AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA RESISTÊNCIA AO NITROXINIL EM ISOLADOS DE *Fasciola hepatica* OBTIDOS DE RUMINANTES DO ESTADO DE SANTA CATARINA[1]

Vitória Maria Petronilha Martins[2], Andreas Lazaros Chryssafidis[3], Paula Maciel Arruda[4], Larissa Américo[4], Felipe Rieth de Lima[5], Luna Silvestri Souto[5], Sandy Gabrielly Radunz Machado[5].

[1] Vinculado ao projeto "Avaliação in vitro de resistência a anti-helmínticos de isolados de *Fasciola hepatica* obtidos de ruminantes do Estado de Santa Catarina"
[2] Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV-UDESC – Voluntária PIVIC/UDESC
[3] Orientador, Departamento de Medicina Veterinária – CAV-UDESC – andreas.ch@udesc.br
[4] Mestranda do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal – CAV-UDESC
[5] Acadêmica (o) do Curso de Medicina Veterinária – CAV-UDESC

Fasciola hepatica, conhecida na região do Planalto Serrano como "baratinha do fígado", é o trematódeo causador da fasciolose, uma parasitose encontrada com maior frequência em bovinos, mas que também pode afetar outros mamíferos, incluindo os humanos. Na produção animal é responsável por perdas econômicas devido à condenação do fígado, redução da produção de carne, leite, lã, além dos custos com tratamento. O tratamento pode ser feito utilizando benzimidazóis, porém a resistência do parasito ao Triclabendazol vem sendo registrada desde 1990 em diversos países, incluindo o Brasil. O uso do Nitroxinil, Albendazol e Closantel tem sido uma alternativa a essa crescente resistência, no entanto com a intensificação de seu uso faz se necessário mais estudos a respeito do surgimento de resistência a estes fármacos, como o presente estudo que tem como foco a avaliação do Nitroxinil *in vitro*, pois um diagnóstico precoce de resistência é essencial para se estabelecer programas de controle parasitário.

O fármaco do presente estudo é quimicamente denominado de 4-Hydroxy-3-lodo-5-NitrobenOnitrile e faz parte do grupo químico dos substitutos fenólicos. Diferentemente do Albendazol e Closantel ele é considerado específico para fasciolose, mas pode ser utilizado para tratar outras parasitoses. Sua concentração recomendada é de 34%, passa por metabolização hepática e excreção renal. Por possuir uma elevada taxa de absorção, seus resíduos podem ser encontrados na carne do animal, sendo necessário um tempo mínimo de 30 dias entre a administração e o abate. Seu mecanismo de ação pelo desacoplamento da fosforilação oxidativa, desta maneira, interferindo na obtenção de energia do parasito, matando-os por inanição.

A avaliação da ação do Nitroxinil *in vitro* é uma alternativa aos testes *in vivo*, que possuem maior custo, pois estudos recentes demonstraram uma correlação positiva entre a resistência verificada em ovos com a resistência dos vermes adultos *in vivo*. A eficácia do tratamento é analisada através da atividade ovicida do fármaco, por meio da seguinte equação:

$$Atividade\ ovicida\ = \frac{(\%ovoscontrole - \%ovostratados)}{\%ovoscontrole} * 100.$$

Desta forma, a avaliação de eficácia do fármaco, e consequente avaliação de resistência do isolado, foi feita com ovos de *F. hepatica* presentes na vesícula biliar de animais naturalmente infectados. Para a coleta deste material foram feitas visitas ao Frigorífico Fox, em Lages, Santa Catarina. Após o abate dos animais é feita a inspeção da carcaça, sendo visualizadas as lesões características e muitas vezes os vermes ainda presentes. Os animais parasitados têm o fígado descartado. As vesículas biliares dos animais positivos foram levadas ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LAPAR-CAV-UDESC) para processamento. As biles

Apoio: CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; fapesc Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina; GOVERNO DE SANTA CATARINA

coletadas eram identificadas, seguindo uma ordem numérica crescente. O processamento inicia-se com a diluição da bile em frascos de sedimentação, para se utilizar a amostra inteira proveniente de um animal ela foi fracionada em mais de um frasco, colocando 100 ml de bile e 400 ml de água em cada um, aguardando por 10 min a sedimentação dos ovos. Após cuidadoso descarte do sobrenadante, o processo foi repetido, e o sedimento restante foi transferido para tubos plásticos de 50 ml, e centrifugados a 1500 rpm por 10 min. Ao final, os sedimentos provenientes de uma mesma amostra foram reunidos em um tubo único de 50 ml, para nova centrifugação, por 4 min à 1500 rpm, sendo o sobrenadante cuidadosamente descartado. Com essa amostra final, adicionou-se água destilada até completar 5 ml e, com uma micropipeta, foram analisadas três alíquotas de 100 µl para a contagem de ovos, sob o microscópio óptico. A concentração de ovos foi calculada através da média aritmética das alíquotas, extrapolada para 5 ml. Para o teste de resistência do fármaco *in vitro*, são necessários no mínimo 400 ovos, que são incubados, por 21 dias, em potes plásticos descartáveis contendo o Nitroxinil (Nitromic®). A dosagem do fármaco foi calculada com base na indicação da bula, sendo de 2 ml / 50 kg, proporcionalmente ao volume final de 40 ml, portanto utilizou-se 1,6 µl do fármaco. A incubação dos ovos de cada amostra foi realizada em triplicata, além do grupo controle em que se utiliza apenas água destilada. Os potes foram colocados em estufa a 37 ºC e, após o período de incubação de 21 dias, foram retirados e expostos a luz por 24 h, para induzir a eclosão dos ovos. Após esse período, as amostras são avaliadas ao microscópio, sendo avaliados 100 ovos, que são classificados em: ovos eclodidos, ovos embrionados e ovos não embrionados. Foram analisadas 17 amostras no total. A partir dos resultados verificou-se quatro isolados com sugestiva resistência, com baixa atividade ovicida (Tabela 1). As 13 amostras restantes apresentaram uma boa média de atividade ovicida, podendo haver indicação do Nitroxinil para o tratamento dos animais infectados. No entanto, o estudo reforça a importância dos testes de resistência para o estabelecimento do protocolo de controle parasitário mais adequado para cada propriedade.

Tabela 1. Avaliação *in vitro* de isolados de *Fasciola hepatica* resistentes ao Nitromic® em comparação à média de 13 amostras não resistentes.

		Resultados (%)			
Nº da amostra		**Não embrionado**	**Embrionado**	**Eclodido**	**Atividade ovicida**
1	**Nitromic 34%**	14,30	21	64,66	2,65
	Controle	12	22,33	65,66	
2	**Nitromic 34%**	3	20,33	76,60	-0,96
	Controle	4	22	74	
3	**Nitromic 34%**	38	18,60	39,60	23,35
	Controle	24	30,33	45,6	
4	**Nitromic 34%**	16	25,60	58,33	23,35
	Controle	2,33	22	75,66	
13	**Nitromic 34%**	97,34	0,99	1,68	96,90
	Controle	10,04	39,44	46,73	

Palavras-chave: Fasciolose. Resistência. Nitroxinil.