

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO-
UENF.**

JORDANA ANDRIOLI SALGADO

**NEMATODIOSES GASTROINTESTINAIS DE OVINOS DO RIO DE JANEIRO:
PREVALÊNCIA, DIAGNÓSTICO, RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA E
EXTENSÃO AO CONTROLE.**

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

2016

JORDANA ANDRIOLI SALGADO

**NEMATODIOSES GASTROINTESTINAIS DE OVINOS DO RIO DE JANEIRO:
PREVALÊNCIA, DIAGNÓSTICO, RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA E
EXTENSÃO AO CONTROLE.**

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia, área de concentração Biologia Celular”.

ORIENTADOR: PROF. CLÓVIS DE PAULA SANTOS.

CAMPOS DOS GOYTACAZES/ RJ

2016.

**NEMATODIOSES GASTROINTESTINAIS DE OVINOS DO RIO DE JANEIRO:
PREVALÊNCIA, DIAGNÓSTICO, RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA E
EXTENSÃO AO CONTROLE.**

JORDANA ANDRIOLI SALGADO

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia, área de concentração Biologia Celular”.

APROVADA EM 30 DE SETEMBRO DE 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profª. Isabella Vilhena Freire Martins (Dra. Ciências Veterinárias)-UFES

Profª. Maria Angélica Vieira Costa Pereira (Dra. Parasitologia Veterinária)-UENF

Prof. Renato Augusto DaMatta (Dr. Biociências)-UENF

Prof. Clóvis de Paula Santos (Dr. Parasitologia Veterinária)-UENF (Orientador)

DEDICO: ao meu pai Joel Salgado (In memorian)
pela demonstração de orgulho antes de me ver
conquistar o título.

*¶You call me out upon the waters
The great unknown where feet may fail
And there I find you in the mystery
In oceans deep, my faith will stand

And I will call upon your name
And keep my eyes above the waves
When oceans rise my soul will rest in your embrace
For I am yours and you are mine

Your grace abounds in deepest waters
Your sovereign hand, will be my guide
Where feet may fail and fear surrounds me
You've never failed and you won't start now

So I will call upon your name
And keep my eyes above the waves
When oceans rise, my soul will rest in your embrace
For I am yours and you are mine

Spirit lead me where my trust is without borders
Let me walk upon the waters
Wherever you would call me
Take me deeper than my feet could ever wander
And my faith will be made stronger
In the presence of my savior

I will call upon your name
Keep my eyes above the waves
My soul will rest in your embrace
I am yours and you are mine¶*

Oceans (Where Feet May Fail)
(Matt Crocker, Joel Houston, Salomon Ligthelm)

AGRADECIMENTOS:

A Deus, por me sustentar com sua destra, guiar minhas escolhas e me ensinar a ter paciência confiando no Seu tempo.

À Universidade Estadual Norte Fluminense e à Faperj: pela oportunidade, bolsa de estudo e aprendizado.

Ao prof. Clóvis de Paula Santos: pela orientação e confiança no trabalho.

Ao meu esposo Pedro Henrique Zerek Hespanha: pelo amor, paciência e incentivo.

Aos meus pais: Regina Cruz Andrioli Salgado e Joel Salgado: pela criação, estudo, amor e educação.

A toda minha família: pela compreensão da minha ausência.

Ao Sr. Ricardo Land Lomardo: por acreditar neste projeto e fazer dele realidade. Por sua ajuda e amizade incondicional. Pela grande dedicação e contribuição à ovinocultura.

Aos amigos e colegas de laboratório que contribuíram e alguma forma neste projeto: Letícia Vidal Cruz; Letícia Oliveira da Rocha, Bruna da Silva, Susane Borges, Luana Maximiliano, Josiana Gomes de Andrade, Deivid França, Lara Pereira de Souza, Júlia Resende. Obrigada pela ajuda.

Aos ovinocultores que abriram suas propriedades para que esta pesquisa fosse realizada: pela confiança, disponibilidade e por acreditarem na ovinocultura deste país.

Aos trabalhadores rurais envolvidos nesta pesquisa: por interromperem suas jornadas de trabalho para me ajudar nas coletas; pelo respeito e contribuição imensurável. Pela importância do seu trabalho na agropecuária e produção de alimentos.

A todos os membros das bancas de projeto, qualificação e defesa de tese: Prof. Renato Augusto da Matta; Prof. Francimar Fernandes Gomes, Prof^a. Maria Angélica Vieira da Costa Pereria; Prof. Angelo José Burla Dias e Prof^a. Isabella Vilhena Freire Martins e ao revisor de tese Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira. Pelas importantes contribuições.

Ao pesquisador Bruno Brasil (EMBRAPA): pela colaboração e contribuições que favoreceram as análises moleculares e confecções dos artigos.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), à profa. Denise Aparecida Andrade de Oliveira e a toda equipe do Laboratório de Genética Animal: pela disponibilidade e ajuda;

À colega Livia Loiola dos Santos: pela ajuda na realização das análises moleculares. Pelo aprendizado vivenciado em todo período.

Ao colega Ronaldo Luíz Nunes (UFMG): pela ajuda e colaboração, principalmente na confecção dos géis de poliacrilamida.

Aos professores que colaboraram nas análises estatísticas: Prof. Ricardo Augusto Mendonça Vieira (UENF), Prof. Leonardo Siqueira Glória (UENF) e Prof. Cesar Augusto Taconeli (UFPR).

Às colegas de casa em Campos: Euzilene Mantoanelli; Elisangela Costa Silva e Karine Alvim. Por dividirem um pouco das suas vidas comigo, pela amizade.

A todos os amigos que fiz em Campos: por tornarem esse período mais leve.

Em especial às amigas: Lara Pereira de Souza, Josiana Gomes de Andrade e Letícia Oliveira da Rocha. Pela amizade para toda a vida, parceria, risadas e sonhos compartilhados.

Ao prof. Marcelo Beltrão Molento (UFPR): por ceder seu laboratório para a separação de amostras no período em que estive em Curitiba.

Aos animais que contribuíram para esta pesquisa, o meu respeito e agradecimento.

SUMÁRIO

	PÁG.
1) INTRODUÇÃO GERAL:	17
Referências:	19
2) ARTIGO 1:	
PANORAMA DA RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM PEQUENOS RUMINANTES NO BRASIL	22
Resumo:.....	22
Abstract:.....	22
Introdução:.....	22
Histórico da RAH em pequenos ruminantes no Brasil e no mundo:.....	24
Métodos de diagnóstico de RAH em pequenos ruminantes utilizados no Brasil..	28
Distribuição das pesquisas com RAH no Brasil:.....	31
Evolução das pesquisas e da eficácia dos anti-helmínticos em pequenos ruminantes no Brasil:	37
Conclusão:.....	41
Referências:	42
3) ARTIGO 2:	
CARACTERIZAÇÃO PRODUTIVA DOS OVINOS DO RIO DE JANEIRO E SEU EFEITO NA INFECÇÃO POR NEMATÓIDES GASTROINTESTINAIS	54
Resumo:.....	54
Abstract:.....	54
Introdução:.....	55
Material e Métodos:	56
Resultados:.....	60
Discussão:	67
Conclusão:	69
Referências:.....	69
4) ARTIGO 3:	
RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA MÚLTIPLA EM OVINOS DETECTADA POR MEIO DE ABORDAGEM FENOTÍPICA E GENOTÍPICA INTEGRADA.	74
Resumo.	74
Abstract:.....	74
Introdução:	75
Material e Métodos:	76
Resultados:	79

Discussão:	87
Conclusão:	93
Referências:	93
5) ARTIGO 4:	
DIAGNÓSTICO QUALI-QUANTITATIVO MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE GÊNEROS DE NEMATOIDES GASTROINTESTINAIS DE OVINOS EM “POOLS” DE LARVAS.	101
Resumo:	101
Abstract:	101
Introdução:	102
Material e Métodos:	104
Resultados:	108
Discussão:	111
Conclusão:	113
Referências:	113
6) TRABALHO DE EXTENSÃO DA PESQUISA DE TESE:	
PROMOÇÃO DE AÇÕES EDUCATIVAS PARA O CONTROLE AOS NEMATOIDES GASTROINTESTINAIS DO REBANHO OVINO FLUMINENSE.....	117
Resumo:.....	117
6.1) Laudos Parasitários:	117
6.2) Cartilha Informativa:	124
6. 3) Cursos e Palestras:	136
6.4) Textos Informativos:	149
7) CONSIDERAÇÕES FINAIS:	151
8) ANEXOS:.....	152

ÍNDICE DE TABELAS:

	PÁG.
<u>ARTIGO 1:</u>	
Tabela 1. Artigos publicados com Resistência Anti-Helmíntica, avaliada pelo Teste de Redução da Contagem de Ovos nas Fezes, em pequenos ruminantes no Brasil.....	27
Tabela 2. Anti-helmínticos que apresentaram melhor índice de eficácia, pelo Teste de Redução da Contagem de Ovos nas fezes, em pesquisas realizadas no Brasil ao longo dos anos (1967 a 2016).....	38
<u>ARTIGO 2:</u>	
Tabela 1. Características das fazendas de ovinos avaliadas no estado do Rio de Janeiro.....	59
Tabela 2. Contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de rebanhos de ovinos criados no estado do rio de Janeiro. Letras diferentes sobrescritas indicam valores que diferiram estatisticamente ($p < 0,05$).....	63
<u>ARTIGO 3:</u>	
Tabela 1. Manejo antiparasitário determinado pelos produtores de ovinos de 22 propriedades no estado do Rio de Janeiro.....	80
Tabela 2. Resistência anti-helmíntica avaliada pelo teste da redução de contagem de ovos nas fezes (TRCOF) em 22 fazendas de ovinos do Rio de Janeiro.....	82
Tabela 3. Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo F200Y do gene β -tubulina 1 em L ₃ de <i>Haemonchus</i> observada pelo Teste do Qui-quadrado, Teste da Redução de Contagem de Ovos nas Fezes (TRCOF) de albendazol calculado sobre a proporção específica de <i>Haemonchus</i> spp. ou sobre todos os nematoides (geral) e população parasitária de nematoides em sete fazendas de ovinos do estado do Rio de Janeiro.....	86
<u>ARTIGO 4:</u>	
Tabela 1. Concordância e probabilidade da detecção de gêneros de nematoides por análise morfológica segundo o proposto por Van wyk e Mahiew, 2013 e molecular por meio da análise de fragmentos (região ITS 2).....	108
Tabela 2. Correlação, concordância e média intra-amostra da identificação quantitativa de gêneros de nematoides por análise morfológica e molecular com intervalos de confiança a 95%.....	110
<u>TRABALHO DE EXTENSÃO:</u>	
-CARTILHA:	
Tabela 1. Localização e principal sinal clínico dos nematoides prevalentes no rebanho ovino Fluminense:.....	126
Tabela 2. Classes de anti-helmínticos suas respectivas bases químicas e nomes comerciais.....	129

ÍNDICE DE FIGURAS:

	PÁG.
<u>ARTIGO 1:</u>	
Figura 1. Distribuição das pesquisas com resistência anti-helmítica e correlação com o rebanho de pequenos ruminantes no Brasil.....	31
<u>ARTIGO 2:</u>	
Figura 1. a. Localização do estado do Rio de Janeiro no Brasil. b. Localização das 22 fazendas de ovinos avaliadas no estado do Rio de Janeiro.....	57
Figura 2. Médias ajustadas de ovos por grama de fezes (OPG) de rebanhos de ovinos do estado do Rio de Janeiro com intervalo de confiança de 95%.....	62
Figura 3. Peso médio de rebanhos ovinos do estado do Rio de Janeiro com intervalo de confiança de 95%.....	64
Figura 4. Média geral dos graus de Famacha, Escore de condição Corporal (ECC) e classificação do grau de infecção pela contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de rebanhos de ovinos do estado do Rio de Janeiro.....	64
Figura 5. Gêneros de nematoides gastrointestinais em fazendas de criação de ovinos do estado do Rio de Janeiro.....	66
<u>ARTIGO 3:</u>	
Figura 1. A) Localização do estado do Rio de Janeiro no Brasil. B) Localização das 22 fazendas de ovinos avaliadas pelo TRCOF e questionários. As fazendas circundadas foram as selecionadas para teste de polimorfismo do gene F200Y da β -tubulina (7, 12, 15, 17, 18, 19 e 20).....	78
Figura 2. Fluxograma da coleta de amostras, testes laboratoriais para análise do manejo anti-helmítico, cálculo de eficiência anti-helmítica (TRCOF) e frequência de polimorfismo F200Y na β -tubulina em nematoides gastrointestinais de ovinos do Rio de Janeiro.	79
Figura 3. Percentual de fazendas com eficácia anti-helmítica por gênero de nematoide. Barras que não aparecem indicam 0% de eficácia.....	83
Figura 4. Distribuição da eficácia avaliada pelo teste da redução de contagem de ovos nas fezes (TRCOF) de 5 anti-helmíticos contra: (a) <i>Haemonchus</i> spp., (b) <i>Trichostrongylus</i> spp., (c) <i>Cooperia</i> spp. e (d) <i>Oesophagostomum</i> spp.....	84
<u>ARTGIGO 4:</u>	
Figura 1. Caracteres morfológicos e morfométricos para o diagnóstico de larvas de terceiro estágio de nematoides de pequenos ruminantes, proposto por Van wyk e Mahiew, 2013.	104
Figura 2. Esquema da identificação de nematoides por meio da análise de fragmentos (região ITS 2). Fonte: Santos (2016).....	106
Figura 3. Determinação quantitativa de gêneros de nematoides. A fluorescência	

emitida pelos amplicons é proporcional ao percentual de cada nematoide na amostra.....	107
Figura 4. Percentual de amostras com resultado negativo (0%) para a detecção dos nematoides pelas técnicas morfológica, molecular ou em ambas simultaneamente.....	109
Figura 5. Identificação quantitativa de gêneros de nematoides gastrointestinais de ovinos pela análise morfológica e molecular de fragmento em 171 amostras provenientes de pools de L3.....	110
Figura 6. Concordância e correlação entre as técnicas morfológica e molecular de detecção de gêneros de nematoides a 95% de intervalo de confiança. A linha em preto refere-se à reta identidade (concordância exata) enquanto a linha em vermelho representa a reta da regressão linear simples ajustada, indicando a tendência linear das aferições.....	111
<u>TRABALHO DE EXTENSÃO:</u>	
-CARTILHA:	
Figura 1. Óbito do animal com anemia profunda, diarreia e perda de peso por verminose.....	127
Figura 2. Ciclo dos principais vermes que acometem ovinos.....	127
Figura 3. A fase de vida livre do ciclo vital dos nematoides gastrointestinais depende, sobretudo, de fatores como a temperatura e umidade favoráveis.....	128
Figura 4. Na pastagem o verme encontra condições propícias para fechar o ciclo...	128
Figura 5. Falta de limpeza das baias, acúmulo de umidade e instalações impróprias podem ocasionar infecções parasitárias em animais confinados.....	128
Figura 6. Instalações limpas e bem planejadas evitam infecções parasitárias (LAPOC/UFPR).....	129
Figura 7. O controle da verminose vai muito além do uso isolado de antiparasitários, englobando manejo nutricional, ambiental e bem-estar animal.....	131
Figura 8. Animais com boa condição nutricional, adequada oferta e qualidade da pastagem, são menos afetados pela verminose.....	131
Figura 9. Coleta de fezes para realização de exames.....	132
Figura 10. Exame de OPG.....	133
Figura 11. Tabela Famacha (Van Wyk et al., 1997) e exposição da mucosa ocular para avaliação do grau de anemia.....	133
Figura 12. Avaliação do escore de condição corporal.....	133
Figura 13. Pesagem do animal para o cálculo de doses do vermífugo.....	135
Figura 14. Cálculo e preparação da dose de vermífugo de acordo com o indicado pelo fabricante.....	135

Figura 15. Aplicação de vermífugo por via subcutânea.....	135
-CURSOS E PALESTRAS:	
Figura 1. Slide inicial da palestra ministrada em Três Rios.....	137
Figura 2. Folder de divulgação do dia de campo sobre Higiene e Profilaxia realizado em Areal.....	138
Figura 3. Folder de divulgação do encontro de ovinocultores realizado em Paraíba do Sul.....	139
Figura 4. Palestra ministrada aos produtores rurais em Paraíba do Sul.....	140
Figura 5. Público participante da palestra em Paraíba do Sul.....	140
Figura 6. Apresentação da Cartilha em Paraíba do Sul.....	141
Figura 7. Entrega das cartilhas em Paraíba do Sul.....	141
Figura 8. Produtores rurais reunidos em Dia de Campo na Fazenda Bode Bravo....	142
Figura 9. Apresentação do método Famacha na Fazenda Bode Bravo.....	142
Figura 10. Demosntração do método Famacha na Fazenda Bode Bravo.....	143
Figura 11. Demonstração da avaliação de Escore de Condição Corporal na Fazenda Bode Bravo.....	143
Figura 12. Demosntração do teste de eficácia de anti-helmínticos na Fazenda Bode Bravo.....	144
Figura 13. Boas práticas na administração de anti-helmínticos na Fazenda Bode Bravo.....	144
Figura 14. Estudantes pasticipantes da palestra na UNIFESO.....	145
Figura 15. Palestra sendo ministrada na UNIFESO.....	146
Figura 16. Palestra sendo ministrada na UNIFESO.....	146
Figura 17. Palestra sendo ministrada na UNIFESO.....	147
Figura 18. Folder de divulgação da Semana do Produtor Rural.....	148
Figura 19. Slide da palestra teórica na Semana do Produtor Rural.....	148
Figura 20. Parte prática de realização de exames coproparasitológicos na Semana do Produtor Rural.....	149

ABREVIATURAS:

A: albendazol;

C: closantel;

Coop.: *Cooperia* spp.;

D: (Dorper) artigo 2;

D: doramectina artigo 3;

Di: disofenol;

ECC: Escore de Condição Corporal;

F: febendazol;

Faz.: Fazenda;

Freq. Frequência;

Haem: *Haemonchus* spp.;

I: ivermectina;

IC: Intervalo de Confiança;

ITS2: *Internal Transcribed Spacer 2*).

L: levamisol;

LC (Lacaune);

M: moxidectina;

Mo: monepantel;

N: nitroxinil;

Ne: netobimin (pré-benzimidazol);

NGI: Nematoides Gastrointestinais;

O: oxifendazol;

Oesop.: *Oesophagostomum* spp.;

OPG: Exame da contagem de ovos por grama de fezes;

PD (Pool Dose);

RAH: Resistência Anti-Helmíntica;

Semi P (semi-intensivo com predominância de pasto);

Semi. C (semi-intensivo com predominância de confinamento);

SI (Santa Inês);

Te: tetramisol;

Th: thiabendazol;

Tr: triclorfon;

TRCOF: Teste da Redução da Contagem de Ovos nas Fezes;

Tric: *Trichostrongylus* sp;

RESUMO

As nematodioses gastrointestinais são o principal problema sanitário na ovinocultura. A dificuldade de controle dessas enfermidades se dá principalmente pela resistência anti-helmíntica fortemente disseminada na maioria dos rebanhos. Esse projeto buscou diagnosticar a prevalência de nematoides gastrointestinais em ovinos do estado do Rio de Janeiro e a situação de resistência anti-helmíntica do rebanho utilizando análises fenotípicas, genotípicas e moleculares. Realizou-se um compilado de todos os trabalhos de resistência anti-helmíntica no Brasil com uma análise crítica da situação nas regiões do país. O Brasil é um dos países que mais relata resistência anti-helmíntica no mundo, sendo os relatos ocorrentes em estados com importância em criação de pequenos ruminantes (região Sul e Nordeste) ou em Centros de Pesquisa (Região Sudeste). No Rio de Janeiro, uma pesquisa prévia apontou que os rebanhos das regiões Norte e Noroeste apresentaram considerada resistência anti-helmíntica, carecendo de pesquisa mais ampla a este respeito. Dessa forma, com o objetivo de determinar a prevalência e resistência de nematoides gastrointestinais, 22 fazendas de ovinos foram avaliadas no estado do Rio de Janeiro. Para tanto, os seguintes procedimentos foram feitos: avaliação dos animais (grau de anemia pelo método Famacha, aferição do peso e Escore Corporal); coleta de fezes dos ovinos; realização de exames de contagem de ovos por grama de fezes (OPG); teste da redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF) de cinco anti-helmínticos (albendazol, closantel, levamisol, ivermectina e moxidectina); realização de coproculturas para identificação de gêneros prevalentes por meio de análise morfológica das larvas infectantes (L₃); realização de análise molecular de fragmentos para identificação de L₃ para comparação com a técnica morfológica padrão; teste genotípico molecular de detecção de resistência aos benzimidazóis por meio do gene da beta tubulina; realização de entrevista para caracterização dos sistemas de criação e produtivo dos rebanhos, além da averiguação do manejo antiparasitário. Dos rebanhos analisados, foi possível determinar que a raça Santa Inês criada em sistemas de produção semi-intensivo e com o uso predominante de pastagem são mais comuns no estado. A infecção parasitária acomete 74% do rebanho que apresenta alta proporção de animais em infecção moderada à maciça. Os gêneros prevalentes nos rebanhos foram 75% *Haemonchus* spp., 20% *Trichostrongylus* spp., 3% *Cooperia* spp. e 2% *Oesophagostomum* spp. A carga parasitária foi favorecida pela alta prevalência de *Haemonchus* spp., baixa condição nutricional dos animais e o uso de pastagens nos sistemas de produção. A utilização conjunta de testes fenotípicos e genotípicos detectou alta proporção de resistência anti-helmíntica de múltiplas drogas e gêneros parasitários nos rebanhos analisados. Sendo este fato justificado pelas falhas no manejo como o tratamento de todos os animais, falta de critério de avaliação clínica ou laboratorial e rotação rápida de bases anti-helmínticas. A avaliação molecular de fragmentos para identificação de gêneros de nematoides demonstrou compatibilidade com diagnóstico morfológico padrão e maior sensibilidade quando os parasitos estavam em baixo percentual na amostra. Portanto, a mesma demonstrou ter potencial de uso de diagnóstico quali-quantitativo para identificação de gêneros de nematoides de ovinos em amostras contendo infecções mistas. Durante o período experimental foram feitos trabalhos de extensão à comunidade para auxiliar no controle parasitário dos rebanhos. Dessa forma, este trabalho apresenta um estudo aprofundado das nematodioses gastrointestinais em ovinos no estado do Rio de Janeiro.

Palavras chaves: Ovinos, nematoides gastrointestinais; manejo antiparasitário; eficácia anti-helmíntica; análise genotípica; resistência anti-helmíntica.

ABSTRACT:

Gastrointestinal nematodiosis are the main health problem in the sheep industry. The difficulty of controlling these diseases is mainly gives the anthelmintic resistance strongly disseminated in most herds. This project sought to diagnose the prevalence of gastrointestinal nematodes in sheep of the state of Rio de Janeiro and anthelmintic resistance situation of the herd using phenotypic, genotypic and molecular analysis. We conducted a compiled of all anti-helmintic resistance works in Brazil with a critical analysis of the situation in all regions of the country. Brazil is one of the countries most reports anthelmintic resistance in the world, and the reports occurring in states with importance in creating small ruminates (South and North) or Research Centers (Southeast Region). In Rio de Janeiro, a previous survey found that herds of the north and northwest regions have high anthelmintic resistance, requiring a broader search. Thus, aiming to determine the prevalence and resistance of gastrointestinal nematodes, 22 farms sheep were evaluated in the state with the following analysis: animals rating (degree of anemia by Famacha method, body condition score and body weighing); collection of faeces of sheep; realization of egg count tests per gram of feces (EPG); realization of fecal egg count reduction test (FECRT) of five anthelmintics (albendazole, closantel, levamisole, ivermectin and moxidectin); execution of stool cultures to identify prevalent genres through morphological analysis of nematodes (infective larvae-L3); conducting molecular analysis of fragments in L3 for comparison with the morphological standard technique; test molecular genotypic resistance to benzimidazoles detection by the beta tubulin gene; conducting surveys for productive characterization of herds and investigation antiparasitic management. The sheep flock of Rio de Janeiro is mainly composed of animal Santa Ines created in semi-intensive production and the predominant use of grazing systems. The parasitic infection affects 74% of the herd that has a high proportion of animals in moderate to massive infection. The prevalent genres in the state were *Haemonchus* (75%), *Trichostrongylus* (20%), *Cooperia* (3%) and *Oesophagostomum* (2%). Parasitic load of the sheep flock of Rio de Janeiro was favored by the high prevalence of *Haemonchus* spp., low nutritional status of animals and the use of pastures in production systems. The joint use of phenotypic and genotypic tests detected high proportion of anthelmintic resistance to multiple drugs and parasitic genera in the sheep flock of Rio de Janeiro. Being this fact justified by shortcomings in the management and treatment of all animals, lack of criteria for clinical or laboratory evaluation and rapid rotation of anthelmintic bases. Molecular assessment fragments demonstrated compatibility with standard morphologic diagnosis and greater sensitivity when the parasites were low percentage in the sample. Therefore, it has shown to have potential for qualitative and quantitative diagnostic use for identification of nematode genera samples in sheep containing L3 pools. During the experimental period, were made extension work to the community to assist in parasite control herds. Thus, this work presents an in-depth study of gastrointestinal nematodiosis in sheep in the state of Rio de Janeiro.

Key words: Sheep, gastrointestinal nematodes, anthelmintic efficacy; anthelmintic resistance; antiparasitic management; genotypic analysis.

1) INTRODUÇÃO GERAL:

As nematodioses gastrointestinais são o principal problema sanitário de pequenos ruminantes no mundo ocasionando grande morbidade e mortalidade (Falzon et al. 2014, Gasser et al., 2016). O prejuízo ocasionado por nematoides na agropecuária anualmente ultrapassa bilhões de dólares (Gang e Hallem, 2016). Atualmente, o controle dessas enfermidades se dá basicamente pelo uso de anti-helmínticos, que são vulneráveis ao aparecimento crescente de resistência anti-helmíntica (RAH), problema alarmante na espécie ovina (Kaplan, 2004; Waller, 2006). O Brasil é o país no continente Americano com maior número de relatos publicados com RAH a múltiplas drogas em diversos rebanhos de pequenos ruminantes distribuídos no território nacional (Torres-Acosta et al., 2012; Salgado e Santos, 2016). De acordo com Leathwick e Besier (2014), o crescente número de pesquisas relacionadas ao assunto tem resultado em uma variedade de estratégias para minimizar os efeitos e o aparecimento de RAH. Com isso, há um apelo para o uso de práticas mais sustentáveis como o tratamento direcionado ou seletivo do rebanho e fortalecimento imunológico do hospedeiro (Charlier et al., 2014, Besier et al., 2016 e Verchave et al., 2016). Para tanto, o conhecimento da epidemiologia dos parasitos é de suma importância no desenvolvimento de um controle estratégico parasitário (Ahid et al, 2008).

A proporção de gêneros de nematoides varia entre os diferentes rebanhos, sendo a patogenicidade dependente da intensidade de infecção e da susceptibilidade do hospedeiro. Na maior parte do Brasil, os nematoides mais prevalentes são *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp. *Cooperia* spp., *Oesophagostomum* spp. e, em regiões subtropicais, *Teladorsagia* spp. (Niciura et al., 2009). Os animais são parasitados por várias espécies de nematoides e a proporção destas determina a sintomatologia clínica e direciona para a forma de controle. Salgado e Rosalinski (2014) ressaltaram, em um boletim técnico direcionado ao produtor rural, a importância do conhecimento da população parasitária dos animais por meio de exames de coprocultura. Neste exame é possível identificar morfológicamente os gêneros parasitários (Wan Wyk et al., 2013). Mais recentemente, técnicas de identificação moleculares, como a análise de fragmentos de genes, estão tornando mais rápido e preciso este diagnóstico (Whittaker et al., 2016).

Haemonchus contortus é o nematoide prevalente em regiões tropicais e subtropicais com clima quente e úmido (Khan et al. 2003), como é o caso do Brasil. Além disso, é o parasito mais estudado em resistência anti-helmíntica, justamente por sua alta capacidade

genética de adquirir resistência (Kotze e Prichard, 2016). Em uma breve pesquisa feita em maio de 2016 na Pubmed com a palavra “anthelmintic resistance”, *Haemonchus contortus* aparece em 12 dos 20 artigos mostrados na primeira página. A patogenia desse nematoide é devido à sua fixação no abomaso dos animais e hábito hematófago, podendo cada parasito ingerir cerca de 0,05 ml de sangue por dia de cada ovino, em casos de infecções graves a perda chega a 200 ml de sangue diariamente, ocasionando severa anemia (Taylor et al., 2007). Além disso, diarreia e perda de peso podem ser observadas em infecções mistas contendo outros gêneros parasitários (*Trichostrongylus*, *Cooperia* e *Oesophagostomum*) devido à espoliação do epitélio intestinal (Amarante et al., 2004).

Além das lesões primárias, os nematoides podem ocasionar infecções subclínicas com danos secundários comprometendo a produtividade animal por meio da redução da eficiência de utilização dos alimentos e/ou no seu consumo voluntário (Host et al., 2016). Desta forma, há desvio dos nutrientes que iriam para o crescimento e desenvolvimento do animal para a recomposição dos danos nos tecidos acometidos pelos parasitos (Roy et al. 2003). Também ocorrem distúrbios no metabolismo proteico e absorção reduzida de minerais, onde a magnitude do problema depende do tamanho, número e espécies de larvas presentes no organismo. Em meio às perdas subclínicas ocasionadas pelo parasitismo e a baixa eficácia dos antiparasitários, a condição nutricional dos animais tem sido fortemente correlacionada com a patogenicidade das parasitoses e resposta imunitária. A baixa condição nutricional de pequenos ruminantes no Brasil e a inclusão de raças exóticas, mais exigentes, é fator complicador para o alto índice de mortalidade por parasitoses e uso indiscriminado de anti-helmínticos (Amarante, 2014).

A falta de critérios de tratamento antiparasitário e de diagnósticos no rebanho tornou a RAH o principal problema na indústria ovina em todo o mundo (Molento, 2009). Atualmente, o diagnóstico de RAH pode ser feito *in vivo* e *in vitro* e há muitos avanços na biologia molecular (Coles et al., 2006). Ainda, para retardar a perda de eficácia das drogas e elaborar guias adequados de tratamento antiparasitário é necessário a identificação de práticas de manejo que estejam relacionadas à diminuição da eficácia dos compostos (Falzon et al., 2014) e que estas sejam repassadas aos profissionais ligados a atividade no campo (Molento, 2009). Falhas no manejo e ineficácia de muitos anti-helmínticos foram diagnosticadas em todo o Brasil por diversos autores (Salgado e Santos, 2016). No Rio de Janeiro, essa situação foi vista nas regiões Norte e Noroeste por Cruz et al. (2010), indicando a necessidade de um trabalho mais amplo em todo o estado.

Sendo assim, essa tese buscou identificar o manejo anti-helmíntico e a eficácia das principais drogas utilizadas nos ovinos do estado do Rio de Janeiro frente aos gêneros de nematoides prevalentes. Além disso, o efeito do manejo e da condição nutricional dos ovinos no grau de infecção parasitária foi verificado. Exames fenotípicos e genotípicos foram realizados para diagnosticar a resistência anti-helmíntica e os gêneros de nematoides predominantes nos ovinos do estado. Ainda, uma revisão bibliográfica foi feita com a compilação dos artigos com resistência anti-helmíntica em pequenos ruminantes no Brasil, buscando uma análise da situação. Com isso, laudos parasitários, cartilhas, orientações, palestras e boletins técnicos foram gerados e repassados aos produtores rurais a fim de se ampliar o trabalho de pesquisa para um trabalho de extensão à comunidade. Estas informações são apresentadas em formato de artigos ao longo da tese.

Referências:

- AHID, S. M.; SUASSUNA, A. C. D.; MAIA, M. B.; COSTA, V. M. M. C.; SOARES, H. S. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da Região do Oeste do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 212-218, 2008.
- AMARANTE, A. F. T. Sustainable worm control practices in South America. **Small Ruminant Research** v. 118, p. 56-62. doi:10.1016/j.smallrumres.2013.12.016, 2014.
- AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P.A.; ROCHA, R.A.; GENARI, S.M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v.120, p. 91-106, 2004.
- BESIER, R. B.;KAHN, L. P.;SARGISON, N. D.;VAN WYK, J. A. Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. **Advances in Parasitology**, v. 93, p. 181-238. doi: 10.1016/bs.apar.2016.02.024, 2016.
- CHARLIER, J.; MORGAN, L.; RINALDI, E.R.; VAN DIJK, J.; DEMELER, J.; HÖGLUND, J.; HERTZBERG, H.; VAN RANST, B.; HENDRICKX, G.; VERCRUYSSSE, J.; KENYON, F. Practices to optimise gastrointestinal nematode control on sheep, goat and cattle farms in Europe using targeted (selective) treatments. **Veterinary Record**, v. 175(10) p.:250-5. doi: 10.1136/vr.102512, 2014
- CRUZ, D. G.; ROCHA, L. O.; ARRUDA, S. S.; PALIERAQUI, J. G. B., CORDEIRO, R. C.; SANTOS-JUNIOR, E. S.; MOLENTO, M. B.; SANTOS, C. P. Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 340–343, 2010.
- FALZON, L.C.; O'NEILL, T. J.; MENZIES, P.I.; PEREGRINE, A.S.; JONES-BITTON, A.; VANLEEuwENE, J.; MEDEROS. A. A systematic review and meta-analysis of factors associated with anthelmintic resistance in sheep. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 15, p. 388-402, 2014.

