2004).

O Closantel é um anti-helmíntico derivado da salicilanida, eficaz contra trematódeos e cestódeos nos animais ruminantes. Tem como alvo farmacológico o desacoplamento da fosforilação oxidativa, assim como a Rafoxanida e Nitroxinil, que fazem parte do grupo químico dos fenóis substituídos. Ambos grupos, são ionóforos de prótons (ANDRADE, 2008; FAIRWEATHER; BORAY, 1999; FURLAN et al., 2009).

Os benzimidazois que atuam contra os trematódeos são classificados em Albendazol (ABDZ), Fembendazol e Triclabendazol (TCBZ) (AMARANTE, 2004). Os anti-helmínticos benzimidazóis atuam como inibidores na síntese de tubulina, ocasionando o capeamento e a inibição da formação adicional de microtúbulo, o resultado é a inanição do parasita (ALVES; MARTINS, 2013; JASMER et al., 2000). Todas estas drogas são eficazes contra as formas adultas deste trematódeo, porém, somente TCBZ é capaz de eliminar as formas jovens, que causam danos expressivos ao migrarem pelo parênquima hepático (CANEVARI et al., 2013). De tal modo, TCBZ é a droga mais frequentemente utilizada no tratamento da fasciolose (AMARANTE; RAGOZO; SILVA, 2015).

2.10 RESISTÊNCIA

Um problema que limita o uso de drogas no tratamento da doença é o aumento de resistência aos anti-helmínticos nas populações de parasitos, pela administração e uso indiscriminado de medicamentos em períodos inadequados (FAIRWEATHER et al., 2020).

Falta de eficácia de uma droga não é necessariamente sinônimo de resistência anti-helmíntica e pode surgir após uma subdosagem, por armazenamento inadequado e/ou a co-infecção com outros parasitas também podem explicar a falha observada no tratamento (FAIRWEATHER, 2011; SARGISON, 2012).

A incidência da resistência aos anti-helmínticos está aumentando e ocasionando perda da produção, contribuindo significativamente para o insucesso dos programas de controle parasitário na pecuária de todo o mundo. Assim, métodos eficazes na detecção e monitoramento de populações resistentes se tornam necessários, principalmente relacionado ao controle parasitário dos animais (FORTES; MOLENTO, 2013).

O diagnóstico da resistência anti-helmíntica, ou da redução de eficácia aos anti-helmínticos, até o momento não é uma realidade na prática do campo e dos laboratórios. Ainda que a resistência possa ser avaliada por meio de testes *in vivo* e *in vitro*, a disponibilidade de testes *in vitro* reconhecidos e disponíveis para o diagnóstico da resistência ainda é bastante restrita, com poucos laboratórios que fornecem esse tipo de serviço (FORTES; MOLENTO, 2013).

Atualmente, a resistência anti-helmíntica é considerada o maior problema no controle da fasciolose bovina, tanto pelo alto custo decorrente de tratamentos ineficazes e descontrole parasitário, quanto pelo grande risco decorrente da transferência de isolados resistentes a seres humanos (MAS-COMA; BARGUES, M; VALERO, 2018).

Para isso, foram desenvolvidos protocolos para análise *in vitro* de resistência parasitária utilizando ovos coletados de vesícula biliar de animais positivos, uma alternativa viável, mais rápida e que apresenta correlação com a resistência encontrada *in vivo*, o teste de eclosão de ovos (TEO) (CANEVARI et al., 2013; CHRYSSAFIDIS et al., 2015; ROBLES-PÉREZ et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar um protocolo simplificado de teste de desenvolvimento e eclosão de ovos (TDEO), a fim de avaliar a atividade ovicida (AO) de diferentes fármacos em ovos de *Fasciola hepatica* coletados de bovinos abatidos em frigoríficos do Planalto Serrano em Santa Catarina, identificando isolados potencialmente resistentes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Realizar ensaios *in vitro* com ovos de *F. hepatica* isolados de bile de bovinos, para avaliar a atividade ovicida (AO) de diferentes fármacos comerciais contendo albendazol, closantel, nitroxinil e triclabendazol.
- II. Padronizar e detalhar o protocolo simplificado de teste de desenvolvimento e eclosão de ovos (TDEO) para o diagnóstico da resistência anti-helmíntica de *F. hepatica*, para que seja incluído na rotina do Laboratório de Parasitologia e Doenças Parásitárias (LAPAR-CAV-UDESC).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os protocolos utilizados no presente estudo foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) do CAV/UDESC sob protocolo nº 6602070619.

4.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS

De acordo com informações cedidas pela Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC), os frigoríficos da região Serrana fazem o abate de animais provenientes de diferentes municípios do Planalto Serrano (e.g. São Joaquim, Bom Jardim da Serra, Urubici, Painel, Correia Pinto), Mesorregião Oeste Catarinense (microrregião de Chapecó) e região litorânea (e.g. Tubarão, Criciúma, etc.), possibilitando a comparação de isolados oriundos de condições climáticas heterogêneas.

A inspeção de fígados de bovinos abatidos nos frigoríficos localizados nas cidades de Lages e Otacílio Costa foi acompanhada, e a vesícula biliar de fígados apresentando lesões características de fasciolose foi aberta, sendo a bile coletada e armazenada em frascos com tampa, devidamente identificados com o número do brinco de cada bovino (Figura 5). O material coletado era acondicionado em caixa térmica e encaminhado ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LAPAR) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). As amostras foram armazenadas sob refrigeração até a realização da análise, que foi realizada em período entre um e quatro dias.

4.2 ISOLAMENTO DE OVOS DE *Fasciola hepatica*

Após a coleta, a bile foi lavada e os ovos foram recuperados por sedimentação. O material era distribuído em frascos cônicos de 500 ml para o processo de sedimentação e isolamento dos ovos. Em cada frasco côncico eram colocadas bile e água, na proporção de 1:5, equivalente a 100 mL de bile e 400 mL de água. A quantidade de frascos utilizados variava de acordo com o volume total da amostra recebida.

A amostra era deixada sedimentando por 10 min e o sobrenadante descartado

por eversão. Este procedimento era realizado duas vezes e, se necessário, havia uma repetição adicional.

Figura 5. Frasco (com tampa) identificado com o número do brinco do bovino e conteúdo biliar diluído em água, distribuídos em frascos cônicos de 500 mL.



Fonte: Própria autora (2022).

Ao final, o sedimento era coletado de todos os frascos e distribuído em tubos de centrifugação de 50 mL, sendo centrifugados por 10 min a 465 x g (1500 rpm, centrífuga modelo KC8, Kindly). Após a centrifugação, o sobrenadante era descartado e os pellets resultantes de todos os tubos eram coletados com pipeta de Pasteur e unificados em um único tubo.

Feito isto, era realizado uma nova centrifugação por 4 minutos a 465 x g, o sobrenadante descartado cuidadosamente, e o volume reduzido para 5 a 10 ml, dependendo da turbidez da amostra, que indicava aproximadamente a quantidade de ovos coletados. Após essa última etapa, o pellet era ressuspenso (Figura 6), sendo posteriormente realizada a quantificação de ovos por volume de solução.

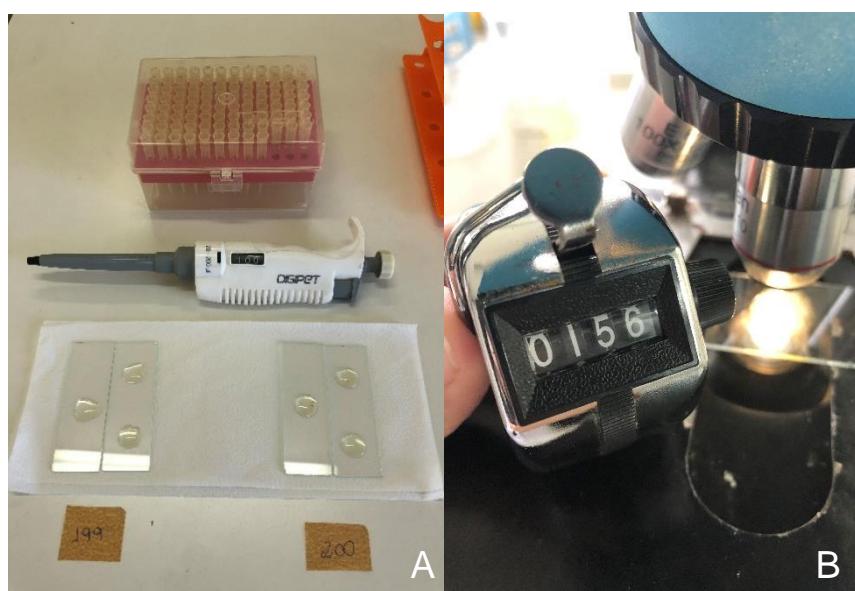
Figura 6. Isolamento dos ovos de *Fasciola hepatica*: (A) Sedimento com ovos observados macroscopicamente; (B) Pellet ressuspenso para quantificação.



