



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**



**MÉTODOS DE ARMAZENAMENTO DE FEZES DE
BOVINOS E EQUINOS PARA TESTE DE
ECLODIBILIDADE LARVAL**

MARIANA GREEN DE FREITAS

Campo Grande – MS
2019

MARIANA GREEN DE FREITAS

**MÉTODOS DE ARMAZENAMENTO DE FEZES DE
BOVINOS E EQUINOS PARA TESTE DE
ECLODIBILIDADE LARVAL**

***STORAGE METHODS OF CATTLE'S AND HORSE'S FECES FOR EGG
HATCH TEST***

MARIANA GREEN DE FREITAS

Orientador: Fernando de Almeida Borges

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Campo Grande – MS
2019

*“Agindo assim, certamente haverá um bom futuro para ti e sua
espera não será frustrada.”*

Prov 23:18

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e pelos dons do Espírito Santo, por me guiar e iluminar, pelo dom da sabedoria, que me iluminou do início ao fim nos momentos de dúvidas e Santa Teresinha do Menino Jesus pelas bênçãos e graças.

Agradeço a minha família, meu pai José pelo esforço e compressão, por ter me apoiado sempre e por ser esse pai incrível e presente, meu exemplo! Minha mãe Raquel que sempre foi meu porto seguro e sempre me apoiou nesse caminho, me deu força em todos os momentos, que me ensinou a ser uma mulher forte e ir atrás dos meus sonhos com minhas próprias pernas. Ao meu irmão Tiago que nunca mediu esforços para me ajudar, que sempre aturou meu estresse durante o mestrado e sempre foi um exemplo de determinação para mim, obrigada por me ouvir e me dar conselhos quando estava confusa sobre minhas escolhas. Vocês são as três pessoas mais importantes da minha vida e amo demais vocês, muito obrigada por tudo!

Agradeço a minha vó Iracema, por ter me apoiado, por ter rezado por mim todos os dias e por ser essa pessoa incrível, cheia de luz e Deus, a senhora é meu exemplo de como Deus e Maria se mostra nas pessoas, obrigada pelo amor e ajuda sempre. *In memoria* também agradeço ao meu vô José que tenho certeza que ia se orgulhar da neta veterinária que sempre quis ter e aos meus avós Lourdes e Antônio por tudo que me ensinaram enquanto estavam aqui comigo, por todo o carinho e amor que sempre recebi de vocês!

Agradeço ao meu orientador Professor Doutor Fernando de Almeida Borges, muito obrigada por nunca desistir de mim, confiar no meu trabalho e sempre me ensinar. É um exemplo para mim como profissional e como pessoa, sua forma de ensinar me inspira. Obrigada pela amizade que conquistamos nesses quase 6 anos de LADPAR e pelos conselhos e puxões de orelha.

Agradeço a equipe LADPAR, os técnicos, estagiários, residentes e amigos de mestrado. Em especial a Giu e ao Gui por ter me ajudado nos testes, a Zelina, Ju e Gui por ter aguentado meu estresse em todos os testes e por ser amigos tão presentes que fizeram esses anos serem mais leves e divertidos, ao Matheus por ter ido comigo em quase todas as coletas e por ter feito meus aparatos de vácuo e ao Dyego Borges pela ajuda de sempre. Ao Mário por me ouvir e viajar muito comigo e pela amizade de anos já.

Agradeço de uma forma especial a Juliane Tutija, obrigada por toda a ajuda. Por ter me apoiado em um momento difícil e ter acreditado no meu potencial. Muito obrigada pela amizade que mesmo não sendo de anos, já me ajudou tanto!

Agradeço ao pessoal da fazenda escola e a Gabi por ter me ajudado nas coletas dos bovinos e ao pessoal da fazenda Angico e ao professor Fernando pela ajuda nas coletas dos equinos.

Agradeço a CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

Enfim agradeço todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram e torceram pela minha conquista, muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
CAPITULO 1.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS	10
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
CAPITULO 2.....	24
Resumo.....	24
Abstract.....	24
Introdução	25
Materiais e Métodos	26
Resultados e Discussão	29
Referências Bibliográficas	42

LISTA DE TABELAS		
Tabela 1.	Grupos experimentais, formas de armazenamento e as horas de realização dos testes de eclodibilidade larval com amostras de fezes de bovinos e equinos naturalmente infectados.....	27
Tabela 2.	Percentual médio de eclodibilidade do controle negativo no teste de eclodibilidade larval realizado com ovos de nematodas de bovinos em diferentes métodos de armazenamentos, em diferentes horas da realização do teste	31
Tabela 3.	Concentração efetiva média (CE50) para o tiabendazole e seu intervalo de confiança (IC95%) em diferentes formas de armazenamento das fezes de bovinos em diferentes horários para o teste de eclodibilidade larval, as repetições e o <i>status</i> de resistência.....	33
Tabela 4.	Percentual médio de eclodibilidade do controle negativo no teste de eclodibilidade larval realizado com ovos de nematodas de equinos em diferentes métodos de armazenamentos, em diferentes horas da realização do teste.....	38
Tabela 5.	Concentração efetiva média (CE50) para o tiabendazole e seu intervalo de confiança (IC95%) em diferentes formas de armazenamento das fezes de equinos em diferentes horários para o teste de eclodibilidade larval, as repetições e o <i>status</i> de resistência.....	39

RESUMO

FREITAS, M.G. Métodos de armazenamento de fezes de bovinos e equinos para teste de eclodibilidade larval. 2018. 48p. Dissertação de Mestrado –Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2018.

O teste de eclodibilidade larval (TEL) é um teste *in vitro* para o diagnóstico da resistência aos benzimidazóis, porém, essa técnica é pouco utilizada a campo, porque o embrionamento dos ovos pode reduzir a sensibilidade ao tiabendazole, dessa forma, o teste deve ser realizado até três horas após a coleta das fezes. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da temperatura, anaerobiose e tempo de conservação de fezes sobre a eclodibilidade e a sensibilidade a benzimidazóis de ovos de nematodas gastrintestinais de bovinos e equinos. Foram utilizados 18 bovinos naturalmente infectados predominantemente por *Cooperia* sp. e um equino naturalmente infectado predominantemente por Ciatostomíneos, ambos previamente caracterizados como suscetíveis aos benzimidazóis no teste de eclodibilidade larval. As amostras de fezes foram homogeneizadas e retiradas alíquotas para 31 tratamentos de armazenamento, divididas no teste padrão (TP) e em seis tratamentos com cinco períodos de avaliação (24,48,72,96 e 120 horas) cada: TP: procedimento padrão realizado até 3 horas; GR1 a 5: fezes diluídas em água, tamisada em peneira com malha de 1 mm e acondicionadas sob anaerobiose em garrafas com capacidade de 600 ml sobre refrigeração ; GA1 a 5: fezes diluídas em água, tamisada em peneira com malha de 1 mm e acondicionadas sob anaerobiose em garrafas com capacidade de 600 ml em temperatura ambiente; SR1 a 5: saco plástico sobre refrigeração ; SA1 a 5: saco plástico em temperatura ambiente; VR1 a 5: fezes mantidas no vácuo sobre refrigeração; VA1 a 5: fezes mantidas no vácuo em temperatura ambiente. Os TELs foram realizados em triplicada e com três repetições de tempo cada, realizados uma vez por semana e como controle negativo foi utilizado água destilada. Foram excluídos do estudo os tratamentos que apresentaram eclodibilidade abaixo de 85%. Para avaliar o efeito dos métodos de armazenamento sobre a sensibilidade dos ovos ao tiabendazole, a concentração efetiva média (CE50) e o intervalo de confiança de 95% obtidos para cada tratamento foram comparados com o teste padrão (TP) e entre as repetições. Nas amostras de fezes de equinos, apesar das formas de armazenamento não terem influenciado na eclodibilidade, houve efeito sobre a sensibilidade dos ovos ao tiabendazole, sendo observada diferença estatística entre as repetições. Para as amostras de bovinos, apenas os tratamentos GA4,VA4,VR4 e VR1 não apresentaram diferença estatística para CE50 entre as repetições de tempo e apenas o VR1 não foi igual ao teste padrão (TP). Para amostras de fezes de equinos, nenhuma forma de armazenamento pode ser indicada, por apresentar grande variação entre as repetições, diminuindo a sensibilidade dos ovos ao tiabendazole e gerando resultados de falsa resistência. Dessa forma deve seguir as recomendações de realização do teste em até 3 horas após a coleta das fezes do hospedeiro.

Palavras-chave: anaerobiose, *in vitro*, sensibilidade

ABSTRACT

The egg hatch test (EHT) is an *in vitro* test for the diagnosis of resistance to benzimidazoles, however, this technique is little used in the field because egg embryo can reduce sensitivity to tiabendazole, so the test should be performed up to three hours after stool collection. The objective of this study was to evaluate the effect of temperature, anaerobic and stool conservation time on hatchability and sensitivity to benzimidazoles of gastrointestinal nematodes of cattle and horses. Eighteen naturally infected cattle predominantly of *Cooperia* sp. and an equine naturally infected predominantly by *Cystostomin*, both previously characterized as susceptible to benzimidazoles in the egg hatch test. The faecal samples were homogenized and aliquoted for 31 storage treatments, divided into the standard test (TP) and six treatments with five evaluation periods (24,48,72,96 and 120 hours) each: TP: standard procedure performed up to 3 hours; GR1 to 5: stool diluted in water, sieved in a 1 mm mesh sieve and conditioned under anaerobic conditions in cylinders with a capacity of 600 ml on cooling; GA1 to 5: stool diluted in water, sieved in a 1 mm mesh sieve and packed under anaerobic conditions in bottles with a capacity of 600 ml at ambient temperature; SR1 to 5: plastic bag over cooling; SA1 to 5: plastic bag at ambient temperature; VR1 to 5: stool held in vacuum over refrigeration; VA1 to 5: stool kept under vacuum at ambient temperature. The EHTs were performed in triplicate and with three repetitions of each time, performed once a week and as a positive control distilled water was used. The treatments that showed hatchability below 85% were excluded from the study. To evaluate the effect of storage methods on egg sensitivity to tiabendazole, the EC50 and the 95% confidence intervals obtained for each treatment were compared with the standard test (TP) and between replicates. In equine faeces samples, although the storage forms did not influence hatchability, there was an effect on the sensitivity of the eggs to tiabendazole, with a statistical difference between the replicates. For the bovine samples, only the treatments GA4, VA4, VR4 and VR1 did not present statistical difference for EC50 between the repetitions of time and only the VR1 was not equal to the standard test (TP). Therefore the bovine samples can be stored from 48 to 96 hours and the forms of storage can be used in anaerobic and therefore no refrigeration is required, ensuring hatchability of the negative control and sensitivity of the eggs to thiabendazole. But forms of storage in a refrigerated plastic bag can also be used with satisfactory results. For samples of equine faeces, no form of storage can be indicated, since it presents a great variation among the repetitions, diminishing the sensitivity of the eggs to the tiabendazole and generating results of false resistance. In this way, the recommendations of the test should be followed up to 3 hours after the collection of the feces from the host.

Key-words: anaerobiosis, *in vitro*, sensitivity.

1. INTRODUÇÃO

Os parasitas gastrintestinais em bovinos e equinos provocam problemas econômicos e sanitários, como redução da ingestão de alimentos e conseqüentemente, do ganho em peso de bovinos, causando prejuízos de até U\$ 7,11 bilhões no Brasil (GRISI et al., 2014).

Dentre os parasitas gastrintestinais de bovinos *Cooperia* sp. é um dos mais prevalente no Brasil, podendo causar diarreias e redução no desempenho. Em equinos esses prejuízos ocorrem principalmente pelos Ciatostomíneos, sendo estes os parasitas mais prevalentes nessa espécie animal, causando episódios de cólicas, provocadas pelas larvas encistadas e redução no desempenho dos animais. Os grandes estrôngilos apesar de serem mais patogênicos, apresentam baixas prevalências.

Na tentativa de reduzir esses problemas, vários produtores tratam os animais de forma sistemática, aumentando a pressão de seleção de parasitas resistentes. O status da resistência a benzimidazóis em equinos e bovinos ainda é inicial em algumas regiões, o que demanda o monitoramento constante da eficácia.