- GANG, S. S.; HALLEM, E. A. Mechanisms of host seeking by parasitic nematodes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, doi: 10.1016/j.molbiopara.2016.05.007. 2016.
- GASSER, R. B. ; SCHWARZ, E. M.; KORHONEN, P. K.; YOUNG, N. D. Understanding *Haemonchus contortus* Better Through Genomics and Transcriptomics. **Advances in Parasitology**, v. 93, p. 519-67. doi: 10.1016/bs.apar.2016.02.015, 2016.
- HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J. F.; QUIJADA, J.; CHAN-PEREZ, I.; DAKHEEL, M. M.; KOMMURU, D. S.; MUELLER-HARVEY, I.; TERRIL, T. H. Interactions Between Nutrition and Infections With *Haemonchus contortus* and Related Gastrointestinal Nematodes in Small Ruminants. **Advances in Parasitology**, v. 93, p. 239-351. doi: 10.1016/bs.apar.2016.02.025, 2016.
- KAHN, L. P.; KNOX, M.R.; WALKDEN-BROWN, S.W.,; LEA, J.M. Regulation of the resistance to nematode parasites of single- and twin-bearing Merino ewes through nutrition and genetic selection. **Veterinary Parasitology**, v.114, p.15–31, 2003.
- KAPLAN, R. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends Parasitology**, v. 20, p. 477–481, 2004.
- KOTZE, A. C. Prichard RK Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. **Advances in Parasitology**, v. 93, p. 397-428. doi: 10.1016/bs.apar.2016.02.012, 2016.
- LEATHWICK, D., M.; BESIÉR, R. B. The management of anthelmintic resistance in grazing ruminants in Australasia Strategies and experiences. **Veterinary Parasitology**, v. 204, p. 44–54, 2014.
- MOLENTO, M. B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. **Veterinary Parasitology**, v. 163 , p. 229–234, 2009.
- NICIURA, S. C. M.; VERÍSSIMO, S. J.; MOLENTO, M.B. Determinação da Eficácia Anti-Helmintíca em Rebanhos Ovinos: Metodologia de Colheita de Amostras e de Informações de Manejo Zoossanitário. EMBRAPA Pecuária Sudeste, documento 91. Disponível em: <http://www2.cppse.embrapa.br/080servicos/070publicacao gratuita/documentos/Documentos91.pdf/view>, 2009.
- ROY, N. C.; BERMINGHAM, E. N.; SUTHERLAND, I. A.A.; MCNABB, W. C.. Nematodes and nutrient partitioning. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 43, n. 12, p.1419 - 1426, 2003.
- SALGADO, J. A.; ROSALINSKI-MORAES, F. Coprocultura: um exame importante no controle de verminose. **Milk Point**. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos-e-caprinos/vale-a-pena-ler-de-novo-coprocultura-um-exame-importante-no-controle-de-verminose-78933n.aspx>. 25/04/2014. Acesso em: 05/06/2016
- SALGADO, J. A.; SANTOS, C. P. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.25, p. 3-17. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016008>, 2016.
- TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. Parasites of sheep and goats. **Veterinary Parasitology**. Third edition, p. 152-165, 2007.

- TORRES-ACOSTA, J. F. J.; MENDONZA-DE-GIVES, P.; AGUILAR-CABALLERO, A.J.; CUÉLLAR-ORDAZ, J. A. Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. **Veterinary Parasitology**, v. 189, p. 89–96, 2012.
- VAN WYK, J. A.; MAYHEW, E. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide, Onderstepoort J. **Veterinary Research**, v. 80, p. 539-553, 2013.
- VERCHAVE, S. H.; CHARLIER, J.; ROSE, H.; CLAEREBOUT, E.; MORGAN, E. R. Cattle and Nematodes Under Global Change: Transmission Models as an Ally. **Trends Parasitology**. doi: 10.1016/j.pt.2016.04.018, 2016.
- WALLER, P.J. From discovery to development: Current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. **Veterinary Parasitology**, v.139, p. 1–3, 1–14. 2006.
- WHITTAKER, J. H.; CARLSON, S. A.; JONES, D. E.; BREWER, M. T. Molecular mechanisms for anthelmintic resistance in strongyle nematode parasites of veterinary importance. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, doi: 10.1111/jvp.12330, 2016.

2) ARTIGO 1:**PANORAMA DA RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM PEQUENOS RUMINANTES NO BRASIL.**

Revisão bibliográfica publicada na Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, v. 25, n. 1, p. 3-17, jan.-mar. 2016. Em anexo (Salgado e Santos; 2016).

Resumo:

O uso frequente e inapropriado de todas as classes de antiparasitários em pequenos ruminantes levou a falhas de eficácia, culminando na problemática global de resistência anti-helmíntica. O Brasil destaca-se como sendo um dos pioneiros nas publicações com resistência anti-helmíntica no mundo e por ter o maior número de relatos em pequenos ruminantes na América. Essas pesquisas envolvem principalmente o teste da redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF) e sua correlação com as práticas de manejo utilizadas no campo. Os estudos de testes de eficácia *in vivo* localizam-se em áreas onde há maior importância dos rebanhos como nas Regiões Sul (ovinos) e Nordeste (caprinos), ou com importância em polos de pesquisa e econômicos, como a região Sudeste (ovinos). Ovina é a espécie mais estudada e com maior gama de drogas avaliadas. Mesmo com grande avanço em pesquisas moleculares, as análises laboratoriais devem envolver o conhecimento da realidade do campo para que possam se tornar viáveis ao produtor. Além disso, a análise dos estudos de campo pode nortear estudos moleculares como, por exemplo, a manutenção da eficácia das drogas ao longo dos anos e os mecanismos envolvidos em tal processo.

Palavras-chave: Pequenos ruminantes, resistência anti-helmíntica, ovino, caprino, nematoides gastrointestinais.

Abstract:

Frequent and inappropriate use of all classes of antiparasitic drugs in small ruminants has led to failures in their effectiveness, culminating in a global problem of anthelmintic resistance. Brazil stands out as one of the world's leaders in publications about anthelmintic resistance, and for having the most numerous reports of this resistance in small ruminants in the Americas. These studies have involved mainly the fecal egg count reduction test (FECRT) and its correlation with field management practices. *In vivo* effectiveness testing is conducted in areas where livestock is of greater economic significance, e.g., in the South (sheep) and Northeast (goats), or is important for research and economic centers, such as the Southeast (sheep). The most widely studied species is sheep, for which the widest range of drugs is also evaluated. Despite significant advances achieved in molecular research, laboratory analyses should include knowledge about the reality in the field so that they can become feasible for the producer. Moreover, molecular studies can be underpinned by the analysis of field studies, such as the maintenance of antiparasitic effectiveness over time and the mechanisms involved in this process.

Keywords: Small ruminants, anthelmintic resistance, sheep, goat, gastrointestinal nematodes.

Introdução:

A produção de pequenos ruminantes em todo o mundo é fortemente comprometida por parasitoses gastrointestinais que ocasionam alto índice de mortalidade (Hoste e Torres-

Acosta, 2011; Stear et al., 2011; Knox et al., 2012; Falzon et al., 2014), além de perdas subclínicas que refletem em baixa produtividade (Charlier et al., 2014). Em países de clima tropical, *Haemonchus contortus* é o nematoide com maior prevalência nos rebanhos, ocasionando graves perdas devido ao seu alto poder patogênico devido à hematofagia (Kassai, 1999). Outros parasitos também colaboram com prejuízos por diarreia, espoliação da mucosa intestinal e anemia, principalmente porque as infecções são mistas ocasionando um somatório de sinais clínicos e baixa produtividade (Molento et al., 2009). No Brasil, o potencial produtivo para ruminantes em geral, com grande área com aptidão agropecuária, é prejudicado por endoparasitoses. Em bovinos, onde o país é líder de rebanho comercial no mundo, estima-se que os prejuízos anuais com parasitoses gastrointestinais possam atingir \$7,11 bilhões (Grisi et al., 2014). Os ovinos e caprinos, com cadeia produtiva em organização no país, são ainda mais susceptíveis, sendo o alto índice de mortalidade grande desanimador do agronegócio.

O controle das parasitoses na pecuária ao longo dos anos ocorre baseado no uso de antiparasitários de amplo espectro e acessíveis. As principais classes anti-helmínticas disponíveis nos últimos anos são: benzimidazóis, imidazotiazóis, lactonas macrocíclicas, salicilanidas e nitrofenóis (Coles et al., 2006). Segundo Molento (2009), os benefícios do uso de antiparasitários em animais de produção ao longo dos anos são inquestionáveis; entretanto, o uso contínuo e inapropriado desses fármacos ocasionou a perda de eficácia de muitos princípios. As lactonas macrocíclicas foram lançadas nos anos 80 (Chabala et al. 1980) e poucos anos depois já houve relato de perda de eficácia no Brasil (Echevarria e Trindade, 1989). Recentemente, lançou-se duas novas classes de anti-helmínticos, um derivado de aminocetronila, o monepantel, (Kaminsky et al., 2008) e o derquantel que foi comercializado associado à abamectina (Little et al., 2010). Entretanto, relatos de resistência já foram feitos ao monepantel (Scott et al., 2013; Mederos et al., 2014; Van de Brom et al., 2015) e derquantel (Kaminsky et al., 2011), mostrando a alta vulnerabilidade dos fármacos.

Segundo as diretrizes da Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology -WAAVP) considera-se resistência anti-helmíntica (RAH) quando a eficácia de um anti-helmíntico reduz abaixo de 95 % a carga parasitária alvo (Coles et al., 1992 e 2006). Isso ocorre quando há maior frequência de indivíduos dentro de uma população parasitária capaz de tolerar doses de um composto que seria letal, sendo essa característica hereditária (Prichard et al., 1980). Essa diminuição da susceptibilidade é causada por um aumento na frequência de alelos de genes que resultam na seleção através do uso repetido de um anti-helmíntico (Fleming et al., 2006).

Quanto maior a pressão de seleção do fármaco, maior será o processo de seleção por organismos resistentes (Barger, 1995). De acordo com Blouin et al. (1995), os nematoides gastrointestinais de pequenos ruminantes possuem características genéticas que promovem o rápido desenvolvimento de RAH como rápidas taxas de seleção e de fluxo gênico e elevado nível de diversidade genética. Como resultado, esses parasitos têm potencial genético para responder rapidamente ao efeito dos anti-helmínticos e os meios para assegurar a disseminação de seus genes resistentes (Fleming et al., 2006).

O aumento da RAH nos rebanhos tem levado a uma necessidade de se identificar as práticas de manejo que possam reduzir o impacto do problema (Falzon et al., 2014), sendo para isso necessário um diagnóstico prévio da situação. Em várias regiões do mundo relatos de RAH em pequenos ruminantes vem ocorrendo: África do Sul (van Wyk et al., 1997); Mexico (Torres-Acosta, 2003); Australia (Suter et al., 2004; Playford et al., 2014), Nova Zelândia (Waghorn et al., 2006) Canadá (Falzon et al., 2013); Dinamarca (Pena-Espinoza et al., 2014); Uganda (Nabukenya et al., 2014); Italia (Zanzani et al., 2014); Irlanda (Keane et al., 2014); França, Grécia e Itália (Guerden et al., 2014). Sendo Nova Zelândia, Reino Unido e Brasil os países com maior número de estudos transversais ao longo do tempo (Falzon et al., 2014). O Brasil também é enfatizado por Torres-Acosta et al. (2012), ao atualizar a situação de RAH no Continente Americano, como o país com maior número de publicações na área. Sendo assim, o objetivo dessa revisão foi traçar um panorama dos relatos de RAH em pequenos ruminantes no Brasil, abordando o histórico e as formas de diagnósticos utilizadas; assim como, realizar uma análise da distribuição das pesquisas por região e, da evolução do uso, eficácia e manutenção dos fármacos ao longo dos anos.

Histórico da RAH em pequenos ruminantes no Brasil e no mundo:

O primeiro relato de RAH no mundo foi feito à fenotiazina em ovinos nos Estados Unidos da América (Leland et al., 1957). Das classes de anti-helmínticos atualmente utilizadas, os benzimidazóis foram os primeiros fármacos a perderem a eficácia em nematoides de pequenos ruminantes, sendo o primeiro relato de RAH feito por Drudge et al. (1964) com o tiabendazole em ovinos. Logo após, no Brasil, Dos Santos e Gonçalves (1967) relataram o primeiro caso de resistência anti-helmíntica em ovinos ao albendazol no estado do RS. Em caprinos, os primeiros relatos de resistência aos benzimidazóis no mundo ocorreram nos anos 80 (Lutu, 1983; Kettle et al., 1983; McKenna, 1984). No Brasil, Charles et al. (1989), utilizando a necropsia de caprinos tratados com albendazol, parbendazol e levamisol,

encontraram resistência a todos esses princípios, questionando inclusive se a dose estaria correta para a espécie. No mesmo ano, Vieira et al. (1989) averiguaram resistência a várias classes de benzimidazóis em caprinos no estado do CE.

As cepas de nematoides resistentes aos benzimidazóis eram altamente susceptíveis aos imidotiazóis, mas na Austrália Le Jambre et al. (1976) reportaram o potencial de resistência de cepas de nematoides selecionadas *in vitro* a esses fármacos, o que logo procedeu outros relatos de resistência no mundo, incluindo cepas de campo (Kelly e Hall, 1979). No Brasil, uma nota prévia de Santiago et al. (1977) já apontava uma cepa de *Trichostrongylus* resistentes ao levamisol. Logo após, Green et al. (1981) fizeram o primeiro relato de resistência múltipla, incluindo benzimidazóis e imidotiazóis causada pela alta pressão de seleção resultante de frequentes tratamentos no rebanho ovino de Queensland- Austrália. Nos artigos publicados no Brasil, tanto em caprinos no estado de Pernambuco (Charles et al., 1989) quanto em ovinos no estado de São Paulo (Amarante et al., 1992), a resistência ao levamisol foi reportada como múltipla às outras formulações de benzimidazóis.

Com o advento da RAH às duas principais classes de anti-helmínticos no mercado animal, o surgimento de uma nova classe trouxe perspectivas para a pecuária brasileira. As lactonas macrocíclicas foram lançadas nos anos 80 (Chabala et al. 1980) na França com ação endectocida, e logo após foram lançadas no Brasil em diversas formulações e concentrações. O primeiro relato de perda de eficácia de ivermectina ocorreu na África do Sul em ovinos (Carmichael et al., 1987) e logo após no Brasil (Echevarria e Trindade, 1989). Em caprinos, o primeiro relato de resistência às ivermectinas no Brasil data da década de 90 no RS (Mattos et al. 1997). Melo et al. (2003) também relataram resistência à ivermectina no CE em ovinos e caprinos, o que sucedeu para uma série de relatos em todo o país.

Com o passar do tempo e o uso de novos fármacos, diversos foram os relatos de resistência múltipla em todo o mundo, principalmente em países com tradição em criação de pequenos ruminantes. No Brasil, Soccol et al. (1996) registraram resistência múltipla em ovinos no estado do Paraná a, além das classes citadas, closantel e disofenol, fármacos até o momento consideradas específicas e eficazes no tratamento de *H. contortus*. Ainda no estado do Paraná, Cunha-Filho et al. (1998) averiguaram resistência à moxidectina, uma milbectina da classe das lactonas macrocíclicas à qual apresentava-se eficaz contra cepas resistentes de ivermectina (Craig et al., 1992). Outros relatos subsequentes de resistência múltipla às lactonas macrocíclicas ivermectina e moxidectina (Conder et al. 1993; Shoop et al., 1993) levantaram a possibilidade de resistência cruzada entre elas (Molento, 1999). Em 2010, Cezar et al. e Cruz

et al. averiguaram resistência, além de outros fármacos, ao nitroxinil, anti-helmíntico de curto espectro e até o momento eficaz para *Haemonchus spp.*.

Devido à falta de lançamento de novas bases, e a situação crescente de RAH em pequenos ruminantes, iniciou-se o uso de combinações de bases com diferentes mecanismos de ação no intuito de atrasar o desenvolvimento de resistência (Smith, 1990; Coles e Roush, 1992). Porém, percebeu-se que essas combinações poderiam falhar principalmente quando já houvesse resistência a uma ou mais fármacos utilizados, sendo a utilização de combinações válida quando inserida em programas integrados de manejo da resistência e pautadas em exames parasitológicos (Leathwick e Besier, 2014). No Brasil, resistência às diversas combinações de antiparasitários foram relatada em ovinos no estado do Paraná por Soccol et al. (1996) e Thomaz-Soccol et al. (2004), no Rio Grande do Sul por Echevarria et al. (1996) e Cezar et al. (2010) e no Mato Grosso do Sul por Sczesny-Moraes et al., 2010 (tabela-1).

Recentemente, lançou-se duas novas classes de anti-helmínticos, um derivado de aminocetronila, de amplo espectro, o monepantel, Zolvix® (Kaminsky et al., 2008) e o derquantel (Startect®), um semissintético spiroindoles, de médio espectro que foi comercializado associado à abamectina (Little et al., 2010; 2011). Sager et al. (2012) averiguaram eficácia de 100% e 95% desses dois produtos respectivamente em cepas de *Haemonchus contortus* resistentes a outros fármacos. Bustamante et al. (2009) averiguaram eficácia de 100% do monepantel em ovinos do Brasil, Argentina e Uruguai. Entretanto, relatos de resistência no mundo já foram feitos ao monepantel (Scott et al., 2013; Mederos et al., 2014; Van de Brom et al., 2015) e derquantel (Kaminsky et al., 2011), mostrando a alta vulnerabilidade dos fármacos. É provável que em breve relatados de resistência a esses anti-helmínticos sejam publicados no Brasil. Sendo assim, o consenso da comunidade científica é de que em meio à alta vulnerabilidade de eficácia dos anti-helmínticos, o tratamento alopático não deve ser a única forma de tratamento antiparasitário, havendo enfoque na correlação com o manejo dos animais, nutrição e formas alternativas de controle.

Tabela 1. Artigos publicados com Resistência Anti-Helmíntica, avaliada pelo Teste de Redução da Contagem de Ovos nas Fezes, em pequenos ruminantes no Brasil:

UF	Anti-helmínticos avaliados	Fármacos com RAH:	Espécie animal	N. fazendas/animais	Fonte
RS	A	A	Ovina	1/27	Dos Santos e Gonçalves (1967);
RS	I	I	Ovina	1/89	Echevarria e Trindade (1989);
CE	O, F, A, Th.	O, F, A, Th	Caprina	1/25	Vieira et al. (1989);
SP	O, I, L	O, I, L	Ovina	9/540	Amarante et al. (1992);
CE	Tr, N e I	Ne, I	Ovina	1 / 20	Vieira et al. (1992);
PR	A, C, L, F, I, Te, Di + Te.	A, C, L, F, I, Te, D + Te	Ovina	6/480	Soccol et al. (1996);
RS	A, L, I, C, A + L	A, L, I, C, A + L	Ovina	182/NI	Echevarria et al. (1996);
RS	I, L, A, F, O, e M	L, A, F, O, M	Ovina	29/870	Farias et al. (1997);
PR	I, A, M	I, A, M	Ovina	10/850	Cunha-Filho et al. (1998);
CE	C, O	C, O	Ovina	1/38	Melo et al. (1998);
CE	I, C	I, C	Caprina	1/29	Melo et al. (1998);
CE	O, L	O, L	Caprina	34/1020	Vieira e Cavalcante (1999);
RS	C, L (8 e 11mg/kg)	C, L (8 e 11mg/kg)	Caprina	1/40	Mattos et al. (2000);
SC	I, L, C, A	I, L, C, A	Ovina	65/7529	Ramos, et al. (2002);
CE	O, L, I	O, L, I	Ovina	16/ 768	Melo et al. (2003);
CE	O, L, I	O, L, I	Caprina	7/336	Melo et al. (2003);
CE	O	O	Ovina	6/144	Melo et al. (2004);
RS	I	I	Caprina	2/12	Mattos et al. (2004);
PR	O, I, C, C + O, L, M	O, I, C, C + O, L, M	Ovina	42/NI	Thomaz-Soccol et al. (2004);
AL	I, A, M	I, A	Caprina	1/40	Ahid et al. (2007);
SP	A+ L + I, M	M	Ovina	1/24	Buzzulini et al. (2007);
SC	I, A, M, C, L	I, A, M, C, L	Ovina	9/450	Rosalinski-Moraes et al. (2007);
PB	A, I, L, M	A, I	Caprina	n/120	Rodrigues et al. (2007);
PR	C + A, I (3,5%)	C + A e I (3,5%)	Ovina	4/120	Cunha-Filho et al. (2008);
RN	A e I.	A, I	Ovina	1/54	Pereira et al. (2008);
RN	A e I.	A, I	Caprina	1/54	Pereira et al. (2008);
MG	A+ I+C, A+ I+C +L+ Selênio	-	Caprina	1/27	Silva et al. (2008);
RS	M, I	I	Ovina	1/30	Bustamante et al. (2009);
PR	Tr e C	C	Ovina	1/27	Falbo et al. (2009);
CE	O.	O	Ovina	18/432	Melo et al. (2009);
CE	O.	O	Caprina	7/168	Melo et al. (2009);
RS	A, I, N, Di, Tr, C, I+ L + A	A, I, N, Di, Tr, C, I+ L + A	Ovina	1/5000	Cezar et al (2010);
RJ	N, D, L, I, A, C, M, F	N, D, L, I, A, C, M, F	Ovina	10/NI	Cruz et al. (2010);
PB	I, L, A	I, L, A	Caprina	8/264	Lima et al. (2010a);

PE	M, I, A	A	Ovina	3/NI	Lima et al. (2010b);
PE	M, I, A	M, I, A	Caprina	6/NI	Lima et al. (2010b);
MS	A, I, L, Tr, M, C, A + I+ L	A, I, L, Tr, M, C, A + I+ L	Ovina	16/120	Sczesny-Moraes et al. (2010);
RN	I, A	I, A	Caprina	30/1350	Coelho et al. (2010);
SP	I, A, M, C, L, Tr	I, A, M, C, L, Tr	Ovina	1/42	Almeida et al. (2010);
SP	I, A, M, C, L	I, A, M, C, L	Ovina	30	Veríssimo et al. (2012);
SP	Tr, I, A, M, C, L	I, A, M, C, L	Ovina	1/42	Chagas et al. (2013);
PR	L (9 mg/kg, 6,75 mg/kg e 4,5 mg/kg)	L (4,5 mg/kg)	Ovina	1/28	Sprenger et al. (2013);
PR	L (9 mg/kg, 6,75 mg/kg e 4,5 mg/kg)	L (9 mg/kg, 6,75 mg/kg e 4,5 mg/kg)	Caprina	1/28	Sprenger et al. (2013);
SC	C, Tr, A, Di, L, M, I, I+ C	C, T, A, L, M, I, I + C	Ovina	1/82	Oliveira et al. (2014);
PR	N, I	N, I	Ovina	1/29	Vila Nova et al. (2014);
PR	Mo	Mo	Ovina	1/30	Cintra et al., 2016
RJ	I, A, M, C, L	I, A, M, C, L	Ovina	22/1500	Salgado et al. (em elaboração).

A: albendazol; O: oxfendazol; F: febendazol; Th: thiabendazol; Te: tetramisol; L: levamisol; D: doramectina; I: ivermectina; M: moxidectina; C: closantel; Tr: triclorfon; N: nitroxinil; Di: disofenol; Ne: netobimin (pré-benzimidazol); Mo: monepantel; (+): associações de fármacos.(NI): dado não informado; (-): não houve fármaco com RAH;

Métodos de diagnóstico de RAH em pequenos ruminantes utilizados no Brasil.

A crescente preocupação com RAH tem levado a uma necessidade de métodos adequados e padronizados para sua detecção (Coles et al., 1992). A obtenção de um diagnóstico preciso e precoce da resistência é importante para auxiliar no controle parasitário, com o objetivo de preservar a vida útil dos anti-helmínticos e limitar o desenvolvimento da resistência parasitária (Taylor et al., 2002; Demeler et al., 2010). Segundo Coles et al. (2006), se existe consenso em retardar o aparecimento da RAH, é necessário ensaios capazes de detectar o status do problema nas fazendas, de tal modo que se possa planejar ações de manejo anti-helmíntico. Ao longo dos anos, os métodos para avaliação de RAH em ruminantes e outros animais vem sendo discutidos pela WAAVP, onde frequentemente estão sendo abordadas metodologias *in vivo*, *in vitro* e, mais recentemente, moleculares (Powers et al., 1982; Coles et al., 1992; Wood et al., 1995 e Coles et al., 2006).

No Brasil, uma preocupação na padronização dos testes vem sendo demonstrada por meio da promoção de cursos e de Manuais técnicos para o diagnóstico de RAH em ruminantes. A EMBRAPA (Empresa Brasileira de pesquisa agropecuária)-Sudeste, vem promovendo cursos de “Metodologias *in vitro* para avaliação de substâncias com potencial

antiparasitário sobre nematoides gastrointestinais de ruminantes” com profissionais de todo o país. A empresa publicou um documento abordando a “Determinação da Eficácia Anti-Helmíntica em Rebanhos Ovinos: Metodologia de Colheita de Amostras e de Informações de Manejo Zoossanitário” (Niciura et al., 2009). Além disso, também foi lançado o “Manual prático de Metodologias de diagnóstico da resistência e da detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes” (Chagas et al., 2011). O documento aborda testes *in vivo* e a colheita de material no campo, incluindo questionários ao produtor, já o manual dá ênfase para ensaios laboratoriais *in vitro* e moleculares. Fortes e Molento (2013) abordaram em uma revisão os avanços e limitações para o diagnóstico de RAH em pequenos ruminantes indicando ser uma necessidade o diagnóstico preciso para a execução do manejo antiparasitário.

As novas ferramentas de biologia molecular podem ser utilizadas, com grande precisão, no diagnóstico de parasitos sensíveis e resistentes (Chagas et al., 2011). Os testes moleculares com base na análise de polimorfismos do gene alvo associadas à resistência, através da utilização de PCR, são altamente sensíveis (Silvestre e Humbert, 2000), não exigem coprocultura e podem complementar os tradicionais métodos de diagnóstico (Nunes et al., 2013). Entretanto, devido ao carácter extremamente poligênico das populações, pesquisadores continuam sendo desafiados a descobrir o mecanismo de resistência dos fármacos e divulgar um ou mais candidatos a marcador específico (Fortes e Molento, 2013). O conhecimento sobre os mecanismos moleculares de RAH ainda limitam-se principalmente aos benzimidazóis (Coles et al., 2006; Taylor et al., 2002), envolvendo uma mutação de fenilalanina em tirosina no gene da Beta-Tubulina (Silvestre e Humbert 2000). Esse polimorfismo também foi associado à resistência às avermectinas mais recentemente (Mottier e Prichard, 2008). No Brasil, Nunes et al. (2013) avaliaram rebanhos de caprinos, ovinos e bubalinos quanto à presença do polimorfismo que confere resistência ao benzimidazol, indicando o diagnóstico molecular como guia de escolha da base anti-helmíntica, antes que estas sejam utilizadas no rebanho. Trabalhos com testes moleculares de RAH no Brasil também foram avaliados, seja com testes em mutações na beta-tubulina (Niciura et al., 2012) ou em avaliações genéticas dos nematoides corroborando com pesquisas de RAH (Dos Santos et al., 2014; Amarante et al., 2014; Brasil et al., 2012).

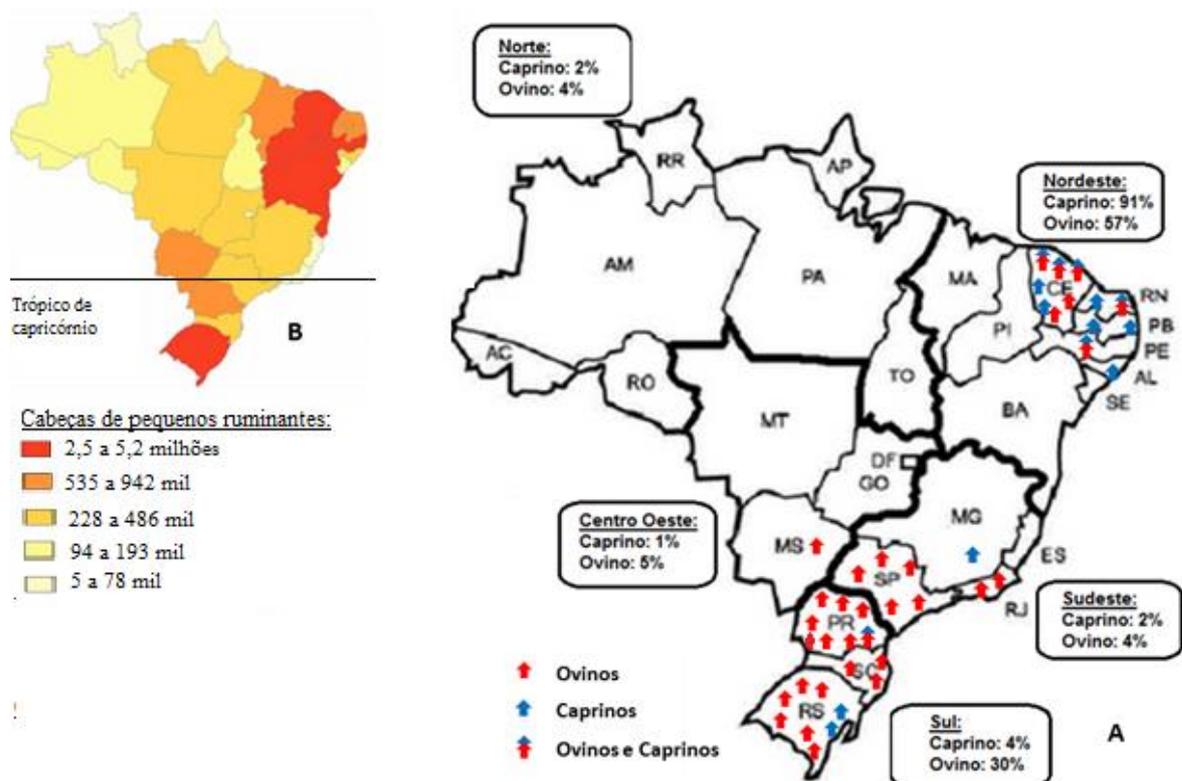
Os testes *in vitro*, também denominados de fenotípicos, foram desenvolvidos para determinar a eficácia de substâncias sobre os parasitos, de acordo com o modo de ação do fármaco ou substância, e também para a identificação de novos princípios ativos (Chagas et al., 2011). As metodologias envolvem a avaliação da inibição da eclodibilidade, motilidade, desenvolvimento e alimentação larvar para nematoides de bovinos, ovinos, caprinos e equinos

(Taylor et al., 2002; Cole et al; 2002; Coles et al., 2006, Álvarez-Sánchez et al., 2005). As avaliações *in vitro* também são utilizadas para confirmar ou colaborar com ensaios efetuados no campo (Vádary et al., 2007). No Brasil, os ensaios *in vitro* são voltados principalmente para a avaliação de plantas com potencial anti-helmíntico. A busca por substâncias naturais com efeito antiparasitário é justificada pela grande falha dos fármacos nos últimos anos em pequenos ruminantes sendo inúmeras plantas e seus extratos testados no país. Em uma revisão sobre o assunto no Brasil, Nery et al. (2009) compilou dados de trabalhos *in vitro* com 64 espécies vegetais, das quais 27 apresentaram eficácia acima de 90% e 15 plantas apresentaram eficácia acima de 95% para inibição do desenvolvimento de trichostrongilídeos, indicando o potencial de pesquisa nessa área em vista da vasta flora nacional.

Os testes *in vivo* avaliam no hospedeiro a redução da carga parasitária seja por meio de necropsia ou exames parasitológicos pós-tratamento anti-helmíntico. O teste controlado da redução da carga parasitária é efetuado após a necropsia do animal e avalia a real situação da eliminação de parasitos no hospedeiro (Wood et al., 1995); porém, tem o limitante da necessidade do abate dos animais e ter alto custo (Boersema, 1983) sendo pouco utilizado (Fortes e Molento, 2013). O teste de redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF) é o método padrão e mais utilizado para a avaliação de eficácia dos animais em campo (Coles et al., 2002; 2006; Taylor, et al., 2002.). Esse método permite a avaliação de vários fármacos ao mesmo tempo e consiste na utilização de grupos de animais medicados com anti-helmínticos que serão submetidos ao exame de contagem de ovos nas fezes (OPG) anterior e posteriormente ao tratamento, sendo considerado eficaz o fármaco que reduzir 95% da carga parasitária (Coles et al., 2006). O TRCOF pode ser realizado com a contagem geral de ovos de strongilídeos (Strongylida) ou de contagem individual de gêneros parasitários por meio de coprocultura (McKenna, 1997). Apesar de muito usual, há várias limitações inerentes às interações hospedeiro, parasito e ambiente (Levecke et al. 2012) e há variantes na fórmula do cálculo (Miller et al. 2006) na necessidade de grupos controle (McKenna et al., 2013 e 2014) e uso de médias aritméticas (Coles et al 1992, 2006) ou geométricas (Smothers et al.1999, Dobson et al., 2009.) no cálculo. Segundo Falzon et al. (2014), os diferentes métodos de cálculo do TRCOF são influenciados pelo nível de RAH e se um viés de correção for utilizado na fórmulas, sendo importante a análise de cada caso. No Brasil, o TRCOF é o mais usado para avaliação de RAH em pequenos ruminantes com inúmeras publicações em várias regiões do país (tabela 1).

Distribuição das pesquisas com RAH no Brasil:

As pesquisas com resistência anti-helmíntica em pequenos ruminantes no mundo estão distribuídas em países onde há maior importância econômica das espécies como é o caso de Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Uruguai e Brasil. Mesmo enfrentando problemas na cadeia produtiva, o Brasil vem se destacando pelo número de pesquisas relacionadas ao assunto (Torres-Acosta et al., 2012) sendo grande produtor de material científico multidisciplinar em ovinos e caprinos (Resende et al., 2010). No território nacional, as pesquisas com resistência anti-helmíntica em pequenos ruminantes, avaliadas pelo TRCOF distribuem-se nas regiões onde há maior número de rebanho de ovinos e caprinos, Sul e Nordeste, ou onde há grandes polos econômicos da atividade como é caso da região Sudeste (Figura 1). A seguir, serão abordadas pesquisas realizadas nessas regiões, sendo os trabalhos publicados no país discriminados na (tabela1).



*Efetivo total do rebanho brasileiro de caprinos: (8.779.213 cabeças) e de ovinos: (17.290.519 cabeças), BGE (2013).

A) Região Nordeste:

O Nordeste possui o maior percentual do rebanho ovino (57%) e caprino (91%) do efetivo nacional sendo a Bahia, Ceará, Pernambuco e Piauí os estados com maiores rebanhos segundo o IBGE (2013). Os sistemas de produção caracterizam-se por subsistência familiar com produção de carne e leite em sua maioria voltada para os programas governamentais de merenda escolar e de combate à desnutrição infantil na população carente (Cardoso et al, 2010). Apesar do clima semi-árido, no curto período chuvoso há problemas com parasitoses devido aos sistemas extensivos e ao manejo sanitário precário (Pinheiro et al, 2000). Sendo assim, há grande número de publicações com RAH em pequenos ruminantes, em especial caprinos, onde o percentual do rebanho segue o mesmo percentual em publicações no Brasil para a espécie (cerca de 90%).

O Ceará (CE) destaca-se no número de publicações com RAH, fato favorecido pela presença de pesquisadores da área e da EMBRAPA caprinos e ovinos neste estado. Vieira et al. (1989), mensuraram a eficácia de quatro benzimidazóis em caprinos após coleta de fezes em horários distintos, observando resistência principalmente contra *H. contortus*. Em outro experimento, Vieira et al (1992), demonstraram a perda de eficácia de ivermectina e um pré-benzimidazol (netobimin) em ovinos trazidos do Sul, levantando a questão de trocas de populações parasitárias entre as regiões. No final dos anos 90, Vieira e Cavalcante (1999), corroboraram com a publicação de 1989 incluindo resultados de resistência do levamisol e oxfendazol em 34 rebanhos caprinos no CE. Melo et al. (1998), averiguaram resistência de ivermectina e closantel em caprinos e de oxfendazol e closantel em ovinos. Resistência ao oxfendazol (Melo et al., 2003; 2004), ao levamisol e ivermectina (Melo et al., 2004) foi averiguada na região do Jaguaribe em ovinos e caprinos. Concluindo esse levantamento, resistência ao oxfendazol foi averiguada em pesquisa a 25 rebanhos do estado (Melo et al., 2009).