Fonte: Própria autora (2021).

Para a quantificação dos ovos, a amostra era homogeneizada e três alíquotas eram analisadas sob microscópio óptico em aumento de 40x (objetiva de 4x, microscópio Eclipse E200, Nikon). Era verificada a média de ovos por 100 µl nas três alíquotas, sendo calculado o número total de acordo com o volume presente no tubo (Figura 7).

Figura 7. Quantificação dos ovos por volume de solução: (A) Três alíquotas de 100 µl em lâminas de microscopia; (B) Contagem de ovos em cada alíquota.



Fonte: Própria autora (2022).

4.3 TESTE DE DESEVOLVIMENTO E ECLOSÃO DE OVOS (TDEO) E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE OVICIDA (AO)

Para a padronização do teste de desenvolvimento e eclosão de ovos (TDEO) de *F. hepatica*, protocolos previamente descritos foram consultados (ALVAREZ et al., 2020; CANEVARI et al., 2013; CHRYSSAFIDIS et al., 2015; ROBLES-PÉREZ et al., 2014; SARGISON, 2012). Para a execução do TDEO, as amostras eram separadas em alíquotas de 1000 ovos, colocadas em coletores universais com tampas, sendo triplicatas para cada fármaco e para o controle negativo.

Foram utilizados no presente estudo quatro anti-helmínticos comerciais: Ricofarm 10 (Biofarm), solução injetável de sulfóxido de albendazol a 100 mg/ml (ABDZ), recomendação para tratamento fasciolícida (rec.) de 2ml/40kg; Taitec (Calbos®), solução injetável de closantel a 250 mg/ml (CSTL), rec. 1ml/50kg; Nitromic (Microsules) solução injetável de nitroxinil a 340 mg/ml (NTXL), rec. 2ml/50kg; e Saguaymic Plus (Microsules), solução oral de triclabendazol (100 mg/ml) + fembendazol (100 mg/ml) (TBZF), rec. 6ml/50kg.

Inicialmente, foram realizados procedimentos pareados, utilizando um mesmo pool de amostras, sendo comparados os ovos incubados com os fármacos em concentração descrita em literatura (0,05 nmol/ml) (CAÑEVARI et al., 2013), e em concentração recomendada pelo fabricante do fármaco comercial, para tratamento de animais infectados (i.e. produto Ricofarm (ABDZ), solução em concentração de 100 mg/ml, recomendação de 2ml/40kg, equivalente a 5,0 µg/ml, dado que 1 L de água equivale a 1 kg).

Após os resultados obtidos dos procedimentos pareados e padronização inicial, foram realizados os testes somente com as concentrações recomendadas pelos fabricantes, utilizando fármacos comerciais, a fim de delinear o protocolo de testes simplificado. As concentrações utilizadas foram: ABDZ = 5,0 µg/ml, CSTL = 5,0 µg/ml, NTXL = 13,6 µg/ml, e TBZF = 12 µg/ml + 12 µg/ml.

As amostras diluídas com os fármacos testados e controle negativo foram incubados por 28 dias, a 27 °C, sem iluminação, devidamente identificados, conforme demonstrado na Figura 8.

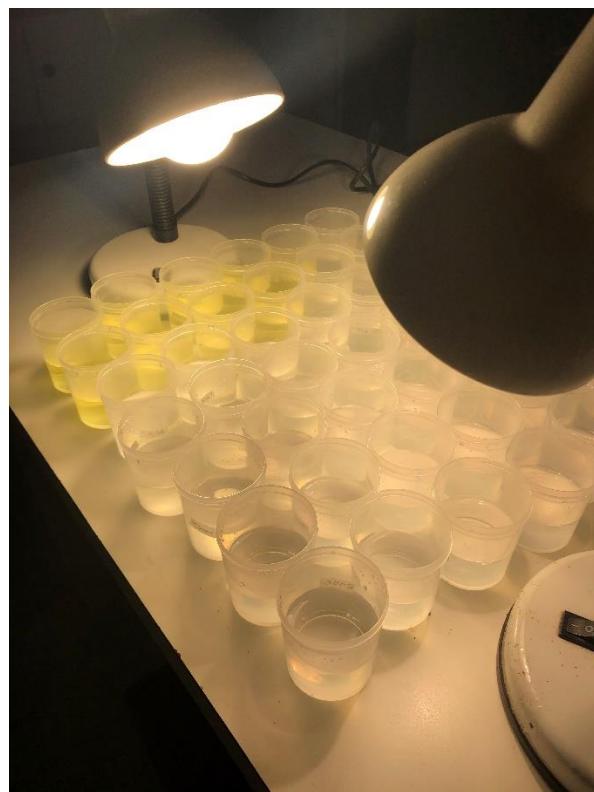
Figura 8. Amostras de ovos de *Fasciola hepatica* acondicionados em coletores universais (1000 ovos/frasco), contendo os fármacos diluídos, incubados em estufa por 28 dias, a 27°C, sem iluminação.



Fonte: Própria autora (2021).

Ao final da incubação, as tampas dos frascos eram removidas, e as amostras deixadas expostas à luz por 24 h, em temperatura ambiente, para estimular a eclosão dos miracídios (Figura 9). A luz era fornecida através de dois abajures comuns, com lâmpada branca de LED (9W), posicionados a aproximadamente 20 cm de distância das amostras.

Figura 9. Amostras de ovos de *Fasciola hepatica* acondicionados em coletores universais (1000 ovos/frasco), contendo os fármacos diluídos, deixadas sob luz, por 24 h para eclosão dos miracídios.



Fonte: Própria autora (2021).

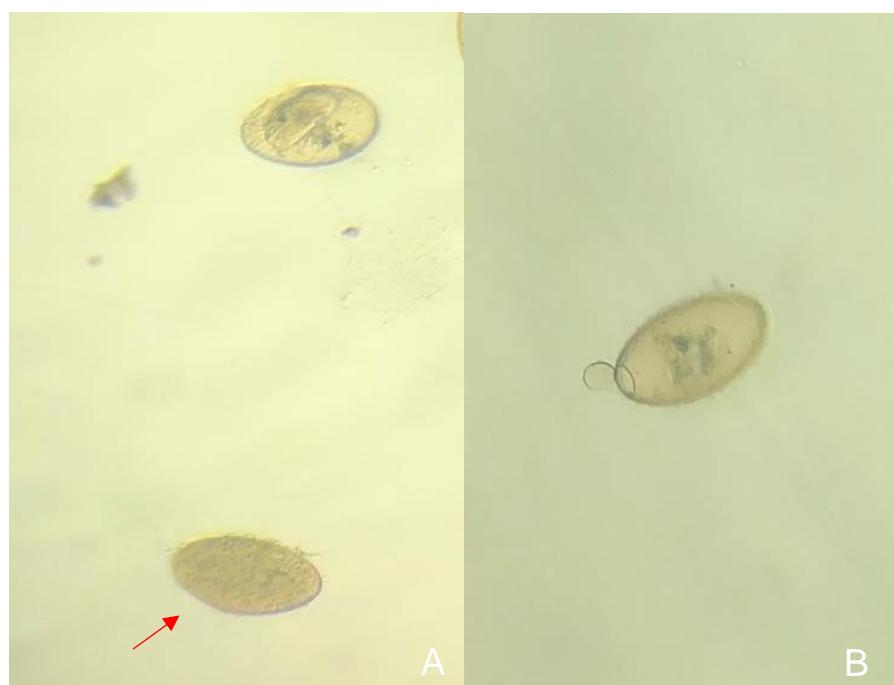
A análise e contagem dos ovos foi realizada diretamente nos frascos coletores, sob estereomicroscópio, após cuidadoso descarte do sobrenadante das amostras por eversão simples. Os ovos foram avaliados e quantificados de acordo com seu grau de desenvolvimento (CHRYSSAFIDIS et al., 2015), sendo classificados em “não desenvolvidos”, “embrionados” ou “eclodidos” (Figura 10). Contava-se no mínimo 100 ovos aleatórios por recipiente, utilizando-se um contador de células para registro. Para cada repetição, foi aferido o percentual de desenvolvimento, sendo calculada então a média entre as triplicatas.