Com o objetivo de monitorar a resistência anti-helmíntica, são utilizados testes *in vivo* e *in vitro*. O teste *in vivo* de redução da contagem de ovos por grama de fezes (TRCOF) é o mais utilizado, pois pode ser empregado com maior facilidade para avaliar amostras de campo, porém, é um teste mais trabalhoso e a resistência só é diagnosticada quando apresenta frequência acima de 25% na população de parasitas. Os testes *in vitro* mais utilizados são: teste de eclodibilidade larval (TEL), teste da inibição da migração larval e teste de desenvolvimento larval. Esses testes são mais sensíveis, rápidos e não sofrem interferência do metabolismo animal no resultado do teste. O teste de eclodibilidade larval é o teste padrão para diagnóstico da resistência aos benzimidazóis, porém apresenta como desvantagem a necessidade de realização em até três horas após a coleta das fezes (COLES et al., 2006), o que limita bastante a sua ampla utilização. Os meios anaeróbicos de conservação de amostras foram utilizados apenas para avaliar a influência da conservação de fezes destinada para a contagem de ovos por grama de fezes e coprocultura e os estudos que avaliaram influência da temperatura foram realizados apenas para verificar o desenvolvimento das larvas desses gêneros de helminto. Não existem

35 relatos sobre a influência da anaerobiose e da temperatura sobre o
36 armazenamento das fezes para realização do TEL. Dessa forma o presente
37 trabalho é o primeiro que avaliou essas variáveis para o teste *in vitro*.

38 **2. OBJETIVOS**

39

40 O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da temperatura, anaerobiose e
41 tempo de conservação de fezes sobre a eclodibilidade e a sensibilidade a
42 benzimidazóis de ovos de nematodas gastrintestinais de bovinos e equinos.

43

44 3. REVISÃO DE LITERATURA

45

46 3.1. Parasitas gastrintestinais de bovinos

47 No Brasil os principais gêneros de parasitas gastrintestinais encontrados
48 nos bovinos são *Cooperia* sp., *Haemonchus* sp., *Oesophagostomum* sp. e
49 *Trichostrongylus* sp., sendo que *Cooperia punctata* é a espécie mais prevalente
50 (SANTOS et al., 2010). *Cooperia* sp. é um parasita que apresenta ciclo direto,
51 sendo que os ovos são eliminados nas fezes, em 12 horas ocorre a eclosão da
52 larva que se encontra no primeiro estágio (L1). Após 48 horas da eclosão essa
53 larva muda para o segundo estágio (L2) e após 90 horas essa larva muda para
54 o terceiro estágio (L3) que é a forma infectante para o hospedeiro. Essas fases
55 ambientais dependem da amplitude de temperatura para ocorrer o
56 desenvolvimento, assim como a umidade é necessária. A amplitude de
57 temperatura que são observados os melhores desenvolvimentos larvais é em
58 torno de 18 a 26°C e a umidade de 80 a 100% (ANDREWS, 1939).

59 A temperatura de 8°C é considerada limite para o desenvolvimento
60 desse gênero e para os principais helmintos de bovinos. Conforme ocorre o
61 aumento da temperatura, também ocorre uma redução de dias para
62 desenvolvimento dos ovos, sendo que a temperatura ideal para
63 desenvolvimento é 25°C. Temperaturas acima de 35°C são letais para o
64 desenvolvimento desses parasitas (CIORDIA & BIZZELL, 1963).

65 *Cooperia* sp. provoca espessamento da mucosa do intestino e o
66 aumento do muco, podendo causar fezes com consistência amolecida e
67 diarreia pela enterite provocada (STROMBERG et al., 2012), além de causar
68 compressão e distorção das vilosidades do duodeno e jejuno anterior, onde são
69 encontrados os parasitas adultos (COOP et al., 1979). Mas o maior prejuízo
70 causado por esse parasita é a diminuição da ingestão de matéria seca (0.08
71 Kg/dia), o que provoca a diminuição de 0.11 Kg/dia no ganho de peso dos
72 bovinos (STROMBERG et al., 2012).

73 Dentre as espécies de *Cooperia*, *Cooperia punctata* e *C. pectinata* são
74 as mais patogênicas, no entanto, *C. oncophora* pode causar perda de até 13
75 kg. Mesmo com esses prejuízos o gênero não é o mais patogênico para

76 bovinos, porém a resistência anti-helmíntica e a alta prevalência podem trazer
77 grandes prejuízos no ganho de peso para os animais, sendo maior em animais
78 jovens que não apresentam resistência contra esse parasita (CANDY et al.,
79 2018).

80 *Haemonchus* sp. também é um parasita que apresenta ciclo de vida direto e
81 os adultos habitam o abomaso dos hospedeiros. A temperatura ambiental
82 adequada é entre 27 e 35°C para a eclosão das larvas e 20 e 35°C para o
83 desenvolvimento da larva no ambiente. A maioria das larvas eclode 19 horas
84 após a eliminação dos ovos nas fezes. Os ovos desse parasita permanecem
85 viáveis em temperaturas baixas, ocorrendo desenvolvimento de 70% das larvas
86 até segundo estágio a 4°C e com 8°C o desenvolvimento é maior, porém em
87 temperatura acima de 55°C o desenvolvimento é reduzido e pode ocorrer morte
88 (VEGLIA, 1915).

89 A importância desse parasita é pela sua patogenicidade, pois é um parasita
90 hematófago e que provoca pontos de hemorragia no abomaso, podendo
91 provocar quadros de anemia e morte. Em casos agudos e com alta carga
92 parasitária podem também causar quadros de hipoalbuminemia (GENNARI et
93 al., 1991).

94

95 **3.1.2 Ciatostomíneos em equinos**

96 Os principais parasitas de equinos são os ciatostomíneos, comumente
97 chamados de pequenos estrôngilos, e os *Strongylus* sp., chamados de grandes
98 estrôngilos. *Strongylus* sp. são os mais patogênicos, como *Strongylus vulgaris*,
99 que pode causar casos severos de cólica trombo embólica e morte. No entanto,
100 com o advento das lactonas macrocíclicas, a frequência desse parasita foi
101 reduzida (HERD, 1986).

102 Os ciatostomíneos são os parasitas mais frequentes, apresentando uma
103 prevalência de 100% nos animais adultos (LYONS et al, 1999). Existem
104 aproximadamente 51 espécies de Ciatostomíneos, das quais, dez são as mais
105 prevalentes: *Cylicostephanus longibursatus*, *Cyathostomum catinatum*,
106 *Cylicostephanus goldi*, *Cylicocyclus nassatus*, *Cyathostomum*
107 *coronatum*, *Cylicostephanus calicatus*, *Cylicostephanus minutus*, *Cylicocyclus*

108 *leptostomus*, *Cyathostomum pateratum*, e *Cylicocyclus insigne* (LYONS et al,
109 1999), sendo impossíveis de diferenciar pelo ovo ou pelos estádios larvais,
110 podendo ser identificados apenas pela morfologia dos adultos ou por biologia
111 molecular (LICHTENFELS,1998).

112 Esses parasitas apresentam ciclo de vida direto, os ovos são eliminados
113 nas fezes 8 semanas após a ingestão das larvas infectantes. As larvas de
114 primeiro e segundo estágio se alimentam de substratos que estão nas fezes,
115 enquanto a de terceiro estágio (L3) é a forma infectante e não se alimenta, pois
116 retém a cutícula da larva do estágio anterior. A L3, após ingerida, aloja-se na
117 parede do intestino grosso e pode permanecer de 4 meses a 2 anos encistada,
118 esse fenômeno ocorre em 90% das larvas. Depois se transformam em L4 e
119 adulto, que habitam o ceco e cólon (CORNING, 2009; LYONS et al., 1999). O
120 ciclo de vida livre desses nematodas é dependente de temperatura e oxigênio,
121 a temperatura adequada para seu desenvolvimento é entre 25 e 33°C. Em
122 climas até 5°C ainda ocorre eclosão dos ovos, temperaturas acima de 40°C
123 podem impedir a eclosão dos ovos. A umidade também apresenta importância
124 na eclosão e desenvolvimento desses parasitas. O desenvolvimento da larva
125 ainda dentro do ovo e a eclosão ocorre mais rápido do que em outras espécies
126 de parasitas (OGBOURNE, 1972).

127 A importância da subfamília Ciatostominae para os equinos é pela alta
128 prevalência, relatos de resistência anti-helmíntica a várias classes de anti-
129 helmínticos e pela patogenia (LYONS et al., 1999; LOVE et al., 1999).

130 A patogenia mais relevante dessa subfamília de parasitas é provocada pelo
131 encistamento das larvas no intestino grosso, causando uma colite, dessa forma
132 podem ocorrer casos de cólica e redução da ingestão de alimentos, além de
133 queda na performance animal (LOVE et al., 1999). A emersão das larvas de
134 forma sincronizada pode provocar tiflocolite generalizada e episódios de
135 diarreia (HERD, 1993). Além disso, os animais podem apresentar anorexia,
136 pirexia e edema (LOVE et al., 1999). O local do encistamento das larvas está
137 relacionado com a patogenia, quanto mais profundo, maior será a inflamação
138 (NIELSEN et al., 2014).

139

140 **3.2. Benzimidazóis**

141 Uma das classes anti-helmínticas mais antigas utilizadas em bovinos
142 são os benzimidazóis. O primeiro princípio ativo foi o tiabendazole, lançado no
143 mercado em 1961, sendo esse o precursor dos demais princípios desse grupo
144 (LACEY, 1990; LACEY & GILL, 1994; ALMEIDA & AYRES, 2011).

145 No princípio acreditava-se que o mecanismo de ação dos benzimidazóis
146 era através da inibição do fumarato redutase (LACEY & GILL, 1994), no
147 entanto, foi provado que a droga liga-se ao citoesqueleto da tubulina e bloqueia
148 a formação da matriz de microtúbulos que é essencial para o funcionamento
149 normal das células (LACEY & GILL, 1994, ALMEIDA & AYRES, 2011).

150 Os microtúbulos permanecem em equilíbrio dinâmico, as enzimas são
151 responsáveis pela polimerização e despolimerização de unidades alfa e beta
152 tubulina que terminam por formar e desestruturar microtúbulos,
153 respectivamente, conforme a necessidade do organismo. (LACEY,
154 1990;LACEY & GILL, 1994). Os benzimidazóis provocam esse desequilíbrio
155 ligando com a β tubulina e inibindo a formação dos microtúbulos e dessa forma
156 matando os parasitas por paralisia e interferindo na formação dos ovos. Essa
157 classe apresenta ação contra todas as fases do parasita, inclusive tendo ação
158 ovicida (LACEY, 1990). Apesar dos mamíferos também apresentarem os
159 microtúbulos, a afinidade da tubulina dos parasitas pelos benzimidazóis é
160 maior, apresentando baixa toxicidade para o animal (LACEY, 1990; LACEY &
161 GILL, 1994).

162

163 **3.3. Resistência a benzimidazóis**

164 A resistência é uma habilidade dos parasitas de tolerar doses de drogas
165 que seriam letais para parasitas de mesma espécie ou estágio, é uma
166 característica genética e dessa forma é herdável (STONE, 1972).

167 O primeiro relato de *Cooperia* sp. resistente aos benzimidazois foi em
168 1987, o oxfendazole apresentou 18,5% de eficácia no teste de redução e
169 essa resistência foi confirmada por teste de eclodibilidade com fator de
170 resistência de 20 vezes a dose indicada (JACKSON et al., 1987). Outros
171 relatos de resistências foram observados em rebanhos na Nova Zelândia

172 (WAGHORN et al., 2006) e em alguns rebanhos no Brasil (SOUTELLO et al.,
173 2007).

174 Em 2011, foi realizado um estudo em dez rebanhos no Mato Grosso do
175 Sul onde a eficácia média dos benzimidazóis era 99% em bovinos (FELIZ,
176 2011). Nos Estados Unidos apresentaram eficácias semelhantes de 98,1%
177 (STROMBERG et al., 2012) e na Alemanha, Suécia e Bélgica foram
178 observadas eficácias de 100% para os benzimidazóis (DEMELER et al., 2009).
179 Na Argentina e no Brasil a eficácia foi acima de 90% (SUAREZ & CRISTEL,
180 2007; SOUTELLO et al., 2007), que mesmo sendo considerada como
181 resistente por Coles et al, (2006), apresentam eficácias altas.

182 Sutherland and Leathwick (2011) observaram que o controle inefetivo de
183 um isolado de *Cooperia oncophora* resistente resultou em um déficit de 14 kg
184 no ganho em peso vivo de bezerros de corte. Fazzio et al. (2014) observaram
185 que animais confinados e desverminados com anti-helmíntico eficaz (94,2% de
186 eficácia) ganharam 8,3% mais em peso vivo que animais tratados com outro
187 princípio de baixa eficácia, isso considerando um período de 75 dias. Candy et
188 al. (2018) observaram perdas de até 13 Kg com o tratamento de animais que
189 apresentavam isolado resistente.

190 Em equinos os relatos de resistência aos benzimidazóis são mais
191 frequentes. O primeiro relato de resistência foi ao tiabendazole em 1960 em
192 ciatostomíneos (LYONS et al., 1999). Os relatos de resistência são frequentes
193 no mundo todo, na Dinamarca (CRAVEN et al., 1999), na Austrália (POOK et
194 al., 2002), na Itália (TRAVERSA et al., 2009) e no Brasil (CANEVER et al.,
195 2013; VERA, 2014). Na Índia a resistência está em processo inicial com
196 apenas 44,4% de relatos de resistência no país (KUMAR et al., 2016).

