



MANUAL PRÁTICO

**Metodologias de diagnóstico
da resistência e de detecção
de substâncias ativas em
parasitas de ruminantes**

Ana Carolina de Souza Chagas
Simone Cristina Méo Niciura
Marcelo Beltrão Molento
Editores Técnicos

Embrapa

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pecuária Sudeste
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

MANUAL PRÁTICO

Metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes

*Ana Carolina de Souza Chagas
Simone Cristina Méo Niciura
Marcelo Beltrão Molento*

Editores Técnicos

Embrapa Informação Tecnológica
*Brasília, DF
2011*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Informação Tecnológica

Parque Estação Biológica (PqEB), Av. W3 Norte (final)
70770-901 Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4236
Fax: (61) 3448-2494
vendas@sct.embrapa.br
www.embrapa.br/liv

Embrapa Pecuária Sudeste

Rod. Washington Luiz, km 234, Caixa Postal 339
CEP 13560-970 São Carlos, SP
Fone: +55 (16) 3411-5600
Fax: +55 (16) 3361-5754
sac@cppsse.embrapa.br
www.cppsse.embrapa.br

Coordenação editorial

Fernando do Amaral Pereira
Lucilene Maria de Andrade
Juliana Meireles Fortaleza

Supervisão editorial

Wesley José da Rocha

Revisão de texto

Corina Barra Soares

Normalização bibliográfica

Márcia Maria Pereira de Souza

Projeto gráfico e capa

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Fotos da capa (de cima para baixo)

Rodrigo Giglioti
Daniilo de Paula Moreira
Simone Cristina Méo Niciura

1ª edição

1ª impressão (2011): 1.000 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.160).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Informação Tecnológica

Manual Prático : metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes / editores técnicos, Ana Carolina de Souza Chagas, Simone Cristina Méo Niciura, Marcelo Beltrão Molento. – Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 2011.
153 p. : il.

ISBN 978-85-7383-515-1

1. Parasito animal. 2. Nematódeo gastrointestinal. 3. Larvas do carrapato. I. Chagas, Ana Carolina de Souza. II. Niciura, Simone Cristina Méo. III. Molento, Marcelo Beltrão. IV. Embrapa Pecuária Sudeste.

CDD 636.089696

© Embrapa 2011

AUTORES

Ana Carolina de Souza Chagas

Bióloga, Doutora em Ciência Animal, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP
carolina@cnpse.embrapa.br

Daniele Bier

Médica-Veterinária, Mestranda em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR
danielebier@gmail.com

Déborah Araújo Santos Pondelek

Médica-Veterinária, Curitiba, PR
dpondelek@hotmail.com

Fernanda Silva Fortes

Médica-Veterinária, Doutoranda em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR
fortesfs@gmail.com

Marcelo Beltrão Molento

Médico-Veterinário, Doutor em Parasitologia, professor da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR
molento@ufpr.br

Márcia Cristina de Sena Oliveira

Médica-Veterinária, Doutora em Medicina-Veterinária, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP
marcia@cnpse.embrapa.br

Mirta Raquel Castaño Zubieta

Médica-Veterinária, Mestre em Biotecnologia, pesquisadora do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (Inta), Castelar, Argentina
rcastano@cnia.inta.gov.ar

Simone Cristina Méo Niciura

Médica-Veterinária, Doutora em Medicina-Veterinária, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP
simone@cnpse.embrapa.br

APRESENTAÇÃO

O *Manual Prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes* é um produto do trabalho de organização das metodologias fenotípicas e genotípicas aplicadas à parasitologia veterinária, tendo como destaque a detecção de substâncias antiparasitárias e o diagnóstico da resistência de parasitas de ruminantes. As técnicas aqui descritas, que foram desenvolvidas ou modificadas por pesquisadoras da Embrapa Pecuária Sudeste, são utilizadas em projetos de pesquisa. O desenvolvimento das metodologias contou com a parceria da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária da Argentina.

As tecnologias descritas neste manual já foram transferidas para estudantes, extensionistas, técnicos e pesquisadores, brasileiros e estrangeiros, por meio dos seguintes cursos: “Treinamento de técnicas in vitro para avaliação de eficácia de substâncias sobre nematoides gastrintestinais”, ministrado em 2008, 2009 e 2010, pela Embrapa Pecuária Sudeste; “Biotecnologias aplicadas à parasitologia veterinária: resistência em helmintos de ruminantes”, ministrado em 2010 e 2011, pela UFPR, e financiado pelo consórcio entre o Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia (CBAB) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); e “Advances in the knowledge of parasite resistance of ruminant hosts and parasites”, ministrado em 2011, pela Embrapa Pecuária Sudeste, e financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp)/ Escola São Paulo de Ciência Avançada.

Por esta publicação formaliza-se, assim, a difusão de conhecimentos sobre técnicas parasitológicas reconhecidas internacionalmente e validadas pelos padrões nacionais.