O grau de atividade ovicida *in vitro* foi expresso em percentual pela somatória dos ovos embrionados e eclodidos através da seguinte fórmula:

$$\text{Atividade ovicida} = \frac{\%ovos_{controle} - \%ovos_{tratados}}{\%ovos_{controle}} \times 100$$

Os isolados foram analisados, e o nível de resistência às drogas, refletido pela atividade ovicida detectada nos testes, foi classificado em “resistente”, “suscetível” ou “indeterminado” (CANEVARI et al., 2013).

Figura 10. Fases dos ovos de *Fasciola hepatica* observadas nos controles negativos com água destilada: (A) ovo não embrionado (seta) e embrionado contendo o miracídio; (B) ovo eclodido.



Fonte: Própria autora (2021).

Para a padronização de um teste com múltiplos fármacos de maneira concomitante, as amostras coletadas foram divididas em grupos, de acordo com o número de ovos isolados e os fármacos utilizados no teste. O fármaco CSTL foi retirado da padronização, devido aos resultados discrepantes obtidos durante o estudo.

Cada coletor contendo uma amostra da triplicata continha no mínimo 1000 ovos de *F. hepatica*, com volume final de 40 ml, incluindo os ovos, água destilada e o fármaco avaliado. As amostras controles possuíam o mesmo volume final, mas somente com água destilada e os ovos. Os ensaios foram divididos em grupos, de acordo com o número de ovos recuperados no isolamento, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Padronização dos grupos de acordo com o número de ovos isolados e fármacos utilizados.

Grupo	Tratamento	Número de Ovos
1	ABDZ NTXL TBZF CONTROLE	≥ 12.000
2	ABDZ NTXL CONTROLE	≥ 9.000 < 12.000
3	ABDZ TBZF CONTROLE	≥ 9.000 < 12.000
4	NTXL TBZF CONTROLE	≥ 9.000 < 12.000
5	FÁRMACO ISOLADO CONTROLE	≥ 6.000 < 9.000

* Considerando que 6 mil ovos é o número mínimo para teste (triplicata teste + triplicata controle).

Fonte: Própria autora (2022).

4.4 RASTREABILIDADE INDIVIDUAL DOS ANIMAIS E LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA

O local de origem dos animais infectados e o histórico completo do animal, desde o nascimento até o momento do abate, foram mapeados, de acordo com os dados de movimentação animal obtidos no Sistema de Gestão da Defesa Agropecuária Catarinense (SIGEN), para a determinação da origem e movimentação dos animais, a fim de caracterizar o isolado por sua localização geográfica.

4.5 ÁGUA DESTILADA

Trinta amostras foram incubadas e analisadas em água destilada proveniente de um laboratório fornecedor, dado que o destilador do LAPAR havia quebrado. Ao longo do estudo, três amostras dos mesmos animais foram incubadas de maneira

pareada, com água do laboratório fornecedor e água do LAPAR, para investigação de possível divergência nos resultados.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados do projeto foram organizados e armazenados em planilhas no Microsoft Excel® 2019, para avaliação e cálculo das amostras coletadas, bem como, gerar a análise estatística descritiva dos dados.

A eficácia de cada tratamento *in vitro* no teste de eclosão de ovos foi determinada de acordo com a equação do grau de atividade ovicida descrita anteriormente e a porcentagem dos ovos desenvolvidos são relatados como a média aritmética \pm desvio padrão (DP).

Os dados obtidos durante o estudo, como o grau de resistência e distribuição entre municípios, foram tratados e analisados individualmente e conjuntamente, por análises de variância (ANOVA), através do Teste de Tukey para comparação estatística dos dados de desenvolvimento dos ovos obtidos de cada tratamento, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para os testes realizados.

Para validação estatística da diferença encontrada entre os tratamentos realizados com a água do Lapar e do Laboratório fornecedor, foi empregado o Teste de T pareado, considerando um valor de $p < 0,05$ estatiticamente significativo. Todas as análises foram realizadas usando-se o software Jamovi®, versão 2.2.5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao todo, foram coletadas 201 amostras de conteúdo biliar provenientes dos abatedouros do Planalto Serrano Catarinense, sendo 176 amostras oriundas do frigorífico de Lages, e 25 amostras do frigorífico de Otacílio Costa. Do total, 50 amostras não apresentavam ovos suficientes para a realização das análises, e 30 amostras foram incubadas com água destilada de um laboratório parceiro, apresentando grandes divergências no grau de atividade ovicida, quando comparados com a água do LAPAR, sendo excluídas do estudo (dados não apresentados). Portanto, foram utilizadas 121 amostras viáveis para a realização do estudo.

No presente estudo, foi possível determinar a atividade ovicida dos anti-helmínticos com o seguinte número de amostras: ABDZ (108/121), NTXL (102/121), TBZF (102/121) e CSTL (19/121).

Os ensaios foram realizados em grupos, padronizados de acordo com o número de ovos isolados na sedimentação e fármacos utilizados: Grupo 1 (n=88), Grupo 2 (n=8), Grupo 3 (n=3), Grupo 4 (n=4), Grupo 5 (n=18).

5.1 A IMPORTÂNCIA DA ÁGUA DESTILADA

No estudo, 30 amostras foram incubadas com água destilada proveniente de um laboratório fornecedor. Ao longo da avaliação do desenvolvimento dos ovos e cálculo da atividade ovicida, foi observada grande divergência dos tratamentos incubados com a água fornecida.

Com isso, três amostras que continham elevada quantidade de ovos tiveram os tratamentos duplicados e foram analisados de maneira pareada, comparando a água dos dois laboratórios. Na Tabela 2, é possível observar que a atividade ovicida das amostras incubadas com a água fornecida apresentou resultados discrepantes das amostras incubadas com água do LAPAR.

Essa diferença foi confirmada através do Teste de T pareado, onde, cada amostra foi testada individualmente e comparada entre as águas, demonstrando diferença significativa em todos os testes, com $p < 0,05$.

Mendes et al. (2011) discutem a importância da água utilizada nos procedimentos laboratoriais e as possíveis interferências nos ensaios, e como sua importância é subestimada. A água é um elemento essencial que contribui para o

desenvolvimento e a qualidade do estudo. De tal maneira, os resultados comprovam que a água fornecida pelo outro laboratório era inadequada e enfatizam a importância da água nos ensaios laboratoriais. Sendo assim, as amostras incubadas com este insumo foram descartadas do presente estudo.

Tabela 2. Comparação da atividade ovicida (%) nos tratamentos entre águas do LAPAR e Laboratório fornecedor.

Amostra	Tratamento	Atividade Ovicida (%)	Atividade Ovicida (%)	p-valor
		LAPAR	Laboratório Fornecedor	
91	ABDZ	100	-12,83	
	NTXL	97,78	22,34	0,013
	TBZF	97,78	-0,88	
97	ABDZ	95,56	58,02	
	NTXL	100	33,44	0,036
	TBZF	96,92	20,13	
99	ABDZ	87,41	-5,94	
	NTXL	98,60	12,93	<,001
	TBZF	89,51	0,34	

Fonte: Própria autora (2022).

5.2 INEFICÁCIA DO CLOSANTEL

As amostras tratadas com CSTL apresentaram baixa atividade ovicida em todas as análises do estudo (Tabela 3). Em estudos anteriores, *in vivo*, a eficácia do CSTL foi testada por administração oral (PO), intramuscular (IM) e/ou subcutânea (SC) em bovinos e ovinos, onde variou de 95 a 100% (BOULARD; CARRERAS; VAN GOOL, 1995; COLES; RHODES; STAFFORD, 2000; GORDON et al., 2012b; HANNA et al., 2015).

O primeiro relato de falha ao tratamento de CSTL em bovinos de corte naturalmente infectados foi dado no ano de 2015, através do teste de redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF) realizada em três rebanhos. Os animais positivos para *F. hepatica* no TRCOF e exame de ELISA de coproantígenos, foram alocados em grupos e tratados topicalmente com um mínimo de 20 mg de CSTL por kg, e as amostras fecais foram coletadas em 0, 7 e 21 dias pós-tratamento. A falha do tratamento com CSTL foi confirmada em duas das três fazendas testadas (NOVOBILSKÝ; HÖGLUND, 2015).

SOLANA et al. (2016), avaliaram *in vivo* a atividade ovicida e a morfologia de ovos de *F. hepatica*, recuperados de ovelhas infectadas experimentalmente com um isolado suscetível ao TCBZ, tratadas com CSTL. Os animais foram abatidos em diferentes intervalos de tempo após o tratamento e a bile foi coletada para isolamento dos ovos. O TDEO foi realizado e os resultados encontrados confirmam que o CSTL afeta *in vivo* o desenvolvimento normal dos ovos e diferenças significativas foram encontradas na embrionação e eclosão dos ovos.