197

198 **3.4. Diagnóstico da resistência**

199 As formas de diagnosticar a resistência anti-helmíntica são por teste *in*
200 *vivo*, *in vitro* e moleculares.

201 **3.3.1. Testes *in vivo***

202 Os testes *in vivo* comumente utilizados são: teste anti-helmíntico
203 controlado, teste anti-helmíntico crítico e teste de redução da contagem de
204 ovos por grama de fezes (TRCOP). O teste anti-helmíntico controlado é

205 realizado através da necropsia dos animais pós-tratamento e comparação do
206 grupo tratado e do grupo controle. O teste anti-helmíntico crítico também é
207 realizado por meio de necropsia do animal pós-tratamento, no entanto, após o
208 tratamento é realizada a coleta dos parasitas eliminados nas fezes. Porém são
209 testes usados apenas para o registro de novos fármacos (DUNCAN et al.,
210 2002). O TRCOP é realizado através da comparação da contagem de ovos por
211 grama de fezes no pré e pós-tratamento ou a comparação entre a contagem do
212 pós-tratamento do grupo tratado e o grupo controle. Sendo considerados
213 isolados sensíveis aqueles que apresentarem eficácia dos produtos testados
214 maior que 95% e o limite inferior do intervalo de confiança for maior que 90%
215 (COLES et al., 2006)

216 As principais vantagens para o uso do TRCOP são a alta aplicabilidade
217 a campo e o fato dessa técnica ser utilizada para avaliar a eficácia de todas as
218 classes de antiparasitários, porém é uma técnica com baixa repetibilidade e
219 sensibilidade, visto que a distribuição dos ovos não é uniforme nas fezes
220 (MATTHEWS, 2014). Quando ocorre a flutuação em soluções supersaturadas,
221 essa distribuição dos ovos não é uniforme (MATTHEWS, 2014;
222 VIDYASHANKAR et al., 2012). Além de ser uma técnica que necessita de um
223 número grande de animais, a maior desvantagem dessa técnica é diagnosticar
224 a resistência quando essa está estabelecida em pelo menos 25% da população
225 da espécie parasita (COLES et al., 2006).

226 3.3.2. Testes *in vitro*

227 Existem várias técnicas *in vitro* para o diagnóstico da resistência anti-
228 helmíntica, porém, três delas são as mais utilizadas para pesquisa científica em
229 animais de produção: teste de eclodibilidade larval, teste de desenvolvimento
230 larval e teste de inibição da migração larval.

231 O teste de desenvolvimento larval é pouco utilizado por apresentar baixa
232 repetibilidade e pouca padronização entre laboratórios, no entanto, é utilizado
233 para diagnosticar a resistência aos benzimidazóis, levamisol, lactonas
234 macrocíclicas e monepantel. Avalia o desenvolvimento do ovo até L3 (COLES
235 et al., 2006), e já existe um teste comercial chamado DrenchRite, utilizado e
236 padronizado para equinos e suínos (TANDON & KAPLAN., 2004).

237 O teste de inibição da migração larval é utilizado para avaliar a
238 resistência para o grupo das lactonas macrocíclicas. É avaliada a capacidade
239 da L3 de migrar através de uma malha após a incubação com a droga
240 (D'ASSONVILLE et al., 1996).

241 A abordagem principal será no teste de eclodibilidade larval.

242 3.3.2.1 Teste de eclodibilidade larval

243 O teste de eclodibilidade larval é utilizado para diagnosticar a resistência
244 aos benzimidazóis (COLES et al., 2006). O tiabendazol é o fármaco utilizado
245 para o teste por apresentar maior solubilidade em água e ser capaz de impedir
246 o desenvolvimento dos ovos. A ação do fármaco é reduzida em poucas horas
247 após a coleta das amostras fecais, pela ação das enzimas que são liberadas
248 pelo desenvolvimento da larva e se acumulam na casca do ovo, impedindo a
249 penetração e ação do fármaco (LE JAMBRE, 1976). As vantagens dessa
250 técnica são o diagnóstico precoce da resistência, baixo custo, além de ser um
251 teste rápido e sem ter interferência do metabolismo do animal (COLES et al.,
252 2006). Outro fator que facilita o uso dessa técnica é a definição da dose
253 discriminante para o diagnóstico da resistência, ou seja, apenas com uma
254 concentração já é possível diagnosticar o *status* do isolado (WHITLOCK et al.,
255 1980). No entanto, o teste deve ser realizado em até três horas após a coleta
256 das fezes do hospedeiro, o que é inviável dependendo da distância da fazenda,
257 o que limita a ampla utilização desta técnica, além de ser utilizado apenas para
258 os benzimidazóis (COLES et al., 2006; MATTHEWS, 2012).

259 Com o objetivo de contornar esse problema e viabilizar o uso massal
260 desse teste, Whitlock et al, (1980) avaliou uma forma de armazenamento de
261 fezes de ovinos e equinos em garrafa de criopreservação com açúcar . Após a
262 flutuação dos ovos era adicionado tiabendazole na concentração de 0.1 µg,
263 podendo manter por 20 a 24 horas dessa forma, no entanto, esse método não
264 avaliou a influência da sacarose na degradação dos ovos e por ser utilizada
265 apenas uma concentração de tiabendazole, não é possível estimar a CE50 do
266 isolado e a resistência é avaliada apenas pela presença de larvas nessa
267 concentração.

268 Hunt & Taylor (1989) indicam a conservação das fezes de ovelhas em
269 meio anaeróbio e mantido em temperatura ambiente para a realização do teste
270 de eclodibilidade larval por até sete dias, no entanto, não foi avaliada a
271 influência na sensibilidade dos ovos ao tiabendazole. Calvete et al, (2014)
272 avaliaram o armazenamento em meio anaeróbio de fezes de ovinos em
273 refrigeração por até 12 dias, pois os autores afirmam que amostras
274 armazenadas em temperatura ambiente favoreciam a fermentação da amostra,
275 interferindo no teste. Nesse estudo foi observado que amostras mantidas
276 refrigeradas podem ter menores eclodibilidades dos ovos.

277 Outros autores avaliaram anaerobiose e a refrigeração, porém em outras
278 espécies animais e sem observar a influência sobre a CE50, apenas na
279 eclodibilidade (SMITH-BEEIJS & BORGSTEEDE, 1986). Outros autores
280 utilizam o armazenamento das fezes em meio anaeróbio, porém sem avaliarem
281 a influência na sensibilidade e nem na eclodibilidade e muitas vezes não
282 informam como foi realizada a anaerobiose no meio. Essa técnica ainda não foi
283 avaliada para bovinos, sendo indicada apenas para pequenos ruminante e
284 equinos por Coles et al, (2006).

285 3.3.3. Testes moleculares

286 A biologia molecular pode ser utilizada para diagnosticar resistência aos
287 benzimidazóis, visto que os genes responsáveis pela resistência nos parasitas
288 são conhecidos. Pode ser realizada reação da cadeia de polimerase (PCR)
289 para pesquisar a mutação do isotipo 1 da β tubulina no códon 200 (KWA et al.,
290 1994; COLES et al., 2006). Outro códon que tem relação com a resistência a
291 essa classe é o isotipo 1 da β tubulina códon 167, sendo esse o mais
292 importante (NIELSEN, 2014). Além desses dois códon pode ocorrer mutação
293 no 198, no entanto, com menor frequência (CANEVER et al, 2013).

294 A resistência a essa classe pode ser diagnosticada também através de
295 pirosequenciamento e PCR em tempo real, que são técnicas quantitativas e
296 com diagnóstico precoce da resistência, porém são técnicas mais caras e mais
297 complexas. (VON SAMSON-HIMMESTJERNA, 2002).

298

299 **4. REFERÊNCIAS**

- 300 ALMEIDA, M.A.O.; AYRES, M.C.C. **Considerações gerais sobre os anti-**
301 **helmínticos**. In Spinosa, H.S.; Górnaiak, S.L.; Bernardi, M.M. Farmacologia
302 Aplicada à Medicina Veterinária. 5. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan
303 S.A., 2011, cap.45, p. 517-530.
- 304 ANDREWS, J.S. Life history of the nematode *Cooperia curticei*, and
305 development of resistance in sheep. **Journal of Agricultural Research**. v. 58,
306 p. 771-785, 1939.
- 307 CALVETE, C; FERRER, L.M; LACASTA, D et al. Variability of the egg hatch
308 assay to survey benzimidazole resistance in nematodes of small ruminants
309 under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 203, p.102–113, 2014.
- 310 CANDY, P.M; WAGHORN, T.S, MILLER, C.M., et al. The effect on liveweight
311 gain of using anthelmintics with incomplete efficacy against resistant *Cooperia*
312 *oncophora* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 251, p.56–62, 2018.
- 313 CANEVER, R.J; BRAGA, P.R.C; BOECKH, A., et al. Lack of *Cyathostomin* sp.
314 reduction after anthelmintic treatment in horses in Brazil. **Veterinary**
315 **Parasitology** v.194, p. 35–39, 2013.
- 316 CIORDIA, H; BIZZELL, W.E. The effects of various constant temperatures on
317 the development of the free living-stages of some nematode parasites of cattle.
318 **The Journal of Parasitology**, v. 49, p. 60-63, 1963.
- 319 COLES, G.; JACKSON, F; POMROY, W.E., et al. The detection of anthelmintic
320 resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**. v.
321 136, p. 167-185, 2006.
- 322 COOP, R.L.; SYKES, A.R.; ANGUS, R.W. The pathogenicity of daily intakes of
323 *Cooperia oncophora* larvae in growing calves. **Veterinary Parasitology**, v.5, p.
324 261-269, 1979.
- 325 CORNING, S. Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance
326 and therapy. **Parasites & Vectors**, v.2, p.1-6, 2009.
- 327 CRANEN, J.; BJORN, H.; BARNES, E.H., et al. A comparison of in vitro tests and a
328 faecal egg count reduction test in detecting anthelmintic resistance in horse
329 strongyles. **Veterinary Parasitology**, v.85, p.49-59, 1999.

- 330 D'ASSONVILLE, J. A.; JANOVSKY, E; VERSTER, A. In vitro screening of
331 *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. **Veterinary**
332 **Parasitology**. v.61, p.73-80, 1996.
- 333 DEMELER, J; KÜTTLER, U,; von SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Monitoring
334 the efficacy of ivermectin and albendazole against gastro intestinal nematodes
335 of cattle in Northern Europe. **Veterinary Parasitology**. v.160, p.109–115, 2009.
- 336 DUNCAN, J.L; ABBOTT, E.M; ARUNDEL, J.H et al. World association for the
337 advancement of (WAAVP): second edition of guidelines for evaluating
338 the efficacy of equine anthelmintics. **Veterinary Parasitology**.v.103, p.1–18,
339 2002.
- 340 FAZZIO, L.E.; SÁNCHEZ, R.O.; STREITENBERGERA, N., et al. The effect of
341 anthelmintic resistance on the productivity in feedlot cattle. **Veterinary**
342 **Parasitology** v.206, p. 240-245, 2014.
- 343 FELIZ, D.C. Resistência a anti-helmínticos em nematodas gastrintestinais
344 de bovinos de corte, no Mato Grosso do Sul, Brasil. 2011. 48 p. Dissertação
345 (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul,
346 Campo Grande.
- 347 GENNARI,S.M.; VIEIRA BRESSAN, M.C.R.; ROGERO, J.R., et al.
348 Pathophysiology of *Haemonchus placei* infection in calves. **Veterinary**
349 **Parasitology**, v.38, p.163-172,1991.
- 350 GRISI, L; LEITE, R.C; MARTINS, J.R.S., et al. Reassessment of the potential
351 economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Jornal Veterinary**
352 **Parasitology** , v. 23, p. 150-156, 2014.
- 353 HERD, R.P. Epidemiology and control of equine strongylosis at Newmarket.
354 **Equine Veterinary Journal**, v.6, p.447-452, 1986.
- 355 HERD, R.P. Control strategies for ruminant and equine parasites to counter
356 resistance, encystment and ecotoxicity in the U.S.A. **Veterinary Parasitology**,
357 v.48, p.327-336,1993.
- 358 HUNT, K.R; TAYLOR, M.A. Use of the egg hatch assay on sheep faecal
359 samples for the detection of benzimidazole resistant nematodes. **Veterinary**
360 **Record**, v. 125, p. 153–154, 1989.
- 361 KRÍZOVÁ-FORSTOVÁ, V; LAMKA, J.; CVILINK, V., et al. Factors affecting
362 pharmacokinetics of benzimidazole anthelmintics in food-producing animals:

- 363 The consequences and potential risks. **Research in Veterinary Science**. v.91,
364 p.333–341, 2011.
- 365 KWA, M.S.; VEENSTRA, J.G.; ROSS, M.H. Benzimidazole resistance
366 in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid
367 200 in β -tubulin isotype 1. **Molecular Biochemical Parasitology** v.63, p.299–
368 303, 1994.
- 369 JACKSON, R.A; TOWNSEND, K.G; PYKE, C., et al. Isolation of oxfendazole
370 resistant *Cooperia oncophora* in cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 5,
371 p.187-189, 1987.
- 372 KUMAR, S.; RAJAT,G.; KUMAR,S., et al. Benzimidazole resistance in equine
373 cyathostomins in India. **Veterinary Parasitology**, v.218, p.93-97, 2016.
- 374 LACEY, E. Mode of Action of Benzimidazoles. **Parasitology Today**, v. 6,
375 p.112-115, 1990.
- 376 LACEY, E; GILL, J.H. Biochemistry of benzimidazole resistance. **Acta Tropica**,
377 v. 56, p.245-262, 1994.
- 378 LE JAMBRE, L.F. Egg hatch as an in vitro assay of Thiabendazole resistance in
379 nematode. **Veterinary Parasitology**, v. 2, p.385-391, 1976.
- 380 LICHTENFELS, J.R.; KHARCHENKO, V.A.; KRECEK, R.C, et al. An annotated
381 checklist by genus and species of 93 species level names for 51 recognized
382 species of small 17 strongyles (Nematoda: Strongyloidea: Cyathostominea) of
383 horses, asses and zebras of the world. **Veterinary Parasitology**, v.79, p. 65–
384 79, 1998.
- 385 LOVE, S., MURPHY, D., MELLOR, D. Pathogenicity of cyathostome infection.
386 **Veterinary Parasitology**, v.85, p.113–122, 1999.
- 387 LYONS, E.T., TOLLIVER, S.C., DRUDGE, J.H. Historical perspective of
388 cyathostomes: prevalence, treatment and control programs. **Veterinary**
389 **Parasitology**, v. 85, p.97–112, 1999.
- 390 MATTHEWS, J.B. The in vitro diagnosis of anthelmintic resistance in
391 cyathostomins. **Veterinary Parasitology**, v. 185, p. 25–31, 2012.
- 392 MATTHEWS, J.B. The future of helminth control in horses, **Equine veterinary**
393 **Journal**, v. 46,p. 10-11, 2014.
- 394 NIELSEN, M.K; PFISTER, K; von SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., et al.
395 Anthelmintic resistance in equine parasites— Current evidence and knowledge
396 gaps. **Veterinary Parasitology**, v.204, p.55–63, 2014.

- 397 OGBOURNE, C.P. Observations on the free-living stages of Strongylid
398 nematodes of the horse. **Parasitology**, v.64, p. 461-477, 1972.
- 399 POOK, J.F.; POWER, M.L.; SANGSTER, N.C., et al. Evaluation of tests for
400 anthelmintic resistance in cyathostomes. **Veterinary Parasitology**, v.106,
401 p.331–343, 2002.
- 402 SANTOS, T.R; LOPES, W.D.Z; BUZULINI, C., et al. Helminth fauna of bovines
403 from the Central-Western region, Minas Gerais State, Brazil. **Ciência Rural**, v.
404 49, p. 934–938, 2010.
- 405 SMITH-BUIJS, C.M.C; BORGSTEEDE, F.H.M. Effect of cool storage of faecal
406 samples containing *Haemonchus contortus* eggs on the results of an in vitro
407 egg development assay to test for anthelmintic resistance. **Research in**
408 **Veterinary Science**, v. 40, p.4–7, 1986.
- 409 SOUTELLO, R.G.V; SENO, M.C.Z; AMARANTE, A.F.T., et al. Anthelmintic
410 resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil.
411 **Veterinary Parasitology**, v.148, p. 360–364, 2007.
- 412 STROMBERG, B.E; GASBARRE, L.C; WAITE, A., et al. *Cooperia punctata*:
413 Effect on cattle productivity?. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 284– 291,
414 2012.
- 415 STONE, B.F. The genetics of resistance by ticks to acaricides. **Australian**
416 **Veterinary Journal**. v. 48, p. 345-350, 1972.
- 417 SUAREZ, V.H; CRISTEL, S.L. Anthelmintic resistance in cattle nematode in the
418 western Pampeana Region of Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 144 , p.
419 111–117, 2007.
- 420 SUTHERLAND, I.A; LEATHWICK, D.M. Anthelmintic resistance in nematode
421 parasites of cattle: a global issue? **Trends in Parasitology**, v. 27, p.176-181,
422 2011.
- 423 TANDON, R; KAPLAN R.M. Evaluation of a larval development assay
424 (DrenchRite) for the detection of anthelmintic resistance in cyathostomin
425 nematodes of horses. **Veterinary Parasitology**, v.121, p.125-42, 2004.
- 426 TRAVERSA, D.; IORIO, R.; OTRANTO, D., et al. Species-specific identification
427 of equine cyathostomes resistant to fenbendazole and susceptible to
428 oxibendazole and moxidectin by macroarray probin. **Experimental**
429 **Parasitology**, v. 121, p. 92–95, 2009.

430 VEGLIA, F., 1915. The anatomy and life history of the *Haemonchus contortus*
431 (Rud.). 3rd and 4th Rep. Dir. Vet. Res. Onderstepoort, Pretoria, South Africa,
432 pp. 349–500.

433 VERA, J.H.S. Resistência anti-helmíntica em equinos na região
434 oeste do estado de São Paulo. 2014. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciência e
435 Tecnologia Animal) – Câmpus experimental de Dracena, Universidade Estadual
436 Paulista “Julio Mesquita Filho”, Dracena.

437 VIDYASHANKAR, A.N; HANLON, B.M; KAPLAN, R.M., et al. Statistical and
438 biological considerations in evaluating drug efficacy in equine strongyle
439 parasites using fecal egg count data. **Veterinary Parasitology**. v.185, p.45-56,
440 2012.

441 VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G,; VON WITZENDORFF,C,; SIEVERS,G.,
442 et al. Comparative use of faecal egg count reduction test, egg hatch assay and
443 beta-tubulin codon 200 genotyping in small strongylus (cyathostominae) before
444 and after benzimidazole treatment. **Veterinary Parasitology**, v.108, p.227-235,
445 2002.

446 WAGHORN, T.S; LEATHWICK, D.M.; RHODES,A.P., et al. Prevalence of
447 anthelmintic resistance on 62 beef cattle farms in the North Island of New
448 Zealand. **New Zealand Veterinary Journal** v.54, p.278–282, 2006.

449 WHITLOCK, H.V; KELLY, J.D; PORTER, C.J et al. In vitro field screening for
450 anthelmintic resistance in strongyles of sheep and horses. **Veterinary**
451 **Parasitology**, v.7, p.215–232, 1980.

452

453

454

455

456

457

458

459

460

CAPÍTULO 2

MÉTODOS DE ARMAZENAMENTO DE FEZES DE BOVINOS E EQUINOS PARA TESTE DE ECLODIBILIDADE LARVAL

STORAGE METHODS OF CATTLE'S AND HORSE'S FECES FOR EGG HATCH TEST

Mariana Green de Freitas¹, Fernando de Almeida Borges¹

¹Laboratório de Doenças Parasitárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS, Brasil

Normatizado segundo o periódico: Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (RBPV)

http://cbpv.org.br/rbpv/normas/rbpv_v24n1_normas_PT.pdf

Abstract: Egg hatch test (EHT) is an *in vitro* test that is rarely used in the field, as it should be performed up to three hours after stool collection. The objective of this study was to evaluate the influence of time, temperature and anaerobiosis on the conservation of bovine and equine faeces on the hatchability and sensitivity of eggs from gastrointestinal nematodes to benzimidazoles in EHT. Eighteen naturally infected cattle predominantly of *Cooperia* sp. and an equine naturally infected predominantly by *Cystostomum*, both previously characterized as susceptible to benzimidazoles in EHT. The stool pool was divided into 31 treatments, divided into standard test (ST), BC 1 to 5 and BA 1 to 5: stool filtered in sieve and kept in refrigerated bottles or at ambient temperature, respectively. BPC 1 to 5 and BPA 1 to 5: refrigerated plastic bag or at ambient temperature, respectively. VR 1 to 5 and VA 1 to 5: stools under refrigerated vacuum or at ambient temperature, respectively, all evaluated at 24, 48, 72, 96 and 120 hours and with three time repetitions. To evaluate the effect of storage methods on egg sensitivity to tiabendazole, the EC50 and the 95% confidence intervals obtained for each treatment were compared with the standard test (ST) and between replicates. In equine faeces samples, although the storage forms did not influence hatchability, there was an effect on the sensitivity of the eggs to tiabendazole, with a statistical difference between the replicates. For the bovine samples, only the treatments BA4, VA4, VR4 and VR1 did not present statistical difference in the EC50 between the time repetitions and only the VR1 was not equal to the standard test (ST). Therefore bovine samples can be stored for 48 to 96 hours and storage, vacuum or bottle samples can be used in anaerobiosis, ensuring hatchability of the negative control and sensitivity of the eggs to thiabendazole. But also can be used forms of storage bag refrigerated plastic, which presented satisfactory results and makes the use of the test more feasible. For samples of equine faeces, no form of storage can be indicated, since it presents a great variation among the repetitions, diminishing the sensitivity of the eggs to the tiabendazole and generating results of false resistance. In this way, the recommendations of the test should be followed up to 3 hours after the collection of the feces from the host.

Key-words: anaerobiosis, *in vitro*, sensitivity

Resumo: Teste de eclodibilidade larval (TEL) é um teste *in vitro* pouco utilizado a campo, pois deve ser realizado até três horas após a coleta das fezes. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência do tempo, temperatura e anaerobiose na conservação de fezes de bovinos e equinos sobre a eclodibilidade e sensibilidade de ovos de nematodas gastrintestinais a benzimidazóis no TEL. Foram utilizados 18 bovinos naturalmente infectados predominantemente por *Cooperia* sp. e um equino naturalmente infectado predominantemente por *Ciatostomíneos*, ambos previamente caracterizados como suscetíveis aos benzimidazóis no TEL. O *pool* de fezes foi dividido em 31 tratamentos, divididos em teste padrão (TP), GR 1 a 5 e GA 1 a 5: fezes filtradas em peneira e mantidas em garrafas refrigeradas ou em temperatura

ambiente, respectivamente. SR 1 a 5 e AS 1 a 5: saco plástico refrigerado ou em temperatura ambiente, respectivamente. VR 1 a 5 e VA 1 a 5: fezes sob vácuo refrigerado ou em temperatura ambiente, respectivamente, todos avaliados em 24, 48, 72, 96 e 120 horas e com três repetições de tempo. Para avaliar o efeito dos métodos de armazenamento sobre a sensibilidade dos ovos ao tiabendazole, a CE50 e o intervalo de confiança de 95% obtidos para cada tratamento foram comparados com o teste padrão (TP) e entre as repetições. Nas amostras de fezes de equinos, apesar das formas de armazenamento não terem influenciado na eclodibilidade, houve efeito sobre a sensibilidade dos ovos ao tiabendazole, sendo observada diferença estatística entre as repetições. Para as amostras de bovinos, apenas os tratamentos GA4, VA4, VR4 e VR1 não apresentaram diferença estatística na CE50 entre as repetições de tempo e apenas o VR1 não foi igual ao teste padrão (TP). Portanto as amostras de bovinos podem ser armazenadas de 48 a 96 horas e podem ser usadas as formas de armazenamento, amostras em vácuo ou em garrafa em anaerobiose, garantindo eclodibilidade do controle negativo e sensibilidade dos ovos ao tiabendazole. Mas também podem ser usadas as formas de armazenamento saco plástico refrigerado, que apresentou resultados satisfatórios e torna a utilização do teste mais viável. Para amostras de fezes de equinos nenhuma, forma de armazenamento pode ser indicada, por apresentar grande variação entre as repetições, diminuindo a sensibilidade dos ovos ao tiabendazole e gerando resultados de falsa resistência. Dessa forma deve seguir as recomendações de realização do teste em até 3 horas após a coleta das fezes do hospedeiro.

Palavras-chave: anaerobiose, *in vitro*, sensibilidade

Introdução

Cooperia sp. e *Haemonchus* sp. são os parasitas gastrintestinais de bovinos mais prevalentes (Stromberg et al., 2012; Santos et al., 2010). *Cooperia* sp. provoca redução da ingestão da matéria seca com diminuição do ganho de peso (0.11Kg/dia) (Stromberg et al., 2012), e, embora não seja a mais patogênica, os relatos de resistência anti-helmíntica nesse gênero são frequentes (Candy et al., 2018). *Haemonchus* sp. é o parasita mais patogênico, podendo provocar anemia e quadros de hipoalbuminemia, além de apresentar vários relatos de resistência anti-helmíntica (Gennari et al., 1991). Os Ciatostomíneos são os parasitas mais prevalentes em equinos (Lyons et al., 1999). Esses parasitas podem provocar redução no ganho de peso e queda na performance animal, além de quadros de cólica no momento da emersão das larvas encistadas (Love et al., 1999).