O estado do Rio Grande do Norte (RN) tem destaque na produção de leite de cabra, pois foi o pioneiro na adoção de programas governamentais de incentivo a produção. Os testes de eficácia no estado foram feitos primariamente por Pereira et al. (2008), que testaram a eficácia de ivermectina e albendazol em ovinos e caprinos com 7, 14 e 21 dias pós tratamento, averiguando resistência aos dois antiparasitários nas duas espécies em todas as avaliações. Nesse trabalho, a prevalência de nematoides resistentes foi de *Haemonchus*, tanto em ovinos como em caprinos, seguidos de *Strongyloides*, *Trichostrongylus* e *Oesophagostomum*. Esses

dois fármacos também foram testadas por Coelho et al. (2010), no município de Mossoró (RN) em trinta criações de caprinos averiguando-se resistência de *H. contortus* em 90% das propriedades ao albendazol e em 36,6% à ivermectina e de *Trichostrongylus* em 42,8% das propriedades ao albendazol e em 33,3% à ivermectina.

No Nordeste, moxidectina foi testada primariamente em caprinos nos estados do Alagoas - AL (Ahid et al., 2007) e Paraíba - PB (Rodrigues et al., 2007) e, posteriormente em ovinos e caprinos em Pernambuco - PE (Lima et al. 2010b). Sendo esse antiparasitário o que apresentou melhor eficácia às demais citadas até o momento na região, apresentando resistência em algumas propriedades. Levamisol também apresentou eficácia em propriedade de caprinos na PB no Sertão (Rodrigues et al., 2007) e Cariri (Lima et al., 2010a). Após muitos anos sem funcionar, Lima et al. (2010b), relataram a eficácia de ivermectina em ovinos em PE no Município de Vitória de Santo Antão, sendo esse o único relato de eficácia desse anti-helmíntico em ovinos no Brasil na última década. Apesar do expressivo rebanho, a Bahia e Piauí não possuem publicações com artigos em RAH, sendo o único relato na Bahia feito em um resumo de Barreto e Silva (1999) em caprinos avaliando albendazol e ivermectina.

B) Região Sul:

A região Sul possui o segundo maior rebanho de pequenos ruminantes do país com 30% do efetivo de ovinos e 4% de caprinos (IBGE, 2013). Existe a forte presença de ovinos de raças lanadas que são mais adaptados a baixas temperaturas predominantes na região, onde a atividade é destinada para produção de lã e carne. Com clima subtropical, há a possibilidade do uso de sistemas de produção em pastagens o ano todo, com espécies forrageiras tropicais e temperadas (Oliveira et al., 2005); o que do ponto de vista parasitário, aumenta o risco de infecções pelo maior tempo de pastejo dos animais. As raças lanadas, provenientes de outros países, também apresentam maior susceptibilidade endoparasitária em comparação à raça nativa Santa Inês, predominante no Nordeste. Dessa forma, a região apresenta grande número de pesquisas com resistência anti-helmíntica, abrangendo o maior número de fármacos e de animais estudados, com ênfase em ovinos.

O Rio Grande do Sul (RS) é o estado com maior número de publicações com RAH em pequenos ruminantes na região e em ovinos no Brasil, fato ocorrido pelo maior rebanho ovino do país, com cerca de 4.250.932 cabeças, quase o dobro do Bahia que é o segundo colocado (IBGE 2013). O estado foi pioneiro no relato de RAH em pequenos ruminantes no Brasil, feito ao albendazol (Dos Santos e Gonçalves, 1967) e à ivermectina (Echevarria e Trindade,

1989) ambos em ovinos. Este ultimo fármaco, ainda apresentou eficácia em fazendas de ovinos nos anos 90, averiguada por Echevarria et al. (1996) e Farias et al. (1997). Mesmo em combinação, a RAH em ovinos ocorreu para albendazol e levamisol (Echevarria et al., 1996) e para ivermectina, levamisol e albendazol (Cezar et al., 2010). Neste ultimo trabalho, houve resistência do *H. contortus* ao Nitroxinil, Disofenol e Closantel, fármacos de espectro específico para esse nematoide (Cole et al., 2006). O estado também foi pioneiro no teste do Monepantel em pesquisa realizada em países da América do Sul por Bustamante et al. (2009) confirmando a eficácia desse novo fármaco em ovinos. Em caprinos, Mattos et al. (2000) testaram a eficácia de duas doses de levamisol e closantel obtendo resistência principalmente a este ultimo fármaco. Posteriormente, Mattos et al. (2004) testaram a ivermectina nessa espécie obtendo apenas 42% de eficácia.

O Paraná (PR), sétimo estado em rebanho ovino do Brasil (IBGE, 2013), conta com setor de produção organizado na forma de cooperativas às quais dão ênfase ao agronegócio de carne de cordeiro no estado. De maior proximidade com Centro-Oeste e Sudeste, o PR possui clima variado em suas cidades, com chuvas bem distribuídas durante o ano e verões quentes, o que favorece as nematodioses gastrointestinais. O problema de resistência é tão grave nesse estado que Soccol et al. (1996) testarem, em seis cidades, diversos fármacos (Albendazol, Closantel, Levamisol, Febendazol, Ivermectina, Tetramisol, Disofenol mais Tetramisol) e encontraram resistência em ovinos a todas, com melhor funcionamento de levamisol que apenas foi ineficaz na cidade de Campo Largo. Esse trabalho foi pioneiro no Brasil no estudo da combinação de anti-helmínticos e no teste de closantel. Este fármaco, também apresentou ineficácia mesmo combinada ao oxfendazol (Thomaz-Soccol et al., 2004), sendo neste trabalho a melhor eficácia obtida para moxidectina, resultado semelhante encontrado em Londrina por Cunha-Filho et al. (1998). Recentemente, resistência ao Monepantel foi relatada em ovinos no município de Fazenda Rio Grande (Cintra et al., 2016).

Santa Catarina (SC), 11º estado em rebanho ovino Nacional, caracteriza-se com sistemas de produção familiar de ovinos e caprinos, porém organizados e com investimento em tecnologia e genética o que destaca o estado na produção de derivados (Diário Catarinense, 2012). Problemas de RAH foram relatados em um amplo estudo de Ramos et al. (2002) avaliando a atuação de ivermectina (0,2mg/kg), levamisol, closantel e albendazole em 65 rebanhos ovinos realizado em área de abrangente produção ovina no estado (Planalto Sul, Planalto Norte, Meio Oeste e Alto Vale do Itajaí). Esse trabalho foi o que abrangeu o maior número de rebanhos e animais avaliando 7529 ovinos dos quais foram 77% resistentes a ivermectina, 65% albendazole, 13% ao closantel e 15% ao levamisol. Sendo *Haemonchus* o

gênero resistente aos três primeiros fármacos e *Trichostrongylus* ao levamisol. Rosalinski-Moraes et al. (2007), avaliaram a situação de RAH em nove propriedades de ovinos na região Oeste de Santa Catarina com resistência a ivermectina, levamisol, moxidectina e albendazol nas doses de 5 e 10 mg/kg. Oliveira et al. (2014) testaram diversos fármacos em ovinos na cidade de Concórdia, obtendo eficácia apenas do disofenol.

C) Região Sudeste:

A região Sudeste, com 4% do rebanho ovino e 2% do rebanho caprino nacional (IBGE, 2013), é importante centro tecnológico na produção de carne e leite, além de ter destaque no consumo e comércio desses produtos (SEBRAE, 2009). Os rebanhos de ovinos são direcionados para produtos com maior agregação de valor, destacando-se atualmente na produção de cortes especiais de cordeiro. Apesar do pequeno rebanho caprino (207 049 cabeças), a região lidera a produção industrial nacional de leite de cabra, cuja oferta se concentra nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. O Sudeste tem bastante diversidade climática, com verões chuvosos o que possibilita o desenvolvimento do ciclo de nematoides gastrointestinais. Apesar da grande produção leiteira caprina, todas as pesquisas realizadas com RAH na região foram feitas em ovinos, fato explicado pela exploração caprina em sua maioria ser feita em sistemas de produção confinados (Borges, 2003) que limitam as infecções parasitárias.

São Paulo (SP) é o estado com maior rebanho ovino na região, 415.327 cabeças (IBGE, 2013), apresentando nível organizacional na ovinocultura avançado principalmente pela maior complexidade do seu desenvolvimento que agrega importante parque industrial do país. Também é o estado com maior número de publicações com RAH em ovinos na região. Nos anos 90, Amarante et al. (1992) avaliaram nove propriedades de ovinos no Município de São Manuel frente ao oxfendazol, levamisol e ivermectina, obtendo resistência a todos eles. Buzzulini et al. (2007) levantaram a possibilidade do uso de associações de anti-helmínticos ao constatarem eficácia da combinação de levamisol, ivermectina e albendazol em ovinos em Jaboticabal. Almeida et al. (2010) infectaram experimentalmente cordeiros com 4000 larvas de *H. contortus* e de *T. clubriiformis* e averiguaram múltipla resistência, sendo esse o primeiro relato de resistência do *Trichostrongylus* às lactonas macrocíclicas após infecção experimental no Brasil. Veríssimo et al. (2012) avaliaram 30 propriedades de ovinos no estado com cinco fármacos e realizaram um questionário aos produtores, obtendo resistência múltipla justificada pela falhas no manejo antiparasitário. Chagas et al. (2013) infectaram

experimentalmente cordeiros com um cepa de *H. contortus* da EMBRAPA-Sudeste e averiguaram resistência múltipla, exceto ao triclorfon; nesse trabalho os autores levantaram a questão do custo de manutenção de produção de cepas de nematoides em ovinos.

Rio de Janeiro (RJ) e Minas Gerais (MG) juntos tem a maior indústria de laticínios de leite de cabra, sendo o RJ o maior produtor nacional desse produto na forma industrializada, além de ser importante polo consumidor de carne de cordeiro. Em MG, Silva et al. (2008), avaliaram cabras leiteiras na cidade de Viçosa quanto a eficácia da combinação de closantel, albendazol e ivermectina e essa combinação associada ao levamisol, vitamina B1, selênio, cobalto e obtiveram alta eficácia principalmente da segunda combinação. No RJ, há duas publicações com RAH em ovinos que se complementam. Cruz et al. (2010) averiguaram RAH múltipla em 10 rebanhos da região Norte e Noroeste do RJ com casos de resistência às oito fármacos testados (Nitroxinil, Doramectina, Levamisol, Ivermectina, Albendazol, Closantel, Moxidectina e Fenbendazole) e com falhas no manejo antiparasitário averiguado por questionário. Posteriormente, Salgado et al. (em elaboração) averiguaram RAH múltipla em 1500 ovinos de 22 fazendas distribuídas em todo o estado do RJ, incluindo resistência a todos os gêneros prevalentes (*Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Cooperia* e *Oesophagostomum*); neste trabalho, também correlacionou-se o manejo antiparasitário com a ineficácia dos produtos.

D) Regiões Centro-Oeste e Norte:

Essas duas regiões possuem a maior área com aptidão agropecuária do país, fato refletido pela criação de mais da metade do rebanho bovino nacional de 209,541 milhões de cabeças segundo IBGE, 2013. Em pequenos ruminantes, os rebanhos são irrisórios frente ao vasto potencial produtivo, com percentual do efetivo nacional de ovinos e caprinos respectivamente de 5% e 1% no Centro-Oeste e 4 e 2% no Norte. Mesmo assim, superam separadamente o Sudeste em rebanho, porém com poucos estudos em RAH em pequenos ruminantes. O Mato Grosso do Sul (MS) é o estado que tem um artigo publicado na área, tendo grande potencial de crescimento na ovinocultura, principalmente por se situar perto do grande mercado consumidor que é o estado de São Paulo (FAPEC/SEBRAE (2006). Neste estado, Sczesny-Moraes et al. (2010), avaliaram a eficácia de Albendazol, Ivermectina, Levamisol, Triclorfon, Moxidectina, Closantel e da combinação dos três primeiro em 16 fazendas de ovinos. Esse trabalho conclui que a resistência múltipla aos anti-helmínticos já está instalada na maioria dos rebanhos de ovinos do MS, sendo as espécies *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* as mais prevalentes e resistentes aos

antiparasitários. Em Tocantins (TO), um resumo publicado por Jablonski et al. (2009), ao contrário da maioria dos resultados, demonstrou eficácia de ivermectina e albendazol em ovinos na cidade de Palmas.

Evolução das pesquisas e da eficácia dos anti-helmínticos em pequenos ruminantes no Brasil:

A tabela 1 compila os dados com RAH, avaliada pelo TRCOF, em ovinos e caprinos no Brasil. Ao longo de quase 50 anos a RAH vem sendo avaliada no Brasil, o TRCOF foi a metodologia mais utilizada; porém, nos últimos anos atenção especial tem sido dada a outras formas de diagnóstico, principalmente por biologia molecular. A espécie ovina foi a mais estudada, fato justificado por quase o dobro do rebanho ovino em relação ao efetivo caprino brasileiro (IBGE, 2013). Pode-se observar que os fármacos mais avaliados e comuns nos estudos com ovinos e caprinos foram: diversas formulações de benzimidazóis (primeiros anti-helmínticos estudados), levamisol, ivermectina, moxidectina, closantel e associações entre essas. Para ovinos, houve maior gama de fármacos estudados que incluíram, além das citadas, disofenol, nitroxinil, triclofor, doramectina e monepantel. Esses anti-helmínticos são de uso mais recente (monepantel e doramectina) ou possuem baixa margem de segurança (disofenol, nitroxinil e triclofor), o que limita o estudo, sendo realmente testados em ocasiões onde houve insucesso no teste dos antiparasitários convencionais.

A tabela 2 apresenta uma compilação das pesquisas com RAH em pequenos ruminantes no Brasil ao longo dos anos (de 1967 a 2015), demonstrando os fármacos que apresentaram melhor índice de eficácia em relação às demais estudadas. Pode-se observar que a partir de 2007 aumentou o número de pesquisas com RAH em pequenos ruminantes no Brasil, com enfoque no ano de 2010 em que houve o maior número de publicações envolvendo principalmente ovinos. Nessa época, o Brasil destacou-se no assunto em artigos de revisão sobre RAH na América (Torres-Acosta et al., 2012) e na América Latina (Molento et al., 2011). De 2007 a 2014 houve o maior número de publicações com testes de eficácia de associações de anti-helmínticos em pequenos ruminantes no Brasil (Tabela 2). Nesta época, no mundo, frente ao grave problema de RAH, houve forte discussão por medidas alternativas de controle ao uso único de alopatia (Hoste e Torres-Acosta, 2011) ou formas de tratamento seletivo (van Wyk et al., 2006; Molento et al., 2009; Kenyon et al., 2009; Mederos et al., 2014; Leathwick e Besier., 2014). No mesmo período, a indústria lançou duas novas

formulações no mercado que foi o monepantel (Zolvix®) e o derquantel (Startect®) justificando a preocupação Global com o problema de RAH em pequenos ruminantes.

Tabela 2. Anti-helmínticos que apresentaram melhor índice de eficácia, pelo Teste de Redução da Contagem de Ovos nas fezes, em pesquisas realizadas no Brasil ao longo dos anos (1967 a 2016).

Espécie	Anti-helmíntico	Ano																		
		67	89	92	96	97	98	99	00	02	03	04	07	08	09	10	12	13	14	16
Ovina	I		*	X	X	X										X				
	M						X				X					XXX				
	A		*											X						
	O										*				*					
	L			X	X						X	X				X	X	X		X
	C						X		X											
	Tr			X											X	X		X		
	Di																			X
	N																			X
	Mo															X				X
	Assoc.												X	X		XX				
	Caprina	I									X	*					X			
M												XX				X				
A			X											X						
O			X				X								*					
L									X		X				X			*		
C							X													
Assoc.														X						

A: albendazol; O: oxifendazol; L: levamisol; I: ivermectina; M: moxidectina; C: closantel; Tr: triclorfon; N: nitroxinil; Di: disofenol; Mo: monepantel; Assoc. = associações de fármacos. Para análise foi considerada o anti-helmínticos que obteve maior índice de eficácia em relação aos demais estudados, não necessariamente sendo eficaz (>95%).

(Índice de Eficácia): fármaco que apresentou melhor percentual de eficácia anti-helmíntica, não necessariamente tendo 95% de eficácia. Houve trabalhos com mais de um anti-helmíntico com melhor índice de eficácia.

X = anti-helmíntico com melhor eficácia.

* = Pesquisas realizadas com único anti-helmíntico não havendo comparativo de eficácia.

X: Salgado et al. em processo de publicação.

Ivermectina, moxidectina, albendazol, levamisol e closantel foram os anti-helmínticos que apresentaram eficácia em pelo menos uma pesquisa realizada em ovinos e caprinos.

Triclorfon, nitroxinil, disofenol e monepantel só foram eficazes para ovinos, porém só foram estudados nessa espécie. O organofosforado triclorfon tem apresentado alta eficácia em estudos com RAH no Brasil onde é comercializado (Tabela 2), provavelmente porque é pouco utilizada devido a alta toxicidade (Almeida et al., 2010), sendo em muitos países não liberado para uso em ruminantes (Coles et al., 2006). Nitroxinil e disofenol, assim como closantel, são fármacos de espectro específico para *H. contortus* (Coles et al., 2006), tendo potencial de eficácia apenas em fazendas onde há grande prevalência desse parasito. Destas, closantel é de uso mais antigo e com maior número de relatos de RAH, inclusive para *H. contortus* (Cezar et al., 2010; Salgado et al., em elaboração). Monepantel, recentemente lançado, está ainda em processo de estudo no Brasil onde o relato de eficácia foi feito primariamente por Bustamante et al. (2009) ao estudarem ovinos dos países da América Latina. Recentemente, um caso de resistência do monepantel foi reportado contra *T. colubriformis* em ovinos no Paraná (Cintra et al., 2016).

Os benzimidazóis (principalmente o albendazol) que são a classe mais antiga dos fármacos estudados, foram os anti-helmínticos mais pesquisados desde os anos 60 (Dos Santos et al., 1967) até atualmente (Salgado et al., em elaboração). O albendazol apresentou melhor eficácia em caprinos (Vieira et al., 1989) apenas quando comparado aos demais benzimidazóis ou quando comparado à ivermectina em teste realizado em ovinos e caprinos por Pereira et al (2008); mesmo assim, não ultrapassou 70% de eficácia neste trabalho. Da mesma forma, Oxfendazol apenas apresentou eficácia em caprinos comparando-o aos outros benzimidazóis (Vieira et al., 1989) ou foi eficaz em 1 fazenda a mais que o levamisol em estudo de Vieira e Cavalcante (1999). Em ovinos, o oxfendazol foi estudado isoladamente por Melo et al. (2004; 2009) com baixos índices de eficácia ao longo dos anos no CE. De maneira geral, os benzimidazóis apresentam diminuição progressiva na eficácia nos últimos anos em pequenos ruminantes no Brasil, fato justificado por serem fármacos antigos, de uso frequente devido ao amplo espectro e baixo custo. Resultados de baixa eficácia dos benzimidazóis vêm sendo corriqueiramente relatados no Brasil e no Mundo, desde a década de 60 onde houve o primeiro relato.

Das lactonas macrocíclicas, a mais estudada foi ivermectina que é o antiparasitário mais utilizado no Brasil, de ação endectocida estando presente em mais de 65 tipos de formulações havendo muita variabilidade na qualidade e preço e pouca restrição na compra (Molento., 2004). Por consequência do seu uso excessivo, nota-se que a eficácia diminuiu ao longo dos anos, principalmente em ovinos em que os relatos de eficácia datam dos anos 90 e os relatos mais recentes de eficácia foram feitos apenas no Nordeste do país. Melo et al. (2003)

averiguaram eficácia de ivermectina em 7 de 17 fazendas de ovinos do Ceará, neste trabalho o levamisol foi superior sendo eficaz em 10 fazendas; mesmo assim, é o maior relato de eficácia da ivermectina em ovinos no país após anos 90. Após esse período, Lima et al. (2010b) averiguaram eficácia da ivermectina em apenas 1 propriedade de ovinos localizada em Vitória do Santo Antão no estado de PE. Em caprinos, os melhores índices de eficácia de ivermectina nos últimos anos também foram obtidos no Nordeste no CE e RN respectivamente por Melo et al. (2003) e Coelho et al. (2010). A região Sul do Brasil, que foi pioneira no relato de RAH à ivermectina (Echevarria e Trindade, 1989), teve melhor índice de eficácia desse fármaco até o final dos anos 90 (Amarante et al., 1992; Echevarria et al., 1996; Farias et al., 1997). A partir desse período, baixa eficácia de ivermectina em pequenos ruminantes vem sendo relatada frequentemente (Ramos, et al., 2002; Mattos et al., 2004; Thomaz-Soccol et al., 2004; Cezar et al., 2010; Cunha-Filho et al., 2008; Vila Nova et al., 2014) e o mesmo ocorrendo com a Região Sudeste (Cruz et al., 2010; Almeida et al., 2010; Veríssimo et al., 2012; Chagas et al., 2013; Salgado et al., em elaboração).

Moxidectina é lactona macrocíclica que apresentou melhores índices de eficácia em pequenos ruminantes no Brasil. Na tabela 2 pode-se observar que ela foi o anti-helmíntico com melhor índice de eficácia (isoladamente) em cinco pesquisas com ovinos (Cunha-Filho et al., 1998; Thomaz-Soccol et al., 2004; Cezar et al., 2010; Lima et al.; 2010b; Sczesny-Moraes et al., 2010) e em 3 com caprinos (Ahid et al., 2007; Rodrigues et al., 2007; Lima et al.; 2010b). Apesar de mecanismos de ação semelhante à ivermectina, superioridade da eficácia da moxidectina em cepas resistentes à ivermectina foi observada por diversos trabalhos no mundo (Barnes et al., 2001; Vickers et al., 2001; Lloberas et al., 2013). Segundo Prichard et al. (2011) a diferença na eficácia entre esses dois antiparasitários deve-se a diferentes interações em canais iônicos dependentes de glutamato, onde atuam, além de diferentes níveis de expressão de proteínas ABC. Porém, essas proteínas podem ocasionar resistência cruzada entre os dois anti-helmínticos, devido a uma superexpressão de glioproteína P ao uso corriqueiro de ivermectina, o que pode influenciar na eficácia de moxidectina (Lloberas et al. 2013). Esse fato pode explicar a baixa eficácia de moxidectina em trabalhos recentes no Brasil (Buzzulini et al., 2007; Rosalinski-Moraes et al., 2007; Veríssimo et al., 2012; Oliveira et al., 2014; Salgado et al., 2015), onde ivermectina é amplamente usada. Na tabela 2 pode-se perceber que moxidectina não mais se destacou nos índices de eficácia nos últimos 5 anos, apontando o uso excessivo no período anterior que levou a ineficácia em muitas propriedades de pequenos ruminantes nos dias atuais.

Levamisol, apesar de ser um fármaco antigo e com relatos primários de resistência desde os anos 70 no mundo e no Brasil (Le Jambre et al., 1976; Santiago et al., 1977), é o anti-helmíntico com maiores relatos de eficácia ao longo dos anos no Brasil, inclusive nas pesquisas recentes. Tendo no país o maior índice de eficácia em relação aos demais fármacos testados em 8 estudos realizados com ovinos (Amarante et al., 1992; Soccol et al. 1996; Melo et al., 2003; Rosalinski-Moraes et al., 2007; Cruz et al., 2010; Veríssimo et al., 2012; Sprenger et al., 2013; Salgado et al., em elaboração) e 3 com caprinos (Mattos et al., 2000; Rodrigues et al., 2007; Lima et al., 2010a). Maior eficácia do levamisol em comparação aos demais antiparasitários estudados também foi obtida no Canadá (Falzon et al., 2013); Dinamarca (Pena-Espinoza et al., 2014) e Austrália (Lyndal-Murphy et al., 2014). É válido ressaltar que o levamisol teve maior índice de eficácia em comparação com os demais anti-helmínticos, entretanto não foi totalmente eficaz (95%) na maioria dos estudos, tendo inclusive diversos relatos de resistência a esse fármaco. Mesmo assim, teve maior manutenção da eficácia em relação aos demais antiparasitários no Brasil. O levamisol tem alvos em receptores colinérgicos atuando como agonista, o que induz a paralisia espástica do nematoide (Lanusse, 1996). Os estudos sobre testes moleculares de RAH ao levamisol ainda são recentes, Martin et al. (2012) abordaram os receptores envolvidos no alvo do levamisol à diferentes nematoides, indicando ser muito ampla a gama e a plasticidade dos subtipos de receptores colinérgicos sendo a resistência associada a perda de expressão ou condutância desses receptores nas membranas do nematoide, o que varia consideravelmente entre espécies parasitárias e entre outros antiparasitários com mecanismos de ação semelhantes. Com tal complexibilidade, estudos de mecanismos de resistência do levamisol associados ao seu histórico de uso, são importantes ferramentas no entendimento da manutenção e perda de eficácia desse anti-helmíntico. Roulfe (1990), já havia levantado a questão de porque esse anti-helmíntico mesmo sendo utilizado de forma indiscriminada ainda tem manutenção de eficácia, sugerindo esforços para a descoberta desses mecanismos.

Conclusão:

O grande número de pesquisas com RAH no Brasil reflete a preocupação do país que tem potencial de produção e almeja a organização da cadeia produtiva de ovinos e caprinos. A vasta publicação com RAH em pequenos ruminantes em todo o Mundo colabora para diretrizes no controle da situação. Para isso, é necessário que haja uma análise desses estudos com fatores peculiares a cada caso, com intuito de se avaliar a correlação do diagnóstico com

número de rebanho, práticas de manejo, espécie animal, espécie parasitária, fármaco utilizado e clima. A frequência de uso e a manutenção da eficácia dos anti-helmínticos ao longo dos anos são fatores importantes no entendimento de mecanismos de resistência, porém são pouco relatados nos estudos atuais. A eficácia calculada por gênero ou espécie de nematoide é essencial para estudos de combinações de fármacos ou com novos antiparasitários. Apesar de muitos limitantes, o TRCOF ainda é o mais utilizado e viável no país, sendo necessária uma padronização considerando as diferenças entre fazendas. Com alta vulnerabilidade e poucas perspectivas no lançamento de novos anti-helmínticos, as práticas de manejo não só devem ser avaliadas no diagnóstico de RAH, como devem fazer parte dos sistemas de controle antiparasitário. Os testes de eficácia *in vitro* e moleculares são grandes promissores no diagnóstico rápido e preciso de RAH, mas devem envolver o conhecimento da realidade do campo para que possam se tornar viáveis ao produtor. A análise dos estudos de campo pode nortear estudos moleculares, um exemplo disso é a manutenção, ao longo dos anos, de eficácia de alguns antiparasitários nos testes *in vivo*, sugerindo estudos específicos que podem contribuir para o prolongamento da eficácia dos anti-helmínticos.

Referências:

- AHID, S. M. M.; CAVALCANTE, M. D. A.; BEZERRA, A. C. D.; SOARES, H. S.; PEREIRA, R. H. M. K. Anthelmintic effectiveness in goats from Alagoas State, Brazil. **Acta Veterinaria Brasílica**, v. 1, p. 56-59, 2007.
- ALMEIDA, F.A.; GARCIA, K.C.O.D.; TORGERSON, P.R.; AMARANTE, A.F.T. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v. 59, p. 622–625, 2010.
- ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, M. A.; PÉREZ GARCÍA, J.; BARTLEY, D.; JACKSON, F.; ROJOVÁZQUEZ, F.A. The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. **Experimental Parasitology**, v. 110, p. 56–61, 2005.
- AMARANTE, A. F. T.; BARBOSA, M. A.; OLIVEIRA, M. A. G.; CARMELLO, M. J.; PADOVANNI, C. R. Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e Ivamisol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 29, p. 31-8, 1992.
- AMARANTE, M. R. V.; BASSETO, C. C.; NEVES, J.H.; AMARANTE, A.F.T. Species-specific PCR for the identification of *Cooperia curticei* (Nematoda: Trichostrongylidae) in sheep. **Journal of Helminthology**, v. 88, p. 447-452, 2014.
- BARGER, I. A. Control strategies minimising the use of anthelmintics. In: Petersen, G. (Ed.), Proceedings of 25th Sheep and Beef Cattle Seminar, Publication No. 165, Veterinary Continuing Education. Massey University, Palmerston North, New Zealand, pp. 59-66, 1995.

- BARNES, E. H.; DOBSON, R. J.; STEIN, P. A.; LE JAMBRE, L. F.; LENANE, I. J. Selection of different genotype larvae and adult worms for anthelmintic resistance by persistent and short-acting avermectin/milbemycins. **International Journal for Parasitology**, v.15, p. 720–727, 2001.
- BARRETO, M. A.; SILVA, J. S. Avaliação da resistência de nematódeos gastrintestinais em rebanhos caprinos do estado da Bahia – (Resultados Preliminares). *In: Seminário brasileiro de parasitologia veterinária dos países do Mercosul, I Simpósio de controle integrado de parasitos de bovinios*. Salvador. 160, 1999.
- BLOUIN, M. S.; YOWELL, C. A.; COURNTEY, C. H.; DAME, J. B. Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. **Genetics**, v.14, p. 1007–1014, 1995.
- BOERSEMA, J.H. Possibilities and limitations in the detection of anthelmintic resistance. *In: Facts and Reflections IV: Resistance of Parasites to Anthelmintics*. A workshop held at the Central Veterinary Laboratory, p. 207–218, 1983.
- BRASIL, B. S. A. F.; NUNES, R. L.; BASTIANETTO, E.; DRUMMOND, M. G.; CARVALHO, D.C.; LEITE, R. C.; MOLENTO, M. B.; OLIVEIRA, D. A. A. Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 42, p. 469-479, 2012.
- BUSTAMANTE, M.; STEFFAN, P. E.; MORLÁN, J. B.; ECHEVARRIA, F.; FIEL, C. A.; CARDOZO, H.; CASTELLS, D.; HOSKING, B. C. The efficacy of monepantel, an amino-acetonitrile derivative, against gastrointestinal nematodes of sheep in three countries of southern Latin America. **Parasitology Research**, v. 106, p. 139–144, 2009.
- BUZZULINI, C.; SOBRINHO, A. G. S.; COSTA, A. J.; SANTOS, T. R.; BORGES, F. A.; SOARES, V. E. Eficácia anti-helmíntica comparativa da associação albendazole, levamisole e ivermectina à moxidectina em ovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 42, p. 891-895, 2007.
- CARDOSO, M. C. C.; DANTAS, A. N. A.; FELIX, C. B. N. Sistema de produção e comercialização do leite de cabra produzido no Município de Currais Novos/ RN. **Holos**. V. 1, p. 31-40, 2010.
- CARMICHAEL, I.; VISSER, R.; SCHNEIDER, D.; SELL, M. *Haemonchus contortus* resistant to ivermectin. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 58, p. 93, 1987.
- CEPEA: Evolução da Caprino/ Ovinocultura. Acessado em março de 2015. Disponível em: http://www.canaldoprodutor.com.br/sites/default/files/ativos_ovcapr_01_0.pdf. Acesso em: 10/11/2015.
- CEZAR, A. S.; TOSCANA, G.; CAMILLO, G.; SANGIONI, L. A.; RIBAS, H. O.; VOGEL, F. S. F. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 157–160, 2010.
- CEZAR, A. S.; TOSCANA, G.; CAMILLO, G.; SANGIONI, L.A.; RIBAS, H.O.; VOGEL, F.S.F. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 157–160, 2010.
- CHABALA, J. C.; MROZIK, H.; TOLMAN, R. L.; ESKOLA, P.; LUSI, A.; PETERSON, L. H.; WOODS, M. F.; FISHER, M. H. Ivermectin, a new broad-spectrum antiparasitic agent. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 1134-1336, 1980.

- CHAGAS A.C.S.; NICIURA S.C.M.; MOLENTO M.B. 2011. Manual Prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF. 153.
- CHAGAS, A. C. S.; KATIKI, L. M.; SILVA, I. C., GIGLIOTI, R., ESTEVES, S. N., OLIVEIRA, M. C. S., JÚNIOR, W. B. *Haemonchus contortus*: A multiple-resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. **Parasitology International**, v.62, p. 1–6, 2013.
- CHARLES, T.P.; POMPEU, J.; MIRANDA, D. B. Efficacy of Three Broad-spectrum Anthelmintics against Gastrointestinal Nematode Infections of Goats. **Veterinary Parasitology**, v. 34, p. 71-75, 1989.
- CHARLIER, J.; MORGAN, E. R.; RINALDI, L.; VAN DIJK, J.; DEMELER, J.; HÖGLUND, J.; HERTZBERG, H. VAN RANST B.; HENDRICKX, G.; VERCRUYSSSE, J.; KENYON, F. Practices to optimise gastrointestinal nematode control on sheep, goat and cattle farms in Europe using targeted (selective) treatments. **Veterinary Record**, v; 175, p. 250-255, 2014.
- CINTRA, M. C. R.; TEIXEIRA, V. N.; NASCIMENTO, L. V.; SOTOMAIOR, C. S. Lack of efficacy of monepantel against *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.216, p. 4-6,
- COELHO, W. A. C.; AHID, S. M. M.; VIEIRA, L. S.; FONSECA, Z. A. A. S.; SILVA, I. P. Resistência anti-helmíntica em caprinos no município de Mossoró, RN. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, p. 589-599, 2010.
- COLES, G.C.; JACKSON, F.; POMROY, W.E.; PRICHARD, R.K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M.A.; VERCRUYSSSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 167–185, 2016.
- COLES, G.C.; ROUSH, R.T. Slowing the spread of anthelmintic resistant nematodes of sheep and goats in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v. 130, p. 505–510, 1992.
- CONDER, G.A.; THOMPSON, D.P.; JOHNSON, S.S. Demonstration of co-resistance of *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin. **Veterinary Record**, v. 132, p. 651–652, 1993.
- CRAIG, T.M.; HATFIELD, T.A.; PANKAVICH, J.A.; WANG, G.T. Efficacy of moxidectin against an ivermectin-resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 41, p. 329–333, 1992.
- CRUZ, D.G.; ROCHA, L.O.; ARRUDA, S.S.; PALIERAQUI, J.G.B.; CORDEIRO, R.C.; SANTOS JUNIOR, E.; MOLENTO, M.B.; SANTOS, C.P. Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 340–343, 2010.
- CUNHA FILHO, L. F. C.; CRISTINE, G. S. T. F.; GRECCO, A. R.; GUERRA, J. L. Efficacy of the Association of Closantel Albendazol and Ivermective 3,5 in the Control of Ovine Elmintosis in Northern Paraná State. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 10, p. 23-28, 2008.
- CUNHA-FILHO, L. F. C.; PEREIRA, A. B. L.; YAMAMUA, M. H. Resistência a anti-helmínticos em ovinos da região de Londrina-Paraná-Brasil. **Semina Ciencia Agrária**, v. 19, p. 31-37, 1998.