A dosagem recomendada utilizada no tratamento do presente estudo foi de 5,0 µg/ml. Não foi possível determinar *in vitro* o diagnóstico da resistência anti-helmíntica através da atividade ovicida na *F. hepatica* ao CSTL no TDEO, devido aos resultados discrepantes e falta de literatura sobre o assunto. Aparentemente, CSTL não apresenta atividade ovicida *in vitro*, não sendo possível utilizá-lo em TDEO, pois não atua diretamente em ovos.

Na Tabela 3 é possível observar graus negativos de atividade ovicida. O fato ocorreu, pois, as amostras tratadas com CSTL apresentaram desenvolvimento e eclosão dos ovos, maior que o encontrado no controle negativo.

Tabela 3. Atividade ovicida (%) do anti-helmíntico closantel em ovos de *Fasciola hepatica*, verificada pelo teste de desenvolvimento e eclosão de ovos (TDEO).

Amostra	Atividade Ovicida (%)
1	23,65
2	10,24
3	2,78
4	-0,37
5	0,74
6	1,68
11	11,64
12	-3,55
13	-1,76
14	1,38
15	15,68
16	-4,26
20	-3,94
24	0
25	-3,21
26	11,74

Fonte: Própria autora (2022).

5.3 ATIVIDADE OVICIDA (AO) DOS ANTI-HELMÍNTICOS ATRAVÉS DO TESTE DE DESENVOLVIMENTO E ECLOSÃO DE OVOS (TDEO)

No presente estudo, o TDEO foi validado e avaliado como técnica *in vitro* para determinar a resistência de *F. hepatica* aos anti-helmínticos, aplicado para avaliar a atividade ovicida dos anti-helmínticos em isolados obtidos de diferentes fontes. A técnica descrita na pesquisa envolve a coleta de ovos após o abate dos animais.

O TDEO foi projetado para avaliar o potencial dos anti-helmínticos em inibir o desenvolvimento dos ovos de *F. hepatica* (CANEVARI et al., 2013; CEBALLOS et al., 2019; FAIRWEATHER et al., 2012), medir a atividade ovicida e determinar a prevalência de resistência no Planalto Serrano Catarinense.

Nos testes preliminares, foram comparados os ovos incubados com os fármacos em concentração descrita em literatura (0,05 nmol/ml) e em concentração

recomendada pelo fabricante do fármaco comercial. Não foi possível detectar a presença de resistência ao ABDZ nos animais amostrados, e ambos os protocolos apresentaram resultados semelhantes (Tabela 4). Portanto, o protocolo simplificado desenvolvido no LAPAR pode ser utilizado na avaliação *in vitro* da resistência de *F. hepatica* a antiparasitários.

Tabela 4. Determinação e comparação da atividade ovicida (AO) em ovos de *Fasciola hepatica* incubados em concentração descrita em literatura (0,05 nmol/ml) e concentração recomendada pelo fabricante do fármaco comercial.

Grupo	Tratamento	Total de ovos examinados	Ovos não desenvolvidos N (%)	Ovos embrionados e eclodidos N (%)	AO (%)
G1	ABZ 10% (10 µg/ml)	600	596 (99,3)	4 (0,7)	99,28
G2	ABDZ 18,75% (3,75 µg/ml)	600	600 (100,0)	0	100
G3	ABDZ 10% (5 µg/ml)	600	600 (100,0)	0	100
G4	Controle	600	38 (6,3)	562 (93,7)	-
G5	ABZ 10% (0,5 nmol/ml)	542	541 (99,8)	1 (0,2)	99,83
G6	ABDZ 18,75% (0,5 nmol/ml)	600	597 (99,5)	3 (0,5)	99,43
G7	ABDZ 10% (0,5 nmol/ml)	600	600 (100,0)	0	100
G8	Controle	592	0	592 (100,0)	-

Grupo G1, G2, G3 e G4 → concentração recomendada pelo fabricante do fármaco comercial
Grupo G5, G6, G7, G8 → concentração descrita em literatura

Fonte: Própria autora (2022).

O diferencial desse projeto em comparação com os outros estudos, é que buscamos trabalhar com fármacos comerciais, tal como é executado no teste de biocarrapaticidograma, ao invés de moléculas puras (GOMES et al., 2017; JÚNIOR; OLIVEIRA, 2005). Outra diferença é a utilização da administração da dosagem recomendada através da bula, para maior correlação com o tratamento realizado *in vivo*.

A porcentagem média (média±DP) de desenvolvimento dos ovos obtida para os controles negativos nos diferentes isolados de *F. hepatica* variaram entre 88,2% (Frigorífico de Lages) e 88,9% (Frigorífico de Otacílio Costa) (Tabela 5). As amostras controles passaram por todo processo de centrifugação e incubação, sem adição de

qualquer fármaco, somente com água destilada.

Coles et al. (2006) e Robles-Pérez et al. (2014) sugeriram que alguns fatores em investigação podem influenciar nos resultados obtidos com o TDEO, que incluem o método de dissolução da solução tratamento (DMSO ou água), diferentes fontes de água utilizada (destilada, deionizada ou água de torneira), método de recuperação e grau de limpeza dos ovos (presença de detritos), sendo isso corroborado pelos resultados encontrados na comparação entre as águas dos laboratórios.

Tabela 5. Média geral dos resultados do teste de desenvolvimento e eclosão de ovos (TDEO) de diferentes isolados de *Fasciola hepatica*, após incubação a 27 °C por 28 dias, em soluções contendo diferentes anti-helmínticos. Os valores indicam a média do percentual de eclosão e desenvolvimento de todas as amostras incubadas, expressa em média ± DP.

Tratamentos (dose)	<i>Fasciola hepatica</i> isolada	
	Lages	Otacílio Costa
Controle negativo	88,24 ± 17,13 ^a	88,92 ± 12,86 ^a
ABDZ (2µL/40mL)	2,40 ± 5,36 ^b	1,23 ± 1,20 ^b
NTXL (1,6µL/40mL)	2,55 ± 4,02 ^b	1,07 ± 1,06 ^b
TBZF (4,8µL/40mL)	4,29 ± 8,62 ^c	14,10 ± 26,75 ^b

Para cada frigorífico, valores com diferentes sobrescritos são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autora (2022).

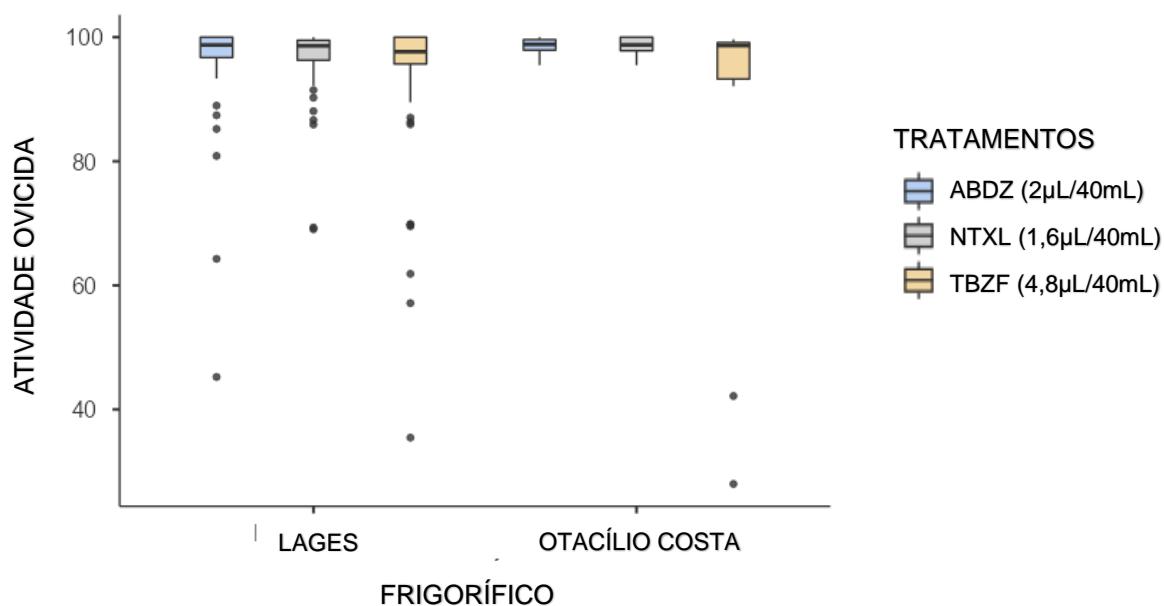
Os resultados gerais refletem adequada atividade ovicida dos fármacos utilizados, nas amostras provenientes de ambos os frigoríficos. Apenas as amostras testadas com TBZF apresentaram resultados diferentes dos demais, de acordo com a Tabela 5, diferindo entre os tratamentos e entre os frigoríficos. Apresentando aumento significativo no desenvolvimento dos ovos, podendo suspeitar da presença de resistência no isolado.