Os benzimidazóis ainda apresentam alta eficácia em bovinos, acima de 95% em quase todos os rebanhos (Suarez & Cristel, 2007; Demeler et al, 2010; Feliz, 2011). Para equinos, apesar da resistência aos benzimidazóis ser relatada com frequência, em alguns países como na Índia a resistência a essa classe se apresenta no início, sendo necessário o monitoramento (Kumar et al., 2016). Uma das formas de monitorar a resistência a benzimidazóis é através do teste *in vitro* de eclodibilidade larval (Coles et al., 2006). No entanto, é indicado que esse teste seja realizado em até três horas após a coleta das fezes (Coles et al., 2006), porque o desenvolvimento dos embriões causa acúmulo de substâncias residuais decorrentes da formação da larva, reduzindo a ação desses fármacos (Le Jambre, 1976), o que inviabiliza a acurácia do teste, principalmente no Brasil que apresenta vasta extensão do território e as fazendas são grandes e distantes, como no Pantanal.

Até o momento, a influência da anaerobiose e da temperatura sobre o desenvolvimento dos ovos de helmintos foi avaliada para contagem de ovos por grama de fezes e coprocultura, sendo essa a única avaliação realizada com ovos de nematodas de bovinos (Ciordia & Bezzell, 1963; Sengupta et al., 2016). A anaerobiose e a refrigeração foram avaliadas em testes de eclodibilidade, porém em ovos de nematodas de ovinos e avaliando apenas a eclodibilidade (Smith-Beejs & Borgsteede, 1986), mas não a sensibilidade a benzimidazóis. A sensibilidade foi avaliada apenas de forma qualitativa em ovos de nematodas de ovinos e equinos, armazenados em temperatura ambiente e em anaerobiose com sacarose (Whitlock et al., 1980). As fezes de ovinos podem ser armazenadas em meio anaeróbico por até 7 dias (Hunt & Taylor.,1989), no entanto, o armazenamento das fezes em temperatura ambiente pode influenciar no teste e ocorrer a fermentação do meio, por isso é indicado o armazenamento em refrigeração por até 12 dias (Calvete et al., 2014).

Nenhum estudo avaliando a influência da temperatura e da anaerobiose em ovos de nematodas de bovinos no teste de eclodibilidade larval foi realizado até o momento. Coles et al, (2006) indicam o armazenamento das fezes em garrafa sob anaerobiose apenas para suínos, equinos e pequenos ruminantes e apesar de existir a indicação não existe um protocolo em relação ao tempo de armazenamento.

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da temperatura, anaerobiose e tempo de conservação de fezes sobre a eclodibilidade e a sensibilidade a benzimidazóis de ovos de nematodas gastrintestinais de bovinos e equinos.

Material e Métodos

Isolado de campo - Bovino

Para a obtenção das fezes com ovos de helmintos foram utilizados 18 bovinos da raça Nelore naturalmente infectados, mantidos na Fazenda Escola da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UFMS), localizada em Terenos - MS.

Foram realizadas coproculturas em cada repetição do estudo, com um pool de fezes antes das amostras serem divididas em grupos. A composição de gêneros foi determinada pela identificação morfológica, segundo chave de Ueno & Gonçalves (1998), de larvas obtidas de coproculturas realizadas segundo Roberts & O'Sullivan (1950). O isolado foi caracterizado pela predominância de *Cooperia* sp., apresentando 87% de *Cooperia* sp., 12% de *Haemonchus* sp., e 1% de *Oesophagostomum* sp., e também foi identificado como sensível aos benzimidazóis através do teste de eclodibilidade previamente realizado (CE50 = 0.011), de acordo com Coles et al, (2006). O estudo foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, registrado com o número 914/2017.

Isolado de campo – Equino

Para a obtenção das fezes com ovos de helmintos foi utilizado um equino naturalmente infectado, mantido em Ribas do Rio Pardo – MS. O isolado foi caracterizado como sensível através de teste de

eclodibilidade (CE 50 = 0.017), de acordo com Coles et al, (2006) e era composto predominantemente por Ciatostomíneos, sendo 96% Ciatostomíneos e 4% grandes estrôngilos.

Coleta de fezes e grupos experimentais

As amostras foram reunidas em *pool* homogeneizadas e separadas em 31 amostras, com cerca de 100 gramas cada, assim identificadas conforme apresentado na Tabela 1. Os testes foram realizados em três repetições com intervalo de uma semana.

Tabela 1. Grupos experimentais, formas de armazenamento e as horas de realização dos testes de eclodibilidade larval com amostras de fezes de bovinos e equinos naturalmente infectados.

Grupos	Formas de armazenamento	Momento de avaliação (h)
TP	Teste padrão	3
GR1,GR2,GR3,GR4,GR5	Garrafa sob anaerobiose refrigerada	24,48,72,96 e 120
GA1,GA2,GA3,GA4,GA5	Garrafa sob anaerobiose ambiente	24,48,72,96 e 120
SR1,SR2,SR3,SR4,SR5	Saco plástico refrigerado	24,48,72,96 e 120
SA1,SA2,SA3,SA4,SA5	Saco plástico ambiente	24,48,72,96 e 120
VR1,VR2,VR3,VR4,VR5	Saco plástico com vácuo refrigerado	24,48,72,96 e 120
VA1,VA2,VA3,VA4,VA5	Saco plástico com vácuo ambiente	24,48,72,96 e 120

Os grupos, nos quais as amostras permaneceram em garrafas sob anaerobiose, foram preparados através da lavagem das fezes após diluição em água, tamisação em peneira com malha de 1mm e acondicionadas sob anaerobiose em garrafas com capacidade de 600 ml. Para manter a anaerobiose foram utilizadas esferas de vidro, as garrafas foram agitadas para retirar o ar e o líquido colocado até formar um menisco na boca da garrafa. Quando armazenadas em refrigeração, foram mantidas em geladeira e a temperatura foi aferida duas vezes ao dia com auxílio de um termômetro para geladeira (Incoterm[®]). Os que permaneceram em garrafas sem refrigeração, foram preparados da mesma forma, porém mantidos em temperatura ambiente em caixa térmica e também com a aferição da temperatura.

Nos grupos acondicionados em sacos plásticos, o ar foi retirado manualmente do saco e o mesmo foi amarrado e mantido sobre refrigeração em geladeira. Os grupos que ficaram em temperatura ambiente, foram preparados da mesma forma, porém acondicionados em caixa térmica.

Para os grupos acondicionados em sacos plásticos a vácuo, as amostras de bovinos foram envoltas em gaze para ser possível a retirada do ar com auxílio de uma bomba de vácuo (Quimis[®]) e vedado com seladora térmica (SH FERRAMENTAS[®]) e um grupo permaneceu em temperatura ambiente em caixa térmica e o outro refrigerado em geladeira. Para as fezes de equinos foi realizado o mesmo procedimento, porém sem a necessidade da gaze por causa da consistência mais fibrosa das fezes de equinos.

No teste padrão, as fezes foram acondicionadas em sacos plásticos e o ar foi retirado manualmente, foi mantida em caixa térmica a temperatura ambiente até chegar ao laboratório e o teste de eclodibilidade larval foi realizado imediatamente após a chegada, dentro de três horas após a coleta, segundo preconizado por Coles et al. (2006).

Recuperação dos ovos e Teste de Eclodibilidade de Larval (TEL)

Os ovos foram recuperados como descrito por Coles et al. (2006), modificado por Bizimenyera et al. (2006). Após a recuperação dos ovos, esses ovos eram quantificados e padronizados, nesse momento também era observada a viabilidade desses ovos. Os ovos larvados foram quantificados, assim como os ovos íntegros e as larvas. Eram considerados ovos íntegros, os que apresentavam mórula (massa sólida). Ovos larvados, eram os que apresentavam uma larva em desenvolvimento dentro do ovo.

Foi preparada uma solução estoque de tiabendazole P.A. (Sigma- Aldrich Brasil Ltda, São Paulo- SP) em solvente dimetil sulfóxido (DMSO, Neon) e as soluções de trabalho preparadas em dez concentrações: 0,5; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025; 0,01; 0,005; 0,002 e 0,001 µg/ml, respectivamente, todas diluídas em água e com concentração final de 0.5% de DMSO no poço.

Cada teste foi realizado em triplicada para cada concentração de tiabendazole e incubada em placa de cultivo de 24 poços. Nos poços, foram depositados 900 µl de água, 10 µl da solução contendo tiabendazole nas várias concentrações e 100 µl da suspensão contendo em média 100 ovos. Como solução controle foi utilizada água e foram depositados nos poços 910 µl de água e 100 µl da suspensão contendo em média 100 ovos. As placas foram incubadas por 24 horas a 27 °C em estufa B.O.D (BiochemicalOxygenDemand, Tecnal®, TE 391). Os ovos e larvas, em cada tratamento, foram quantificados em microscópio invertido (Optiphase®).

Análise Estatística

O percentual de eclodibilidade foi calculado com a seguinte fórmula proposta por Coles et al, 2006: $[(\text{número de larvas} / (\text{número de ovos} + \text{larvas}) \times 100)]$ e foi expresso em porcentagem, sendo utilizado os valores de cada triplicata. A eclodibilidade larval em água foi considerada acima de 85% (Coles et al, 2006), caso a eclodibilidade fosse menor, o tratamento era excluído do estudo.

Para avaliar a viabilidade dos ovos, foi calculada a porcentagem de ovos larvados em cada forma de armazenamento em cada repetição para cada espécie animal.

A susceptibilidade ao tiabendazole foi analisada através de curvas sigmóides de regressão não linear da relação dose x resposta do tiabendazole em 10 diferentes concentrações. Através da curva foi estimada a CE50 (Concentração efetiva de 50%), a partir da equação $Y = 100 / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{HillSlope}))}$ em que $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{HillSlope}))}$, respectivamente, onde: X= logaritmo da concentração, Y= percentual de eficácia, Bottom= eficácia mínima, Top= eficácia máxima e HillSlope = fator de inclinação da curva dose-resposta. As concentrações foram transformadas em log X. Após estimar a CE50 e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%), foram comparados os IC 95% dos grupos para averiguar se existia sobreposição entre os mesmos. Foi realizado um teste de correlação de Pearson ($\alpha = 0.05$) para

avaliar a relação entre a porcentagem de *Haemonchus* sp. e a porcentagem de eclodibilidade no controle negativo.

Primeiramente foram comparados os IC95% das repetições dentro do mesmo tratamento e depois com o teste padrão. Estas análises estatísticas foram realizadas empregando o programa estatístico GraphPadPrism®. Version 5.01.

Resultados e Discussão

A temperatura ambiente nas três repetições de testes com fezes de bovinos foi em média de 23°C, sendo que a menor temperatura observada foi 20°C e a maior 27°C. A temperatura em geladeira variou entre 9 e 15°C. A temperatura ambiente ficou próxima do ideal para desenvolvimento (25°C) (Ciordia & Bizzell, 1963). Nos testes com fezes de equinos a temperatura ambiente média foi 22°C, variando entre 18 e 30°C e a temperatura das amostras refrigeradas foi a mesma observada para bovinos. A temperatura ambiente variou próximo da ideal para desenvolvimento das espécies de parasitas de equinos (25-33°C) e a da geladeira não atingiu a mínima para o desenvolvimento (5°C) (Ogbourne, 1972).

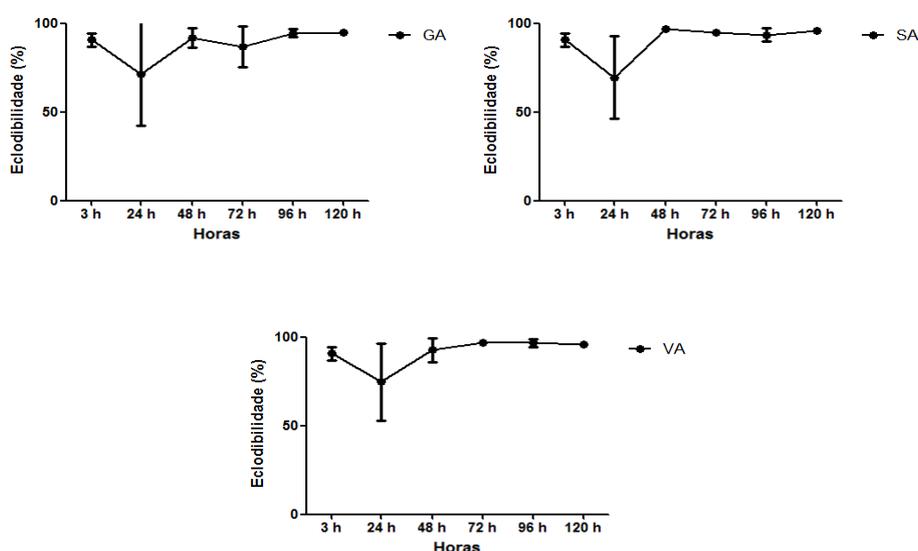
Nenhuma forma de armazenamento utilizada no presente estudo com amostras de fezes de bovinos apresentou ovos larvados ou larvas no momento de avaliação da viabilidade dos ovos, demonstrando que os processos de armazenamento utilizados não permitiram o desenvolvimento dos ovos dos gêneros de parasitas de bovinos antes do início do teste.