- DEMELER, J.; KUTTLER, 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**, v. 170, p. 61–70, 2010.
- DIARIO CATARINENSE: Acessado em março de 2015. Disponível em: <http://diariocatarinense.clicrbs.com.br/sc/economia/noticia/2012/09/ovelhas-ganham-espaco-em-sc-com-precos-diferenciados-3872004.html>
- DOBSON, R. J.; SANGSTER, N. C.; BESIÉ, R. B.; WOODGATE, R. G. Geometric means provide a biased efficacy result when conducting a faecal egg count reduction test (FECRT). **Veterinary Parasitology**, v. 161, p.162–167, 2009.
- DOS SANTOS, V. T.; GONÇALVES, P. C. Verificação de estirpe resistente de *Haemonchus* resistente ao thiabendazole no Rio Grande do Sul (Brasil). **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária**, v. 9, p. 201-209, 1967.
- DRUDGE, J. H.; SZANTO, J.; WYATT, Z. N.; ELAN, G. Field studies on parasite control in sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. **American Journal Veterinary Research**, v. 25, p. 1512-1518, 1964.
- ECHEVARRIA, F.; BORBA, M.F.S.; PINHEIRO, A.C.; WALLER, P.J.; HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 199–206, 1996.
- ECHEVARRIA, F.A.M.; TRINDADE, G.N.P. Anthelmintic resistance by *Haemonchus contortus*, to ivermectin in Brazil: A preliminary report. **Veterinary Record**, v. 124, p. 147-148, 1989.
- FALZON, L. C.; O'NEILL, T. J.; MENZIES, P. I.; PEREGRINE, A. S.; JONES-BITTON, A.; VAN LEEUWEN, J.; MEDEROS, A. A systematic review and meta-analysis of factors associated with anthelmintic resistance in sheep. **Preventive Veterinary Medicine**, v.15, p. 388-402, 2014.
- FALZON, L.C.; MENZIES, P.I.; SHAKYA, K.P.; JONES-BITTON, A.; VANLEEUEWEN, J.; AVULA, J.; STEWART, H.; JANSEN, J.T.; TAYLOR, M.A.; LEARMOUNT, J.; PEREGRINE, A.S. Anthelmintic resistance in sheep flocks in Ontario, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 193, p. 150–162, 2013.
- FAPEC/SEBRAE. 2006. Proposta de elaboração de estudo da cadeia produtiva da ovinocultura em Mato Grosso do Sul. Campo Grande: FAPEC/SEBRAE. 97.
- FARIAS, M.T.; BORDIN, E.L.; FORBES, A.B.; NEWCOMB, K. A survey on resistance to anthelmintics in sheep stud farms of southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 72, p. 209–214, 1997.
- FLEMING, S. A.; CRAIG, T.; KAPLAN, R. M.; MILLER, J.E.; NAVARRE, C.; RINGS, M. Anthelmintic Resistance of Gastrointestinal Parasites in Small Ruminants. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, p. 435–444, 2006.
- FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 1391-1402, 2013.
- GEURDEN, T.; HOSTE, H.; JACQUIET, P.; TRAVERSAC, D.; SOTIRAKI, S.; REGALBONOE, A. F.; TZANIDAKIS, N.; KOSTOPOULOU, D.; GAILLAC, C.; PRIVAT, S.; GIANGASPEROF, A.; ZANARDELLOG, C.; NOÉA, L.; VANIMISSETTI, B.; BARTRAMI, D. Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-

- intestinal nematodes in France, Greece and Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 201, p. 59–66,
- GREEN, P. E.; FORSYTH, B. A.; ROWANS, K. J.; PAYN, G. The isolation of a Field. strain of *Haemonchu contortus* in Queensland showing multiple anthelmintic resistance. **Australian Vererinary Journal**, v. 57, p. 79-84, 1981.
- GRISI, L., R LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, p. 150-156, 2014.
- HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J.F. Non chemical control of helminths in ruminants: adapting solutions for changing worms in a changing world. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 144–154, 2011.
- HOSTE. H.; TORRES-ACOSTA, J. F. J. Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 144–154, 2011.
- IBGE. Produção da Pecuária Mundial. Brasil. 38. 2013.
- JABLONSKL, B. M.; SOBRINHO, P. A. M.; VALADARES, R. R.; FERNANDES, C. H. C.; RAMOS, T. R.; MENEZES, D. C. R.; FILHO, E. B. O. Avaliação da eficácia do albendazol e ivermectina contra helmintos gastrintestinais em rebanhos de ovinos e caprinos na microrregião de Palmas- TO. In XVI Jornada Científica, Interdisciplinaridade, In dissociáveis saberes. Disponível em: http://www.unitins.br/portal/pesquisa/arquivos/pibic/artigos_2009.pdf, 2009.
- KAMINSKY, R.; BAPST, B.; STEIN, P. A.; STREHLAU, G. A.; ALLAN, B. A.; HOSKING, B. C.; ROLFE, P. F.; SAGER, H. Differences in efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against multi-resistant nematodes of sheep. **Parasitology Research**, v. 109, p. 19–23, 2011.
- KAMINSKY, R.; DUCRAY, P.; JUNG, M.; CLOVER, R.; RUFENER, L.; BOUVIER, J.; WEBER, S. S.; WENGER, A.; WIELAND-BERGHAUSEN, S.; GOEBEL, T.; GAUVRY, N.; PAUTRAT, F.; SKRIPSKY, T.; FROELICH, O.; KOMOIN-OKA, C.; WESTLUND, B.; SLUDER, A.; MÄSER, P.A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. **Nature**, v. 452, p. 176– 180, 2008.
- KASSAI, T. 1999. Veterinary Helminthology. Butterworth & Heineann, Oxford, 260 p.
- KEANE, O. M.; KEEGAN, J. D.; GOOD , B.; WAAL, T.; FANNING, J.; GOTTSTEIN, M.; CASEY, M.; HURLEY, C.; SHEEHAN, M. High level of treatment failure with commonly used anthelmintics on Irish sheep farms. *Irish Veterinary Journal*. 67, 16, 2014.
- KELLY J, D.; HALL, C. A. Resistance of animal helminths to anthelmintics. **Adv Pharmacol Chemother**, v. 16, p. 89-128. [http://dx.doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60243-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60243-4). PMID:382801, 1979.
- KENYON, F.; A. W.; COLES, C. G.; CRINGOLI, G.; PAPADOPOULOS , E.; CABARETF, J.; BERRAG, B.; VARADY, M.; VAN WYK, J. A.; THOMAS, E.; VERCRUYSSSE, J.; JACKSON, F. The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 3–11, 2009.

- KETTLE, P.R.; VLASSOFF, A.; REID, T.C.; HORTON, C.T. A survey of nematode control measures used by milking goat farmers and of anthelmintic resistance on their farms. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 31, p. 139-143, 1983.
- KNOX, M.R.; BESIÉ, R.B.; LE JAMBRE, L.F.; KAPLAN, R.M.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; MILLER, J.; SUTHERLAND, I. Novel approaches for the control of helminth parasites of livestock VI: Summary of discussions and conclusions. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 143–149, 2012.
- LANUSSE, C. E. Farmacologia dos compostos antihelmínticos. *In*: Controle dos nematódeos gastrintestinais, v. 1, p. 44, 1996.
- LE JAMBRE, L. F.; SOUTHCOOT, W.H.; DASH, K. M. Resistance of selected line of *Haemonchus contortus* to thiabendazole, morantel tartrate and levamisole. **Journal Parasitology**, v. 6, p. 217-222, 1976.
- LEATHWICK, D.M.; BESIÉ, R.B. The management of anthelmintic resistance in grazing ruminants in Australasia—Strategies and experiences. **Veterinary Parasitology**, v. 204, p. 44–54, 2014.
- LELAND, S. E.; DRUDGE, J. H.; WYANT, Z. N.; ELAM, G.W. Strain variation in the response of sheep nematodes to the action of phenothiazine. III. Field observations. **American Journal of Veterinary Research**. 18, 851-860, 1957.
- LEVECKE, B.; DOBSON, R.J.; SPEYBROECK, N.; VERCRUYSSÉ, J.; CHARLIER, J. Novel insights in the faecal egg count reduction test for monitoring drug efficacy against gastrointestinal nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.188, p. 391–396, 2012.
- LIMA, M. M., FARIAS, M. P. O., ROMEIRO, E. T., FERREIRA, D. R. A., ALVES, L. C., FAUSTINO, M. A. G. 2010 (b). Eficácia da moxidectina, ivermectina e albendazole contra helmintos gastrintestinais em propriedades de criação caprina e ovina do estado de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, p. 94-100, 2010 (b).
- LIMA, W. C.; ATHAYDE, A. C. R.; MEDEIROS, G. G.; LIMA, D. A. S. D.; BORBUREMA, J. B.; SANTOS, E. M.; VILELA, V. L. R.; AZEVEDO, S. S. Nematóides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 1003-1009, 2010 (a).
- LITTLE, P. R.; HODGE, A.; MAEDER, S. J.; WIRTHERLE, N. C.; NICHOLAS, D. R.; COX, G. G.; CONDER, G. A. Efficacy of a combined oral formulation of derquantel–abamectin against the adult and larval stages of nematodes in sheep, including anthelmintic-resistant strains. **Veterinary Parasitology**, v.181, p. 180–193, 2011.
- LITTLE, P. R.; HODGE, A.; WATSON, T.G.; SEED, J.A.; MAEDER, S.J. Field efficacy and safety of an oral formulation of the novel combination anthelmintic, derquantel–abamectin, in sheep in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 58, p. 121–129, 2010.
- LITTLE, P. R.; HODGES, A.; WATSON, T.G.; SEED, J. A.; MAEDER, S.J. Field efficacy and safety of an oral formulation of the novel combination anthelmintic, derquantel–abamectin, in sheep in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**. 58, 121-129, 2010.
- LLOBERAS, M.; ALVAREZ, L.; ENTROCASSO, C.; VIRKEL, G.; BALLENT, M.; MATE, L.; LANUSSE, C.; LIFSCHITZ, A. Comparative tissue pharmacokinetics and efficacy of moxidectin, abamectin and ivermectin in lambs infected with resistant

- nematodes: Impact of drug treatments on parasite P-glycoprotein expression. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 3, p. 20–2, 2013.
- LUTU, W.Z. Internal parasitism in milk goats in Kenya. **Tropical Animal Health and Production**, v. 16, p. 153-157, 1983.
- LYNDAL-MURPHY, M.; SWAIN, A. J.; PEPPER, P. M. Methods to determine resistance to anthelmintics when continuing larval development occurs. **Veterinary Parasitology**, v. 199, p. 191–200, 2014.
- MARTIN, R. J.; ROBERTSON, A. P.; BUXTON, S. K.; BEECH, R. N.; CHARVET, C. L.; NEVEU, C. Levamisole receptors: a second awakening. **Trends in Parasitology**, v. 28, p. 289-296, 2012.
- MATTOS, M. J. T.; OLIVEIRA, C. M. B.; GOUVEA, A. S.; ANDRADE, C. B. *Haemonchus resistente* à lactona macrocíclica em caprinos naturalmente parasitados. **Ciência Rural**, v. 34, p. 879-883, 2004.
- MATTOS, M. J. T.; SCHMIDT, V.; BASTOS, C. D. Ovicidal activity of two medicaments against goat gastrointestinal nematode in RS, Brazil. **Ciência Rural**, v. 30, p. 893-895, 2000.
- MATTOS, M.J.T.; GERMER, M.; CASTRO, E.S. Eficácia do ivermectin sobre endoparasitos de caprinos, no RS. In: Congresso estadual de Medicina Veterinária, Gramado, RS. *Anais...Gramado: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul*. 198, 1997.
- MCKENNA, P. B. Further studies on the necessity or otherwise of multiple pre-treatment groups in faecal egg count reduction tests in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 200, p. 212–215, 2014.
- MCKENNA, P.B. Are multiple pre-treatment groups necessary or unwarranted in faecal egg count reduction tests in sheep? **Veterinary Parasitology**, v.196, p. 433–437, 2013.
- MCKENNA, P.B. Further potential limitations of the undifferentiated faecal egg count reduction test for the detection of anthelmintic resistance in sheep. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 45, p. 244–246, 1997.
- MCKENNA, P.B. Gastro-intestinal parasitism and "anthelmintic resistance" in goats. **Surveillance**, v. 1, p. 2-4, 1984.
- MEDEROS, A.; KELTON, D.; PEREGRINE, A. S.; VANLEEUEWEN, J.; FERNÁNDEZ, S.; LEBOEUF, A.; MENZIES, P.; MARTIN, R. Evaluation of the utility of subjective clinical parameters for estimating fecal egg counts and packed cell volume in Canadian sheep flocks. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 568–574, 2014.
- MEDEROS, E.; RAMOS, Z.; BANCHERO, G. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay América. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 598-602, 2014.
- MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L.; REIS, I. F. Resistência aos anti-helmínticos benzimidazóis em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes no Semiárido Nordeste brasileiro. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 294-300, 2009.
- MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L.; SELAIVE, A. V.; GIRÃO, M. D. Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes from sheep and goats, in Pentecoste county, State of Ceará. **Ciência Animal**, v. 8, p. 7-11, 1988.

- MELO, A. C. F. L.; REIS, I. S.; BEVILAQUA, C. M. L.; VIEIRA, L. S.; ECHEVARRIA, F. A. M.; MELO, L. M. Nematódeos resistentes a antihelmínticos em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, p. 339-344, 2003.
- MELO, A. C. F. L.; RONDONN, S.; REIS, I. S.; F. C. M.; BEVILAQUA, C. M. L. Desenvolvimento da resistência ao oxfendazol em propriedades rurais de ovinos na região do Baixo e Médio Jaguaribe, Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p.137-141, 2004.
- MILLER, C. M.; WAGHORN, T. S.; LEATHWICK, D. M.; GILMOUR, M. L. How repeatable is a faecal egg count reduction test? **New Zealand Veterinary Journal**, v. 54, p. 323-328, 2006.
- MOLENTO, M. B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 229–234, 2009.
- MOLENTO, M. B. Resistência em Helminthos de Ovinos e Caprinos. 2004. *In* XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, Ouro Preto, MG, 2004.
- MOLENTO, M. B., WANG, G. T., PRICHARD, R. K. Decreased ivermectin and moxidectin sensitivity in *Haemonchus contortus* selected with moxidectin over 14 generations. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 77–81, 1999.
- MOLENTO, M.B.; FORTES, F.S.; PONDELEK, D.A.S.; BORGES, F.A.; CHAGAS, A.C.S.; TORRES-ACOSTA, J.F.; GELDHOF, P. Challenges of nematode control in ruminants: focus on Latin America. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 126–132, 2011.
- MOLENTO, M.B.; GAVIÃO, A. A.; DEPNER, R. A.; PIRES, C.C. Frequency of treatment and production performance using the FAMACHA® method compared with preventive control in ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 314–319, 2009.
- MOTTIER, M. L.; PRICHARD, R. K. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. **Pharmacogenet Genomics**, v. 18, p. 128–140, 2008.
- NABUKENYA, I.; RUBAIRE-AKIIKI, C.; OLILA, D.; MUHANGI, D.; HÖGLUND, J. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in goats and evaluation of FAMACHA diagnostic marker in Uganda. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 666–675, 2014.
- NERY, P. S.; DUARTE, E. R.; MARTINS, E. R. Eficácia de plantas para o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes: revisão de estudos publicados. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, p. 330-338, 2009.
- NICIURA, S. C. M.; VERÍSSIMO, C. J.; GROMBONI, J. G. G.; ROCHA, M. I. P.; MELLO, S. S.; BARBOSA, C. M. P.; CHIEBAO, D. P.; CARDOSO, D.; SILVA, G.S.; OTSUK, I. P.; PEREIRA, J. R.; AMBROSIO, L.A.; NARDONH, R.F.; UENO, T.E.H.; MOLENTO, M.B. F200Y polymorphism in the -tubulin gene in field isolates of *Haemonchus contortus* and risk factors of sheep flock management practices related to anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 608–612, 2012.
- NICIURA, S. C. M.; VERÍSSIMO, S. J.; MOLENTO, M.B. Determinação da Eficácia Anti-Helmintica em Rebanhos Ovinos: Metodologia de Colheita de Amostras e de Informações de Manejo Zoossanitário. EMBRAPA Pecuária Sudeste, documento 91. Disponível em: <http://www2.cppse.embrapa.br/080servicos/070publicacao gratuita/documentos/Documentos91.pdf/view>, 2009.

- NUNES, R. L.; SANTOS, L. L., BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, D. A. A.; BRASIL, B. S. A. F. Frequency of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* populations isolated from buffalo, goat and sheep herds. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 548-553, 2013.
- OLIVEIRA, M. P.; RODRIGUES, R. M. C. Carne ovina: quando começou a ser explorada e como estamos hoje? 2010. Farm Point. Acesso em março de 2015. Disponível em: <http://www.farmpoint.com.br>.
- OLIVEIRA, P. A.; PINTO, D. M.; RUAS, G. L.; SANTOS, T. R. B.; PAPPEN, F. G.; SALVADEGO, T. A.; BORBA, T. C.; FERIGOLLO, A. Eficácia de diferentes fármacos no controle parasitário em ovinos. **Science and Animal Health**, v. 2, p. 126-136, 2014.
- OLIVEIRA, P. P. A.; PRIMAVESI, A. C.; CAMARGO, A. C.; RIBEIRO, W. M.; SILVA, E. T. M. Recomendação da sobressemeadura de aveia forrageira em pastagens tropicais e subtropicais irrigada. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste. 7. Embrapa Pecuária Sudeste. Comunicado técnico, v. 61, 2005.
- PENA-ESPINOZA, M.; THAMSBORG, S. M.; DEMELER, J.; HEIDI, L. E. Field efficacy of four anthelmintics and confirmation of drug-resistant nematodes by controlled efficacy test and pyrosequencing on a sheep and goat farm in Denmark. **Veterinary Parasitology**, v. 206, p. 208–215, 2014.
- PEREIRA, R. H. M. K.; AHID, S. M. M.; BEZERRA, A. C. D. S.; SOARES, H. S.; FONSECA, Z. A. A. S. Diagnosis of nematodes gastrointestinal resistance to antihelminthic in goats and sheep from Rio Grande do Norte state, Brazil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, p. 16-19, 2008.
- PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F.; HADDAD, J. A. P. Epidemiological aspects of the raising goat in Ceará State, Brazil. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 52, 2000.
- PLAYFORD, M. C.; SMITH, A. N.; LOVE, S., BESIER, R. B.; KLUVERD, P.; BAILEY, J. N. Prevalence and severity of anthelmintic resistance in ovine gastrointestinal nematodes in Australia (2009–2012). **Australian Veterinary Journal**. v. 92, 2014.
- POWERS, K. G.; WOOD, I. B.; ECKERT, J.; GIBSON, T.; SMITH, H. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) Guidelines for Evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). **Veterinary Parasitology**, v. 10, p. 265-284, 1982.
- PRICHARD, R. K.; HALL, C. A.; KELLY, J. D.; MARTINS, I. C. A.; DONALD, A. D. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, 1980.
- PRICHARD, R.; MÉNEZ, C.; LESPINE, A. Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 134–153, 2012.
- PRIHARD, R.K.; HALL, C.A.; KELLY, J.D.; MARTI. I.C.A.; DONALD, A.D. The problems of anthelmintic resistance in nematodes. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, 1980.
- RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; ÁVILA, V. S.; COUTINHO, G. C.; SOUZA, A. P. Gastrointestinal parasites resistance in sheep to some anthelmintics in Santa Catarina state, Brazil. **Ciência Rural**, v. 32, p. 473-477, 2002.

- RESENDE, K. T.; TEIXEIRA, I. A. M. A.; BIAGIOLI, B.; LIMA, L. D.; BOAVENTURA NETO, O.; PEREIRA JUNIOR, J. D. Progresso científico em pequenos ruminantes na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 369-375, 2010.
- RODRIGUES, A. B.; ATHAYDE, A. C. R.; RODRIGUES, O. G.; SILVA, W. W.; FARIA, E. B. Sensibilidade dos nematóides gastrintestinais de caprinos a Sensibilidade dos nematóides gastrintestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do Sertão P anti-helmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 162-166, 2007.
- ROSALINSKI-MORAES, F.; MORETTO, L. H.; BRESOLIN, W. S.; GABRIELLI, I.; KAUFER, L.; ZANCHET, I.K.; SONAGLIO, F.; THOMAZ-SOCCOL, V. Resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos da região da associação dos municípios do alto Irani (AMAI), Oeste de Santa Catarina. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, p. 559–565, 2007.
- SAGER, H.; BAPST, B.; STREHLAU, G. A.; KAMINSKY, R. Efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against adult stages of a multi-resistant *Haemonchus contortus* isolate. **Parasitology Research**, v. 111, p. 2205-2207, 2012.
- SALGADO, J. A.; CRUZ, L. V., ROCHA, L. O., SANTOS, L. L., BRASIL, B. S. A., NUNES, R. L., OLIVEIRA, D. A. A., TACONELI, C. A., SANTOS, C. P. Detection of multidrug resistance to anthelmintics in sheep using phenotypic and genotypic integrated approach. **Em processo de submissão**.
- SANTIAGO, M., COSTA, U. C., BENEVENGA, S. 1977. *Trichostrongylus coluibriformis* resistente ao levamisol. **Revista Centro de Ciências Rurais**. 7, 421-422.
- SANTOS, M. C.; AMARANTE, M. R. V.; SILVA, M. R. L.; AMARANTE, A. F. T. Differentiation of *Haemonchus placei* from *Haemonchus contortus* by PCR and by morphometrics of adult parasites and third stage larvae. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** (Online), v. 23, p. 495-500, 2014.
- SANTOS, M. C.; AMARANTE, M. R. V.; SILVA, M. R. L.; AMARANTE, A. F. T. Differentiation of *Haemonchus placei* from *Haemonchus contortus* by PCR and by morphometrics of adult parasites and third stage larvae. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 495-500, 2014.
- SCOTT, I.; POMROY, W. E.; KENYON, P. R.; SMITH, G.; ADLINGTON, B.; MOSS, A. Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p. 166–171, 2013.
- SCZESNY-MORAES, E. A.; BIANCHIN, I.; SILVA, K. F.; CATTO, J. B.; HONER, M. R.; PAIVA, F. Resistência anti-helmíntica de nematóides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 30, 229-236.
- SEBRAE. Informações de Mercado sobre Caprinos e Ovinos – Relatório Completo. Série Mercado. Acessado em março, 2015. Disponível em: <http://www.biblioteca.sebrae.com.br>, 2010.
- SHOOP, W.; HAINES, H.; MICHAEL, B.; EARY, C. Mutual resistance to avermectins and milbemycins: oral activity of ivermectin and moxidectin against ivermectin-resistant and susceptible nematodes. **Veterinary Record**, v. 133, p. 445–447, 1993.
- SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; OLIVEIRA, A. C.; CARVALHO, R. O.; ARAÚJO, J. M.; CASTEJON F. V. Avaliação da eficácia de compostos anti-helmínticos sobre nematoides parasitos gastrintestinais (Strongyloidea) de caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 120-125, 2008.

- SILVESTRE A.; HUMBERT J.F. A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites. **Experimental Parasitology**, v. 95, p. 271-276, 2000.
- SMITH, G. A mathematical model for the evolution of anthelmintic resistance in a direct life cycle nematode parasite. **International Journal for Parasitology**, v. 20, p. 913–921, 1990.
- SMOTHERS, C. D.; SUN, F.; DAYTON, A. D. Comparison of arithmetic and geometric means as measures of a central tendency in cattle nematode populations. **Veterinary Parasitology**, v. 81, p. 211–224, 1999.
- SOCCOL, V. T.; SOTOMAIOR, C.; SOUZA, F. P.; CASTRO, E. A.; PESSOA SILVA, M. C.; MILCZEWSKI, V. Occurrence of resistance to anthelmintics in sheep in Parana State, Brazil. **Veterinary Record**, v. 139, p. 421-422, 1996
- SPRENGER, L. K., AMARAL, C. H., FILHO, R. V. L. 2013. AGUIAR, T. N., MOLENTO, M. B. Eficácia do fosfato de levamisol em nematoides gastrintestinais de caprinos e ovinos. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, p. 29-39, 2013.
- STEAR, M.J.; SINGLETON, D.; MATTHEWS, L. An evolutionary perspective on gastrointestinal nematodes of sheep. **Journal of Helminthology**, v. 85, p. 113–120, 2011.
- SUTER, R.J.; BESIÉR, R.B.; PERKINS, N.R.; ROBERTSON, I.D.; CHAPMAN, H.M. Sheep-farm risk factors for ivermectin resistance in *Ostertagia circumcincta* in Western Australia. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 63, p. 257–269, 2004.
- TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, v. 103, p. 183–194, 2002.
- THOMAZ-SOCCOL, V.; DE SOUZA, F.P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E.A.; MILCZEWSKI, V.; MOCELIN, G.; PESSOA E SILVA, M.C. Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, p. 41–47, 2004.
- TORRES-ACOSTA, J. F. J.; DZUL-CANCHE, U.; AGUILAR-CABALLERO, A. J.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I. Prevalence of benzimidazole resistant nematodes in sheep flocks in Yucatan, Mexico. **Veterinary Parasitology**, v. 114, p. 33–42, 2003.
- TORRES-ACOSTA, J.F.J.; MENDOZA-DE-GIVES, P.; AGUILAR-CABALLERO, A.J.; CUÉLLAR-ORDAZ, J. A. Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. **Veterinary Parasitology**, v. 189, p. 89-96, 2012.
- VÁDARY, J. A.; CUDEKOVA, P.; COBRA, J. *In vitro* detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*: egg hatch test versus larval development test. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 104-110, 2007.
- VAN DEN BROM, R.; MOLL, L.; KAPPERT, C.; VELLEMA, P. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 209, p. 278-280, 2015.
- VAN WYK, J. A.; HOSTE, H.; KAPLAN, R. M.; BESIÉR, R. B. Targeted selective treatment for worm management-How do we sell rational programs to farmers? **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 336–346, 2006.
- VAN WYK, J. A.; MALAN, F. S.; RANDLES, J. L. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? **Veterinary Parasitology**, v. 70, p. 111-122, 1997.

- VERÍSSIMO, C. J.; NICIURA, S. C. M.; ALBERTI, A.L.; RODRIGUES, C.F.C.; BARBOSA, C. M. P.; CHIEBAOE, D. P.; CARDOSO, D.; SILVA, G.S.; PEREIRA, J. R.; MARGATHOI, L. F. F.; COSTA, R. L. D.; NARDON, R. F.; UENOK, T. E. H.; CURCIF, V. C. L. M.; MOLENTO, M. B. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 209–216, 2012.
- VICKERS, M.; VENNING, M.; MCKENNA, P. B.; MARIADASS, B. Resistance to macrocyclic lactone anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* in sheep in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 49, p. 101–105, 2001.
- VIEIRA, L. S.; BERNE, M. E. A.; CAVALCANTE, A. C. R.; COSTA, C. A. F. *Haemonchus contortus* resistance to ivermectin and netobimin in Brazilian sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 45, p. 111-116, 1992.
- VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, p. 99-103, 1999.
- VIEIRA, L.S.; GONÇALVES, P.C.; COSTA, C.A.E.; BERNE, M.E.A. Redução e esterilização de ovos de nematódeos gastrintestinais em caprinos medicados com anti-helmínticos benzimidazóis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 24, p. 1255-1265, 1989.
- VILA NOVA, L. E.; COSTA, M. E.; MELO, P. G. C. F.; CUNHA FILHO, L. F. C.; BARCA JUNIOR, F. A.; SILVA, L. C.; OKANO, W.; BOGADO, A. L. G. Resistência de nematoides aos anti-helmínticos nitroxinil 34% e ivermectina 1% em rebanho ovino no município de São João do Ivaí, Paraná. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 08, p. 160 – 171, 2014.
- WAGHORN, T.S.; LEATHWICK, D.M.; RHODES, A.P.; LAWRENCE, K.E.; JACKSON, R.; POMROY, W.E.; WEST, D.M.; MOFFAT, J.R. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep farms in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 54, p. 271–277, 2006.
- WOOD, L. B.; AMARA, N. K.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J. L.; KASSAI, T.; MALONE, J. B.; PANKAVICH, J. A.; REINECKE, R. K.; SLOCOMBE, O.; TAYLOR, S. M.; VERCRUYSSSE, J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology**, v. 58, p. 181-213, 1995.
- ZANZANI, S. A.; GAZZONIS, A. L.; CERBO, A. D.; VARADY, A.; MANFRED, A. T. Gastrointestinal nematodes of dairy goats, anthelmintic resistance and practices of parasite control in Northern Italy. **BMC Veterinary Research**, v. 10, p. 114, 2014.

3) ARTIGO 2:

CARACTERIZAÇÃO PRODUTIVA DOS OVINOS DO RIO DE JANEIRO E SEU EFEITO NA INFECÇÃO POR NEMATOIDES GASTROINTESTINAIS.

Resumo:

O conhecimento da prevalência de nematoides gastrointestinais associado às características produtivas do rebanho é importante no entendimento das parasitoses em pequenos ruminantes. Este trabalho buscou caracterizar a produção ovina no estado do Rio de Janeiro e seu efeito na infecção por nematoides gastrointestinal mensurada pela contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e prevalência de gêneros de nematoides. Considerou-se o efeito de sistema de produção, raça, finalidade da criação, grau de anemia pelo método Famacha, escore de condição corporal (ECC), peso dos animais e região do estado. Assim, de 40-75 ovelhas adultas da raça predominante foram avaliadas em 22 fazendas de ovinos distribuídas em todas as regiões do estado, totalizando 1222 animais. O rebanho de ovinos analisados foi composto principalmente por animais da raça Santa Inês (86%) criados em sistemas de produção semi-intensivo com o uso predominante de pasto e para a finalidade de carne. A média geral de OPG dos animais do rebanho foi de 827, sendo que 74% dos animais apresentaram OPG positivo. Entre os positivos, 69 % tiveram infecção leve (até 1000 OPG), 15% infecção moderada (de 1000 a 2000 OPG) e 16% infecção maciça ou grave (acima de 2000 OPG). O OPG foi superior nos animais das regiões Noroeste e dos Lagos com médias de OPG de 1656 e 851 respectivamente. O percentual médio de gêneros encontrados nas 22 fazendas foi de 75% *Haemonchus* spp., 20% *Trichostrongylus* spp., 3% *Cooperia* spp. e 2% de *Oesophagostomum* spp. Apenas uma fazenda, localizada em Angra dos Reis, apresentou maior percentual de *Trichostrongylus* spp. (76%) em relação à *Haemonchus* spp. (24%). Os animais com maior Famacha apresentaram maior OPG ($\hat{\theta}_1 = 0.442$; $P < 0.001$) enquanto os mais pesados apresentaram menor OPG ($\hat{\theta}_2 = -0.016$; $P = 0.001$). 46% do rebanho obteve ECC baixo, porém esta variável não se correlacionou com o OPG. A alta taxa de infecção parasitária no rebanho ovino analisado do Rio de Janeiro foi favorecida pela alta prevalência de *Haemonchus* spp., baixa condição nutricional dos animais e o uso de pastagens nos sistemas de produção.

Palavras chaves: escore de condição corporal, Famacha, ovinos, OPG, nematoides gastrointestinais.

Abstract:

Knowledge of the prevalence of gastrointestinal nematodes associated with the production characteristics of the herd is important in the understanding of the gastrointestinal nematodiasis in small ruminants. This study aimed to characterize the sheep production in the state of Rio de Janeiro and its effect on infection with gastrointestinal nematodes measured by egg per gram of faeces (EPG) and prevalence of nematode genera. It was considered the effect of production system, race, purpose of creation, anaemia by Famacha method, body condition score (BCS), weight of the animals, and region of the state. Thus, 40-75 ewes the predominant race were evaluated in 22 sheep farms distributed in all regions of the state, totaling 1222 animals. The sheep flock of Rio de Janeiro was mainly composed of animal Santa Ines (86%) created in semi-intensive production systems with the predominant use of pasture and for the purpose of meat. The general EPG of herd animals was 827, with 74% of

animals showed positive EPG. Among the positive animals, 69% showed tenuous infection (up to 1000 EPG), 15% moderate infection (1000-2000 EPG) and 16 % severe infection (above 2000 EPG). The EPG was higher in animals of Northwest and Lakes regions with mean of the EPG of 1656 and 851 respectively. The average percentage of genus found in 22 farms was 75% *Haemonchus* spp., 20% *Trichostrongylus* spp., 3% *Cooperia* spp. and 2% of *Oesophagostomum* spp. Only one farm, located in Angra dos Reis, had a higher percentage of *Trichostrongylus* spp. (76%) against *Haemonchus* spp. (24%). Animals with higher Famacha showed higher EPG ($\theta_{_1} = 0.442$; $P < 0.001$) while the heavier animals had lower EPG ($\theta_{_2} = -0.016$, $P = 0.001$). 46% of the herd showed BCS down, but this variable did not correlate with the EPG. The high rate of parasitic infection in sheep flock of Rio de Janeiro was favored by the high prevalence of *Haemonchus* spp., low nutritional status of animals and the use of pastures in production systems.

Key words: body condition score, EPG, Famacha, gastrointestinal nematodes, sheep.

Introdução:

As infecções por nematoides gastrointestinais são o maior limitante na ovinocultura mundial ocasionando grande morbidade e mortalidade (Falzon et al. 2014, Gasser et al., 2016). Ovinos são infectados por uma gama de nematoides que ocasionam diferentes patologias de acordo com a prevalência dos gêneros. Em países de clima tropical, *Haemonchus contortus* é o parasito de maior prevalência e é altamente patogênico por seu hábito hematófago que ocasiona anemia (Khan et al. 2003; Raza et al., 2016). Outros nematoides dos gêneros *Trichostrongylus*, *Cooperia* e *Oesophagostomum* ocasionam diarreia e perda progressiva de peso (Amarante et al., 2014). As perdas na produção ovina também ocorrem devido às infecções subclínicas (Zajac, 2006), havendo diminuição na produção de leite, carne e lã (Mavrot et al., 2015). O controle dessas enfermidades se dá principalmente pelo uso de anti-helmínticos que são altamente vulneráveis devido ao problema de resistência dos nematoides a estes fármacos (Kaplan, 2004; Waller, 2006; Zivikova et al., 2016)

Em meio às perdas produtivas e à dificuldade de controle, abordagens mais amplas têm sido dadas enfocando a relação parasito/hospedeiro, controle estratégico e precisão no diagnóstico (Charlier et al., 2014, Besier et al., 2016). Dessa forma, maior entendimento do ambiente e sistema produtivo como um todo tem sido requerido para propor formas alternativas de controle. A análise parasitária do rebanho sob a influencia do clima (Idika et al., 2013; Matinez-Valadares, 2013), raça (Amarante et al., 2004) e pastagens (Santos et al. 2012; Tonini et al., 2015; Merlim et al., 2016.) tem agregado conhecimentos importantes para o manejo antiparasitário. Ainda, o fortalecimento do sistema imune e o efeito da condição nutricional dos animais nas defesas às parasitoses estão cada vez mais relevantes (Hoste et al., 2016). Assim, o diagnóstico das taxas de infecção, dos sinais clínicos dos

animais e a caracterização produtiva do rebanho são primordiais na compreensão da epidemiologia parasitária e medidas auxiliares de controle.