Simone Cristina Méo Niciura

Secretária-Executiva do Comitê Local de Publicações e pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste

PREFÁCIO

As doenças parasitárias em animais representam um dos principais fatores de limitação à produção animal e, mesmo recorrendo ao uso, em larga escala, de compostos químicos antiparasitários, a pecuária nacional continua carente de medidas efetivas de controle sanitário. Nos anos 1950, as estratégias de controle sanitário animal indicavam a utilização de produtos químicos apenas como medida preventiva. Entretanto, ao longo dos anos, essa prática foi a única utilizada na eliminação ou na erradicação dos parasitas, com o conseqüente aparecimento de populações resistentes. Essa situação foi se agravando por conta do uso inadequado e abusivo desses produtos, a despeito das tentativas de conscientizar os usuários sobre suas nefastas conseqüências, fartamente comprovadas em artigos técnico-científicos.

Produtores e técnicos do campo continuam à espera de novas substâncias ativas que controlem os parasitas, sem que seu uso racional seja negligenciado. É importante que o monitoramento da resistência dos parasitas aos fármacos seja realizado no propósito de desenvolver estratégias sustentáveis de uso e recomendações de prevenção. O principal objetivo é aumentar a vida útil dos medicamentos antiparasitários, melhorar a produtividade animal e reduzir os níveis de resíduos das drogas no ambiente e nos produtos de origem animal.

As metodologias *in vitro* de cultivo de nematoides gastrintestinais foram desenvolvidas para determinar a eficácia de certas substâncias sobre os parasitas, facultando também a identificação de novos princípios ativos específicos. Tais protocolos dão lugar a várias interpretações, por meio do estudo da ação dos candidatos sobre a eclodibilidade, a motilidade, a alimentação e o desenvolvimento larvar. Os resultados obtidos com os testes fenotípicos também permitem avaliar a situação de resistência detectada no campo, de forma semelhante ao teste de redução da contagem de ovos.

Verifica-se também que novas tecnologias, sob a forma de ferramentas de biologia molecular, podem ser utilizadas, com grande precisão, no diagnóstico de parasitas sensíveis e resistentes. Os protocolos moleculares incluídos neste manual poderão ser associados a ensaios *in vitro*, por meio da genotipagem de larvas no pré e no pós-tratamento e também no cálculo das diferenças da frequência dos alelos de interesse. Atualmente, já é possível detectar a resistência aos benzimidazóis pela avaliação do gene da β -tubulina em nematoides, que, segundo estudos recentes, também está associado à resistência ao levamisole e às lactonas macrocíclicas. Novas sequências estão sendo comprovadas com o objetivo de estabelecer polimorfismos de base única – os chamados SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) –, que permitem que o diagnóstico da resistência possa ser executado como rotina laboratorial. Compreender os mecanismos de resistência aos antiparasitários pode ser útil também em experiências com o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, pois o polimorfismo denominado KDR, que já foi demonstrado em populações brasileiras, está associado à resistência aos piretroides.

Para cooperar com a qualificação de agentes envolvidos nesse tema, principalmente de parasitologistas, algumas técnicas fenotípicas foram validadas e estabelecidas no Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE). Os protocolos apresentam alta reprodutibilidade, e suas metodologias vêm sendo divulgadas em cursos anuais. Várias técnicas moleculares foram validadas no Laboratório de Biotecnologia Animal do CPPSE e no Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR). O Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia tem-se empenhado na divulgação dessas técnicas, por meio de treinamento de pessoal.

As informações contidas neste manual permitirão ao leitor empregar técnicas *in vitro* e moleculares, para monitorar o estado da resistência parasitária. As técnicas básicas de contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e o teste de redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF) para a determinação da resistência e da recuperação de parasitas (ovos, larvas e adultos) foram atualizados e descritos no Capítulo 11 desta publicação, pois estão diretamente relacionados aos protocolos deste manual. O material

preparado é um instrumento fundamental para o treinamento de pessoal em técnicas fenotípicas e genotípicas.

Espera-se que esta iniciativa sirva como ferramenta de transferência de tecnologias para pesquisadores, a qual deverá levar à descoberta de outras substâncias antiparasitárias e ao monitoramento da resistência parasitária, garantindo, assim, a qualidade de vida dos animais no Brasil.

Ana Carolina de Souza Chagas
Pesquisadora da
Embrapa Pecuária Sudeste

Marcelo Beltrão Molento
Professor e pesquisador da
Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

Capítulo 1 Nematoides gastrintestinais	13
Capítulo 2 Metodologias fenotípicas aplicadas à detecção de substâncias antiparasitárias e ao diagnóstico de resistência parasitária em nematoides gastrintestinais	17
Capítulo 3 Protocolos fenotípicos para nematoides gastrintestinais.....	23
Capítulo 4 Metodologias genotípicas aplicadas à detecção de espécies de parasitas e ao diagnóstico de resistência parasitária.....	55
Capítulo 5 Protocolos genotípicos para nematoides gastrintestinais	59
Capítulo 6 Marcadores moleculares SNP: conceitos e aplicações na resistência anti-helmíntica	83
Capítulo 7 Isolamento de RNA total de amostras	93
Capítulo 8 Técnica de rt-PCR.....	97
Capítulo 9 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	103
Capítulo 10 Protocolo para genotipagem por PCR da mutação no gene que codifica a proteína do canal do sódio em larvas do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	105
Capítulo 11 Protocolos básicos de laboratório para a realização de metodologias fenotípicas e genotípicas	117
Referências	145