Foram utilizadas amostras de campo naturalmente adquiridas de bovinos, compostas principalmente por *Cooperia* sp. e *Haemonchus* sp.. Segundo Calvete et al, (2014), em isolados que apresentam entre 1 a 30% de *Haemonchus* sp. podem ocorrer queda na eclodibilidade larval em relação a isolados puros de *Cooperia* sp.. No entanto, no presente estudo ocorreu variação de 4 a 21% na intensidade de *Haemonchus* sp. nas repetições e não foi observada correlação significativa entre intensidade de *Haemonchus* sp. e eclodibilidade larval do controle negativo, exceto, para as amostras armazenadas por 24 horas ($r=0.57$; $p\text{-value}= 0.0068$), na qual a correlação foi positiva e significativa, dessa forma, o resultado do presente estudo não corrobora com Calvete et al, (2014). As amostras armazenadas por 48 horas ($r=-0.016$; $p\text{-value}= 0.94$), 72 horas ($r=0.28$; $p\text{-value}= 0.21$), 96 horas ($r=-0.15$; $p\text{-value}= 0.50$) e 120 horas ($r=-0.36$; $p\text{-value}= 0.17$) não apresentaram correlação significativa. Desse modo, a presença de mais de um gênero nas amostras avaliadas não interferiu nos resultados de eclodibilidade do estudo.

A eclodibilidade do controle negativo do grupo teste padrão (TP) em amostras de bovinos foi em média 90,66% (Tabela 2), considerada aceitável para o teste (Coles et al., 2006). Os grupos que foram armazenados por 24 horas (GR1, SR1, GA1, SA1,VA1) apresentaram eclodibilidades abaixo de 85% e foram excluídos do estudo, sendo esse horário de avaliação o que apresentou mais tratamentos com eclodibilidades baixas, principalmente os tratamentos armazenados em temperatura ambiente (GA,VA e SA) (Fig. 1). Nos grupos com armazenamento por 48 horas, os grupos VR1, SR1 e VA3 foram excluídos por apresentarem eclodibilidades abaixo de 85%. Os grupos que apresentaram eclodibilidades superiores a 85 %

foram os armazenados por 72 horas (GR3, GA3, VA3,VR3, SA3 e SR3) e por 96 horas (GR4,GA4,VA4,VR4,SA4 e SR4). Os grupos SR5 e VR5 armazenados por 120 horas também foram excluídos por apresentarem eclodibilidades inaceitáveis para o teste. Na primeira repetição do estudo, as formas de armazenamento por 120 horas, (GR5,GA5,VR5,VA5,SR5 e SA5) foram excluídas, por apresentarem baixas eclodibilidades no grupo controle e valores de R^2 baixo, não sendo possível calcular a CE50 (Tabela 3). A baixa eclodibilidade em amostras armazenadas por 120 horas pode ser explicada pela fermentação que pode ocorrer no meio e essa fermentação excessiva é tóxica para os ovos, impedindo a posterior eclosão das larvas (Veglia, 1915).

Figura 1. Eclodibilidade larval do controle negativo (água) para os diferentes horários de realização do teste, de amostras de bovinos armazenadas em temperatura ambiente.



GA: amostras armazenadas em garrafa em anaerobiose e mantidas em temperatura ambiente; SA: amostras armazenadas em saco plástico amarrado e retirado o ar manualmente e mantidas em temperatura ambiente; VA: amostras armazenadas sob vácuo e mantidas em temperatura ambiente.

As amostras que permaneceram em vácuo em temperatura ambiente foram eficientes e garantiram eclodibilidades acima de 85%. Dados que corroboram com a literatura, visto que o armazenamento em vácuo permite o desenvolvimento das larvas de *Cooperia* sp. mesmo após 96 horas de armazenamento (Sengupta et al., 2016). Em outros estudos a condição de vácuo proporcionou interrupção do embrionamento inicial, sem impedir a eclosão dos ovos depois do armazenamento, assim como a refrigeração por 21 dias (Rinaldi et al., 2011).

As amostras refrigeradas por 72 e 96 horas, também apresentaram eclodibilidade aceitável. Sengupta et al (2016) avaliaram a melhor forma para desenvolvimento das larvas de *Cooperia* sp. e a temperatura ambiente foi melhor que a refrigeração, porém, nesse estudo a temperatura utilizada para refrigeração foi 5°C, temperatura considerada fatal para desenvolvimento dessa espécie (Ciordia & Bezzel, 1963).

A CE50 média do grupo padrão (G1) foi 0.014 µg/l (IC95%: 0.012-0.016), não apresentando eclosão na concentração de 0.1µg/l, valor indicado como dose discriminante para o teste de eclodibilidade larval

(Whitlock, 1980), em nenhuma das repetições. Os grupos armazenados por 96 horas, principalmente as amostras em vácuo e garrafa em anaerobiose (GA4, VA4, VR4) apresentaram CE50 iguais ao grupo padrão e entre as repetições para a mesma forma de armazenamento (Tabela 3). A anaerobiose não interferiu na eclodibilidade do controle negativo e também permitiu a eclosão dos ovos nas diferentes concentrações de tiabendazole, dessa forma não permite resultados de falsa resistência.

Apesar dos grupos serem diferente estatisticamente do grupo teste padrão (TP), a maioria das formas de armazenamento não apresentaram eclodibilidade na concentração de 0.1 µg/l, sendo classificado como isolado sensível, mesmo aumentando a CE50. No entanto, a utilização da dose discriminante pode ser questionável. Isolados com CE50 baixas podem apresentar larvas na concentração de 0.1 µg/l e manter a classificação de sensíveis. Além disso, não há uma quantidade aceitável de larvas nessa concentração. Calvete et al, (2014) padronizaram a utilização de dose discriminante para ovinos, para viabilizar a utilização do teste, no entanto, os autores sugerem que essa dose deve ser padronizada para cada laboratório e para cada isolado testado. Apesar da utilização da dose discriminante ser questionável, no presente estudo foi a melhor forma de avaliar a resistência, visto que como foi utilizado um isolado sabidamente sensível, essa forma de avaliação acertou mais em relação a utilização da CE50 (Tabela 3).

O horário de avaliação de 96 horas foi o que apresentou melhor concordância entre CE50 e dose discriminante, ambas apresentaram resultados que classificavam o isolado como sensível. A utilização da anaerobiose apresenta efeito quando as amostras de fezes de bovinos não estão em condição de refrigeração.

Tabela 2. Percentual médio de eclodibilidade do controle negativo no teste de eclodibilidade larval realizado com ovos de nematodas de bovinos em diferentes métodos de armazenamentos, em diferentes horas da realização do teste.

Grupo	Repetição	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
GR	1	71.49%	95.47%	91.60%	95.06%	-
SR	1	70.30%	96.67%	94.83%	94.81%	-
VR	1	92.98%	16.10%	94.50%	91.42%	-
GA	1	38.99%	94.71%	73.38%	96.90%	-
AS	1	59.34%	98.54%	95.30%	89.18%	-
VA	1	52.70%	96.65%	97.53%	96.10%	-
3 horas 1: 92,31%						
GR	2	96.23%	96.28%	94.31%	94.01%	90.05%
SR	2	94.52%	93.60%	97.35%	95.96%	95.85%
VR	2	96.89%	84.17%	92.95%	97.71%	88.31%
GA	2	79.72%	85.55%	93.60%	93.47%	94.26%
AS	2	52.88%	95.49%	95.17%	94.61%	96.09%
VA	2	75.31%	96.60%	97.09%	99.02%	97.14%

3 horas 2 : 86.49%						
GR	3	83.73%	81.50%	94.42%	89.52%	92.06%
SR	3	88.02%	64.59%	97.27%	93.84%	1.91%
VR	3	95.77%	76.17%	96.88%	87.31%	28.18%
GA	3	95.65%	95.02%	92.97%	93.35%	95.45%
AS	3	96.09%	96.10%	94.27%	96.30%	95.57%
VA	3	96.08%	84.55%	95.71%	94.83%	94.94%

3 horas 3: 93.18%

GR: amostras armazenadas em garrafa em anaerobiose e refrigeradas em geladeira; GA: amostras armazenadas em garrafa em anaerobiose e mantidas em temperatura ambiente; SR: amostras armazenadas em saco plástico amarrado e retirado o ar manualmente e mantidas sob refrigeração em geladeira; SA: amostras armazenadas em saco plástico amarrado e retirado o ar manualmente e mantidas em temperatura ambiente; VR: amostras armazenadas sob vácuo e mantidas sob refrigeração; VA: amostras armazenadas sob vácuo e mantidas em temperatura ambiente.

Tabela 3. Concentração efetiva média (CE50) para o tiabendazole e seu intervalo de confiança (IC95%) em diferentes formas de armazenamento das fezes de bovinos em diferentes horários para o teste de eclodibilidade larval, suas repetições e *status* de resistência.

Tratamento	Repetição		3 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
GR	1	CE50 (IC95%)	0.012 (0.011-0.014)	-	0.017 (0.016-0.018)	0.018 (0.016-0.019)	0.015 (0.013-0.016)	-
			Aa (S)		Db (R)	Ab (R)	Aab (S)	
		ECLO D.D	0% (S)	-	0% (S)	0% (S)	0% (S)	-
	2	CE50 (IC95%)	0.016 (0.013-0.019)	0.016 (0.013-0.020)	0.003 (0.002-0.003)	0.041 (0.039-0.044)	0.015 (0.014-0.016)	0.014 (0.013-0.015)
			Aa (S)	Aba (S)	Ab (S)*	Cc (R)	Aa (S)	Aca (S)
		ECLO D.D	0% (S)	0% (S)	0% (S)	1.66% (R)	0% (S)	0% (S)
	3	CE50(IC95%)	0.015 (0.014-0.016)	-	-	-	0.014 (0.010-0.022)	0.017 (0.015-0.018)
			Aa (S)				Aba (S)	Aa (S)
		ECLO D.D	0% (S)	-	-	-	0% (S)	0% (S)
SR	1	CE50 (IC95%)	0.012 (0.011-0.014)	-	0.006 (0.005-0.007)	0.016 (0.015-0.017)	-	-
			Aa (S)		Bb (S)*	Abc (R)		
		ECLO D.D	0% (S)	-	0% (S)	0% (S)	-	-
	2	CE50 (IC95%)	0.016 (0.013-0.019)	0.019 (0.017-0.020)	0.012 (0.009-0.015)	-	0.015 (0.014-0.016)	0.017 (0.015-0.019)
			Aab (S)	BCb (S)	Ca (S)		Aa (S)	Aa (S)
		ECLO D.D	0% (S)	0% (S)	0% (S)	-	0% (S)	0% (S)
	3	CE50 (IC95%)	0.015 (0.014-0.016)	0.014 (0.012-0.016)	-	0.014 (0.013-0.015)	0.015 (0.012-0.018)	-
			Aa (S)	Aa (S)			Aba (S)	

						Ba (S)		
		ECLO D.D	0% (S)	0% (S)	-	0% (S)	0% (S)	-
VR	1	CE50 (IC95%)	0.012 (0.011-0.014)	0.016 (0.015-0.017)	-	0.014 (0.013-0.016)	0.014 (0.013-0.015)	-
			Aa (S)	ABb (R)			Aab (S)	
						ABab (S)		
		ECLO D.D	0% (S)	-				
	2	CE50 (IC95%)	0.016 (0.013-0.019)	0.013 (0.011-0.016)	-	0.036 (0.034-0.038)	0.016 (0.015-0.017)	0.014 (0.013-0.016)
			Aa (S)	Aa (S)			Aa (S)	
						Db (R)		Aca (S)
		ECLO D.D	0% (S)	0% (S)	-	2.53% (R)	0% (S)	0% (S)
	3	CE50 (IC95%)	0.015 (0.014-0.016)	0.017 (0.015-0.018)	-	0.013 (0.012-0.015)	0.018 (0.015-0.022)	-
			Aa (S)	Aba (S)			Aa (S)	
						Ba (S)		
		ECLO D.D	0% (S)	0% (S)	-	0% (S)	0% (S)	-
GA	1	CE50 (IC95%)	0.012 (0.011-0.014)	-	-	-	0.012 (0.010-0.016)	-
			Aa (S)				Aba (S)	
		ECLO D.D	0% (S)	-	-	-	0% (S)	-
	2	CE50 (IC95%)	0.016 (0.013-0.019)	-	0.017 (0.016-0.018)	0.049 (0.044-0.054)	0.016 (0.015-0.017)	0.016 (0.015-0.017)
			Aa (S)		Da (S)	Cb (R)	Aa (S)	Aa (S)
		ECLO D.D	0% (S)	-	0% (S)	0% (S)	0% (S)	0% (S)
	3	CE50 (IC95%)	0.015 (0.014-0.016)	0.026 (0.024-0.028)	0.025 (0.021-0.030)	0.014 (0.011-0.017)	0.019 (0.016-0.023)	0.009 (0.009-0.010)
			Aa (S)	Dc (R)	Ec (R)	Aba (S)	Aa (S)	Bb (S)*
		ECLO D.D	0% (S)	0% (S)	0.47% (R)	0% (S)	0% (S)	1.10% (R)
SA	1	CE50 (IC95%)	0.012 (0.011-0.014)	-	0.017 (0.016-	0.012 (0.012-	0.010 (0.009-0.012)	-