O conhecimento epidemiológico das espécies de parasitos prevalentes e mais patogênicos em cada região apoiam as práticas de manejo antiparasitário (Souza et al., 2013). Segundo Rinaldi et al. (2015), o mapeamento dos nematoides gastrointestinais são importantes fatores para limitar o impacto das parasitoses e garantir saúde, bem-estar-animal e produtividade. A principal forma de monitoramento parasitário ainda é a realização de exames coproparasitológicos como a contagem de ovos por grama de fezes e a identificação de gêneros prevalentes (Ueno e Gonçalves, 1998; Coles et al., 2006). Porém, estes exames não são particularmente sensíveis e devem ser interpretados em conjunto com informações sobre o estado nutricional, idade e manejo dos rebanhos ovinos (Atlija et al., 2016). Com o monitoramento parasitológico dos rebanhos, é possível o acompanhamento das oscilações parasitológicas, observações sobre as tendências no uso de anti-helmíntico e melhoria da prestação de serviços no campo (Kozaruk et al., 2015). O estado do Rio de Janeiro carece de uma análise conjunta na ovinocultura que leve em consideração as características produtivas dos animais com o grau de infecção parasitária e os sinais clínicos das parasitoses. Dado a importância e necessidade do tema, este trabalho buscou caracterizar a produção ovina no estado do Rio de Janeiro e seu efeito na infecção por nematoides gastrointestinais.

Material e Métodos:

Local e data:

O experimento foi conduzido no estado do Rio de Janeiro (Sudeste do Brasil) entre outubro de 2011 a julho de 2014, avaliando rebanhos de 22 fazendas de ovinos (Figura 1) localizadas nas seguintes cidades: Paraíba do Sul, Sapucaia, Vassouras, Areal, Angra dos Reis, Resende, Rio Claro, Magé, São Pedro da Aldeia, Araruama, Maricá, São Francisco de Itabapoana, São João da Barra, Rio de Janeiro (Campo Grande), Cardoso Moreira e São José de Ubá; Campos dos Goytacazes; Paty do Alferes; Teresópolis.

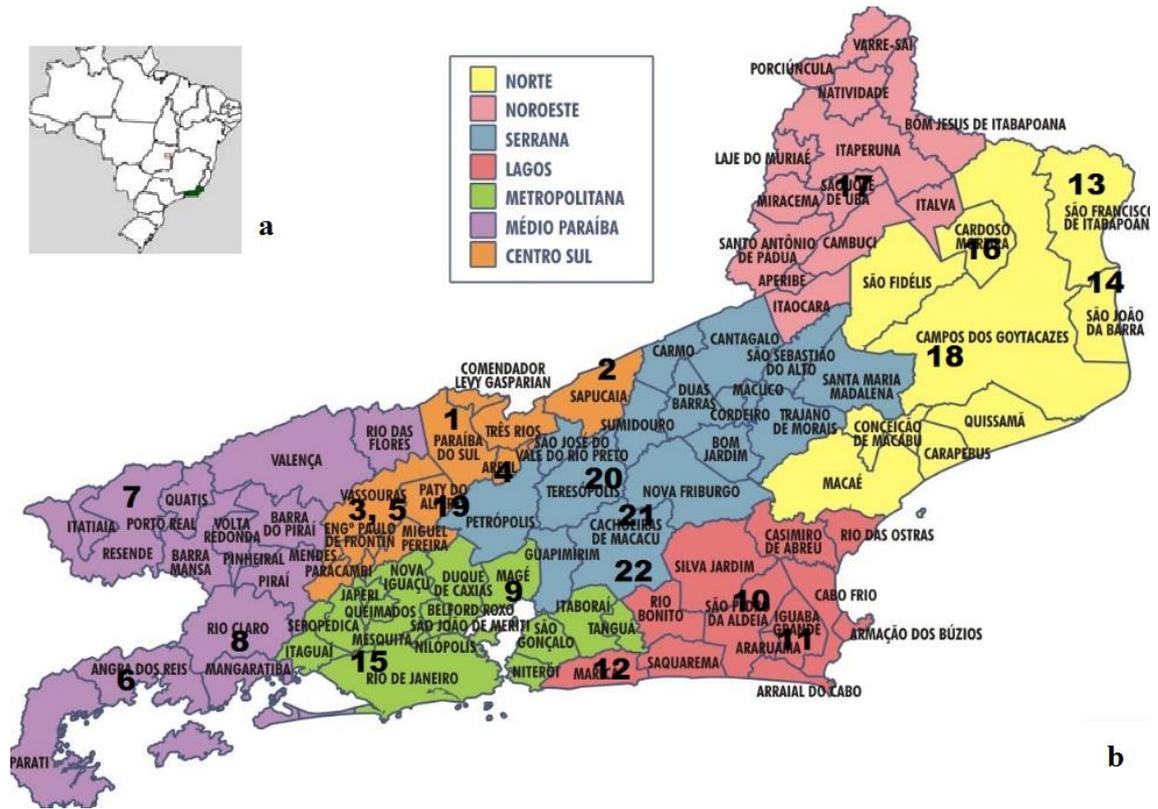


Figura 1. a. Localização do estado do Rio de Janeiro no Brasil. **b.** Localização das 22 fazendas de ovinos avaliadas no estado do Rio de Janeiro. Municípios: (1) Paraíba do Sul, (2) Sapucaia, (3 e 5) Vassouras, (4) Areal, (6) Angra dos Reis, (7) Resende, (8) Rio Claro, (9) Magé, (10) São Pedro da Aldeia, (11) Araruama, (12) Maricá, (13) São Francisco de Itabapuna, (14) São João da Barra, (15) Rio de Janeiro, (16) Cardoso Moreira, (17) São José de Ubá, (18) Campos dos Goytacazes, (19) Paty de Alferes, (20) Teresópolis e (21 e 22) Cachoeiras de Macacu.

Animais:

Em cada fazenda, foram avaliadas entre 40-75 ovelhas adultas, não prenhas, da raça predominante, totalizando 1222 animais. O número de animais avaliados por fazenda e por região pode ser observado na tabela 1.

Avaliações:

a) Exames coproparasitológicos: foram realizadas coletas de fezes intra-retal e posterior realização de OPG (contagem de ovos por grama de fezes). Foram contabilizados ovos do tipo *strongiliformes* pela técnica de Gordon e Whitlock (1939). As fezes positivas foram agrupadas, dentro de cada propriedade, sendo submetidas à coprocultura de acordo com a técnica adaptada de Roberts e O'Sullivan (1950) e posterior classificação morfológica das larvas para obtenção dos gêneros parasitários de acordo com Van Wyk et al. (2004).

b) Famacha: os animais foram avaliados no grau de anemia pelo método Famacha o qual pontua a coloração da mucosa ocular numa escala de um a cinco, em que um corresponde ao menor grau e cinco ao maior grau de anemia (van Wyk e Bath, 2002). Esse método foi criado para detectar a anemia causada pelo parasito hematófago *H. contortus*.

c) ECC (score de condição corporal): avaliação da condição nutricional dos animais apalpando-se as apófises transversas e espinhosa das vértebras lombares, a deposição de músculo e gordura de forma a pontuar os animais de um a cinco, sendo um o animal excessivamente magro e cinco o excessivamente gordo (Russel et al., 1969).

d) Pesagem dos animais: individualmente no período da manhã sem o jejum prévio.

e) Características produtivas do rebanho (Tabela 1): foram averiguadas de acordo com entrevista aos produtores rurais e observação dos animais e das propriedades: raças predominantes em cada fazenda; sistemas e finalidade de produção.

Tabela 1. Características das fazendas de ovinos avaliadas no estado do Rio de Janeiro.

REGIÕES	REBANHOS		CARACTERÍSTICAS PRODUTIVAS		
	Fazenda	n ¹	Raças	Sistemas	Finalidades
Centro Sul	1	61	SI ²	Semi. P ⁶	Corte/genética
	2	60	SI	Semi. P	corte
	3	62	SI	Extensivo	corte
	4	75	PD ³ , SI	Extensivo	corte
	5	56	LC ⁴	Semi. C ⁷	leite
	19	40	LC	Semi C	leite
Total	6	354			
Sul	6	55	SI, D ⁵	Semi. C	genética
	7	57	SI	Semi C	corte
	8	56	SI	Semi. P	Corte/genética
Total	3	168			
Baixada	9	54	SI	Semi. P	corte
	15	55	SI	Semi C	corte
Total	2	109			
Lagos	10	58	SI	Semi. P	corte
	11	60	SI, D	Semi. P	corte
	12	45	D	Semi. C	genética
Total	3	163			
Norte	13	50	SI	Semi. P	corte
	14	70	SI	Semi. P	corte
	16	58	SI, D	Semi. P	corte
	18	50	SI, D	Semi C	Corte/genética
Total	4	228			
Noroeste	17	60	SI	Semi. P	corte
	20	50	SI	Semi. P	corte
	21	40	SI	Confinamento	Sangue ⁸
	22	50	SI	Semi. P	corte
Total	4	200			
TOTAL GERAL	22	1222			

¹Número de animais avaliado por propriedade;²Santa Inês;³Pool Doseit;⁴Lacaune;⁵Dorper;⁶Semi-intensivo com predominância de pasto;⁷Semi-intensivo com predominância de confinamento;⁸extração de sangue para fins laboratoriais.

Análise Estatística:

A variável OPG foi transformada para log de $x + 10$ para atingir normalidade e foi analisada por meio do seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijklmpq} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \gamma_{k(j)} + \delta_{l(jk)} + \eta_{m(jkl)} + f_{p(jklm)} + \theta_1 X_1 + \theta_2 X_2 + \theta_3 X_3 + e_{ijklmpq}$$

No qual $Y_{ijklmpq}$ corresponde à contagem de OPG efetuada no q -ésimo ovino da p -ésima fazenda onde se cria a m -ésima raça segundo o l -ésimo sistema de criação e com a k -ésima finalidade de produção em cada uma das j -ésimas regiões do estado e durante as estações chuvosa ($i = 1$) e seca ($i = 2$). As covariáveis X_1 , X_2 e X_3 correspondem às medidas simultâneas Famacha (adimensional), massa corporal (kg) e ECC (adimensional), respectivamente tomadas em cada ovino. Os parâmetros θ_1 , θ_2 e θ_3 são os coeficientes de regressão para as variáveis X_1 , X_2 e X_3 . O termo $e_{q(ijklmp)}$ representa o erro aleatório. O modelo foi ajustado aos dados por meio do procedimento GLIMMIX do programa SAS (Vonesh, 2012), sendo $Y_{ijklmpq} \sim Poisson$, cujo valor esperado tanto para a média como para a variância correspondente ao parâmetro λ (Mood et al., 1974). Os valores preditos para cada fazenda foram computados considerando-se como efeitos fixos a estação do ano (α_i), região geográfica (β_j), finalidade de produção ($\gamma_{k(j)}$), sistema de produção ($\delta_{l(jk)}$) e raça ($\eta_{m(jkl)}$) e considerado efeito aleatório a fazenda ($f_{p(jklm)}$).

As frequências médias de Famacha, ECC, raças e população parasitária foram descritas. O OPG foi classificado no grau de infecção parasitária de acordo com a indicação de infecção mista em ovinos (Ueno e Gonçalves; 1998) em: infecção nula (OPG igual à zero), infecção leve (OPG até 1000), infecção moderada (OPG de 1000 a 2000) e infecção maciça ou grave (OPG maior que 2000).

Resultados

As características produtivas de 22 fazendas de ovinos do Rio de Janeiro estão na tabela 1. A maioria do rebanho (19 fazendas) foi composta pela raça Santa Inês e seus mestiços; cinco fazendas criam animais Dorper ou White Dorper, duas fazendas criam ovinos Lacaunes e uma fazenda cria animais Pool Dorset. Em quatro fazendas havia duas raças predominantes. Outras raças foram observadas, porém em cruzamento com animais Santa Inês (Suffolk, Texel, Ille de France). O sistema de produção predominante foi o semi-intensivo com predominância de uso de pastagem (12 fazendas). A produção semi-intensiva com predominância de uso de confinamento ocorreu em sete fazendas. O uso exclusivo de

pastagem em sistema extensivo ocorreu em duas fazendas, e somente em uma fazenda os animais eram 100% confinados. A maioria do rebanho analisado (17 fazendas) produz animais com a finalidade para carne (corte). A produção de animais de padrão genético para a venda como reprodutores ocorreu em quatro fazendas. Duas fazendas produziam leite e uma fazenda produzia sangue para venda laboratorial.

Considerando os efeitos fixos no modelo, foram detectados efeitos significativos para a região ($P = 0.001$). Os demais efeitos fixos categóricos, a saber, estação do ano ($P = 0.295$), finalidade dentro de região ($P = 0.124$), sistema de produção dentro de finalidade e dentro de região ($P = 0.346$) e raça dentro de sistema, finalidade e região ($P = 0.327$) não afetaram a contagem de OPG. Contudo, o modelo ajustado sem o efeito de estação do ano apresentou menor critério de perda de informação de Akaike e o modelo foi reanalisado sem o efeito de estação. Tal medida reduziu o valor da função de verossimilhança do modelo.

Houve diferença significativa na variável OPG entre as fazendas (efeito aleatório) e regiões analisadas ($P < 0,001$) considerando as co-variáveis FAMACHA ($P < 0,001$) e Peso ($P = 0,001$). Assim, das 22 propriedades avaliadas (Figura 1), 13 apresentaram diferenças significativas com base no intervalo de confiança (95%) para a variável OPG. Destas, apenas duas fazendas apresentaram diferenças significativas com uma única fazenda, ou seja, a fazenda 3 diferiu da 17 e a fazenda 15 da 17. Nas demais fazendas, cada uma diferiu estatisticamente com duas a até 10 fazendas. Convém lembrar que os valores individuais de cada fazenda se encontram acompanhados de seus respectivos intervalos de confiança a 95% e foram considerados valores de OPG diferentes quando estes mesmos intervalos não se justapuseram (Figura 2).

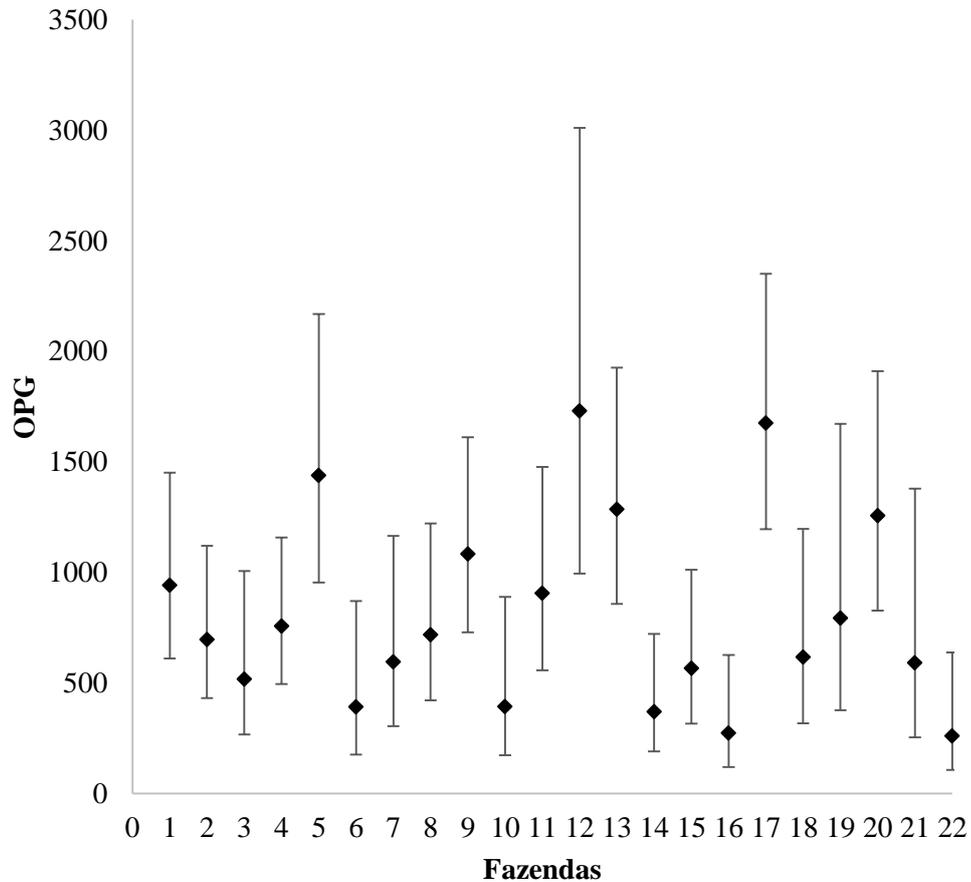


Figura 2. Médias ajustadas de ovos por grama de fezes (OPG) de rebanhos de ovinos analisados no estado do Rio de Janeiro com intervalo de confiança de 95%.

A média geral ajustada do OPG de todas as fazendas (1222 animais) foi de 827 (Tabela 2). De acordo com a classificação do grau de infecção (figura 3), 74% dos animais apresentaram OPG positivo, sendo que destes, 69 % tiveram infecção leve (até 1000 OPG), 15 % infecção moderada (de 1000 a 2000 OPG) e 16% infecção maciça ou grave (acima de 2000 OPG). Considerando as diferenças entre regiões do estado, as fazendas da região Noroeste e dos Lagos apresentaram OPG superior às fazendas das demais regiões (tabela 1), com médias de OPG de 1656 e 851 respectivamente.

Tabela 2. Contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de rebanhos de ovinos criados no estado do rio de Janeiro. Letras diferentes sobrescritas indicam valores que diferiram estatisticamente ($p < 0,05$).

REGIÕES	MÉDIA ¹	ERRO ²	INTERVALO DE CONFIANÇA ³	
			Inferior	Superior
Centro-Sul	815	92	652	1018 ^a
Médio-Paraíba	551	109	373	813 ^a
Baixada	783	143	547	1121 ^a
Lagos	851	157	592	1223 ^b
Norte	532	90	382	742 ^a
Noroeste	1676	289	1195	2351 ^b
Serrana	578	128	374	894 ^a
MÉDIA	827	-	373	1223

¹Média ajustada;

²Erro padrão para as médias ajustadas;

³Para as médias ajustadas.

Considerando o efeito das covariáveis no OPG, o FAMACHA está positivamente relacionado, vide o valor positivo para a estimativa do coeficiente de regressão ($\hat{\theta}_1 = 0.442$; $P < 0.001$). Sendo assim, um maior grau de anemia ocorreu nos animais com maior carga parasitária. A média geral dos índices de Famacha pode ser vista na figura 4, onde se observa que 14% do rebanho (22 fazendas) apresentou anemia (Famacha 3 ou 4). A covariável peso foi negativamente associada ao OPG, pois $\hat{\theta}_2 = -0.016$ ($P = 0.001$), sendo que animais mais pesados apresentaram, de forma geral e individualmente, menor carga parasitária. A figura 3 mostra a variação de peso entre fazendas, a média geral do peso de todos os ovinos avaliados foi de 46 kg. A covariável ECC não se relacionou com o OPG; na figura 4 há a média geral dos índices de ECC, notando-se que 46% dos animais apresentaram condição corporal baixa (menor do que 3).

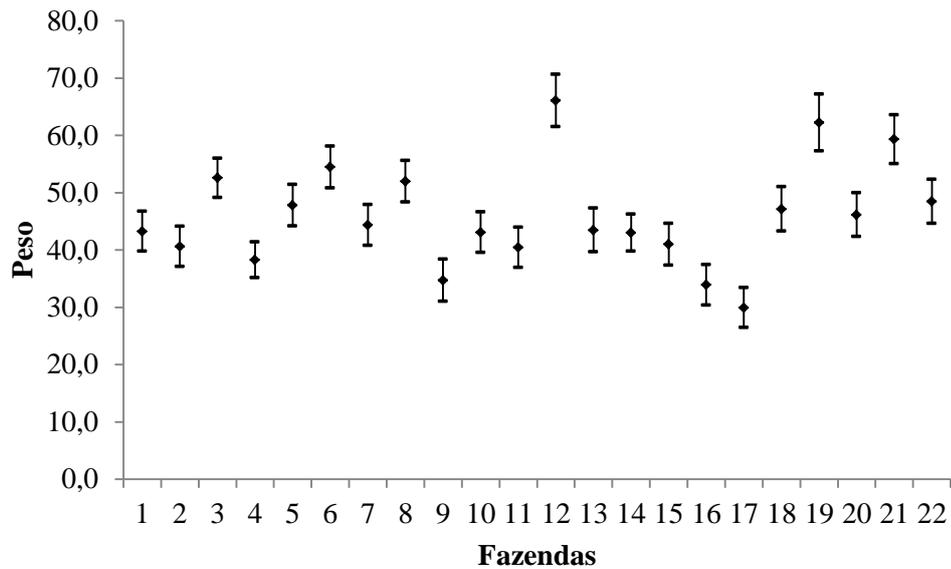


Figura 3. Peso médio de rebanhos ovinos analisados no estado do Rio de Janeiro com intervalo de confiança de 95%.

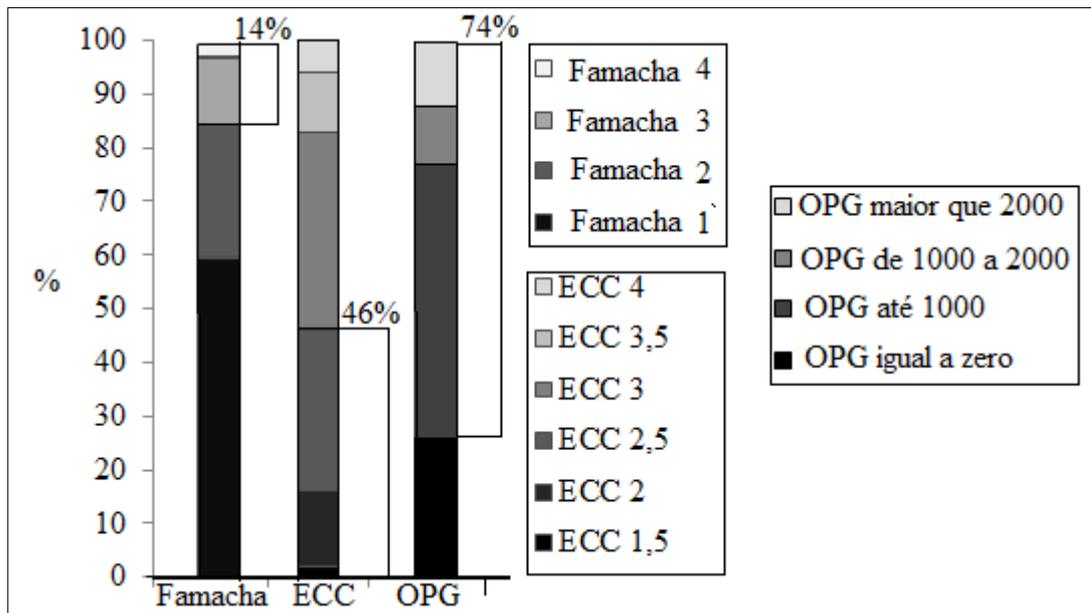


Figura 4. Média geral dos graus de Famacha, Escore de condição Corporal (ECC) e classificação do grau de infecção pela contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de rebanhos de ovinos analisados no estado do Rio de Janeiro. Os percentuais assinalados representam os animais com anemia (Famacha 3 ou 4), baixo ECC (1,5; 2 e 2,5) ou com OPG positivo (acima de zero).

A média geral e por região do estado da proporção de gêneros de nematoides gastrointestinais nos ovinos do Rio de Janeiro pode ser visualizada na figura 5. O percentual médio de gêneros encontrados nas 22 fazendas foi de 75% *Haemonchus* spp., 20% *Trichostrongylus* spp., 3% *Cooperia* spp. e 2% de *Oesophagostomum* spp. O gênero

Strongyloides spp. foi visto em 35% das propriedades, porém não foi quantificado na coprocultura. *Haemonchus* spp. predominou em 21 fazendas, diferindo apenas na fazenda 6 (em Angra dos Reis). Neste caso, *Trichostrongylus* spp. correspondeu a 76% das larvas analisadas enquanto que *Haemonchus* spp. ficou em 24% destas. *Trichostrongylus* spp. apareceu em todas as fazendas sendo que foi o segundo gênero predominante em 20 delas. *Cooperia* spp. apareceu em 8 fazendas com índices variando de 1 a 21%. *Oesophagostomum* spp. apareceu em 13 fazendas com índices variando de 1% a 16%.

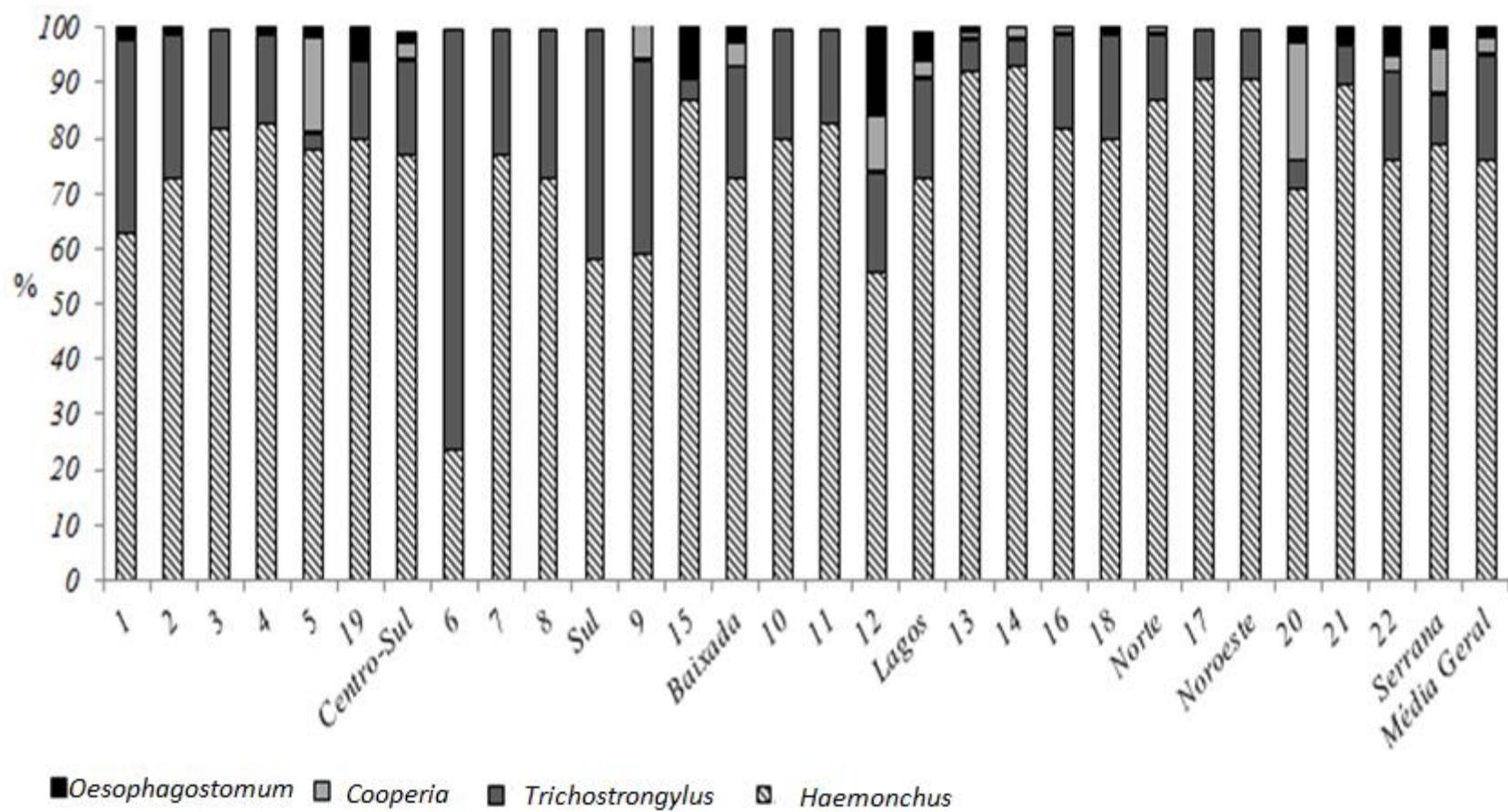


Figura 5. Gêneros de nematoides gastrointestinais em fazendas de criação de ovinos do estado do Rio de Janeiro.

Discussão:

Infecção por nematoides gastrointestinais ocorreu em 74% do rebanho ovino analisado do Rio de Janeiro. Algum grau de infecção parasitária é comum em ovinos e os observados no estado do Rio de Janeiro são similares ao encontrado por Vieira et al. (2014) no Sertão Paraibano (75,9%), por Ahid et al., 2008 no Rio Grande do Norte (75,2%) e por Asmare et al. (2016) na Etiópia (75,8%). Esses valores são superiores ao encontrado no Paquistão por Razzaq et al., 2014 (23,92%) e menores do que a prevalência encontrada por Martinez-Valadares et al. (2013) na Espanha (100%). Entretanto, o grau de infecção parasitária dos animais espanhóis ficou em apenas 2,3% do rebanho acima de 1000 OPG, com média de OPG de 237, muito menor do que o observado neste trabalho onde 22 % do rebanho teve infecção moderada a grave (acima de 1000 OPG) com valor médio de 827, demonstrando maior severidade na infecção.

O percentual de animais com infecção grave (12%) acompanhou o percentual de animais com anemia (14%) e esse fato ocorreu porque o Famacha correlacionou-se positivamente o OPG. O método Famacha foi desenvolvido para detectar infecção por *H. contortus* (van Wyk e Bath 2002), gênero predominante (75%) neste trabalho. Molento et al. (2004) verificaram correlação do Famacha com o OPG e hematócrito de ovinos com infecção contendo 60% de *Haemonchus* spp. Diminuição no uso de anti-helmínticos foi verificada por Maia et al. (2015) em ovinos e Vilela et al (2012) em caprinos ao implantarem o método Famacha como auxiliar no diagnóstico e critério de tratamento. Além disso, Pereira et al. (2016) verificaram que o Famacha também é uma ferramenta para a avaliação de animais sensíveis, resilientes e resistentes às parasitoses, facilitando a seleção genética. Sendo assim, o método Famacha pode ser auxiliar no controle de parasitoses gastrointestinais do rebanho ovino do Rio de Janeiro já que mostrou correlação com o OPG e o gênero *Haemonchus* spp. foi predominante na quase totalidade das fazendas analisadas, sendo necessária a realização de coprocultura anteriormente à sua utilização.

Haemonchus contortus é o nematoide prevalente em regiões tropicais e subtropicais com clima quente e úmido (Khan et al., 2003), como é o caso do Brasil. Predominância de *Haemonchus* seguida de *Trichostrongylus* foi vista em diferentes regiões do Brasil: São Paulo (Amarante et al., 2004); Paraná (Soccol e Sotomaior, 1996) e Paraíba: Vieira et al. (2014). No RJ, uma única fazenda (6) situada em Angra dos Reis apresentou predominância de *Trichostrongylus* a *Haemonchus*, nesta propriedade provavelmente devido ao uso de anti-

helmínticos específicos para *Haemonchus* e ao isolamento da fazenda com relação às outras, o que impede o trânsito de animais e de parasitos. Em São Paulo, também situada na região Sudeste, Veríssimo et al. (2012) encontraram proporções semelhantes de nematoides às encontradas no presente trabalho (75,8% de *Haemonchus* spp., 19,1% de *Trichostrongylus* spp.; 2,5% de *Cooperia* spp., e 1,4% de *Strongyloides* spp.). Na região Sul, Echevarria et al. (1996) encontraram no Rio Grande do Sul *Ostertagia* spp. (*Teladorsagia* spp.), gênero prevalente em regiões temperadas e não encontrado em nenhuma fazenda do Rio de Janeiro. Apesar de as fezes terem sido coletadas em épocas diferentes do ano, a proporção de gêneros parasitários não oscilou muito, mas esse fator deve ser considerado uma vez que é importante na epidemiologia parasitária (Bowman, 2003). Além disso, o conhecimento da população parasitária pode nortear a escolha de anti-helmínticos a serem testados e do método de diagnóstico para cada fazenda.

Cada vez mais, tem se discutido o efeito da nutrição e da condição nutricional dos animais na infecção parasitária em ovinos (Coop and Sykes 2002; Greer et al. 2009; Hoste, 2016). O OPG correlacionou-se negativamente com peso, mas não se correlacionou com o ECC. Sabe-se que a condição corporal, assim como o status nutricional dos animais tem efeito na infecção parasitária (Gaba et al. 2010; Idika et al. 2012; Cornelius 2014). No presente estudo a falta de correlação do ECC com o OPG pode ser em decorrência da grande quantidade (46%) de ovinos com ECC abaixo do indicado para a categoria. Logo, falhas nutricionais podem ocasionar queda no ECC sem necessariamente ocasionar queda no OPG, no caso deste trabalho que analisou animais em diferentes situações produtivas. Mesmo assim, os animais mais pesados foram os que tiveram menor OPG. Apesar de o peso apresentar grandes variações entre raças e categorias, neste trabalho 86% do rebanho era composto pela raça Santa Inês e por ovelhas adultas o que reduziu esta variação. Sendo assim, animais mais pesados apresentaram menor OPG provavelmente porque estavam em melhor estado nutricional.

Não foi verificado efeito de raça no OPG, e isso ocorreu pela alta proporção (86%) de animais Santa Inês às demais raças criadas no estado e pelas diferenças nos sistemas de produção. A raça nativa brasileira Santa Inês tem sido considerada resistente comparada às raças exóticas (Corriedale, Suffolk, Ile de France, Lacaune, Texel e Bergamasa) devido ao longo processo de seleção natural e contato com a população parasitária local (Amarante, 2014). Silva e Fonseca (2011) ao compararem quatro raças de ovinos (Santa Inês, Lacaune, Bergamácia e mestiços) no Sul do Rio de Janeiro verificaram que apenas os animais da raça Lacaune apresentaram maior OPG em relação aos demais. Neste estudo, os animais da raça

Lacaune, com aptidão leiteira, eram mantidos preferencialmente em sistemas com o uso de confinamento, o que pode não ter diferenciado o OPG destes em relação às demais raças.