No presente estudo, a quantidade de substância administrada no TDEO foi determinada a partir da dose indicada pelas bulas farmacológicas, seguindo a proporção 1L=1Kg. Para determinar a resistência anti-helmíntica, Canevari et al.

(2013) assumiram um nível de atividade ovicida, determinando suscetibilidade quando a eficácia era $>70\%$ e $<40\%$ para resistência. Os resultados entre 40% e 70% representam uma área onde há uma possibilidade de suscetibilidade e/ou resistência indeterminada. A partir do mesmo critério, a resistência através do cálculo da atividade ovicida (%) na dosagem utilizada nos anti-helmínticos presentes no estudo foi determinada no Gráfico 1.

Uma atividade ovicida muito baixa foi observada em ambos os frigoríficos, sendo sugestivo de resistência, Lages (35,46%) e Otacílio Costa (28%) para TBZF. Há nove suspeitas de suscetibilidade/resistência indeterminada no Frigorífico de Lages dentre os três tratamentos incubados, com atividade ovicida variando de 45,24% a 69,89% entre eles. No Frigorífico de Otacílio Costa foi observada apenas uma suspeita de suscetibilidade/resistência indeterminada para TBZF, que apresentou atividade ovicida de 42,17%.

Gráfico 1. Atividade ovicida (%) dos anti-helmínticos em ovos de *Fasciola hepatica* isolados dos Frigoríficos de Lages e de Otacílio Costa, de janeiro 2021 a março 2022.



Fonte: Própria autora (2022).

5.3.1 Eficácia do Sulfóxido de Albendazol

Em dois estudos anteriores, foi realizado o TDEO em ovos recuperados de bile de animais infectados experimentalmente com isolados suscetíveis e resistentes ao TCBZ e ABZ. Os animais foram abatidos e os ovos recuperados da bile. A eclosão dos ovos foi avaliada e uma inibição significativa ($P<0,05$) foi observada em ovos incubados com Albendazol e o Sulfóxido de Albendazol. Em conclusão, tiveram um claro efeito inibitório, possuindo excelente atividade ovicida contra ovos de *F. hepatica*, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo (ALVAREZ et al., 2009; CANEVARI et al., 2013).

CANEVARI et al. (2013), validam o TDEO com os resultados encontrados em sua pesquisa. O teste demonstrou que após o período de incubação, os ovos provenientes de isolados resistentes, tiveram uma atividade ovicida menor que 13,4% em todas as concentrações utilizadas para Albendazol e o Sulfóxido de Albendazol. Em isolados suscetíveis, ambos apresentaram atividade ovicida adequada e afetaram significativamente a eclodibilidade dos ovos.

Em nematoides gastrointestinais foi sugerido o uso de uma dose discriminante de ABDZ para determinar sua resistência. A dose discriminante é a aquela que impede a eclosão de 99% dos ovos suscetíveis. Assim, por definição, ovos que estão eclodindo são resistentes (COLES et al., 2006). Em trematódeos, testes têm sido validados e padronizados e informações sobre a dose discriminante para prever a resistência ao ABDZ não está estabelecido (CEBALLOS et al., 2019).

Há relatos que eficácia de 71-90% podem ser consideradas suficientes para drogas como ABDZ (FAIRWEATHER et al., 2020) e propõe-se que, mesmo que a redução percentual não ultrapasse 90%, o ABDZ ainda pode reduzir a carga parasitária a um nível que será benéfico do ponto de vista da economia e saúde animal (FAIRWEATHER, 2011).

No estudo de CEBALLOS et al. (2019) foi relatado a importância da comparação entre métodos *in vivo* e *in vitro* para detecção de resistência anti-helmíntica e eficácia ao ABDZ. Os resultados encontrados *in vivo* (contagem de fascíolas no fígado e TRCOF) foram semelhantes a atividade ovicida encontrada *in vitro*.

A maioria dos autores sugere correlacionar o TRCOF com o TDEO para detecção de resistência. No entanto, os dados aqui descritos sugerem o valor do teste

de eclosão dos ovos como um método adequado para detectar resistência a anti-helmínticos em *F. hepatica*, independentemente do TRCOF.

5.3.2 Eficácia do Nitroxinil

Atualmente, não há estudos *in vitro* presentes na literatura para o anti-helmíntico que faz parte do grupo químico dos fenóis substituídos. Portanto, o presente estudo foi pioneiro no teste de eclosão de ovos *in vitro* para o NTXL, e com os resultados obtidos, é sugerida a eficácia do teste na detecção de resistência anti-helmíntica à isolados de *F. hepatica*.

Somente estudos *in vivo* avaliaram a eficácia do NTXL através do TRCOF. De acordo com González-Garduño et al. (2020) e Romero et al. (2019) o tratamento com NTXL reduziu significativamente o número de ovos nas fezes, obtendo a maior eficácia contra ovos tanto de trematódeos no rúmen quanto em ovos de *F. hepatica*.

Outro estudo avaliou a eficácia do NTXL contra *F. hepatica* resistente ao TCBZ em um rebanho de ovinos naturalmente infectados, e o mesmo concluiu que o NTXL pode ser uma alternativa em caso de resistência ao TCBZ por apresentar elevada redução na contagem dos ovos nas fezes (HANNA et al., 2015).

Para determinar a eficácia dos anti-helmínticos comerciais (triclabendazol; ivermectina + closantel; ivermectina + clorsulon e nitroxinil) pelo TRCOF, em estudo, o NTXL foi o mais eficaz no controle de trematódeos, enquanto os outros produtos obtiveram valores inferiores a 90%, o que coloca em risco o controle sustentável do parasita (ICO-GÓMEZ et al., 2021).

Todos os testes realizados *in vivo* na literatura, corroboram com os resultados encontrados no TDEO *in vitro* do presente estudo, demonstrando suscetibilidade ao tratamento com este anti-helmíntico.

5.3.3 Eficácia do Triclabendazole e Fenbendazole

Triclabendazole é o fármaco mais utilizado para eliminação de *F. hepatica* em sua forma imatura e adulta, mas a resistência generalizada à droga compromete muito o controle do parasita nos ruminantes e nos humanos (AKSOY et al., 2005; FAIRWEATHER et al., 2020; GORDON et al., 2012a; KAMALUDEEN et al., 2019; KELLEY et al., 2016).

A porcentagem média do desenvolvimento dos ovos obtidos dos frigoríficos de Lages e Otacílio Costa incubados através do TDEO *in vitro* com TBZF foi de $4,29 \pm 8,62$ e $14,10 \pm 26.75$, respectivamente. Ambos apresentaram valores elevados quando comparados com o tratamento do ABDZ ($2,40 \pm 5,36$ e $1,23 \pm 1,20$) e NTXL ($2,55 \pm 4,02$ e $1,07 \pm 1,06$), demonstrando maior embrionamento e eclodibilidade dos ovos.

Em estudos *in vivo* com TRCOF, constatam que o tratamento com TCBZ não apresentou redução significativa na contagem de ovos de *F. hepatica* nas fezes (ROMERO et al., 2019; SARGISON, 2012). A falta de eficácia do TCBZ está presente em vários países e a evidência dela para o TCBZ foi detectada em 21/26 fazendas de três regiões da Inglaterra e País de Gales (KAMALUDEEN et al., 2019), indicando resistência ao anti-helmíntico e concordância com o TDEO *in vitro*.

Diversos estudos demonstram a prevalência e a elevada resistência ao tratamento com TCBZ, através de métodos *in vivo* e *in vitro* e protocolos comparativos entre si (ALVAREZ et al., 2009; ELLISON et al., 2014; ICO-GÓMEZ et al., 2021; OLAECHEA et al., 2011; ORTIZ et al., 2013; ROMERO et al., 2019).

A combinação de TBZF já foi testada *in vivo* contra infecções de *F. hepatica* induzidas experimentalmente em ovelhas, apresentando elevada eficácia ao tratamento, sem observar efeitos adversos associados (FOREYT, 1988). No presente estudo, foram detectados dois isolados, que apresentaram reduzida atividade ovicida, presentes nos Frigoríficos de Lages (35,46%) e de Otacílio Costa (28%) para essa combinação, sendo sugestivo de resistência.