		Aa (S)		0.018)	0.013)	Ba (S)	
				Db (R)	Ba (S)		
		ECLO D.D	0% (S)	-	0% (S)	0% (S)	-
	2	CE50 (IC95%)	0.016 (0.013-0.019)	-	-	0.046 (0.042-0.050)	0.016 (0.015-0.018)
			Aa (S)			Cb (R)	Aa (S)
							Aca (S)
		ECLO D.D	0% (S)	-	-	2.38% (R)	0% (S)
	3	CE50 (IC95%)	0.015 (0.014-0.016)	0.020 (0.019-0.022)	0.036 (0.031-0.041)	0.014 (0.013-0.016)	0.018 (0.017-0.021)
			Aa (S)	Cc (R)	Fd (R)	Aba (S)	Ac (R)
							Cb (S)*
		ECLO D.D	0% (S)	0% (S)	7.08% (R)	0% (S)	0.60% (R)
VA	1	CE50 (IC95%)	0.012 (0.011-0.014)	-	0.018 (0.017-0.019)	0.011 (0.010-0.011)	0.013 (0.012-0.013)
			Aab (S)		Dc (R)	Eb (S)	Aba (S)
		ECLO D.D	0% (S)	-	0% (S)	0% (S)	0% (S)
	2	CE50 (IC95%)	0.016 (0.013-0.019)	-	-	0.041 (0.038-0.045)	0.017 (0.016-0.017)
			Aa (S)			Cb (R)	Aa (S)
							Aa (S)
		ECLO D.D	0% (S)	-	-	1.43% (R)	0% (S)
	3	CE50 (IC95%)	0.015 (0.014-0.016)	0.024 (0.023-0.025)	-	0.016 (0.015-0.016)	0.017 (0.016-0.018)
			Aa (S)	Db (R)		Aba (S)	Aa (S)
		ECLO D.D	0% (S)	0% (S)	-	0% (S)	0% (S)

Médias seguidas de mesma letra minúscula na mesma linha não apresentam diferenças estatísticas entre si e médias seguidas de mesma letra maiúscula na mesma coluna não apresentam diferenças estatísticas entre si. GR: amostras armazenadas em garrafa em anaerobiose e refrigeradas em geladeira; GA: amostras armazenadas em garrafa em anaerobiose e mantidas em

temperatura ambiente; SR: amostras armazenadas em saco plástico amarrado e retirado o ar manualmente e mantidas sob refrigeração em geladeira; SA: amostras armazenadas em saco plástico amarrado e retirado o ar manualmente e mantidas em temperatura ambiente; VR: amostras armazenadas sob vácuo e mantidas sob refrigeração; VA: amostras armazenadas sob vácuo e mantidas em temperatura ambiente; S: Sensível; R: Resistente; * diferente do teste padrão.

O desenvolvimento larval das espécies de parasitas de equinos foi rápido, e foram observados ovos larvados em todas as formas de armazenamentos das amostras de fezes de equinos, exceto nas amostras armazenadas por 24 horas. Com 48 horas 3,66 % dos ovos quantificados apresentavam algum grau de desenvolvimento larval, 72 horas foram observadas 4,15% de ovos em desenvolvimento, 96 horas foram observados 1,94% de ovos em desenvolvimento e com 120 horas apenas 0,06% de ovos larvados. Dessa forma as espécies de parasitas de equinos apresentaram desenvolvimento rápido e nenhuma forma de armazenado após 24 horas impediu esse desenvolvimento.

A eclodibilidade do controle negativo do grupo teste padrão (TP) em amostras de equinos foi em média 87,66% (Tabela 4), sendo considerada aceitável por Coles et al, (2006). As amostras de fezes armazenadas por 72 horas foram as que apresentaram mais formas de armazenamento com eclodibilidades acima de 85% (GR3, SR3, GA3, VR3, SA3, VA3) (Tabela 4). A garrafa em anaerobiose e em temperatura refrigerada foi a forma de armazenamento que manteve as eclodibilidades acima de 85% em todos os horários de avaliação do teste, exceto o grupo GR2 armazenado por 48 horas. Esses dados são diferentes dos observados por Sengupta et al, (2016), no qual as amostras foram armazenadas em vácuo por 96 horas e apresentaram eclodibilidades satisfatórias para a realização da coprocultura. O pico de desenvolvimento ocorre com 72 horas e após esse período ocorre uma redução na eclodibilidade, podendo ser explicada pelo desenvolvimento das larvas e deposição de compostos do desenvolvimento, o que pode interferir na posterior eclosão das larvas (Le Jambre, 1976).

Os testes com amostras de equinos apresentaram CEs50 diferentes entre as repetições (Tabela 5). A última repetição apresentou resultados de CE50 maiores, esse fato também pode ser explicado pelo desenvolvimento acelerado nessa espécie de parasitas (Tabela 5), com o desenvolvimento das larvas dentro dos ovos, a ação do tiabendazole é reduzida e dessa forma a CE50 apresenta valores maiores (Le Jambre, 1976).

Tabela 4. Percentual médio de eclodibilidade do controle negativo no teste de eclodibilidade larval realizado com ovos de nematodas de equinos em diferentes métodos de armazenamentos, em diferentes horas da realização do teste.

Grupo	Repetição	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
GR	1	87.44%	94.94%	96.59%	88.27%	87.60%
SR	1	84.15%	81.91%	87.88%	74.10%	82.14%
VR	1	83.81%	76.64%	54.89%	71.27%	79.72%
GA	1	93.52%	62.04%	87.95%	65.25%	80.63%
SA	1	86.89%	78%	82.66%	74.20%	68.60%
VA	1	47.94%	87.50%	82.93%	71.92%	77.90%
3 horas 1: 90.26%						
GR	2	97.06%	75%	95.79%	97.44%	96.44%
SR	2	83.45%	90.71%	94.35%	91.27%	87.56%
VR	2	97.30%	78.19%	97.33%	86.96%	90.26%
GA	2	85.05%	90.32%	91.80%	88.83%	72.76%
SA	2	83.92%	78.23%	90.87%	83.33%	70.38%
VA	2	79.15%	93.92%	94.67%	76.12%	71.52%
3 horas 2: 85.23%						
GR	3	86.67%	95%	96.20%	92.04%	98.21%
SR	3	95.81%	80.63%	81.32%	83.17%	92.05%
VR	3	91.30%	91.43%	95.92%	91.92%	96.27%
GA	3	98.35%	88.89%	80.88%	80.15%	77.06%
AS	3	96.09%	86.17%	92.79%	81%	82.29%
VA	3	94.26%	91.24%	78.76%	76%	80.75%
3 horas 3: 87.50%						

GR: amostras armazenadas em garrafa em anaerobiose e refrigeradas em geladeira; GA: amostras armazenadas em garrafa em anaerobiose e mantidas em temperatura ambiente; SR: amostras armazenadas em saco plástico amarrado e retirado o ar manualmente e mantidas sob refrigeração em geladeira; SA: amostras armazenadas em saco plástico amarrado e retirado o ar manualmente e mantidas em temperatura ambiente; VA: amostras armazenadas sob vácuo e mantidas sob refrigeração; VR: amostras armazenadas sob vácuo e mantidas em temperatura ambiente.

Tabela 5. Concentração efetiva média (CE50) para o tiabendazole e seu intervalo de confiança (IC95%) nas diferentes formas de armazenamento das fezes de equinos em diferentes horários para o teste de eclodibilidade larval, suas repetições e o *status* de resistência.

Tratamento	Repetição		3 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
GR	1	EC50 (IC95%)	0.015 (0.013-0.018)	0.013 (0.012-0.014)	0.011 (0.009-0.012)	0.008 (0.007-0.009)	0.012 (0.011-0.014)	0.007 (0.006-0.007)
		Aa (S)		AEac (S)	ADc (S)*	Abc (S)*	Aa (S)	Ab (S)*
		ECLO D.D	2.55% (R)	0% (S)	0% (S)	2.42% (R)	0.86% (R)	0% (S)
	2	EC50 (IC95%)	0.015 (0.013-0.017)	0.015 (0.013-0.016)	-	0.019 (0.017-0.020)	0.016 (0.014-0.018)	0.014 (0.013-0.016)
		Aab (S)		Aba (S)		Bb (R)	Aca (S)	Ba (S)
		ECLO D.D	0.37% (R)	0% (S)	-	0.46% (R)	1.08% (R)	0.61% (R)
	3	EC50 (IC95%)	0.009 (0.008-0.011)	0.020 (0.018-0.023)	0.021 (0.018-0.025)	0.019 (0.016-0.023)	0.029 (0.027-0.031)	0.021 (0.019-0.022)
		Ba (S)		Cb (R)	BCb (R)	BCb (R)	Bc (R)	Cb (R)
		ECLO D.D	0.96% (R)	2.47% (R)	0.40% (R)	0.44% (R)	6.67% (R)	0.42% (R)
SR	1	EC50 (IC95%)	0.015 (0.013-0.018)	-	-	0.014 (0.013-0.016)	-	-
		Aa (S)				CDa (S)		
		ECLO D.D	2.55% (R)	-	-	1.34% (R)	-	-
	2	EC50 (IC95%)	0.015 (0.013-0.017)	-	0.008 (0.006-0.009)	0.019 (0.017-0.020)	0.015 (0.014-0.016)	0.012 (0.011-0.014)
		Aab (S)			Dc (R)	Bb (S)	Aca (S)	Ba (S)
		ECLO D.D	0.37% (R)	-	0% (S)	0.41% (R)	1.83% (R)	0% (S)
	3	EC50 (IC95%)	0.009 (0.008-0.011)	0.016 (0.015-0.018)	-	-	-	0.021 (0.018-0.023)
		Ba (S)		BFb (R)				Cb (R)

		ECLO D.D	0.96% (R)	2.40% (R)	-	-	-	4.04% (R)
VR	1	EC50 (IC95%)	0.015 (0.013-0.018)	-	-	-	-	-
		A						
		ECLO D.D	2.55% (R)	-	-	-	-	-
	2	EC50 (IC95%)	0.015 (0.013-0.017)	0.015 (0.014-0.016)	-	0.022 (0.020-0.024)	0.016 (0.014-0.019)	0.018 (0.017-0.020)
		Aac (S)		Abc (S)		BEb (R)	ACac (S)	Cab (S)
		ECLO D.D	0.37% (R)	0.78% (R)	-	2.19% (R)	0.47% (R)	3.29% (R)
	3	EC50 (IC95%)	0.009 (0.008-0.011)	0.017 (0.016-0.019)	0.015 (0.015-0.018)	0.019 (0.017-0.022)	0.027 (0.023-0.032)	0.026 (0.024-0.029)
		Ba (S)		BCc (R)	CEc (R)	Bc (R)	Bb (R)	Db (R)
		ECLO D.D	0.96% (R)	1.34% (R)	2.22% (R)	2.30% (R)	4.63% (R)	15.74% (R)
GA	1	EC50 (IC95%)	0.015 (0.013-0.018)	0.010 (0.009-0.011)	-	0.008 (0.007-0.009)	-	-
		Aa (S)		DEb (S)*		Ab (S)*		
		ECLO D.D	2.55% (R)	1.24% (R)	-	0.38% (R)	-	-
	2	EC50 (IC95%)	0.015 (0.013-0.017)	0.011 (0.011-0.012)	0.023 (0.020-0.026)	0.012 (0.011-0.014)	0.014 (0.012-0.016)	-
		Aa (S)		Ec (S)*	Bb (R)	Dac (S)	Cac (S)	
		ECLO D.D	0.37% (R)	0% (S)	0.49% (R)	0.93% (R)	0% (S)	-
	3	EC50 (IC95%)	0.009 (0.008-0.011)	0.017 (0.016-0.019)	0.011 (0.011-0.012)	-	-	-
		Ba (S)		BCb (R)	Aa (S)			
		ECLO D.D	0.96% (R)	0.93% (R)	0% (S)	-	-	-
SA	1	EC50 (IC95%)	0.015 (0.013-0.018)	0.014 (0.013-0.015)	-	-	-	-
		Aa (S)		AFa (S)				