O sistema de produção de ovino mais usado no estado é o semi-intensivo com predominância de pastejo. Apenas uma fazenda, a que cria para a finalidade de extração de sangue (fazenda 22), confina 100% os animais justamente pela necessidade de maior controle do hematócrito e menor uso de anti-helmínticos. Mesmo assim, esta fazenda apresentou algum grau de infecção parasitária nos animais, porém baixo (OPG médio de 300), provavelmente devido à manutenção de animais já infectados no ambiente. Os maiores OPGs ocorreram em duas fazendas que utilizavam sistemas em pastagem, com predominância de uso de pasto (fazenda 17) ou confinamento (fazenda 12). Estas duas propriedades elevaram as médias do OPG da região em que se localizam, tornando maiores os OPGs nas Regiões Noroeste e dos Lagos respectivamente.

Sabe-se que o ambiente de pastagem favorece maior infecção parasitária comparado ao confinamento, devido ao ciclo parasitário necessitar de condições de temperatura e umidade para o desenvolvimento dos estádios parasitários que têm período pré-patente médio de três semanas (Bowman et al., 2003). Este fato pode ter influenciado na taxa de animais infectados já que em 21 fazendas havia o uso de pastagens. O OPG não correlacionou-se com o sistema de produção porque outras práticas de manejo podem influenciar a taxa de infecção como a taxa de lotação, o uso de anti-helmínticos, clima e tipo de pastagem (Hansen e Perry, 1994).

Conclusão:

O rebanho ovino do Rio de Janeiro analisado foi composto principalmente por animais da raça Santa Inês criados em sistemas de produção semi-intensivo e com o uso predominante de pastagem. As nematodioses acometem a maior parte do rebanho que apresenta alta proporção de animais em infecção moderada à maciça. A carga parasitária do rebanho foi favorecida pela alta prevalência de *Haemonchus* spp., baixa condição nutricional dos animais e o uso de pastagens nos sistemas de produção.

Referências:

- AHID, S. M. M.; SUASSUNA, A. C. D.; MAIA, M. B.; COSTA, V. M. M.; SOARES, H, S. Parasitos gastrointestinais em caprinos e ovinos da região Oeste do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n.1, p. 212-218, 2008.
- AMARADASA, B. S.; LANE, R. A.; MANAGE, A. Vertical migration of *Haemonchus contortus* infective larvae on *Cynodon dactylon* and *Paspalum notatum* pastures in response to climatic conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 78-87, 2010.

- AMARANTE, A. F. T. Sustainable worm control practices in South America. **Small Ruminant Research**, v. 118, p.56-62. doi:10.1016/j.smallrumres.2013.12.016, 2014.
- AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v.120, p. 91-106, 2004.
- ASMARE, K.; SHEFERAW, D.; ARAGAW, K.; ABERA, M.; SIBHAT, B.; HAILE, A.; KIARA, H.; SZONYI, B.; SKJERVE, E.; WIELAND, B. Gastrointestinal nematode infection in small ruminants in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 160, p. 68-77, 2016.
- ATLIJA, M.; PRADA, J. M.; GUTIÉRREZ-GIL, B.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A.; STEAR, M. J.; ARRANZ, J. J.; MARTÍNEZ-VALLADARES, M. Implementation of an extended ZINB model in the study of low levels of natural gastrointestinal nematode infections in adult sheep. **Veterinary Research**, v. 12, p. 97, 2016.
- BESIER, R. B.; KAHN, L. P.; SARGISON, N. D.; VAN WYK, J. A. Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. **Advances in Parasitology**, v. 93, p. 181-238, 2016.
- BOWMAN, D. D.; GEORGI, J. R.; LYNN, R. C. *Georgi's Parasitology for Veterinarians*, (Saunders Publishing Company, St. Louis, Missouri, 8 ed., 422, 2003.
- CHARLIER, J.; MORGAN, L.; RINALDI, E. R.; VAN DIJK, J.; DEMELER, J.; HÖGLUND, J.; HERTZBERG, H.; VAN RANST, B.; HENDRICKX, G.; VERCRUYSSSE, J.; KENYON, F. Practices to optimise gastrointestinal nematode control on sheep, goat and cattle farms in Europe using targeted (selective) treatments. **Veterinary Record**. Disponível em: veterinaryrecord.bmj.com, 2014.
- COLES, G. C.; JACKSON, F.; POMROY, W. E.; PRICHARD, R. K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M. A.; VERCRUYSSSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**. v. 136, p. 167–185, 2006.
- COOP, R. L.; SYKES, A. R. Interactions between gastrointestinal parasites and nutrition. In **'Sheep nutrition'** (Eds Freer M, Dove H) p. 313-329. (Wallingford: CABI International), 2002.
- CORNELIUS, M. P.; JACOBSON, C.; BESIER, R. B. Body condition score as a selection tool for Targeted Selective Treatment-based nematode control strategies in Merino ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 206, p. 173–181, 2014.
- ECHEVARRIA, F.; BORBA, M. F. S.; PINHEIRO, A. C.; WALLER, P. J.; HANSEN, J. W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 199–206, 1996.
- FALZON, L.C.; O'NEILL, T.J.; MENZIES, P.I.; PEREGRINE, A.S.; JONES-BITTON, A.; VANLEEuwENE, J.; MEDEROS, A. A systematic review and meta-analysis of factors associated with anthelmintic resistance in sheep. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 15, p. 388-402. 2014.
- GABA, S.; CABARET, J.; SAUVE, C.; CORTET, J.; SILVESTRE, A. Experimental and modeling approaches to evaluate different aspects of the efficacy of Targeted Selective Treatment of anthelmintics against sheep parasite nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 171, p. 254- 262, 2010.

- GASSER, R. B.; SCHWARZ, E. M.; KORHONEN, P. K.; YOUNG, N. D. Understanding *Haemonchus contortus* Better Through Genomics and Transcriptomics. **Advances in Parasitology**, v. 93, p. 519-67, 2016.
- GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council of Scientific and Industrial Research**, v. 12, p. 50-52, 1939.
- GREER, A. W.; SEDCOLE, R. J.; JAY, N. P.; MCANULTY, R. W.; GREEN, R. S.; STANKIEWICZ, M.; SYKES, A. Protein supply influences the nutritional penalty associated with the development of immunity in lambs infected with *Trichostrongylus coluibriformis*. **Animal**, v.3, p. 437-445, 2009.
- HANSEN, J.; PERRY, B. The epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of ruminants. **International Laboratory on Animal Diseases, Nairobi**, p. 83-90. Disponível em: <http://www.fao.org/wairdocs/ILRI/x5492E/x5492e04.htm#2.2.1> life cycles, 1994.
- HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J. F.; QUIJADA, J.; CHAN-PEREZ, I.; DAKHEEL, M. M.; KOMMURU, D. S.; MUELLER-HARVEY, I.; TERRILL, T. H. Interactions Between Nutrition and Infections With *Haemonchus contortus* and Related Gastrointestinal Nematodes in Small Ruminants. **Advances in Parasitology**, v. 93, p. 239-351, 2016.
- IDIKA, I. K.; IHEAGWAM, C. N.; EZEMONYE, C. N.; NWOSU, C. O. Gastrointestinal Nematodes and Body Condition Scores of Goats Slaughtered in Nsukka, Nigeria. **Nigerian Veterinary Journal**, v.30, p. 440-447, 2012.
- KAHN, L. P.; KNOX, M.R.; WALKDEN-BROWN, S.W.; LEA, J.M. Regulation of the resistance to nematode parasites of single- and twin-bearing Merino ewes through nutrition and genetic selection. **Veterinary Parasitology**. v. 114, p. 15–31, 2003.
- KAPLAN, R. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends Parasitology**, v. 20, p. 477–481, 2004.
- KERN, G.; TRAUlsen, I.; KEMPER, N.; KRIETER, J. Analysis of risk factors for infections with gastrointestinal nematodes, *Eimeria* spp. and lungworms in German organic sheep farms. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr.** v. 128, p. 233-9, 2015.
- KOZARUK, M. K.; CHURCHILL, R.; WINDSOR, P. A. Findings from an ovine parasitological monitoring service provided by a rural veterinary practice in New South Wales, Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 93, n.4, 2015.
- MAIA, D.; ROSALINSKI-MORAES, F.; TORRES-ACOSTA, J. F.; CINTRA, M. C.; SOTOMAIOR, C. S. FAMACHA© system assessment by previously trained sheep and goat farmers in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 30;p. 202-9, 2015.
- MARTÍNEZ-VALLADARES, M.; ROBLES-PÉREZ, D.; MARTÍNEZ-PÉREZ, J. M.; CORDERO-PÉREZ, C.; FAMULARO, M. R.; FERNÁNDEZ-PATO, N.; GONZÁLEZ-LANZA, C.; CASTAÑÓN-ORDÓÑEZ, L.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 282, 2013.
- MAVROT, F.; HERTZBERG, H.; TORGERSON, P. Effect of gastro-intestinal nematode infection on sheep performance: a systematic review and meta-analysis. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 557, 2015.
- MERLIN, A.; CHAUVIN, A.; MADOUASSE, A.; FROGER, S.; BAREILLE, N.; CHARTIER, C. Explaining variability in first grazing season heifer growth combining individually measured parasitological and clinical indicators with exposure to

- gastrointestinal nematode infection based on grazing management practice. **Veterinary Parasitology**, v. 225, p. 61-9, 2016.
- MOLENTO, M. B.; TASCA, C.; GALLO, A. K. ; FERREIRA, M. J. ; BONONI, R. R.; STECCA, E. Método FAMACHA como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, v. 34, n.4, p. 1139-1145, 2004.
- MOOD, A. M.; GRAYBILL, F. A.; BOES, D. C. Introduction to the theory of statistics, McGraw-Hill Kogakusha, LTD., Tokyo, 1974.
- PEREIRA, J. F. S.; MENDES, J. B.; DE JONG, G.; MAIA, D.; TEIXEIRA, V. N.; PASSERINO, A. S.; GARZA, J. J.; SOTOMAIOR, C. S. . FAMACHA© scores history of sheep characterized as resistant/resilient or susceptible to *H. contortus* in artificial infection challenge. **Veterinary Parasitology**, v. 218, p. 102-105, 2016.
- RAZA, A.; KOPP, S. R.; BAGNALL, N. H.; JABBAR, A.; KOTZE.; A. C. Effects of in vitro exposure to ivermectin and levamisole on the expression patterns of ABC transporters in *Haemonchus contortus* larvae. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 23;p. 103-115, 2016.
- RAZZAQ, A.; ASHRAF, K.; MAQBOOL, A.; ISLAM, M.; HANAN, A.; AWAIS, M. M.; KHETRAN, M. A.; JAN, S.; SHAFEE, M.; ESSA, M.; KAKAR, H. Epidemiology, Sero-Diagnosis and Therapeutic Studies on Nematodes Infection in Balochi Range-Sheep at District Quetta, Balochistan, Pakistan. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 9, n. 2, 2014.
- RINALDI, L.; HENDRICKX, G.; CRINGOLI, G.; BIGGERI, A.; DUCHEYNE, E.; CATELAN, D.; MORGAN, E.; WILLIAMS, D.; CHARLIER, J.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; VERCRUYSSSE, J. Mapping and modelling helminth infections in ruminants in Europe: experience from GLOWORM. **Geospatial Health**, v. 9, p. 257-259, 2015.
- ROBERTS, F.; O'SULLIVAN, P. Methods for egg counts and larval culture for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.1, p. 99-102, 1950.
- RUSSEL, A. J. F.; DONEY, J. M.; GUNN, R. G. Subjective assessment of body fat in live sheep. **Journal Agricultural Science**, v. 72, p. 451-454, 1969.
- SANTOS, M. C.; SILVA, B. F.; AMARANTE, A. F. T.. Environmental factors influencing the transmission of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 277-288, 2012.
- SILVA1, J. B.; FONSECA, A. H. Racial susceptibility of sheep to gastrointestinal helminths. DOI: 10.5433/1679-0359.2011v32Suplp1935. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, p. 1935-1942, 2011.
- SOCCOL, V. T.; SOTOMAIOR, C.; SOUZA, F. P.; CASTRO, E. A.; PESSOA SILVA, M. C.; MILCZEWSKI, V. Occurrence of resistance to anthelmintics in sheep in Parana State, Brazil. **Veterinary Record**, v. 139, p. 421-422, 1996.
- SOTOMAIOR, C.S.; THOMAZ-SOCCOL, V. Infecção parasitária em ovinos criados em sistema intensivo: acompanhamento de evolução do parasitismo durante um ano. **Hora Veterinária**, n.119, p.10-15, 2001.
- SOUZA, M. F.; PIMENTEL-NETO, M.; PINHO, A. L. S.; SILVA, R. M.; FARIAS, A. C. B.; GUIMARÃES, M. P. Seasonal distribution of gastrointestinal nematode infections in

- sheep in a semiarid region, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 351-359, 2013.
- TONTINI, J. F.; POLI, C. H.; BREMM, C.; DE CASTRO, J. M.; FAJARDO, N. M.; SAROUT, B. N.; CASTILHOS, Z. M. Distribution of infective gastrointestinal helminth larvae in tropical erect grass under different feeding systems for lambs. **Tropical Animal Health Production**, v. 47, p. 1145-52, 2015.
- UENO, H.; GONÇALVES, P.C. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4.ed. JICA, p.166, 1998.
- VAN WYK, J. A.; BATH, G. F. The FAMACHA system from managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. **Veterinary Research**, v. 33, p. 509-529, 2002.
- VAN WYK, J. A.; CABARET, J.; MICHAEL, L. M. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. **Veterinary Parasitology**, v.119, p.277–306, 2004.
- VERÍSSIMO, C. J.; NICIURA, S. C. M.; ALBERTI, A. L.; RODRIGUES, C. F. C.; BARBOSA, C. M. P.; CHIEBAOE, D. P.; CARDOSO, D.; SILVA, G. S.; PEREIRA, J. R.; MARGATHOI, L. F. F.; COSTA, R. L. D.; NARDON, R. F.; UENOK, T. E. H.; CURCIF, V. C. L. M.; MOLENTO, M. B. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 187, p. 209–216, 2012.
- VIEIRA, V. D.; VILELA, V. L.; FEITOSA, T. F.; ATHAYDE, A. C.; AZEVEDO, S. S.; SOUTO, D. V.; SILVEIRA, G. L.; MELO, L. R. Sheep gastrointestinal helminthiasis in the Sertão region of Paraíba State, Northeastern Brazil: prevalence and risk factor. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 488-94, 2014.
- VILELA, V. L.; FEITOSA, T. F.; LINHARES, E. F.; ATHAYDE, A. C.; MOLENTO, M. B.; AZEVEDO, S. S. FAMACHA(©) method as an auxiliary strategy in the control of gastrointestinal helminthiasis of dairy goats under semiarid conditions of Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 1-2, 2012.
- VONESH, E. F. Generalized linear and nonlinear models for correlated data: theory and applications using SAS[®], **SAS Institute Inc.**, Cary, 2012.
- WALLER, P.J. From discovery to development: Current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 1-14, 2006.
- ZAJAC, A. M. Gastrointestinal nematodes of small ruminants: life cycle, anthelmintics, and diagnosis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 22, p. 529–541, 2006.
- ZVINOROVA, P. I.; HALIMANI, T. E.; MUCHADEYI, F. C.; MATIKA, O.; RIGGIO, V.; DZAMA K. Breeding for resistance to gastrointestinal nematodes– the potential in low-input/output small ruminant production systems. **Veterinary Parasitology**, v. 225, p. 19-28, 2016.

4) ARTIGO 3:

RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA MÚLTIPLA EM OVINOS DETECTADA POR MEIO DE ABORDAGEM FENOTÍPICA E GENOTÍPICA INTEGRADA.

Resumo.

As nematodioses gastrointestinais são o principal problema sanitário na ovinocultura e o seu controle é dificultado pela crescente perda de eficácia dos anti-helmínticos. Neste estudo, identificamos o manejo e a eficácia dos principais anti-helmínticos utilizados no rebanho ovino do estado do Rio de Janeiro (albendazol, levamisol, ivermectina, moxidectina e closantel) contra os gêneros de nematoides prevalentes. A eficácia anti-helmíntica foi calculada pelo teste fenotípico de redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF) em 22 propriedades. O manejo anti-helmíntico foi avaliado por meio de uma entrevista. As sete fazendas que apresentaram populações de *Haemonchus* spp. com maior resistência ao albendazol foram selecionadas para averiguação da presença do polimorfismo F200Y no gene codificador para β -tubulina 1. Foram genotipadas 30 larvas de terceiro estágio para cada rebanho. Em 100% das propriedades são usados anti-helmínticos, sendo que em 91% dos casos todos os animais são tratados de uma só vez, apenas 2% fazem exames de OPG e apenas 7% usam o método Famacha. 64% dos produtores possui algum tipo de assistência veterinária. Entretanto, apenas 10% escolhe o anti-helmíntico de acordo com a indicação do veterinário. Os anti-helmínticos mais utilizados foram Levamisol e Closantel, seguidos por Moxidectina, Albendazol e Ivermectina. Em nenhuma fazenda o último anti-helmíntico utilizado foi eficaz. A eficácia variou entre os gêneros de nematoides, sendo *Haemonchus* spp. o mais resistente aos fármacos estudados; principalmente à ivermectina e albendazol. *Trichostrongylus* foi mais resistente a levamisol e closantel. Esta última droga apresentou resistência para todos os gêneros incluindo *Cooperia* spp. e *Oesophagostomum* spp.. No teste genotípico, confirmando a resistência de *Haemonchus* spp. ao albendazol, a frequência média polimorfismos (F200Y) de alelos de resistência (R) foi de 57% e SS (sensibilidade) de 43%, apresentando 41,4% em média de genótipos RR. O uso de testes fenotípicos e genotípicos detectou uma elevada proporção de resistência anti-helmíntica múltipla ocasionada por manejo inadequada nos rebanhos de ovinos no estado do Rio de Janeiro.

Palavras chaves: beta-tubulina, F200Y, manejo, resistência anti-helmíntica, TRCOF.

Abstract:

Gastrointestinal nematodiasis is the main health problem in the sheep industry. It is a limiting factor for the Brazilian industry where the increasing loss of anthelmintic efficacy has led to failures in antiparasitic management. We surveyed management and effectiveness of the most used anthelmintics in sheep flocks in 22 farms in the state of Rio de Janeiro, Brazil. The five anthelmintics most used by sheep farmers were albendazole, levamisole, ivermectin, moxidectin and closantel and their efficacy were first evaluated using the fecal egg count reduction test. The 7 farms with populations of *Haemonchus* spp. with greater resistance to albendazole were further examined by investigating the F200Y polymorphism in the β -tubulin 1 gene (a resistance marker). Thirty infective larvae for each flock were genotyped. All properties used anthelmintics, 86% treated all animals at least once a year, and only 5% and 9% used EPG and the FAMACHA© system, respectively. Levamisole and closantel were the most commonly used anthelmintics, followed by moxidectin, albendazole and ivermectin. Nematodes were resistant to all of these anthelmintics on 64% of the farms. The last

anthelmintic used was not effective in any of the farms. Only levamisole, moxidectin and closantel were effective on 23, 9 and 9% of the properties, respectively. *Haemonchus* spp. was the most resistant helminth to the anthelmintics surveyed, mainly to ivermectin and albendazole. *Trichostrongylus* spp. were more resistant to levamisole and closantel. All nematode genera, including *Cooperia* spp. and *Oesophagostomum* spp., were resistant to closantel. We confirm the resistance of *Haemonchus* spp. to albendazole in the selected farms. Mean frequency of the BZ resistance-conferring allele (R) and frequency of the BZ sensitivity-conferring allele (S) was 57% and 43%, respectively. Mean resistant homozygous genotype (RR) was 41.4%. The use of phenotypic and genotypic tests detected high proportion of anthelmintic resistance to multiple anthelmintics caused by inadequate management in sheep flocks in the state of Rio de Janeiro, Brazil.

Keywords: Anthelmintic resistance, sheep, gastrointestinal nematodes, small ruminants, β -tubulin gene, FECRT.

Introdução:

As nematodioses gastrointestinais são o principal problema sanitário e limitante econômico na produção mundial de ovinos, havendo dependência do uso de anti-helmínticos para o seu controle (Stear et al., 2011; Gasser et al., 2016). O uso exclusivamente de antiparasitários torna-se altamente vulnerável devido ao aparecimento crescente de resistência em diversos países com grande ameaça a produção ovina (Kaplan, 2004). No continente Americano, o Brasil é o país com maior número de publicações relatando resistência a múltiplos fármacos em diversos rebanhos distribuídos no território nacional (Torres-Acosta et al., 2012). A crescente preocupação com resistência anti-helmíntica tem levado a uma necessidade de métodos adequados e padronizados para sua detecção (Demeler et al., 2010).

O diagnóstico de resistência anti-helmíntica realizado pelo teste da redução de contagem de ovos nas fezes (TRCOF) ainda é o mais utilizado e acessível (Coles et al., 2002; 2006; Taylor et al., 2002.). Porém, apresenta alguns limitantes referentes ao número de animais, fórmula do cálculo, baixa sensibilidade, nível de resistência anti-helmíntica e demora na obtenção dos resultados pela necessidade de coproculturas (Fortes e Molento, 2013; Falzon et al., 2014; McKenna et al., 2014). Inúmeros avanços moleculares vêm sendo alcançados para tentar reduzir as limitações dos diagnósticos fenotípicos para diversos fármacos, no entanto o único teste padronizado atualmente é o de resistência aos benzimidazóis (Coles et al., 2006; Whittaker et al., 2016).

Sabe-se que mutações no isotipo I do gene da β -tubulina (F167Y, E198A e F200Y) são relatadas em nematoides tricostrongilídeos resistentes aos benzimidazóis, sendo o F200Y o mais comumente determinante genético (Silvestre e Cabaret, de 2002; Ghisi et al, 2007, citado por Skuce, 2010). Apesar da identificação de isotipos F200Y já ter sido bastante

discutida (Silvestre e Humbert, 2000; Coles et al., 2006; Santos et al., 2014; Brasil et al., 2012; Nunes et al., 2013), ainda busca-se maior aplicabilidade de testes moleculares no campo (Nagy et al., 2016). Niciura et al. (2012) ressaltam a importância do acompanhamento do manejo parasitário na fazenda conjuntamente com os diagnósticos genotípicos. Dessa forma, os testes fenotípicos de resistência anti-helmíntica e o conhecimento do manejo antiparasitário no campo colaboram com análises moleculares, tornando o diagnóstico mais preciso e norteando estratégias de controle.

O controle de parasitoses em pequenos ruminantes tem sido cada vez mais desafiador, sendo discutidas estratégias para minimizar os efeitos e o aparecimento de resistência anti-helmíntica (Charlier et al., 2014; Leathwick e Besier, 2014; Moore et al., 2016). Para retardar a perda de eficácia dos fármacos e elaborar guias adequados de tratamento antiparasitário é necessária a identificação de práticas de manejo que estejam relacionadas ao aparecimento de resistência anti-helmíntica (Falzon et al., 2014) e que estas sejam repassadas aos profissionais ligados a atividade no campo (Molento, 2009). Falhas no manejo e ineficácia de vários anti-helmínticos foram diagnosticadas em muitas regiões do Brasil (Salgado e Santos et al., 2016). Na região Norte e Noroeste do Rio de Janeiro Cruz et al. (2010) averiguaram alto índice de resistência anti-helmíntica em ovinos, apontando a necessidade de um trabalho mais amplo em todo o estado. Sendo assim, este trabalho buscou uma avaliação abrangente da resistência anti-helmíntica em nematoides gastrointestinais do rebanho ovino do Rio de Janeiro, utilizando métodos diagnósticos genotípicos (detecção de polimorfismo F200Y no gene codificador para β -tubulina1) e fenotípico (TROF) já padronizados e correlacionando seus resultados com as práticas de manejo do rebanho.

Material e Métodos:

Local e data:

A coleta de dados foi realizada entre outubro de 2011 a julho de 2014 no estado do Rio de Janeiro, Região Sudeste do Brasil. Foram avaliadas 22 fazendas distribuídas em todas as regiões do estado (Figura 1) com no mínimo de 60 ovinos aptos a participarem do teste de eficácia anti-helmíntica e da entrevista sobre manejo anti-helmíntico. Em cada fazenda foram escolhidas ovelhas adultas em bom estado de saúde e da raça predominantemente Santa Inês e mestiços.

Os exames corpoparasitológicos foram realizados no laboratório de biologia Celular e Tecidual do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual Norte

Fluminense- Darcy Ribeiro (UENF). As análises genotípicas foram realizadas em maio de 2016 no Laboratório de Genética Animal da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

Levantamento do manejo parasitário:

O manejo anti-helmíntico foi averiguado por meio de uma entrevista realizada aos 22 ovinocultores. As perguntas englobaram: tratamento dos animais, frequência de uso de anti-helmínticos, tratamento de todos os animais conjuntamente, rotação de anti-helmínticos, critério de uso de anti-helmínticos, doses de acordo com o peso, dose de acordo com indicação do rótulo, assistência veterinária, critério de escolha do anti-helmíntico, último anti-helmíntico usado e manejo de “drench and move” (tratar os animais e colocá-los em um piquete limpo).

Teste da Redução da Contagem de Ovos nas Fezes (TRCOF):

A eficácia de cinco drogas foi avaliada utilizando a redução da contagem de ovos nas fezes (FECRT) segundo Coles et al. (2006). Os animais foram distribuídos por conveniência em grupos de 10-15 animais por anti-helmíntico e após pesagem foram tratados por via subcutânea e com a dose indicada pelo fabricante: ivermectina (0,2 mg/kg) moxidectina (0,2 mg/kg) albendazole (3,4 mg/kg), levamisole (7,5 mg/kg) e Closantel (10 mg/kg). Estas drogas foram estabelecidas após pesquisa prévia sobre os anti-helmínticos mais utilizados no rebanho ovino do estado. As coletas de fezes foram realizadas no dia zero e 14 dias após administração do anti-helmíntico. Estas foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais, acondicionadas em sacos plásticos e transportadas em caixas isotérmicas até o laboratório e mantidas a temperatura de refrigeração (8 °C) até o exame das mesmas. Foi realizada a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) por animal, segundo a técnica de Gordon e Whitlock (1939), sendo contabilizados ovos de parasitos da ordem Strongylida. Foram realizadas coproculturas para determinação dos gêneros predominantes e resistentes aos tratamentos anti-helmínticos conforme Bonadiman et al. (2006). A identificação morfológica dos gêneros larvais foi feito de acordo com Van Wyk et al. (2013).

O cálculo de eficácia geral e por gênero de nematoide foi realizado pelo programa RESO 2.0 (Wursthorn and Martin, 1990) considerando a diferença entre o OPG no dia zero e após 14 dias do tratamento: $\text{eficácia (\%)} = (\text{OPG antes do tratamento} - \text{OPG depois do tratamento}) / \text{OPG antes do tratamento} \times 100$. Foram considerados no cálculo os animais com OPG no dia zero superior a 200 e eficaz o anti-helmíntico que reduzisse 95% do OPG (Coles et al., 2006). Os dados de eficácia das 22 fazendas foram representados de forma descritiva e por meio de gráficos de box plot. O fluxograma das avaliações é demonstrado na figura 2.

Frequência de polimorfismo F200Y no gene da β -tubulina:

Foram selecionadas as fazendas com menor índice de eficácia do Albendazol a *Haemonchus* spp. em cada uma das 7 regiões do estado (figura 1). Para cada fazenda, 30 larvas de terceiro estágio de *Haemonchus* spp. foram pescadas no poll de larvas obtidas pela coprocultura do rebanho (antes de aplicar o albendazol) e alocadas individualmente em eppendorfs. O DNA genômico foi extraído usando uma adaptação do protocolo descrito para larvas em Silvestre e Humbert (2000). A genotipagem do polimorfismo TTC / TAC na posição 200 de um isotipo do gene β -tubulina (F200Y) foi realizada nas larvas por meio de uma reação específica de AS-PCR para *Haemonchus* spp., como descrito por Niciura et al. (2012). Foram instituídos controles de plasmídeos contendo alelos β -tubulin1 clonados que carregam tanto o códon TTC200 (S alelo) ou o códon TAC200 (alelo R). Teste do Qui-quadrado foi realizado para comparar a homogeneidade das frequências alélicas utilizando o programa R.

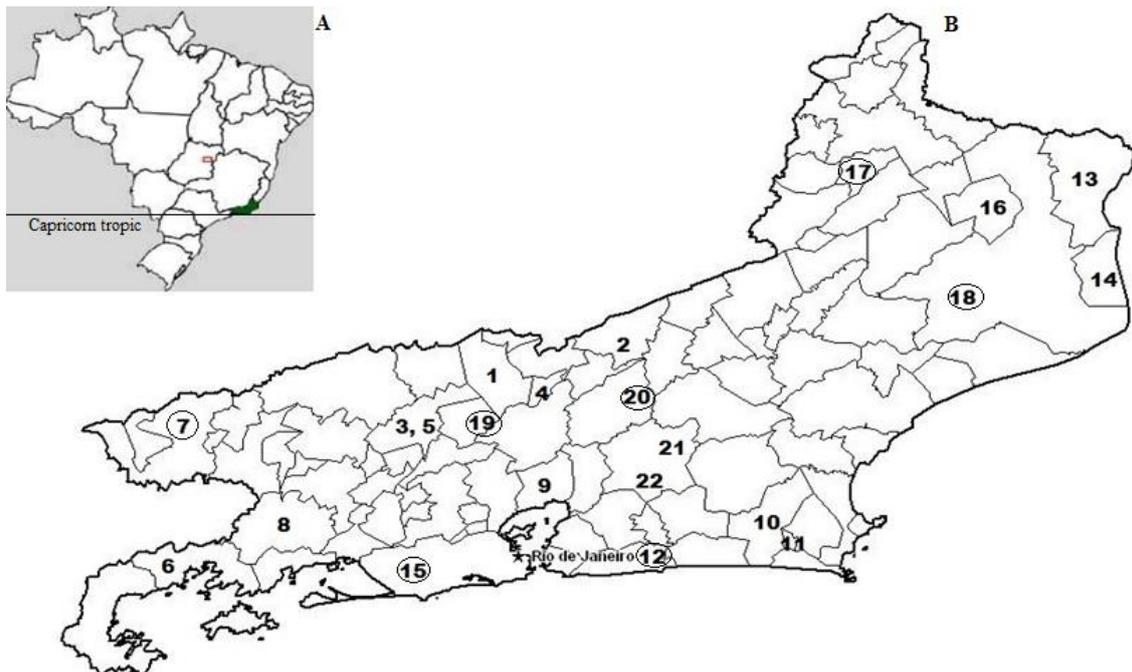


Figura 1. A) Localização do estado do Rio de Janeiro no Brasil. B) Localização das 22 fazendas de ovinos avaliadas pelo TRCOF e questionários. As fazendas circundadas foram as selecionadas para teste de polimorfismo do gene F200Y da β -tubulina (7, 12, 15, 17, 18, 19 e 20).

Municípios das 22 fazendas: (1) Paraíba do Sul, (2) Sapucaia, (3 e 5) Vassouras, (4) Areal, (6) Angra dos Reis, (7) Resende, (8) Rio Claro, (9) Magé, (10) São Pedro da Aldeia, (11) Araruama, (12) Maricá, (13) São Francisco de Itabapuna, (14) São João da Barra, (15) Rio de Janeiro, (16) Cardoso Moreira, (17) São José de Ubá, (18) Campos dos Goytacazes, (19) Paty de Alferes, (20) Teresópolis e (21 e 22) Cachoeiras de Macacu.

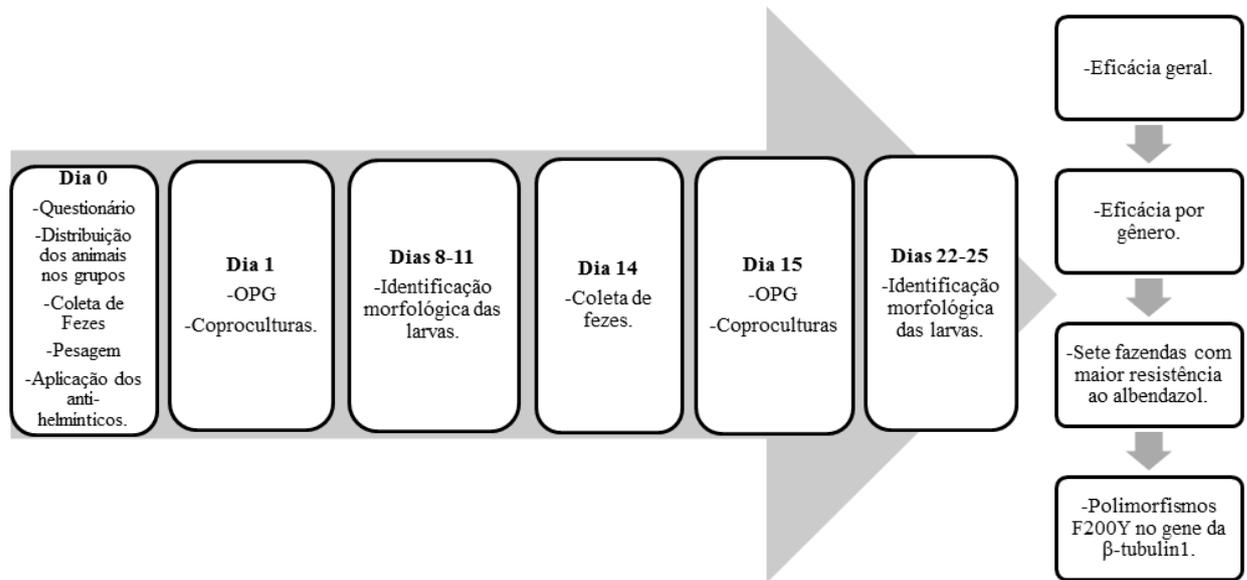


Figura 2. Fluxograma da coleta de amostras, testes laboratoriais para análise do manejo anti-helmíntico, cálculo de eficiência anti-helmíntica (TRCOF) e frequência de polimorfismo F200Y na β -tubulina em nematoides gastrointestinais de ovinos do Rio de Janeiro.

Resultados:

Manejo antiparasitário:

Todos os produtores entrevistados utilizavam algum anti-helmíntico no rebanho ovino com critério de uso desses fármacos determinados pelo método FAMACHA em 7% dos casos e OPG em 2%. Em 91% das fazendas não havia critério para a administração da droga e os produtores tratavam todos os animais de uma só vez. A frequência de tratamento no rebanho foi mensal em 36% dos casos, bimestral em 46%, trimestral em 5% e sem critérios em 13% das fazendas. Nenhum produtor faz melhoramento genético ou manejo de pastagens com base em índices parasitários (Tabela 1).

A maioria dos produtores possui algum tipo de assistência veterinária, entretanto; a indicação de qual droga usar era feita em 10% dos casos por veterinários, em 40% por outros produtores e em 50% pela loja agropecuária. Em apenas 2% das fazendas o animal era pesado para o cálculo da dose, no restante era feita uma dose padrão para o lote sem pesagem prévia (Tabela 1).