5.4 DISTRIBUIÇÃO DE BOVINOS COM RESISTÊNCIA A FASCIOLOSE

Através da rastreabilidade individual dos animais, pelo número de identificação pesquisados no SIGEN, investigando o histórico completo do animal, desde o nascimento até o momento do abate, para a avaliação da origem e movimentação dos animais, foi possível rastrear a localização dos isolados possivelmente resistentes em Santa Catarina.

Descartando as amostras inviáveis, foi possível realizar o rastreamento de 121 amostras para a rastreabilidade dos animais. Dentre elas, uma amostra apresentou divergência na numeração do brinco do animal, impossibilitando o rastreamento da mesma.

As amostras foram analisadas em conjunto e individualmente através da estatística descritiva. Na análise dos dados, foi verificado que dois isolados apresentaram AO < 40%, caracterizando-os como resistentes ao TBZF. Um destes isolados era proveniente de Capão Alto, o outro de Lages, sendo ambos casos de fasciolose bovina autóctone. Dez amostras apresentaram 40% < AO < 70%, sugerindo susceptibilidade/resistência indeterminada aos anti-helmínticos ABDZ (2), NTXL (2) e TBZF (6), conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Atividade ovicida (%) de isolados que apresentaram resistência e suscetibilidade/resistência indeterminada em ovos de *Fasciola hepatica*, e investigação de autoctonia.

Amostra	Grupo	Tratamento	Atividade Ovicida (%)	Cidade de Origem	Autoctonia
64	Grupo 1	ABDZ	99,64		
		NTXL	94,32	Capão Alto	Sim
		TBZF	35,46**		
68	Grupo 1	ABDZ	64,28*		
		NTXL	69,04*	Bom Retiro	Não
		TBZF	57,14*		
70	Grupo 1	ABDZ	99,61		
		NTXL	97,66	Rio Rufino	Não
		TBZF	61,86*		
71	Grupo 1	ABDZ	94,77		
		NTXL	97,76	Painel	Sim
		TBZF	69,77*		
73	Grupo 1	ABDZ	97,45		
		NTXL	97,94	Lages	Não
		TBZF	69,52*		
84	Grupo 5	TBZF	28**	Lages	Sim
86	Grupo 1	ABDZ	99,48		
		NTXL	100	Pousos Redondo	Não
		TBZL	42,17*		
90	Grupo 1	ABDZ	94,26		
		NTXL	96,05	Capão Alto	Não
		TBZF	69,89*		
101	Grupo 1	ABDZ	45,24*		
		NTXL	98,85	Lages	Não
		TBZL	95,43		
135	Grupo 1	ABDZ	93,33		
		NTXL	69,33*	Bocaina do Sul	Não
		TBZF	97		

* Suscetibilidade/resistência indeterminada (40% < AO < 70%).

** Resistência (AO < 40%).

Fonte: Própria autora (2022).

Dos dez isolados que apresentaram suscetibilidade/resistência indeterminada, apenas um não realizou movimentação no estado e foi dado como autóctone, e este, está localizado na cidade de Painel. Os demais animais rastreados realizaram movimentação em diversas cidades do estado, dificultando a real localização do exato momento em que houve a infecção e a determinação da autoctonia.

Nesse contexto, recentemente comprovou-se a presença da fasciolose em bovinos positivos e autóctones em municípios da Mesorregião Serrana, que historicamente é dada como livre de fasciolose, evidenciando alto índice de positividade em animais abatidos nos frigoríficos regionais (AMÉRICO et al., 2022). Com base nos dados apresentados e a confirmação da presença da doença no Planalto Serrano Catarinense, isolados potencialmente resistentes a anti-helmínticos em *F. hepatica* estão sendo detectados.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com a validação realizada no estudo e os resultados encontrados na atividade ovicida *in vitro* dos anti-helmínticos na inibição do desenvolvimento e eclosibilidade dos ovos, o teste de desenvolvimento e eclosão de ovos (TDEO) é uma técnica valiosa para análise da resistência de *F. hepatica* aos anti-helmínticos, possibilitando obter esta informação sem a necessidade de eutanásia de um grande número de animais.

Para testes *in vitro* em trematódeos, 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. Essas variáveis podem ser divididas em: origem das amostras, recuperação e isolamento dos ovos, processamento, manuseio, material, qualificação do técnico de laboratório, entre outros.

A obtenção de um diagnóstico da resistência anti-helmíntica mais precoce pode auxiliar a tomada de decisão quanto à escolha do tipo de estratégia de controle parasitário a ser utilizado em campo, a fim de reduzir o impacto econômico e o alto custo gerado pela utilização de fármacos ineficazes.

Assim, de uma forma geral, os resultados encontrados foram promissores para a continuidade de novos estudos e utilização do teste na rotina laboratorial.

REFERÊNCIAS

- ABIDU, M. et al. Estudo comparativo entre técnicas coproparasitológicas para diagnóstico de Fasciola hepática em bovinos. **Rev. bras. ciênc. vet.**, v. 3, n. 1, p. 1–3, 1996.
- ABÍLIO, F. J. P.; WATANABE, T. Ocorrência de Lymnaea columella (Gastropoda: Lymnaeidae), hospedeiro intermediário da Fasciola hepatica, para o Estado da Paraíba, Brasil. **Revista de Saude Publica**, v. 32, n. 2, p. 185–186, 1998.
- AGUDO-PADRÓN, A. I.; VEADO, R. W. AD-V.; SAALFELD, K. **Moluscos e Saúde Pública em Santa Catarina: subsídios para a formulação estadual de políticas preventivas sanitárias**. 1 edição ed. Duque de Caxias: Espaço Científico Livre Projetos Editoriais, 2013.
- AKSOY, D. Y. et al. Infection with Fasciola hepatica. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 11, p. 859–861, 2005.
- ALBA, A. et al. Fasciola hepatica-Pseudosuccinea columella interaction: Effect of increasing parasite doses, successive exposures and geographical origin on the infection outcome of susceptible and naturally-resistant snails from Cuba. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2018.
- ALBUQUERQUE, R. B. DA F. E. et al. Spatial distribution analysis of bovine fascioliasis cases recorded in an abattoir in the state of santa catarina, brazil. **Ciencia Rural**, v. 52, n. 3, 2022.
- ALEIXO, M. A. et al. Fasciola hepatica: Epidemiology, perspectives in the diagnostic and the use of geoprocessing systems for prevalence studies. **Semina: Ciencias Agrarias**, v. 36, n. 3, p. 1451–1465, 2015.
- ALMEIDA, B. R. et al. A importância do diagnóstico e tratamento da fasciolose em rebanhos bovinos. **PUBVET**, v. 6, 2012.
- ALVAREZ, L. et al. Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on Fasciola hepatica eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2, p. 211–216, 2009.
- ALVAREZ, L. I. et al. Testing Albendazole Resistance in Fasciola hepatica. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 2137, p. 213–220, 2020.

ALVES, D. P. .; MARTINS, I. V. F. Atualizações no Controle Parasitário da Fasciolíase em Bovinos. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v. 9, p. 323–351, 2013.

AMARANTE, A. F. T. Controle integrado de helmintos de bovinos e ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 68–71, 2004.

AMARANTE, A. F. T.; RAGOZO, A. M. A.; SILVA, B. F. Helmintos 2 - Classe trematoda. **Os parasitas de ovinos**, p. 99–109, 2015.

AMÉRICO, L. et al. Epidemiological Survey and Confirmation of Autochthonous Cases of Bovine Fasciolosis in the Serrana Mesoregion of Santa Catarina, Brazil. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 8, 2022.

ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica Veterinária**. 3. ed. São Paulo: [s.n.].

ARIAS-PACHECO, C. et al. Economic impact of the liver condemnation of cattle infected with *Fasciola hepatica* in the Peruvian Andes. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 4, p. 1927–1932, 2020.

BABJÁK, M. et al. Assessing the efficacy of albendazole against *fasciola hepatica* in naturally infected cattle by in vivo and in vitro methods. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 11, 2021.

BEESLEY, N. J. et al. *Fasciola hepatica* demonstrates high levels of genetic diversity, a lack of population structure and high gene flow: possible implications for drug resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 1, p. 11–20, 2017.

BEESLEY, N. J. et al. Evidence of population structuring following population genetic analyses of *Fasciola hepatica* from Argentina. **International journal for parasitology**, v. 51, n. 6, p. 471–480, maio 2021.