		ECLO D.D	2.55% (R)	1.61% (R)	-	-	-	-
	2	EC50 (IC95%)	0.015 (0.013-0.017)	-	-	0.014 (0.013-0.016)	-	-
			Aa (S)			CDa (S)		
		ECLO D.D	0.37% (R)	-	-	0.44% (R)	-	-
	3	EC50 (IC95%)	0.009 (0.008-0.011)	0.032 (0.027-0.037)	0.020 (0.017-0.023)	0.029 (0.024-0.033)	-	-
			Ba (S)	Gd (R)	BCc (R)	Eb (R)		
		ECLO D.D	0.96% (R)	8.65% (R)	3.43% (R)	4.05% (R)	-	-
VA	1	EC50 (IC95%)	0.015 (0.013-0.018)	-	0.013 (0.012-0.016)	-	-	-
			Aa (S)		AEa (S)			
		ECLO D.D	2.55% (R)	-	0.90% (R)	-	-	-
	2	EC50 (IC95%)	0.015 (0.013-0.017)	-	0.016 (0.015-0.017)	0.015 (0.014-0.017)	-	-
			Aa (S)		AEa (S)	BCDa (S)		
		ECLO D.D	0.37% (R)	-	0.39% (R)	0% (S)	-	-
	3	EC50 (IC95%)	0.009 (0.008-0.011)	0.032 (0.030-0.035)	0.024 (0.020-0.029)	-	-	-
			Ba (S)	Gc (R)	Bb (R)			
		ECLO D.D	0.96% (R)	4.62% (R)	3.81% (R)	-	-	-

Médias seguidas de mesma letra minúscula na mesma linha não apresentam diferenças estatísticas entre si e médias seguidas de mesma letra maiúscula na mesma coluna não apresentam diferenças estatísticas entre si. GR: amostras armazenadas em garrafa em anaerobiose e refrigeradas em geladeira; GA: amostras armazenadas em garrafa em anaerobiose e mantidas em temperatura ambiente; SR: amostras armazenadas em saco plástico amarrado e retirado o ar manualmente e mantidas sob refrigeração em geladeira; SA: amostras armazenadas em saco plástico amarrado e retirado o ar manualmente e mantidas em temperatura ambiente; VA: amostras armazenadas sob vácuo e mantidas sob refrigeração; VR: amostras armazenadas sob vácuo e mantidas em temperatura ambiente; S: sensível; R: Resistente; * diferente do teste padrão.

Apesar da técnica de anaerobiose em garrafa ser indicada por Coles et al, (2006), não existem estudos que avaliaram como essa forma de armazenamento pode influenciar na eclodibilidade e na ação do tiabendazole conforme ocorre o desenvolvimento dos ovos. Por ser uma técnica indicada, ela foi utilizada com a intenção de prolongar o período de armazenamento para avaliar a resistência aos benzimidazóis, não sendo citado, em nenhum dos relatos avaliações sobre essa técnica (Ihler, 1996; Whitlock et al., 1980). Porém, no presente estudo, quando essas diferentes técnicas de anaerobiose foram testadas, nenhuma delas, incluindo a GA, apresentou resultados favoráveis e não são indicadas para o armazenamento das fezes de equinos, visando o teste de eclodibilidade larval.

Amostras em meio anaeróbico armazenadas na garrafa por 24 horas foram utilizadas para levantamento da resistência por meio de teste de eclodibilidade larval e foi observada alta frequência de resistência nas populações (Ihler, 1996). Mesmo que os relatos de resistências em Cistotomíneos aos benzimidazóis sejam frequentes, essa forma de armazenamento, no presente estudo, não apresentou repetições iguais, podendo apresentar resultados de falsa resistência.

Como existem 51 espécies de Cistotomíneos, é difícil avaliar como cada espécie pode influenciar no teste de eclodibilidade larval, se existe diferença de desenvolvimento entre as espécies e a proporção de resistência de cada espécie (Smith-Beejs & Borgsteede, 1986), no entanto, com o presente estudo foi possível definir que independente da espécie de parasita presente na amostra, o desenvolvimento dos parasitas de equinos é mais rápido e esse fator influencia no resultado do teste.

Conclui-se que as amostras de fezes de bovinos podem ser armazenadas de 48 a 96 horas, as amostras armazenadas em anaerobiose não precisam ser armazenadas refrigeradas para realização do teste, mostrando que a anaerobiose não interfere na eclodibilidade do controle negativo e não reduz a sensibilidade dos ovos ao tiabendazole. No entanto as amostras que não estão em anaerobiose, se refrigeradas também apresentam resultados satisfatórios para a realização do teste, dessa forma o método de armazenamento para processamento da técnica facilita o diagnóstico da resistência aos benzimidazóis em nematodas de bovinos, podendo ser utilizada a forma de armazenamento amostras em saco sob refrigeração, o que facilita a utilização da técnica. Para as amostras de fezes de equinos nenhuma forma de armazenamento avaliado no presente estudo pode ser indicada, por apresentar grande variação entre as repetições, não manter a eclodibilidade do controle negativo e reduzir a sensibilidade dos ovos ao tiabendazole, podendo gerar resultados de falsa resistência. Dessa forma deve seguir as recomendações de realização do teste em até 3 horas após a coleta das fezes deste hospedeiro.

Referências bibliográficas

Bizimenyera ES, Githiori JB, Eloff JN, Swan GE. In vitro activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology* 2006; 142: 336–343.

- Calvete C, Ferrer LM, Lacasta D, Calavia L, Ramos JJ, Ruiz-de-Arkaute M, et al. Variability of the egg hatch assay to survey benzimidazole resistance in nematodes of small ruminants under field conditions. *Veterinary Parasitology* 2014; 203: 102–113.
- Candy PM, Waghorn TS, Miller CM, Ganesh S, Leathwick DM. The effect on liveweight gain of using anthelmintics with incomplete efficacy against resistant *Cooperia oncophora* in cattle. *Veterinary Parasitology* 2018; 251: 56–62.
- Ciordia H, Bizzell WE. The effects of various constant temperatures on the development of the free living-stages of some nematode parasites of cattle. *The Journal of Parasitology* 1963; 49: 60-63.
- Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, Von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology* 2006; 44: 35-44.
- Demeler J, Küttler U, von Samson-Himmelstjerna G. Adaptation and evaluation of three different in vitro tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle. *Veterinary Parasitology* 2010; 170: 61–70.
- Feliz DC. Resistência a anti-helmínticos em nematodas gastrintestinais de bovinos de corte, no Mato Grosso do Sul, Brasil [Dissertação]. Mato Grosso do Sul: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2011.
- Gennari SM, Vieira Bressan MCR, Rogero JR, MacLean JM, Duncan JL. Pathophysiology of *Haemonchus placei* infection in calves. *Veterinary Parasitology* 1991; 38:163-172.
- Gordon HM, Whitlock HVA. New technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Jornal of Council of Science and Industry Research* 1939;12:50-52.
- Hunt KR, Taylor MA. Use of the egg hatch assay on sheep faecal samples for the detection of benzimidazole resistant nematodes. *Veterinary Record* 1989; 125: 153–154.
- Ihler CF, Bjorn H. Use of two in vitro methods for the detection of benzimidazole resistance in equine small strongyles (*Cyathostoma* spp.). *Veterinary Parasitology* 1996; 65: 117-125.
- Kumar S, Rajat G, Kumar S, Barrerjee PS, Ram H, Prasad A. Benzimidazole resistance in equine cyathostomins in India. *Veterinary Parasitology* 2016; 218:93-97.
- Le Jambre LF. Egg hatch as an in vitro assay of Thiabendazole resistance in nematode. *Veterinary Parasitology* 1976; 2: 385-391.
- Love S, Murphy D, Mellor D. Pathogenicity of cyathostome infection. *Veterinary Parasitology* 1999; 85:113-122.
- Lyons ET, Tolliver SC, Drudge JH. Historical perspective of cyathostomes: prevalence, treatment and control programs. *Veterinary Parasitology* 1999; 85: 97-112.
- Ogbourne CP. Observations on the free-living states of Strongylid nematodes of the horse. *Parasitology* 1972; 64:461-477.

- Rinaldi L, Coles GC, Maurelli MP, Musella V, Cringoli G. Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep. *Veterinary Parasitology* 2011; 177: 345–352.
- Robert FHS, O'sullivan PJ. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research* 1950; 1: 99-102.
- Rossanigo CE, Gruner L. Relative effect of temperature and moisture on the development of strongyle eggs to infective larvae in bovine pats in Argentina. *Veterinary Parasitology* 1994; 55: 317-325.
- Santos TR, Lopes WDZ, Buzulini C, Borges FA, Sakamoto CAM, Lima RCA. Helminth fauna of bovines from the Central-Western region, Minas Gerais State, Brazil. *Ciência Rural* 2010; 40: 934-938.
- Sengupta ME, Thapa S, Thamsborg SM, Mejer H. Effect of vacuum packing and temperature on survival and hatching of strongyle eggs in faecal samples. *Veterinary Parasitology* 2016; 217: 21–24.
- Smith-Buijs CMC, Borgsteede FHM. Effect of cool storage of faecal samples containing *Haemonchus contortus* eggs on the results of an in vitro egg development assay to test for anthelmintic resistance. *Research in Veterinary Science* 1986; 40: 4–7.
- Stromberg BE, Gasbarre LC, Waite A, Bechtol DT, Brown MS, Robinson NA. *Cooperia punctata*: Effect on cattle productivity? *Veterinary Parasitology* 2012; 183: 284–291.
- Suarez VH, Cristel SL. Anthelmintic resistance in cattle nematode in the western Pampeana Region of Argentina. *Veterinary Parasitology* 2007;144: 111–117.
- Ueno H.; Gonçalves PC. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4.ed. JICA, 1998. 166p.
- Veglia, F. The anatomy and life history of the *Haemonchus contortus* (Rud.). 3rd and 4th Rep. Dir. Vet. Res. Onderstepoort, Pretoria, South Africa 1915: 349–500.
- Whitlock HV, Kelly JD, Porter CJ, Griffin DL, Martin ICA. In vitro field screening for anthelmintic resistance in strongyles of sheep and horses. *Veterinary Parasitology* 1980; 7:215-232.



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



RESOLUÇÃO Nº 52 DE 15 DE AGOSTO DE 2017.

A PRESIDENTE DO COLEGIADO DE CURSO DOS CURSOS DE MESTRADO E DOUTORADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no uso de suas atribuições legais, resolve, **ad referendum**:

Aprovar os projetos dos mestrandos referentes à disciplina “Projetos”, a qual foi ofertada no primeiro semestre de 2017, conforme constam na tabela abaixo:

Orientador	Aluno	Título do Projeto
Raquel Soares Juliano	Ernest Schillings Neto	EFEITO DA VACINAÇÃO PARA IBR, BVD E LEPTOSPIROSE BOVINA, SOBRE A TAXA DE PREENHEZ DE NOVILHAS NELORE CRIADAS EM SISTEMA EXTENSIVO
Veronica Jorge Babo Terra	Gabriel Utida Eguchi	ASPECTOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E EPIDEMIOLÓGICOS DA DERMATOFITOSE EM CÃES E GATOS NA CIDADE DE CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO SUL
Alda Izabel de Souza	Gustavo Gomes de Oliveira	METABOLISMO DO CÁLCIO, FÓSFORO E SEUS HORMÔNIOS REGULADORES NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES
Gustavo Guerino Macedo	Jéssica Souza Lima	EFEITOS DA VACINAÇÃO SOBRE A INFECÇÃO POR BOHV-1 QUANTO À VIABILIDADE DE EMBRIÕES PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> E TAXA DE PREENHEZ
Eric Schmidt Rondon	Joyce Maira de Araújo	CRIAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA DOENÇA DE LEGG-CALVÉ-PERTHES
Fernando Arévalo Batista	Luis Guilherme Pereira Guerra	DOSAGEM DOS HORMÔNIOS ANTI-MULLERIANO E TESTOSTERONA EM EQUINOS PORTADORES E NÃO PORTADORES DE CRIPTORQUIDISMO
Fernando de Almeida Borges	Mariana Green de Freitas	MÉTODOS DE ARMAZENAMENTO DE FEZES DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO PARA TESTE DE ECLODIBILIDADE LARVAL



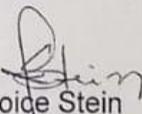
Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Métodos de armazenamento de fezes de animais de produção para teste de eclodibilidade larval", registrada com o nº 914/2017, sob a responsabilidade de **Fernando Almeida Borges** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 10ª reunião ordinária do dia 09/11/2017.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1º/02/2018 a 1º/12/2018
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Bos taurus</i> / Nelore <i>Equus caballus</i> / Pantaneiro <i>Ovis aries</i> / Pantaneiro
Nº de animais	20 20 20
Peso/Idade	200 kg/ 8 meses 400kg / 3 anos 50 kg/ 6 meses
Sexo	Macho / Fêmea
Origem	Fazenda Escola da FAMEZ/UFMS


Joice Stein

Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 09 de novembro de 2017.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.propp@ufms.br
fone (67) 3345-7925