O último anti-helmíntico utilizado pelos produtores na data da entrevista foi: 27% Levamisol, 27% Closantel, 23% Moxidectin, 14% Albendazol e 9% Ivermectin. 91% dos produtores faz rotação frequente de princípios ativos e 80% utilizam ivermectina como ectoparasiticida (Table 1). 90% dos entrevistados têm ovinocultura como atividade pecuária

principal da fazenda; entretanto, em todos os casos o produtor não vive da atividade e tem uma renda fixa de outro emprego (geralmente na cidade).

Tabela 1. Manejo antiparasitário determinado pelos produtores de ovinos de 22 propriedades no estado do Rio de Janeiro.

ENTREVISTA	OCORRÊNCIA (%)
Tratamento anti-helmíntico no rebanho	100
Mensal	36
Bimestral	46
Trimestral	5
Sem critério	13
Rotação de Anti-helmínticos	91
Tratamento de todos os animais conjuntamente	91
Critério de tratamento	
OPG	2
Famacha	7
Nenhum	91
Dose de acordo com peso e indicação da bula	2
Assistência Veterinária	64
Escolha do Anti-Helmíntico	
Indicação do Veterinário	10
Indicação de outro produtor	40
Indicação da loja agropecuária	50
Último Anti-helmíntico utilizado	
Closantel	27
Levamisol	27
Moxidectina	23
Albendazol	14
Ivermectina	9
Uso de Ivermectina como ectoparasiticida	80
Manejo “Drench and move”	60

Eficácia Geral:

Em 64% das fazendas não houve droga eficaz ao passo que em 32% e 4% destas houve eficácia de um e dois fármacos respectivamente. Ivermectina e Albendazol foram ineficazes em todas as fazendas avaliadas, Closantel e Moxidectina foram eficazes, individualmente, em 9% das fazendas e Levamisol em 23% das fazendas. Em nenhuma fazenda avaliada o ultimo anti-helmíntico utilizado foi o eficaz nesse estudo (tabela 2).

Tabela 2. Eficácia anti-helmíntica avaliada pelo teste da redução de contagem de ovos nas fezes (TRCOF) em 22 fazendas de ovinos do Rio de Janeiro.

FAZENDA	EFICÁCIA (%)					ANTI-HELMINTICO	
	A ¹	C ²	I ³	L ⁴	M ⁵	Último utilizado	Eficaz (TRCOF)
1	80	54	0	95	68	C	L
2	73	72	0	97	0	C	L
3	80	95	0	49	67	L	C
4	88	30	0	77	0	C	Nenhum
5	2	38	0	51	64	L	Nenhum
6	34	63	12	91	48	M	Nenhum
7	5	48	58	48	32	C	Nenhum
8	85	78	0	95	60	C	L
9	79	42	74	93	88	C	Nenhum
10	27	0	62	95	0	A	L
11	38	77	0	62	88	L	Nenhum
12	48	59	0	73	0	M	Nenhum
13	54	73	68	92	96	A	M
14	9	65	0	57	35	M	Nenhum
15	0	68	43	96	96	I	M e L
16	47	40	8	0	0	A	Nenhum
17	0	58	0	0	21	L	Nenhum
18	0	43	39	0	0	M	Nenhum
19	38	62	10	53	85	L	Nenhum
20	0	61	0	50	90	I	Nenhum
21	17	95	57	68	90	M	C
22	22	65	0	89	0	L	Nenhum

¹Albendazol;

²Closantel;

³Ivermectina;

⁴Levamisol;

⁵Moxidectina.

Eficácia por gênero de nematoide:

O percentual médio de gêneros encontrados na primeira coprocultura nas 22 fazendas foi de 75% *Haemonchus* spp., 20% *Trichostrongylus* spp., 3% *Cooperia* spp. e 2% de *Oesophagostomum* spp.. O gênero *Strongyloides* foi visto em 35% das propriedades, porém não foi quantificado na coprocultura.

O percentual de fazendas com eficácia anti-helmíntica das cinco drogas para cada gênero de nematoide pode ser visualizado na figura 3. O percentual de fazendas com eficácia para *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* sp, *Cooperia* spp. e *Oesophagostomum* spp. , respectivamente, foi: Albendazol (5%, 15%, 60% e 83%), Closantel (9%, 0%, 20% e 27%), Ivermectina (0%, 23%, 80% e 75%), Levamisol (27%, 18%, 63% e 75%) e Moxidectina (9%, 45%, 100% e 100%). A distribuição geral dos dados de eficácia (de 0 a 100%) das 22 fazendas para cada gênero, assim como as médias e medianas, está apresentada na figura 4 (a, b, c e d).

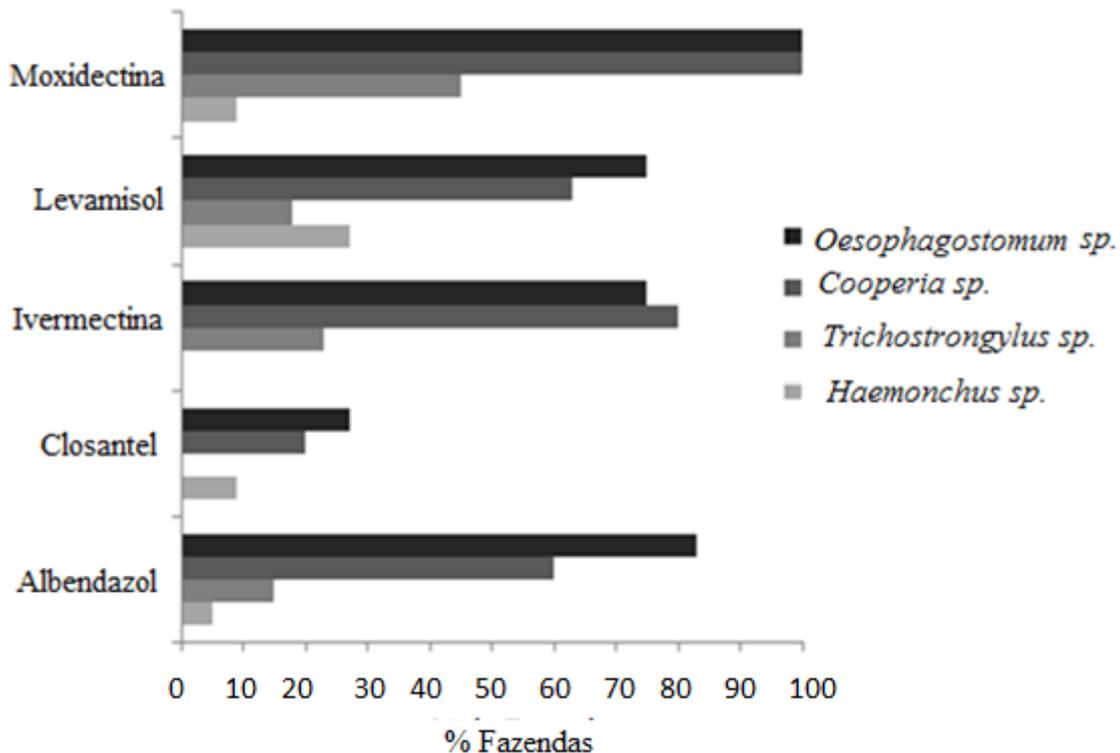


Figura. 3. Percentual de fazendas com eficácia anti-helmíntica por gênero de nematoide. Barras que não aparecem indicam 0% de eficácia.

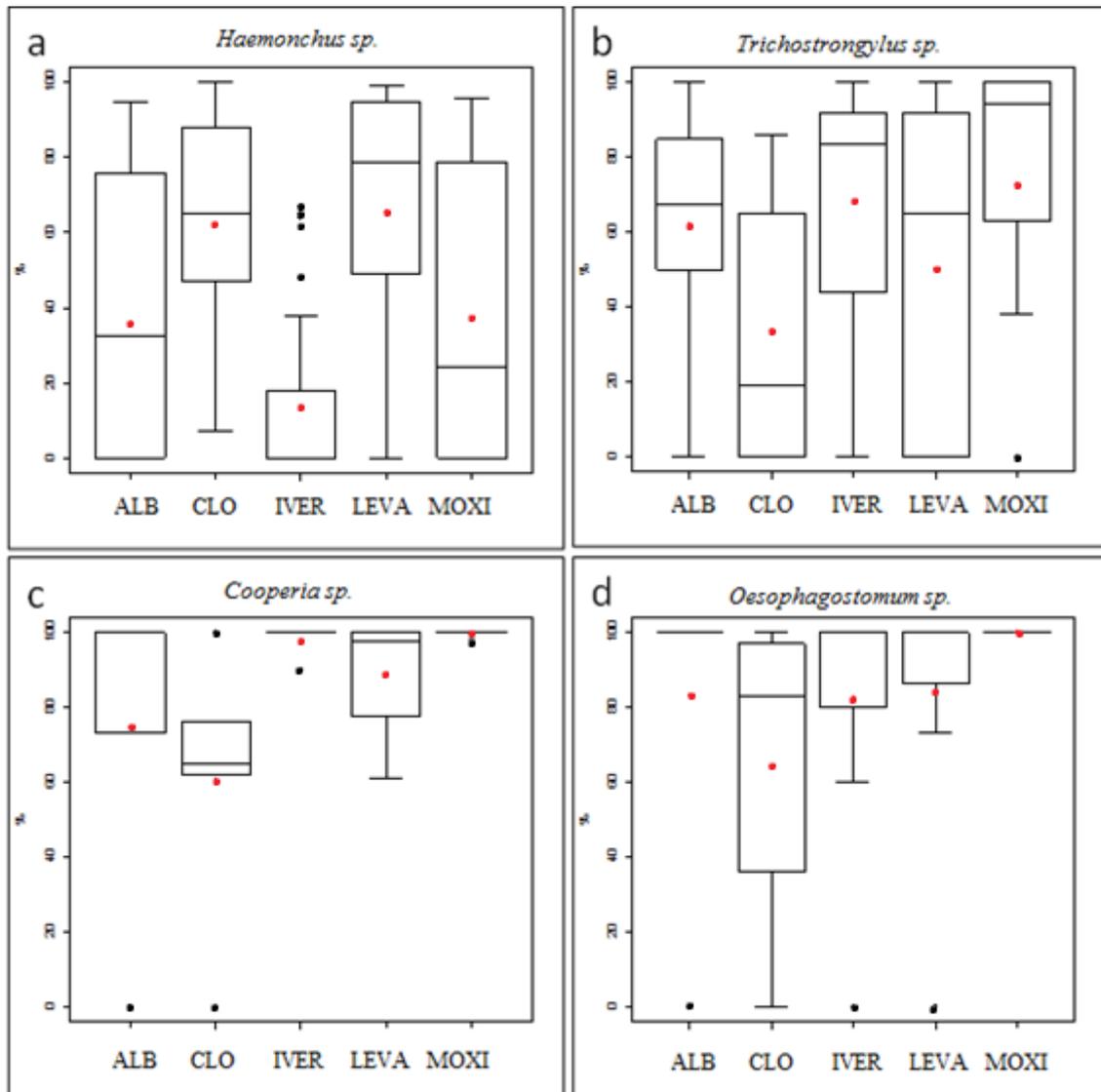


Figura 4. Distribuição da eficácia avaliada pelo teste da redução de contagem de ovos nas fezes (TRCOF) de 5 anti-helmínticos contra: (a) *Haemonchus* spp., (b) *Trichostrongylus* spp., (c) *Cooperia* spp. e (d) *Oesophagostomum* spp. As linhas horizontais representam as medianas, os pontos vermelhos representam as médias aritméticas e os pontos pretos representam os “outliers”.

Teste genotípico: polimorfismo F200Y no gene 1 da β -Tubulina:

Segundo o questionário, as sete fazendas selecionadas como mais resistentes ao albendazol tratavam todos os animais conjuntamente em intervalos fixos e sem critérios. Na tabela 1, observa-se que os últimos anti-helmínticos utilizados nestas fazendas foram levamisol, moxidectina e ivermectina. Porém, com a prática de alternância de princípios é provável que tenha havido a utilização de algum tipo de benzimidazol nos últimos anos.

A tabela 3 mostra as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo F200Y do gene β -tubulina 1 nas sete fazendas selecionadas com maior resistência fenotípica de *Haemonchus* spp. ao albendazol. Não houve heterogeneidade ($P < 0,05$) nas frequências gênicas entre as

fazendas estudadas. As frequências do alelo R variaram de 48% a 72% (média de 57%), e do genótipo resistente (RR ou RS) de 30% a 60%. A frequência do alelo S variou de 28% a 52% e do genótipo sensível (SS) de 30% a 43,3%. A média dos genótipos resistentes (RR + RS) foi igual a 73,3% e dos sensíveis igual a 26,7%. Os testes de eficácia fenotípica (TRCOF) geral ou específico para *Haemonchus* spp. apresentaram índices de em média 13% e 7,9% respectivamente.

Tabela 3. Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo F200Y do gene β -tubulina 1 em L3 de *Haemonchus* observada pelo Teste do Qui-quadrado (p : 0,6 X^2 : 11); Teste da Redução de Contagem de Ovos nas Fezes (TRCOF) de albendazol calculado sobre a proporção específica de *Haemonchus* spp. ou sobre todos os nematoides (geral) e, população parasitária de nematoides em sete fazendas de ovinos do estado do Rio de Janeiro.

FAZENDAS	FREQUÊNCIAS (%)					TRCOF (%)		POPULAÇÃO PARASITÁRIA (Gêneros %)			
	R ¹	S ²	RR ³	RS ³	SS ⁴	<i>Haemonchus</i>	Geral	<i>Haemonchus</i>	<i>Trichostrongylus</i>	<i>Cooperia</i>	<i>Oesophagostomum</i>
7	43 (0,72)	17 (0,28)	18 (60)	7 (23,3)	5 (16,7)	0	5	77	23	0	0
12	37 (0,62)	23 (0,38)	14 (46,7)	9 (30)	7 (23,3)	17	48	56	18	10	16
15	29 (0,48)	31 (0,52)	10 (33,3)	9 (30)	11 (36,7)	0	0	87	4	0	9
17	33 (0,55)	27 (0,45)	10 (33,3)	13 (43,3)	7 (23,3)	0	0	91	9	0	0
18	37 (0,62)	23 (0,38)	14 (46,6)	9 (30)	7 (23,4)	0	0	80	19	0	1
19	33 (0,55)	27 (0,45)	11 (37)	11 (37)	8 (27)	38	38	80	14	0	6
20	29 (0,48)	31 (0,52)	10 (33,3)	9 (30)	11 (36,7)	0	0	71	5	21	3
MÉDIA	57	43	41,4	31,9	26,7	7,9	13	77,4	13,1	4,4	5,0

¹ Alelo que confere resistência aos benzimidazóis (F200Y);

² Alelos que confere sensibilidade aos benzimidazóis;

³ Genótipos resistentes aos benzimidazóis;

⁴ Genótipo sensível aos benzimidazóis;

Discussão:

Este estudo demonstrou falhas no manejo anti-helmíntico do rebanho ovino do Rio de Janeiro, o mesmo observado por Cruz et al. (2010) avaliando fazendas no Norte e Noroeste do estado e por vários autores no Brasil (Echevarria et al., 1996; Cezar et al., 2010; Veríssimo et al., 2012; Niciura et al., 2012; Brasil et al., 2012; Nunes et al., 2013). A maioria das propriedades não possui critério clínico de tratamento, fazendo-o seguindo um calendário (mensal, bimestral, trimestral). Ou ainda aproveitando a ocasião de reunir o rebanho para vacinação, casqueamento ou manejo reprodutivo e tratando todos os animais de uma só vez. Esse tipo de manejo tem sido descrito como um dos agravantes para o surgimento da resistência anti-helmíntica por diminuir a população em refúgio, ou seja, de parasitos que ainda não entraram em contato com o fármaco (Kenyon et al., 2009; Molento et al., 2011; Rinaldi et al., 2014; Leathwick and Besier, 2014).

Aliado ao tratamento de todo o rebanho, nesse estudo foi verificado que em 36% dos casos a população parasitária era exposta mensalmente aos anti-helmínticos. A frequência de tratamento tem sido relatada como um agravante do aparecimento de resistência anti-helmíntica; entretanto, esse fator é particularmente importante em países de clima tropical onde há condições propícias para o desenvolvimento de estádios larvais (Leathwick and Besier 2014). De acordo com Bentousin et al. (2012), um tratamento eficaz contra nematoides gastrointestinais depende da correta identificação dos animais que precisam de anti-helmíntico. Porém, apesar de haver real necessidade da realização de exames clínicos e laboratoriais para se traçar estratégias de controle parasitário, esse fato ainda não é uma realidade na América Latina (Molento et al., 2011; Torres-Acosta et al., 2012). A realização de exames fecais, por exemplo, é limitada pelo custo operacional, necessidade de aparelhos laboratoriais e mão de obra (Molento et al., 2009).

O uso do OPG como forma de indicação ao tratamento nem sempre está correlacionado com a carga real parasitária do animal (Charlier et al., 2014). Entretanto, pode ser utilizado como acompanhamento da oscilação parasitária no rebanho, juntamente com outros parâmetros clínicos, principalmente quando interpretado com a identificação das espécies parasitárias. Apesar dos limitantes, a contagem de OPG é a prática mais convencional e padronizada de cálculo de eficácia em campo, fato primordial para a escolha da droga anti-helmíntica (Coles et al., 2006).

O método Famacha que avalia a coloração da mucosa ocular como critério de tratamento para nematoides hematófagos (Van Wyk and Bath, 2002) foi utilizado em apenas 7% das fazendas. Esse método tem demonstrado bons resultados como tratamento clínico seletivo no Brasil, onde *Haemonchus* é prevalente (Molento et al., 2004; Rosalinski-Moraes et al., 2012; Sotomaior et al., 2012; Vilela et al., 2012; Maia et al., 2014) e no Mundo (Burke et al., 2007; Di Loria et al., 2009; Scheuerle et al., 2010; Besier, 2012; Kaplan e Vidyashankar, 2012; Whitley et al., 2014). O método é bem aceito pelos produtores, uma vez que é de fácil aplicação no campo (Van Wyk et al., 2006). Entretanto, sua utilização só deve ser feita juntamente com outros exames clínicos e após treinamento (Molento et al., 2009). Abebe et al. (2010) ressaltam a importância da avaliação de outros sinais clínicos como escore de condição corporal, consistência das fezes para auxílio no diagnóstico e diminuição no uso supressivo de anti-helmínticos. No presente trabalho, as fazendas que utilizaram Famacha e OPG não tiveram menor grau de resistência anti-helmíntica provavelmente pelo trânsito de animais entre outras fazendas, favorecendo a troca de fluxo gênico de resistência, aliado a outros manejos equivocados.

Apesar do rebanho ovino do Rio de Janeiro ser em sua maioria da raça nativa brasileira Santa Inês e seus cruzamentos, isto tem sido descrito como fator relevante na resistência do hospedeiro ao parasitismo (Amarante et al., 2004, 2009; Shakya et al., 2011), pois nesse estudo não houve fazendas que fizessem melhoramento genético dentro do rebanho com intuito de se melhorar a resistência ao parasitismo. De acordo com Saddiqi et al. (2011) a capacidade do ovino para adquirir imunidade e expressar resistência varia substancialmente entre e dentro de raças, sendo estratégia sustentável para o controle de nematoides gastrointestinais.

Nas fazendas avaliadas, o manejo de pastagem não era feito com intuito de manejo parasitário, uma vez que nenhum produtor fazia rotação fixa de pastagem, uso de outros hospedeiros (bovinos e equinos) ou diminuição na lotação animal. O único manejo realizado pelos produtores foi “drench and move” em 60% dos casos. Porém, o fato de se tratar os animais e aloca-los em uma pastagem limpa (drench and move) tem sido relacionado como diminuição na população de refugia, uma vez que há povoamento da pastagem apenas com nematoides resistentes (Abbott et al., 2004; Molento, 2009; Kenyon et al., 2009). Este tipo de manejo somente seria viável em propriedades seguramente avaliadas com drogas que tenham eficácia de 100%. Sabe-se que a rotação de pastagens não é fator simples na descontaminação, uma vez que a sobrevivência das larvas depende de fatores climáticos podendo durar alguns meses (O'Connor et al., 2006) e a migração larvar atinge extratos

prontamente pastejados pelos animais (Silva et al., 2008). A diminuição do número de animais por área, taxa de lotação, assim como a rotação com outros hospedeiros são fatores relacionados ao controle de parasitoses (Mahieu, 2013; Fernandes et al., 2004).

O erro de manejo no controle parasitário poderia ser justificado pela carência de assistência veterinária. Porém, nesse estudo verificou-se que 64% dos produtores relataram ter algum tipo de consultoria. Ovinocultura não é uma atividade pecuária tradicional no estado do Rio de Janeiro; dessa forma, as consultorias, na maioria das vezes, são realizadas por veterinários especializados em outras atividades de maior importância econômica (bovino ou equideocultura) e em momentos pontuais. Sendo assim, apesar de haver consultoria veterinária em 64% das fazendas, o produtor não tem periodicidade de consultorias; esse fato é perceptível quando se observa que a indicação do fármaco é feito, na maioria das vezes, pela loja agropecuária ou por outros produtores. Segundo Molento (2009), deve haver maior comunicação entre laboratórios parasitologistas e profissionais ligados ao campo para que haja harmonia no repasse de tecnologia ao produtor rural.

Os erros de manejo foram refletidos no aparecimento de resistência múltipla, o que já tem sido observada em vários países, sendo um problema sério na América Latina onde ovinocultura é explorada economicamente (Torres Acosta et al., 2012). No Brasil, vários são os relatos de resistência anti-helmíntica: Paraná (Thomaz-Soccol et al., 2004; Falbo et al., 2009) Santa Catarina (Rosalinki-Moraes et al., 2007; Ramos et al., 2002), Rio Grande do Sul (Cezaret al., 2010); Mato Grosso do Sul (Sczesny-Moraes et al., 2010); Ceará (Melo et al., 2003); Paraíba (Rodrigues et al., 2007), Alagoas (Ahidet al., 2007), Rio Grande do Norte (Pereira et al., 2008; Ahid et al., 2008); Rio de Janeiro (Cruz et al., 2010) e São Paulo (Almeida et al., 2010; Veríssimo et al., 2012; Chagas et al., 2013).

De maneira geral, *Haemonchus* foi o parasito mais resistente aos fármacos fato comum no Brasil, por ser o parasito prevalente e o mais relacionado ao aparecimento de resistência (Almeida et al., 2010; Amarante et al., 1992). Contrariamente a relatos de trabalhos que mostram o uso principal de lactonas macrocíclicas ou benzimidazóis em ovinos no Brasil (Cruz et al., 2010; Veríssimo et al., 2012) ou em outros países (Torres-Acosta et al., 2003; Cernanská et al., 2008), neste trabalho houve o uso prevalentemente (última droga utilizada) de Levamisol e Closantel; o que indica a experiência prévia dos ovinocultores com insucesso no uso de benzimidazóis e lactonas macrocíclicas e a rotatividade rápida de princípios.

Levamisol, apesar de ser um dos anti-helmínticos mais utilizados no momento da pesquisa, foi o que apresentou eficácia em mais fazendas (36%); resultado também observado em estudo com as mesmos fármacos feito por Veríssimo et al. (2012). Entretanto, não

funcionou em nenhuma das fazendas que o utilizavam previamente ao estudo; fato observado devido a grande variabilidade nos índices de eficácia, que oscilou de 0 a 97%, nas 22 fazendas (Tabela 2). O melhor resultado obtido por esse fármaco provavelmente foi devido a maior eficiência contra *Haemonchus*, parasito prevalente (Figura 3). Da mesma forma, os baixos índices de eficácia em algumas fazendas (Figura 4a) foram contribuídos pela baixa eficácia ao *Trichostrongylus* (Figura 3), tendo grande variabilidade na distribuição dos dados de eficácia para esse gênero (Figura 4 b). Ineficácia de Levamisole ao *Trichostrongylus* spp. também foi reportada por Waller et al. (1995) ; Ramos et al. (2002); Rosalinski-Moraes et al. (2007); Almeida et al. (2010) e Mahieu et al. (2014).

Moxidectina e Closantel obtiveram eficácia geral similar nas fazendas avaliadas (em 9% das fazendas), porém, diferiram no espectro dos gêneros. Moxidectin apresentou melhor eficácia contra *Trichostrongylus* spp., que foi altamente resistente ao closantel (Figura 3 e Figura 4 b), o mesmo resultado observado por Almeida et al (2010). Porém, contra *Haemonchus* spp., Moxidectina apresentou alto grau de resistência (Figura 3), com valores centrais de eficácia entre 20-40%, semelhantes ao albendazole (figura 4 a). Ineficácia de Moxidectina principalmente a *Haemonchus* spp. também foi vista por Cezar et al. (2010); Veríssimo et al. (2012) e Chagas et al. (2013).

Closantel foi a droga que apresentou menor eficácia contra *Cooperia* spp. e *Oesophagostomum* spp. não funcionando em nenhuma fazenda para *Trichostrongylus* (figuras 3 e 4 b, c e d). *Oesophagostomum* spp. e *Cooperia* spp. comumente não são parasitos com alto relato de resistência em ovinos; nesse trabalho foram os gêneros com menor índice de resistência; entretanto, somente moxidectina funcionou 100% contra esses dois gêneros (Figura 3). Closantel tem sido descrita como específica para o controle de *Haemonchus* spp. (Spinosa et al., 2006); e no presente trabalho apenas apresentou eficácia para o gênero em apenas de 9% das propriedades avaliadas. Cezar et al. (2010) também encontraram a resistência de *Haemonchus* spp. ao closantel. Por ser uma das drogas mais utilizadas no estado, observa-se o grande erro no manejo parasitário efetuado pelo produtor frente ao alto grau de resistência.

Ivermectina e Albendazol foram os anti-helmínticos com maior grau de resistência nesse estudo. Os dois fármacos só obtiveram eficácia para *Cooperia* spp. e *Oesophagostomum* spp. (Figuras 3; 4 C e D), tendo alto grau de resistência contra *Haemonchus* spp., inclusive com Ivermectina não funcionando em nenhuma fazenda para esse gênero. Esses dados confirmam os obtidos por outros trabalhos no Brasil (Echevarria et al., 1996; Cezar et al., 2010; Cruz et al., 2010; Veríssimo et al., 2012; Niciura et al., 2012; Chagas et al., 2013) e em

outros países como Canadá (Falzon et al., 2013), Paraguai (Maciel et al., 1996) e EUA (Howell et al., 2008). O alto grau de ineficácia se deve por serem fármacos de uso muito antigo, com os primeiros relatos de resistência no Brasil aos benzimidazóis (Dos Santos and Gonçalves, 1967) e à ivermectina (Echevarria and Trindade, 1989), sendo *Haemonchus* o gênero mais resistente a esses dois anti-helmínticos. Ivermectina, apesar de nesse estudo não ser a principal droga utilizada no momento da pesquisa como endoparasiticida, é utilizada em 80% dos casos rotineiramente como ectoparasiticida. Esse fato é comum no Brasil, havendo contribuição significativa no aparecimento e manutenção de resistência às lactonas macrocíclicas. Cruz et al. (2010) verificaram que 72% dos fazendeiros faziam uso ou já tinham utilizado ivermectina no Norte e Noroeste do Rio de Janeiro.

A resistência ao albendazol foi confirmada pela presença de polimorfismos (SNPs) F200Y na β -tubulina com elevada frequência de alelos e genótipos resistentes. Pode-se observar que as populações estão em desequilíbrio de Hardy-Weinberg, pois as frequências genotípicas não seguem a proporção esperada $p^2 + 2pq + q^2$ (Crow, 1999). Há claro excesso de homozigotos RR (acima da frequência esperada p^2), o que indica que os indivíduos com este genótipo estão sobrevivendo melhor no ambiente analisado (seleção positiva de genótipo RR). Este resultado corrobora a baixa eficácia de albendazol nestes rebanhos. Mesmo o albendazol não sendo o último anti-helmíntico utilizado na maioria das fazendas, é provável que ele tenha participado na rotação de bases anti-helmínticas nos rebanhos nos últimos meses.

A frequência média de alelos de resistência (53%) neste trabalho foram superiores às encontradas em rebanhos ovinos por Nunes et al. (2013) em Minas Gerais (43%), Niciura et al. (2012) em São Paulo (52%) e Santos et al. (2014) no Ceará (32%). Ainda que no trabalho realizado no Ceará em alguns rebanhos o TRCOF tenha acusado 0% de eficácia, como foi o caso do presente trabalho, porém Santos et al. (2014) utilizaram vermes adultos e oxfendazol, ao passo que neste trabalho foram utilizados L3 e albendazol. Como foi visto no questionário aos produtores, a alta frequência de alelos de resistência foi ocasionada pela adoção de manejos equivocados como tratamento de todos os animais, rotação de bases anti-helmínticas (incluindo uso de benzimidazóis) e dosagens aleatórias. Ainda, a presença de SNPs F200Y estão sendo relacionados à resistência de outras classes de fármacos como é o caso de lactonas macrocíclicas (Ashraf et al., 2015), anti-helmínticos comumente utilizados no rebanho avaliado e que também deram baixa eficácia.

Não houve heterogeneidade dos genes entre as fazendas de ovinos possivelmente porque os rebanhos foram previamente selecionados com o mais alto índice de resistência do

Haemonchus spp. ao albendazol pelo TRCOF (variando de 0 a 38%). Além disso, o rebanho ovino do Rio de Janeiro é muito pequeno e o estado também possui pequeno território (43,696 km²), facilitando o trânsito de animais entre fazendas e conseqüentemente o fluxo gênico que é alto na população de trichostrongylídeos (Silvestre et al., 2009; Brasil et al., 2012). Segundo Nunes et al. (2013) a baixa variabilidade genética entre rebanhos torna possível estimar a resistência com amostragens obtidas de poucos animais, inclusive entre espécies de ruminantes que compartilham áreas comuns. A alta proporção de *Haemonchus* spp. na população parasitária também favorece surgimento de mutações dada a grande prolificidade e ovopostura deste gênero (Prichard., 2001).

Buscando-se correlacionar os dois testes padronizados para diagnóstico de resistência aos benzimidazóis (TRCOF e SNPs F200Y), ao comparar as frequências de genótipos sensíveis (SS) com as eficácias do TRCOF, nota-se que o teste fenotípico acusa eficácia mais baixa do que a frequência de genes sensíveis no rebanho (Tabela 3). É importante lembrar que o TRCOF possui inúmeras variáveis que podem modificar em algum grau o índice de eficácia (Fortes e Molento, 2013). Ainda, a análise de polimorfismos F200Y é um dos três SNPs sabidamente envolvidos na resistência aos benzimidazóis, havendo outros (F167Y e E198A), que podem ocasionar resistência (Ghisi et al., 2007) não sendo acusados nesta análise. Brasil et al. (2012) encontraram valores muito próximos de frequências de F167 Y e F200Y relacionadas à resistência aos benzimidazóis. Mesmo assim, no presente estudo ambos os testes (fenotípico e genotípico) indicaram alto grau de resistência do *Haemonchus* spp. ao albendazol seja pela baixa redução na contagem de ovos nas fezes ou pela alta frequência de alelos relacionados à resistência (Tabela 3).

Como é frequente a realização do TRCOF com a população parasitária geral do rebanho e não especificamente por gênero de nematoídeo, buscou-se comparar formas de cálculo e o teste genotípico (feito com L₃ de *Haemonchus* spp.). Ao se analisar o TRCOF geral e específico para este parasito, nota-se que os resultados são muito próximos, principalmente quando o percentual de *Haemonchus* spp. foi superior a 70%, exceto quando a população parasitária é muito heterogênea, como foi o caso da fazenda 12 (Tabela 3). Nestes casos, para fins de diagnóstico pode ser necessária a realização de testes genotípicos em mais de um gênero de nematoídeo. Resultados de SNPs em diversas espécies de nematoides tem sido obtidos como em *Teladorsagia* (Skuce et al., 2010) ou em *Nematodirus battus* (Morison et al., 2014). Sendo assim, nota-se a importância do conhecimento da população parasitária previamente a qualquer diagnóstico de resistência.

Conclusão:

A utilização conjunta de testes fenotípicos e genotípicos detectou alta proporção de resistência anti-helmíntica de múltiplos fármacos e gêneros parasitários no rebanho ovino do Rio de Janeiro. Sendo este fato justificado pelas falhas no manejo como o tratamento de todos os animais, falta de critério de avaliação clínica ou laboratorial e rotação rápida de bases anti-helmínticas. Com o avanço e padronização dos testes moleculares, são necessárias abordagens mais amplas que propiciem uma visão global dos rebanhos juntamente com as práticas de manejo e os exames laboratoriais realizados, e que esse conhecimento seja acessível ao produtor.