BENNEMA, S. C. et al. *Fasciola hepatica* in bovines in Brazil: data availability and spatial distribution. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 35–41, 2014.

BOULARD, C.; CARRERAS, F.; VAN GOOL, F. Evaluation of nitroxynil and closantel activity using ELISA and egg counts against *Fasciola hepatica* in experimentally and naturally infected cattle. **Veterinary research**, v. 26, n. 4, p. 249–255, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Decreto nº 30.691

de 29 de março de 1952. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. n. Brasília, p. 154, 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Inspeção de carnes. Padronização de técnicas, instalações e equipamentos. Tomo I: Bovinos. p. 183, 1971.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29-03-52, alterado pelos Decretos nos 1.255 de 25-06-62, 1.236 de 02-09-94, no 1.812 de 0. p. 174, 1997.

CAMINADE, N. J. B. C. et al. *Fasciola and fasciolosis in ruminants in Europe : Identifying research needs.* v. 65, n. April 2017, p. 199–216, 2018.

CANEVARI, J. et al. Testing albendazole resistance in *Fasciola hepatica*: validation of an egg hatch test with isolates from South America and the United Kingdom. **Journal of Helminthology**, v. 88, n. 03, p. 286–292, set. 2013.

CANTANHEDE, S. P. D. et al. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 282–288, 2010.

CEBALLOS, L. et al. The egg hatch test: A useful tool for albendazole resistance diagnosis in *Fasciola hepatica*. **Veterinary Parasitology**, v. 271, n. February, p. 7–13, 2019.

CHRYSSAFIDIS, A. L. et al. Standardisation of egg-viability assays for *Fasciola hepatica* and *Calicophoron daubneyi*: A tool for evaluating new technologies of parasite control. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 1–2, p. 25–31, 2015.

COLES, G. C. et al. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary parasitology**, v. 136, n. 3–4, p. 167–185, mar. 2006.

COLES, G. C.; RHODES, A. C.; STAFFORD, K. A. Activity of closantel against adult resistant *Fasciola hepatica*. 2000.

CORAL, R. P.; MASTALIR, E. T.; MASTALIR, F. P. Retirada de *fasciola hepatica* da via biliar principal por coledoscopia. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 34, n. 1, p. 69–71, 2007.

- DA COSTA, R. A. et al. Evaluation of losses in carcasses of cattle naturally infected with *Fasciola hepatica*: effects on weight by age range and on carcass quality parameters. **International Journal for Parasitology**, v. 49, n. 11, p. 867–872, 2019.
- DOS SANTOS, L.; VIEIRA, T. Considerações sobre os sete primeiros casos de fasciolose humana encontrados no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 25, n. 0 SE-ARTIGO ORIGINAL, p. 95–110, 31 jan. 1965.
- DUTRA, L. H. et al. Mapping risk of bovine fasciolosis in the south of Brazil using Geographic Information Systems. **Veterinary parasitology**, v. 169, n. 1–2, p. 76–81, abr. 2010.
- ECHEVARRIA, F. Fasciolose. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, n. 1, p. 100–102, 2004.
- ELLISON, S. et al. *Fasciola hepatica*: A comparative survey of adult fluke resistance to triclabendazole, nitroxynil and closantel on selected upland and lowland sheep farms in Northern Ireland using faecal egg counting, coproantigen ELISA testing and fluke histology. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 1–2, p. 34–43, 2014.
- EPAGRI. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2019-2020. v. 41, p. 175, 2021.
- EPAGRI. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2020-2021**. [s.l: s.n.]. v. 1
- FAIRWEATHER, I. Reducing the future threat from (liver) fluke: Realistic prospect or quixotic fantasy? **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1–2, p. 133–143, 2011.
- FAIRWEATHER, I. et al. Development of an egg hatch assay for the diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: proof of concept. **Veterinary parasitology**, v. 183, n. 3–4, p. 249–59, fev. 2012.
- FAIRWEATHER, I. et al. Drug resistance in liver flukes. **International journal for parasitology. Drugs and drug resistance**, v. 12, p. 39–59, abr. 2020.
- FAIRWEATHER, I.; BORAY, J. C. Fasciolicides: Efficacy, actions, resistance and its management. p. 81–112, 1999.
- FARIA, R. N.; CURY, M. C.; LIMA, W. S. Concordância entre duas técnicas

coproparasitológicas para diagnóstico de *Fasciola hepatica* em bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 60, n. 4, p. 1023–1025, 2008.

FEPMVZ (ED.). **Atlas de Parasitologia Veterinária**. 92. ed. Belo Horizonte, Minas Gerais: Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Minas Gerais - CRMV-MG, 2019.

FOREYT, W. J. Efficacy of a fenbendazole-triclabendazole combination against *Fasciola hepatica* and gastrointestinal nematodes in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 26, n. 3, p. 265–271, 1988.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. São Paulo: Ícone: [s.n.].

FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33, n. 12, p. 1391–1402, 2013.

FURLAN, F. H. et al. Intoxicação por closantel em ovinos e caprinos no Estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 89–93, 2009.

GIRÃO, E. S.; UENO, H. DIAGNÓSTICO COPROLÓGICO QUANTITATIVO DA FASCIOLOSE DE RUMINANTES NO RIO GRANDE DO SUL. **Pesq. Agrop. Bras.**, v. 20, n. 4, p. 461–466, 1985.

GOMES, G. B. et al. Aplicação do biocarrapaticidograma para controle eficaz do r. (b.) Microplus em Piedade, São Paulo. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 15, n. 2, p. 91–92, 2017.

GONZÁLEZ-GARDUÑO, R. et al. Evaluation of anthelmintic drugs against egg development of rumen flukes recovered from cattle raised in the humid tropics of Mexico. **Journal of helminthology**, v. 94, p. e177, ago. 2020.

GORDON, D. et al. Confirmation of triclabendazole resistance in liver fluke in the UK. **The Veterinary record**, v. 171, n. 6, p. 159–60, ago. 2012a.

GORDON, D. K. et al. On farm evaluation of the coproantigen ELISA and coproantigen reduction test in Scottish sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 3, p. 436–444, 2012b.

HANNA, R. E. B. et al. *Fasciola hepatica*: a comparative survey of adult fluke resistance to triclabendazole, nitroxynil and closantel on selected upland and

lowland sheep farms in Northern Ireland using faecal egg counting, coproantigen ELISA testing and fluke histology. **Veterinary parasitology**, v. 207, n. 1–2, p. 34–43, jan. 2015.

HÉLIO, F. et al. Expansão de Lymnaea Columella (SAY , 1817), molusco transmissor da fasciolose , no maciço de Baturité , estado do Ceará Expansion of Lymnaea Columella (SAY , 1817), a fasciolosis transmitting mollusk , in the Baturité massif , Ceará state. v. 9, n. 2, p. 62–66, 2015.

ICO-GÓMEZ, R. et al. Assessment of anthelmintic effectiveness to control *Fasciola hepatica* and paramphistome mixed infection in cattle in the humid tropics of Mexico. 2021.

IGREJA, R. P.; GONÇALVES, M.; BARRETO, M. Fasciolíase: relato de dois casos em área rural do Rio de Janeiro. v. 37, n. 5, p. 416–417, 2004.

JASMER, D. P. et al. Multiple lethal effects induced by a benzimidazole anthelmintic in the anterior intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 105, n. 1, p. 81–90, jan. 2000.

JOHN, B. C. et al. A review of our current understanding of parasite survival in silage and stored forages, with a focus on *Fasciola hepatica* metacercariae. **Grass and Forage Science**, v. 74, n. 2, p. 211–217, 2019.

JÚNIOR, D. A. C.; OLIVEIRA, P. R. DE. Avaliação in vitro da eficácia de acaricidas sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) de bovinos no município de Ilhéus, Bahia, Brasil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1386–1392, 2005.

KAMALUDEEN, J. et al. Lack of efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* is present on sheep farms in three regions of England, and Wales. **The Veterinary record**, v. 184, n. 16, p. 502, abr. 2019.

KELLEY, J. M. et al. Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 6, p. 458–469, 2016.

KELLEY, J. M. et al. Determination of the prevalence and intensity of *Fasciola hepatica* infection in dairy cattle from six irrigation regions of Victoria, South-eastern Australia, further identifying significant triclabendazole resistance on three properties. **Veterinary Parasitology**, v. 277, n. October 2019, p. 109019, 2020.

KELLEY, J. M. et al. *Fasciola hepatica* Control Practices on a Sample of Dairy Farms

- in Victoria, Australia. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, n. June, p. 1–12, 2021.
- KLEIMAN, F.; PIETROKOVSKY, S.; GIL, S. Comparison of two coprological methods for the veterinary diagnosis of fasciolosis [.] **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 57, n. 2, p. 181–185, 2005.
- LAMB, J. et al. Prevalence and pathology of liver fluke (*Fasciola hepatica*) in fallow deer (*Dama dama*). **Veterinary Parasitology**, v. 293, p. 109427, 2021.
- LANUSSE, C. E.; PRICHARD, R. K. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. **Vet. Parasitol.**, p. 123–158, 1993.
- LÓPEZ-VILLACÍS, I. C. et al. *Fasciola hepática* : aspectos relevantes en la salud animal . **Journal of the Selva Andina Animal Science**, v. 4, n. 2, p. 137–146, 2017.
- LUZ, J. E. et al. Human Fascioliasis in The Metropolitan Area of Curitiba, Brazil Evaluation of The Foci of Infection and Report of Nine Cases Treated With Triclabendazole. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 3, n. 6, p. 220–225, dez. 1999.
- MARTINS, I. V. F. et al. Sensibilidade e reproduzibilidade da técnica de sedimentação (Foreyt, 2005) para o diagnóstico de *Fasciola hepatica*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 110–112, 2008.
- MAS-COMA, S. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. **Journal of Helminthology**, v. 79, n. 3, p. 207–216, set. 2005.
- MAS-COMA, S. ; BARGUES, M. D. ; VALERO, M. A. Human fascioliasis infection sources, their diversity, incidence factors, analytical methods and prevention measures. **Parasitology**, v. 145, n. 13, p. 1665–1699, 2018.
- MAS-COMA, S.; BARGUES, M. D. Human Liver Flukes: a Review. **Research and Reviews in Parasitology**, v. 57, n. 3–4, p. 145–218, 1997.
- MAS-COMA, S.; BARGUES, M. D.; VALERO, M. A. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. **International journal for parasitology**, v. 35, n. 11–12, p. 1255–78, out. 2005.
- MAS-COMA, S.; VALERO, M. A.; BARGUES, M. D. Fascioliasis BT - Digenetic

- Trematodes. In: TOLEDO, R.; FRIED, B. (Eds.). . Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 71–103.
- MCCONVILLE, M. et al. An evaluation of the efficacy of compound alpha and triclabendazole against two isolates of *Fasciola hepatica*. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 1–2, p. 75–88, 2009.
- MEDEIROS, C. ET AL. Distribuição espacial de Lymnaeidae (Mollusca, Basommatophora), hospedeiros intermediários de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda, Digenea) no Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 3, p. 235–252, 2014.
- MEDEIROS, C. et al. Distribuição espacial de Lymnaeidae (Mollusca, Basommatophora), hospedeiros intermediários de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda, Digenea) no Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 3, p. 235–252, 2014.
- MEHMOOD, K. et al. A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. **Microbial Pathogenesis**, v. 109, p. 253–262, 2017.
- MENDES, M. E. et al. A importância da qualidade da água reagente no laboratório clínico. **Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 47, n. 3, p. 217–223, 2011.
- MEZZARI, A. et al. Fasciolíase humana no Brasil diagnosticada por colangiografia endoscópica retrógrada. **J. bras. patol.**, v. 36, n. 2, 2000.
- MITCHELL, G. Update on fasciolosis in cattle and sheep. **In Practice**, v. 24, n. 7, p. 378–385, 2002.
- MOLENTO, M. B. et al. Bovine fascioliasis in Brazil: Economic impact and forecasting. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 12, p. 1–3, maio 2018.
- MOONEY, L. et al. The comparative efficacy of four anthelmintics against a naturally acquired *Fasciola hepatica* infection in hill sheep flock in the west of Ireland. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2–4, p. 201–205, 2009.
- MORIENA, R. A.; RACIOPPI, O.; ALVAREZ, J. D. Fasciolosis en bovinos del nordeste argentino. Prevalencia según edad *. **Rev. vet**, v. 15, n. 1, p. 3–4, 2004.

- NEVES, D. P. Parasitologia humana. In: 8. ed. São Paulo, Atheneu: [s.n.]. p. 501.
- NOVOBILSKÝ, A. et al. Assessment of flukicide efficacy against *Fasciola hepatica* in sheep in Sweden in the absence of a standardised test. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 6, n. 3, p. 141–147, 2016.
- NOVOBILSKÝ, A.; HÖGLUND, J. First report of closantel treatment failure against *Fasciola hepatica* in cattle. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, n. 3, p. 172–177, 2015.
- OLAECHA, F. et al. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 3–4, p. 364–366, 2011.
- ORTIZ, P. et al. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 1–2, p. 118–121, jul. 2013.
- PARAENSE, W. L. *Lymnaea viatrix* and *Lymnaea columella* in the neotropical region: a distributional outline. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 77, n. Rio de Janeiro, p. 181–188, 1982.
- RIET-CORREA, F. et al. **DOENÇAS DE RUMINANTES E EQÜINOS**. Segunda ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. v. 2
- RINALDI, L. et al. Sheep and *Fasciola hepatica* in Europe: the GLOWORM experience. **Geospatial Health**, v. 9, n. 2 SE-Original Articles, p. 309–317, 19 mar. 2015.
- ROBERTS, J. A.; SUHARDONO. Approaches to the control of fasciolosis in ruminants. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 8–9, p. 971–981, 1996.
- ROBLES-PÉREZ, D. et al. Development of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazole in *Fasciola hepatica* isolated from sheep. **Veterinary parasitology**, v. 203, n. 1–2, p. 217–21, jun. 2014.
- ROLDÁN, C. et al. Endemic occurrence of *Fasciola hepatica* in an alpine ecosystem , Pyrenees , Northeastern Spain. n. June, p. 1–6, 2020.
- ROMERO, J. et al. Flukicide efficacy against *Fasciola hepatica* of Triclabendazole and Nitroxynil in cattle of the central valley of Chile. **Brazilian Journal of Veterinary**

Parasitology, v. 28, n. 1, p. 164–167, 2019.

SÁNCHEZ-ANDRADE, R. et al. Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain) & v. 93, p. 39–46, 2000.

SARGISON, N. Diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*.

Veterinary Record, p. 151–152, 2012.

SERRA-FREIRE, N. M. DA; NUERNBERG, S. **Geopolitical dispersion of the occurrence of *Fasciola hepatica* in the State of Santa Catarina, Brazil** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1992.

SILES-LUCAS, M. et al. Fascioliasis and fasciolopsiasis: Current knowledge and future trends. **Research in Veterinary Science**, v. 134, n. October 2020, p. 27–35, 2021.

SILVA, A. E. P. et al. Correlation between climate data and land altitude for *Fasciola hepatica* infection in cattle in Santa Catarina, Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinaria**, v. 29, n. 3, p. 1–7, 2020.

SOLANA, M. V. et al. In vivo assessment of closantel ovicidal activity in *Fasciola hepatica* eggs. **Experimental Parasitology**, v. 160, p. 49–53, 2016.

SOUZA, S. P. et al. Principais causas de condenação de fígado bovino em estabelecimento sob Serviço de Inspeção Federal na Zona da Mata mineira. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 69, n. 4, p. 1054–1061, 2017.

TEIXEIRA, J. L. R.; QUEVEDO, L. DE S.; QUEVEDO, P. DE S. PERDAS ECONÔMICAS POR FASCIOLOSE EM CARCAÇAS BOVINAS SUBMETIDAS AO SERVIÇO DE INSPEÇÃO MUNICIPAL DE PELOTAS, RS, BRASIL. **Ciência Animal**, v. 30, p. 11–22, 2020.

TESSELE, B.; BRUM, J. S.; BARROS, C. S. L. Lesões parasitárias encontradas em bovinos abatidos para consumo humano. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33, n. 7, p. 873–889, 2013.

TOLAN, R. W. Fascioliasis Due to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* Infection: An Update on This “Neglected” Neglected Tropical Disease. **Laboratory Medicine**, v. 42, n. 2, p. 107–116, jan. 2011.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminante.** [s.l.: s.n.].

UETA, M. T. Alguns aspectos da biologia de lymnaea columella say, 1817 (gastropoda, pulmonata). **Rev. Saúde pública**, v. 10, n. São Paulo, p. 355–366, 1976.

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). v. 58, p. 181–213, 1995.

YOKANANTH, S. et al. Characterization of specific and cross-reacting antigens of *Fasciola gigantica* by immunoblotting. **Parasitology research**, v. 97, n. 1, p. 41–48, ago. 2005.