Referências:

- ABBOTT, K.A.; TAYLOR, M.A.; STUBBINGS, L.A. Anthelmintic resistance management in sheep. **Veterinary Record.**, v. 154, p. 735–736, 2014.
- ABEBE, R.; GEBREYOHANNES, M.; MEKURIA, S.; ABUNNA, F.; REGASSA, A. Gastrointestinal nematode infections in small ruminants under the traditional husbandry system during the dry season in southern Ethiopia. **Trop Anim Health**, v. 42, p. 1111–1117, 2010.
- AHID, S. M.; SUASSUNA, A.C.D.; MAIA, M. B.; COSTA, V.M.M.C.; SOARES, H.S. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da Região do Oeste do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 212-218, 2008.
- AHID, S.M.M.; CAVALCANTE, D.A.; BEZERRA, A.C.D.; SOARES, H.S.; PEREIRA, R.H.M.A. Eficácia anti-helmíntica em rebanho caprino no estado do Alagoas. **Acta Veterinaria Brasília**, v.1, n.2, p.56-59, 2007.
- ALMEIDA, F.A.; GARCIA, K.C.O.D.; TORGERSON, P.R.; AMARANTE, A.F.T. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v. 59, p. 622–625, 2010.
- AMARANTE, A.F.T.; BARBOSA, M.A.; OLIVEIRA, M.A.G.; CARMELLO, M.J.; PADOVANI, C.R. Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e levamisol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. V. 29, v. 31-8, 1992.
- AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A.; ROCHA, R.A.; GENNARI, S.M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 120, p. 91–106, 2004.
- AMARANTE, A.F.T.; SUSIN, I.; ROCHA, R.A.; SILVA, M.B.; MENDES, C.Q.; PIRES, A. V. Resistance of Santa Ines and crossbred ewes to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 273–280, 2009.
- ASHRAF, S.; MANI, T.; BEECH, R.; PRICHARD, R. Macrocyclic lactones and their relationship to the SNPs related to benzimidazole resistance. **Molecular and**

- Biochemical Parasitology**, v. 201, n. 2, p. 128-34. doi: 10.1016/j.molbiopara.2015.07.007, 2015.
- BARTLEY, D.J.; JACKSON, F.; JACKSON, E.; SARGISON, N. Characterisation of two triple resistant field isolates of *Teladorsagia* from Scottish lowland sheep farms. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 189–199, 2004.
- BENTOUNSI, B.; MERADI, S.; CABARET, J. Towards finding effective indicators (diarrhoea and anaemia scores and weight gain) for the implementation of targeted selective treatment against the gastro-intestinal nematodes in lambs in a steppic environment. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 275-279, 2012.
- BESIER, R.B. Refugia-based strategies for sustainable worm control: factors affecting the acceptability to sheep and goat owners. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 2–9, 2012.
- BONADIMAN, S. F.; EDERLI, N. B.; SOARES, A. K. P.; MORAES NETO, A. H. A.; SANTOS, C. P.; DAMATTA, R. A. Occurrence of *Libyostongylus* spp. (Nematoda) in ostriches (*Struthio camelus* Linnaeus, 1758) from the north of the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 175-179, 2006.
- BRASIL, B. S. A. F.; NUNES, R. L.; BASTIANETTO, E.; DRUMMOND, M. G.; CARVALHO, D. C.; LEITE, R. C.; MOLENTO, M. B.; OLIVEIRA, D. A. Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 5, p. 469-479. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.03.003>, 2012.
- BURKE, J. M.; KAPLAN, R. M.; MILLER, J. E.; TERRILL, T. H.; GETZ, W. R.; MOBINI, S.; VALENCIA, E.; WILLIAMS, M. J.; WILLIAMSON, L. H.; VATTA, A.F. Accuracy of the FAMACHA© system for on-farm use by sheep and goat producers in the southeastern United States. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 89–95, 2007.
- CERNANSKÁ, D.; VÁRADY, M.; CUDEKOVÁ, P.; CORBA, J. Worm control practices on sheep farms in the Slovak Republic. **Veterinary Parasitology**, v. 154, p. 270–276, 2008.
- CEZAR, A. S.; TOSCANA, G.; CAMILLO, G.; SANGIONI, L.A.; RIBAS, H.O.; VOGEL, F.S.F. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 157–160, 2010.
- CHAGAS, A. C. S.; KATIKI, L. M.; SILVA, I. C.; GIGLIOTI, R.; ESTEVES, S. N.; OLIVEIRA, M.C. S.; BARIONI JÚNIOR, W. *Haemonchus contortus*: A multiple-resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. **Parasitology International**. 62, 1–6, 2013.
- CHARLIER, J.; MORGAN, L.; RINALDI, E. R.; VAN DIJK, J.; DEMELER, J.; HÖGLUND, J.; HERTZBERG, H.; VAN RANST, B.; HENDRICKX, G.; VERCRUYSSSE, J.; KENYON, F. Practices to optimise gastrointestinal nematode control on sheep, goat and cattle farms in Europe using targeted (selective) treatments. **Veterinary Record**, v. 175, n. 10, p. 250-5. doi: 10.1136/vr.102512, 2014.
- COLES, G.C.; JACKSON, F.; POMROY, W.E.; PRICHARD, R.K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M.A.; VERCRUYSSSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 167–185, 2006.
- CROW, J.F. Hardy, Weinberg and language impediments. **Genetics**, v. 152, p. 821-825. Disponível em: genetics.org/content/152/3/821.full, 1999.

- CRUZ, D.G.; ROCHA, L.O.; ARRUDA, S.S.; PALIERAQUI, J.G.B.; CORDEIRO, R.C.; SANTOS JUNIOR, E.; MOLENTO, M.B.; SANTOS, C.P. Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 340–343, 2010.
- DEMELER, J.; KUTTLER, 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**, v. 170, p. 61–70, 2010.
- DI LORIA, A.; VENEZIANO, V.; PIANTEDOSI, D.; RINALDI, L.; CORTESE, L.; MEZZINO, L.; CRINGOLI, G.; CIARAMELLA, P. Evaluation of the FAMACHA© system for detecting the severity of anaemia in sheep from southern Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 53–59, 2009.
- DOMKE, A.V.; CHARTIER, C.; GJERDE, B.; HÖGLUND, J.; LEINE, N.; VATN, S.; STUEN, S. Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep and goats in Norway. **Parasitology Research**, v.11, p. 185-93, 2012.
- DOS SANTOS, V.T.; GONÇALVES, P.C. Verificação de estirpe resistente de *Haemonchus* resistente ao thiabendazole no Rio Grande do Sul (Brasil). **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária**. V. 9, p. 201-209, 1967.
- ECHEVARRIA, F. A. M.; TRINDADE, G. N. P. Anthelmintic resistance by *Haemonchus contortus* to ivermectin in Brazil. **Veterinary Record**, v.124, p.147-148, 1989.
- ECHEVARRIA, F.; BORBA, M.F.S.; PINHEIRO, A.C.; WALLER, P.J.; HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 199–206, 1996.
- FALBO, M.K.; THOMAZ-SOCCO, V.; SANDINI, I.E.; NEUMANN, M.; ISHIY, T.M. Atividade anti-helmíntica do triclorfon e closantel em cordeiros naturalmente infectados por *Haemonchus* spp. **Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 926-930, 2009.
- FALZON, L. C.; O'NEILL, T. J.; MENZIES, P. I.; PEREGRINE, A. S.; JONES-BITTON, A.; VANLEEUEWENE, J.; MEDEROS. A. A systematic review and meta-analysis of factors associated with anthelmintic resistance in sheep. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 15, p. 388-402, 2014.
- FALZON, L.C.; MENZIES, P.I.; SHAKYA, K.P.; JONES-BITTON, A.; VANLEEUEWENC, J.; AVULA, J.; STEWART, H.; JANSENE, J.T.; TAYLOR, M. A.; LEARMOUNT, J.; PEREGRINE, A.S. Anthelmintic resistance in sheep flocks in Ontario, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 19 , p. 150–162, 2013.
- FERNANDES, L. F.; SENO, M.C.Z.; AMARANTE, A.F.T.; SOUZA, H.; BELLUZZO, C.E.C. Effect of rotation al and alternate grazing with adult cattle on the control of nematode parasites in sheep. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.6, p.733-740, 2004.
- FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, p. 1391-1402, 2013.
- GASSER, R. B.; SCHWARZ, E. M.; KORHONEN, P. K.; YOUNG, N. D. Understanding *Haemonchus contortus* Better Through Genomics and Transcriptomics. **Advances in Parasitology**, 93, p. 519-67. doi: 10.1016/bs.apar.2016.02.015, 2016.

- GEURDEN, T.; JACQUIET, H. H. P.; TRAVERSA, D.; SOTIRAKI, S.; REGALBONO, A. F.; TZANIDAKIS, N.; KOSTOPOULOU, D.; GAILLAC, C.; PRIVAT, S.; GIANGASPERO, A.; ZANARDELLO, C.; NOÉ, L.; VANIMISSETTI, B.; BARTRAM, D. Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 201, p. 59–66, 2014.
- Ghisi M, Kaminsky R, Mäser P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. **Veterinary Parasitology**, 144, p. 313-320, 2007.
- GORDON, N.M.; WITHLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**. v. 12, p. 50–52, 1939.
- HOWELL, S. B.; BURKE, J. M.; MILLER, J. E.; TERRILL, T. H.; VALENCIA, E.; WILLIAMS, M. J.; WILLIAMSON, L. H.; ZAJAC, A. M.; KAPLAN, R. M. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the southeastern United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 233, p. 1913–1919, 2008
- KAPLAN, R. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol.*, v. 20, p. 477–481, 2004.
- KAPLAN, R. M.; VIDYASHANKAR, A. N. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, 186, 70–78, 2012.
- KENYON, F.; GREER, A. W.; COLES, G. C.; CRINGOLI, G.; PAPADOPOULOS, E.; CABARETF, J.; BERRAG, B.; VARADY, M.; VAN WYK, J. A.; THOMAS, E.; VERCRUYSSSE, J.; JACKSON, F. The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p.3–11, 2009.
- LEATHWICK, D. M.; BESIÉ, R. B. The management of anthelmintic resistance in grazing ruminants in Australasia Strategies and experiences. **Veterinary Parasitology**, v. 204, p. 44–54, 2014.
- MACIEL, S.; GIMÉNEZ, A.; GAONA, C.; WALLER, P. J.; HANSEN, J. W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Paraguay. **Veterinary Parasitology**, v. 62, n. 3–4, p. 207–212, 1996
- MAHIEU, M. Effects of stocking rates on gastrointestinal nematode infection levels in a goat/cattle rotational stocking system. **Veterinary Parasitology**, v. 15, p.136-44, 2013.
- MAHIEU, M.; FERRÉA, B.; MADASSAMY, M.; MANDONNET, N. Fifteen years later, anthelmintic resistances have dramatically spread over goat farms in Guadeloupe. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 379–384, 2014.
- MAIA, D.; ROSALINSKI-MORAES, F.; VAN WYK, J. A.; WEBER, S.; SOTOMAIOR, C. S. Assessment of a hands-on method for FAMACHA© system training. **Veterinary Parasitology**, v. 200, p. 165–171, 2014.
- MCKENNA PB. Further studies on the necessity or otherwise of multiple pre-treatment groups in faecal egg count reduction tests in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 200, p. 212-215, 2014.

- MELO, A. C. F.; REIS, I. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; VIEIRA, L. S.; ECHEVARRIA, F. A. M.; MELO, L. M. Nematódeos resistentes a anti-helmínticos em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 339-344, 2003.
- MOLENTO, M. B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 229–234, 2009.
- MOLENTO, M. B.; FORTES, F. S.; PONDELEK, D. A. S.; BORGES, F. A.; CHAGAS, A. C. S.; TORRES-ACOSTA, J. F.; GELDHOFF, P. Challenges of nematode control in ruminants: focus on Latin America. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 126–132, 2011.
- MOLENTO, M. B.; GAVIÃO, A. A.; DEPNER, R. A.; PIRES, C. C. Frequency of treatment and production performance using the FAMACHA© method compared with preventive control in ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 314–319, 2009.
- MOLENTO, M. B.; TASCA, C.; GALLO, A.; FERREIRA, M.; BONONI, R., STECCA, E. FAMACHA© guide as an individual clinical parameter for *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. **Ciencia Rural**, v. 34, p. 1139–1145, 2004.
- MORRISON, A. A.; MITCHELL, S.; MEARNS, R.; RICHARDS, I.; MATTHEWS, J. B.; BARTLEY, D. J. Phenotypic and genotypic analysis of benzimidazole resistance in the ovine parasite *Nematodirus battus*. **Veterinary Research**, v. 9, p. 45:116. doi: 10.1186/s13567-014-0116-5, 2014.
- NAGY, G.; CSIVINCSIK, A.; ZSOLNAI, A.; SUGÁR, L. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* recovered from farmed red deer. **Parasitology Research**, p. 1-5, DOI 10.1007/s00436-016-5155-6, 2016.
- NICIURA, S. C. M.; VERÍSSIMO, C. J.; GROMBONI, J. G. G.; ROCHA, M. I. P.; MELLO, S. S.; BARBOSA, C. M. P.; CHIEBAO, D. P.; CARDOSO, D.; SILVA, G. S.; OTSUK, I. P.; PEREIRA, J. R.; AMBROSIO, L. A.; NARDONH, R. F.; UENO, T. E. H.; MOLENTO, M. B. F200Y polymorphism in the -tubulin gene in field isolates of *Haemonchus contortus* and risk factors of sheep flock management practices related to anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 608–612, 2012.
- NUNES, R L.; SANTOS, L L.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, D. A. A.; BRASIL, B. S. A. F. Frequency of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* populations isolated from buffalo, goat and sheep herds. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 548-553, 2013.
- O'CONNOR, L. J.; WALKDEN-BROWN, S. W.; KAHN, L. P. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 1–15, 2006.
- PEREIRA, R. H. M. A.; AHID, S. M.; BEZERRA, A. C. D. S.; SOARES, H. S.; FONSECA, Z. A. A. S. Diagnóstico da resistência dos nematóides gastrintestinais a anti-helmínticos em rebanhos caprino e ovino do RN. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.1, p.16-19, 2008.
- PRICHARD, R. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trends in Parasitology**, v. 17, p. 445–453, 2001.
- RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; ÁVILA, V. S.; COUTINHO, G. C., SOUZA, A.P. Gastrointestinal parasites resistance in sheep to some anthelmintics in Santa Catarina State, Brazil. **Ciência Rural**, v.32, n.3, p.473-477, 2002
- RINALDI, L.; ERIC, R.; BOSCO, A.; COLES, G. C.; CRINGOLI, G. The maintenance of anthelmintic efficacy in sheep in a Mediterranean climate. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1–2, p.139–143, 2014.

- RODRIGUES, A. B.; ATHAYDE, A. C. R.; RODRIGUES, O. G.; SILVA, W. W.; FARIA, E. Sensibilidade dos nematóides gastrintestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 162-166, 2007.
- ROSALINSKI-MORAES, F.; MORETTO, L.H.; BRESOLIN, W.S.; GABRIELLI, I.; KAFER, L.; ZANCHET, I. K.; SONAGLIO, F.; THOMAZ-SOCCOL, V. Resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos da região da associação dos municípios do alto Irani (AMAI), Oeste de Santa Catarina. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 8, p. 559–565, 2007.
- ROSALINSKI-MORAES, F.; FERNANDES, F.G.; MUNARETTO, A.; DE OLIVEIRA, S.; WILMSEN, M. O.; PEREIRA, M. W.; MEIRELLES, A. C. F. Famacha system, body condition score and diarrhea score as indicators for the targeted selective anthelmintic treatment of breeding ewes. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 6, p.1015-1023, 2012.
- SADDIQLI, H. A.; JABBAR, A.; SARWAR, M.; IQBAL, Z., MUHAMMAD, G.; NISA, M.; SHAHZAD, A. Small ruminant resistance against gastrointestinal nematodes: a case of *Haemonchus contortus*. **Parasitology Research**, v. 109, p. 1483-500, doi: 10.1007/s00436-011-2576-0, 2011.
- SANTOS, J. M. L.; MONTEIRO, J. P.; RIBEIRO, W. L. C.; MACEDO, I. T. F.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; VIEIRA, L. S.; BEVILAQUA, C. M. L. Identification and quantification of benzimidazole resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.199, p. 160-164, doi: 10.1016/j.vetpar.2013.11.006, 2014.
- SCHEUERLE, M.; MAHLING, M., MUNTWYLER, J.; PFISTER, K. The accuracy of the FAMACHA© method in detecting anaemia and haemonchosis in goat flocks in Switzerland under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 71–77, 2010.
- SCZESNY-MORAES, E.A., BIANCHIN, I., SILVA, K.F., CATTO, J.B., HONER, M.R., PAIVA, F., 2010. Resistência anti-helmíntica de nematóides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 229-236.
- SHAKYA, K.P., MILLER, J.E., LOMAX, L.G., BURNETT, D.D. 2011. Evaluation of immune response to artificial infections of *Haemonchus contortus* in Gulf Coast Native compared with Suffolk lambs. **Veterinary Parasitology**. 181, 239–247.
- SILVA, B.F.; AMARANTE, M. R. V.; KADRI, S. M.; CARRIJO-MAUAD, J. R.; AMARANTE, A. F. T. Vertical migration of *Haemonchus contortus* third stage larvae on *Brachiaria decumbens* grass. **Veterinary Parasitology**, v.158, p. 85–92, 2008.
- SILVESTRE, A.; CABARET, J. Mutation in position 167 of isotype 1 beta-tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 2, p. 297-300. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00455-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00455-8), 2002.
- SILVESTRE, A.; HUMBERT, J. F. A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites. **Experimental Parasitology**, v. 95, n. 4, p. 271-276, doi: <http://dx.doi.org/10.1006/expr.2000.4542>, 2000.
- SILVESTRE, A.; SAUVE, C.; CORTET, J.; CABARET, J. Contrasting genetic structures of two parasitic nematodes, determined on the basis of neutral microsatellite markers and selected anthelmintic resistance markers. **Molecular Ecology**, v.18, n. 24, 2009.

- SKUCE, P.; STENHOUSEA, L.; JACKSON, F.; HYPŠA, V.; GILLEARD, J. Benzimidazole resistance allele haplotype diversity in United Kingdom isolates of *Teladorsagia circumcincta* supports a hypothesis of multiple origins of resistance by recurrent mutation. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 1247–1255, 2010.
- SOTOMAIOR, C.S.; ROSALINSKI-MORAES, F.; COSTA, A. R. B.; MAIA, D.; MONTEIRO, A. L.; VAN WYK, J. A. Sensitivity and specificity of the FAMACHA© system in Suffolk sheep and crossbred Boer goats. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 114–119, 2012.
- SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK S. L.; BERNARDI M. M. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guana- bara Koogan, p.256, 2006.
- STEAR, M.J.; SINGLETON, D.; MATTHEWS, L. An evolutionary perspective on gastrointestinal nematodes of sheep. **Journal of Helminthology**, v. 85, p. 113–120, 2011.
- THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F. P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E. A.; MILCZEWSKI, V.; MOCELIN, G.; PESSOA E SILVA, M. C. Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 41–47, 2004.
- TORRES-ACOSTA, J. F. J.; DZUL-CANCHE, U.; AGUILAR-CABALLERO, A. J.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I. Prevalence of benzimidazole resistant nematodes in sheep flocks in Yucatan, Mexico. **Veterinary Parasitology**. v. 114, p. 33–42, 2003.
- TORRES-ACOSTA, J.F.J.; MENDOZA-DE-GIVES, P.; AGUILAR-CABALLERO, A.J.; CUÉLLAR-ORDAZ, J. A. Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. **Veterinary Parasitology**. v. 189, p. 89–96, 2012.
- VAN WYK, J. A.; BATH, G. F. The FAMACHA(c) system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. **Veterinary Research**, v. 33, p. 509–529, 2002.
- VAN WYK, J. A.; HOSTE, H.; KAPLAN, R. M.; BESIÉ, R. B. Targeted selective treatment for worm management- How do we sell rational programs to farmers? **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 336–346, 2006.
- VAN WYK, J. A.; MAYHEW, E. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide, Onderstepoort **Journal of Veterinary Research**, v. 80, n. 1, p. 539-553, 2013.
- VERÍSSIMO, C. J.; NICIURA, S. C. M.; ALBERTI, A. L.; RODRIGUES, C. F. C.; BARBOSA, C. M. P.; CHIEBAOE, D. P.; CARDOSO, D.; SILVA, G. S.; PEREIRA, J. R.; MARGATHOI, L. F. F.; COSTA, R. L. D.; NARDON, R. F.; UENOK, T. E. H.; CURCIF, V. C. L. M.; MOLENTO, M. B. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 209–216, 2012.
- VILELA, V. L. R.; FEITOSA, T. F.; LINHARES, E. F.; ATHAYDE, A. C. R.; MOLENTO, M. B.; AZEVEDO S. S. FAMACHA© method as an auxiliary strategy in the control of gastrointestinal helminthiasis of dairy goats under semiarid conditions of Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 281–284, 2012.
- WALLER, P. J.; DASH, K. M.; BARGER, I. A.; LE JAMBRE, L. F.; PLANT, J. Anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep: learning from the Australian experience. **Veterinary Record**, v. 136, p. 411- 413, 1995.

- WHITLEY, N. C.; OHA, S. H.; LEE, S.J.; SCHOENIAN, S.; KAPLAN, R. M.; STOREY, B.; TERRILL, T. H.; MOBINI, S.; BURKE, J. M., MILLER, J. E.; PERDUE, M. A. Impact of integrated gastrointestinal nematode management training for U.S. goat and sheep producers. **Veterinary Parasitology**, v. 200, p. 271–275, 2014.
- WHITTAKER, J. H.; CARLSON, S. A.; JONES, D. E.; BREWER, M. T. Molecular mechanisms for anthelmintic resistance in strongyle nematode parasites of veterinary importance. **Journal Veterinary Pharmacology**, doi: 10.1111/jvp.12330, 2016.
- WURSTHORN, L.; MARTIN, P. Reso: faecal egg count reduction test (FECRT) Analysis Program. 2.01. Parkville: CSIRO Animal Health Research Laboratory, 1990.

5) ARTIGO 4:

DIAGNÓSTICO QUALI-QUANTITATIVO MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE GÊNEROS DE NEMATÓIDES GASTROINTESTINAIS DE OVINOS EM “POOLS” DE LARVAS.

Resumo:

Estratégias de controle parasitário em ovinos são baseadas no diagnóstico dos gêneros de nematoides gastrointestinais em suas diferentes prevalências e proporções. Esse estudo comparou uma técnica padronizada de identificação morfológica de gêneros de nematoides em ovinos a outra baseada na análise molecular de fragmentos. Foram identificadas 171 amostras de pool de larvas de terceiro estágio (L₃) provenientes de fezes coletadas de 2000 ovinos distribuídos em 22 propriedades do estado do Rio de Janeiro. Para cada amostra, foram direcionadas 100 L₃ para análise morfológica e 10 µl de L₃, suspensas em água destilada, para análise molecular. Nesta análise, foram feitas reações em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do DNA da região ITS-2 ribossomal (*Internal Transcribed Spacer 2*) seguida de análise de fragmentos por eletroforese capilar para a identificação e quantificação de nematoides em nível de gênero. Foram realizadas análises de concordância e correlação para averiguação da semelhança de diagnóstico entre as duas técnicas, além do cálculo de sensibilidade, especificidade e média da proporção de gêneros. A concordância da detecção de nematoides pelas duas técnicas foi alta para todos os gêneros (*Oesophagostomum*, *Haemonchus*, *Trichostrongylus* e *Cooperia*) com valores de 0,84; 0,99; 0,84; 0,90 respectivamente. Os valores de kappa foram afetados pela alta presença dos nematoides *Haemonchus* e *Trichostrongylus* e baixa quantidade de semelhança entre negativos. Sendo este índice para *Oesophagostomum*, *Haemonchus*, *Cooperia* e *Trichostrongylus* de 0,56; 0,50 e 0,66 e 0,18 respectivamente. A sensibilidade e posteriormente a especificidade das técnicas (considerando a técnica morfológica como padrão) para *Oesophagostomum*, *Trichostrongylus* e *Cooperia* foram de respectivamente de 0,72; 0,92; 0,79 e 0,87; 0,25 e 0,92. A proporção geral dos gêneros de nematoides de todas as amostras (N=171) para os gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Oesophagostomum* e *Cooperia* foram respectivamente para a análise molecular: 78,6%; 17,3%; 2,7%; 1,4% e morfológica: 77,2%; 18,6%; 1,9%; e 2,3%. Os valores da correlação ($p \leq 0,05$) entre os percentuais detectados nas amostras para os gêneros *Oesophagostomum*, *Haemonchus*, *Trichostrongylus* e *Cooperia* foram respectivamente de 0,77; 0,84; 0,85 e 0,80. A concordância entre os dados para a mesma sequência de gêneros foi de respectivamente 0,75; 0,84; 0,88 e 0,68. A avaliação molecular de fragmentos demonstrou compatibilidade e maior sensibilidade ao diagnóstico morfológico dos nematoides, principalmente quando estes estavam em baixo percentual na amostra. Portanto, a mesma tem potencial de uso de diagnóstico quali-quantitativo para identificação de gêneros de nematoides de ovinos em amostras contendo pools de L₃.

Palavras-chave: ovinos, nematoides gastrointestinais, diagnóstico molecular, Internal Transcribed Spacer 2.

Abstract:

Parasite control strategies in sheep are based on the diagnosis of the genera of gastrointestinal nematodes in their different prevalences and proportions. This study compared a standard technique of morphological identification of nematode genera in sheep the other based on the molecular analysis of fragments. 171 samples of the infective larvae pool (L₃) were identified from feces collected of 2000 sheep distributed in 22 farms of the state of Rio de Janeiro. For each sample, 100 L₃ were directed for morphological analysis and 10 µl of L₃ for

molecular analysis. In this analysis, polymerase chain reaction was done (PCR) for amplifying DNA of the ITS-2 region ribosomal (Internal Transcribed Spacer 2) followed by analysis of fragments by capillary electrophoresis for identification and quantification of nematodes in the genus level. Agreement and correlation analysis were performed to investigate the similarity between the two diagnostic techniques, and sensitivity calculation, specificity and average proportion of genera. The agreement of the nematode detection by both techniques was high for all genera (*Oesophagostomum*, *Haemonchus*, *Trichostrongylus* and *Cooperia*) with values of 0.84; 0.99; 0.84; 0.90 respectively. The kappa values were affected by the high presence of *Haemonchus* and *Trichostrongylus* nematodes and low amount of similarity between negative. As this index to *Oesophagostomum*, *Haemonchus*, *Cooperia* and *Trichostrongylus* 0.56; 0.50 and 0.66 and 0.18 respectively. The sensitivity and specificity of the later techniques (considering the morphological technique as standard) for *Oesophagostomum*, *Trichostrongylus* and *Cooperia* were respectively 0.72; 0.92; 0.79 and 0.87; 0.25 and 0.92. The general proportion of the nematode genera of all samples (n = 171) to the *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Cooperia* and *Oesophagostomum* were respectively for molecular analysis: 78.6%; 17.3%; 2.7%; 1.4% and morphological: 77.2%; 18.6%; 1.9%; and 2.3%. The correlation values ($p \leq 0.05$) between the percentage detected in the samples for *Oesophagostomum*, *Haemonchus*, *Trichostrongylus* and *Cooperia* were respectively 0.77; 0.84; 0.85 and 0.80. The agreement between the data for the same sequence of genera was respectively 0.75; 0.84; 0.88 and 0.68. The molecular fragments analysis demonstrated compatibility and greater sensitivity to the morphologic diagnosis of nematodes, especially when they were in low percentage in the sample. Therefore, this analysis has the potential of quali-quantitative diagnostic for identification of nematode genera of sheep in the sample containing pools of L₃.

Keywords: Sheep, gastrointestinal nematodes, molecular diagnostics, Internal Transcribed Spacer 2.

Introdução:

Infecções por nematoides gastrointestinais são o principal problema sanitário na ovinocultura mundial (Falzon et al., 2014; Gasser et al., 2016). A emergência da resistência anti-helmíntica e a dificuldade no controle dessas enfermidades tem forçado a adoção de práticas de manejo mais sustentáveis e diagnósticos precisos (Molento, 2011; Charlier et al., 2014; Besier et al., 2016). Ovinos são parasitados por várias espécies de nematoides gastrointestinais e a proporção destas determina a sintomatologia clínica nos animais e apoia práticas de manejo (Amarante et al., 2014). Os gêneros de nematoides mais prevalentes em ovinos são *Haemonchus*, *Trichostrongylus* e *Cooperia* (von Samson-Himmelstjerna et al., 2002). *Haemonchus contortus* é o parasito que ocasiona maiores danos à produção ovina pela alta mortalidade devido à anemia sendo prevalente principalmente em regiões tropicais (Khan et al. 2003; Raza et al., 2016). Outros nematoides em suas diferentes proporções (*Trichostrongylus* spp.; *Cooperia* spp.; *Oesophagostomum* spp.) podem determinar sinais clínicos como diarreia, perda de peso e nódulos intestinais (Roeder et al., 2013). A detecção

de gêneros parasitários também tem papel importante em testes mais precisos de eficácia anti-helmíntica (Bott et al., 2009).

A população parasitária nos rebanhos não é estática e muda de acordo com o clima, manejo e trânsito de animais (Hansen e Perry, 1994). Os exames coproparasitológicos são a principal forma de diagnóstico das endoparasitoses em ovinos. Porém, a identificação de gêneros de nematoides em ovos obtidos prontamente nas fezes é difícil e imprecisa, havendo a necessidade da análise das larvas de terceiro estágio (L₃) para identificação dos gêneros presentes (Van Wyk, 2004). Esta é baseada morfológicamente, pelo formato da L₃ (no todo, cauda extremidade cranial) e números de células intestinais (McMurtry, 2000). Porém, muitas larvas são parecidas (*Chabertia* e *Oesophagostom*; *Trichostrongilus* e *Teladorsagia*) sendo necessárias mensurações em diferentes porções das larvas (Van wyk, 2004). Atualmente, os sistemas de mensurações consideram o tamanho da larva, da cauda à bainha e do filamento da cauda; além de se considerar a proporção entre mensurações de espécies distintas (Van Wyk e Mayhew, 2013). Mesmo havendo padronização dos métodos morfológicos de identificação de gêneros de nematoides, há a necessidade de experiência por parte do examinador, o que por vezes torna o diagnóstico impreciso (Bott et al., 2009).

Para aumentar a precisão nos diagnósticos parasitológicos, técnicas moleculares desenvolvidas a partir da PCR e o sequenciamento de DNA têm sido ferramentas úteis na identificação de parasitos gastrointestinais em animais (Amarante e Amarante, 2016). Entre os marcadores moleculares utilizados para a diferenciação de espécies, destaca-se o sequenciamento da região ITS (Internal Transcribed Spacer), região altamente conservada intraespecificamente, mas variável entre diferentes espécies, o que possibilita a distinção destas (Gasser, 1997; Gasser, 2006). A região ITS-2 tem sido muito utilizada para a identificação de nematoides, incluindo espécies de *Haemonchus*, *Teladorsagia*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Bunostomum*, *Oesophagostomum* e *Chabertia*, (Gasser et al., 2008). Em vista do grau de patogenicidade e epidemiologia dos diferentes nematoides, há uma busca por diagnósticos moleculares também quantitativos (Nielsen et al., 2008; Drag et al., 2016). Em ovinos ensaios convencionais, multiplex, e recentemente qPCR, de uma forma mais limitada, têm sido desenvolvidos para a detecção de uma variedade de nematoides (von SamsonHimmelstjerna et al., 2002; Roeber et al., 2011). Assim, esse estudo comparou a técnica morfológica padronizada de identificação de gêneros de nematoides gastrointestinais de ovinos em pools de L₃ à avaliação molecular quali-quantitativa por análise de fragmento (região ITS-2).

Material e Métodos:

Coleta de material:

Foram coletadas fezes intra-retais de 2000 ovinos situados em 22 rebanhos no estado do Rio de Janeiro –Brasil. Em cada fazenda as fezes coletadas foram separadas em “pools” de 10 animais obtendo-se 5-10 “pools” por fazenda, totalizando 171 amostras (“pools” de fezes) no total.

Obtenção das larvas:

As 171 amostras foram submetidas à coprocultura de acordo com a técnica adaptada de Roberts e O’Sullivan (1950). As larvas obtidas foram depositadas vivas em garrafas com água destilada e acondicionadas em geladeira para posterior identificação morfológica. Para identificação molecular, as amostras foram centrifugadas e o sedimento ressuspendido em etanol absoluto para fixação. Os exames coproparasitológicos e de identificação morfológica das L₃ foram feitos no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

Identificação morfológica de gêneros:

As amostras foram centrifugadas para concentração das L₃ que foram colocadas em lâmina, coradas com lugol e posteriormente identificadas (100 larvas por amostra) para obtenção do percentual dos gêneros. A identificação foi de acordo com a classificação morfológica e morfométrica proposta por Van Wyk et al. (2004) e Van Wyk e Mayhew (2013) e demonstrada na figura 1.

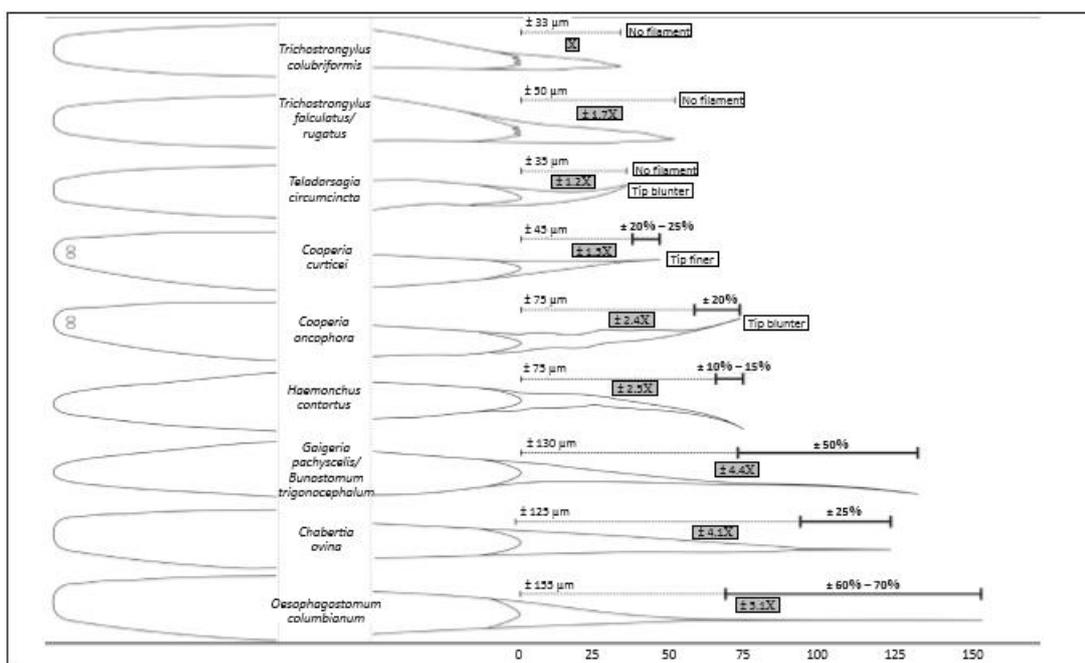


Figura 1. Caracteres morfológicos e morfométricos para o diagnóstico de larvas de terceiro estágio de nematoides de pequenos ruminantes, proposto por Van wyk e Mayhew, 2013.

Identificação molecular pela análise de fragmento:

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Genética Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A metodologia de identificação de strongilídeos de ruminantes foi patenteada com o número do depósito no INPI (BR 10 2016 015075 2) sendo a tecnologia de co-titularidade da UFMG, FAPEMIG e da empresa Myleus Biotecnologia.

Extração do DNA dos isolados:

Para cada amostra separou-se 10 µl do pool de L3 e posteriormente adicionou-se 10 µl de solução de hipoclorito de sódio 2,5% e, em seguida, 20 µl de solução de NaOH 0,8%. Essas amostras permaneceram em banho a 97°C por 15 minutos. Para neutralizar, foram adicionados 20 µl de solução Tris-HCl 1M. Em seguida, centrifugou-se o tubo por 15 minutos a 14.000 rpm. Quando houve precipitado evidente, retirou-se o sobrenadante, que foi transferido para um novo tubo. Adicionou-se 100 µl de isopropanol absoluto na solução. Centrifugou-se a 14.000 rpm por 15 minutos e desprezou-se o sobrenadante. Em seguida, adicionou-se 200 µl de Etanol 70% e centrifugou-se a 14.000 rpm por 15 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e as amostras foram secas em estufa a 57°C. Para ressuspender o DNA, adicionou-se 10 µl de água Milli-Q (Millipore, MA, EUA) e incubou-se a 37°C por 30 minutos. O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher, CA, EUA).

PCR

Para a amplificação do DNA da região ITS-2 ribossomal foram utilizados o primer NNC1F marcado com o fluoróforo FAM e o primer NC2R. As reações de amplificação por PCR foram conduzidas em um volume final de 25 µl, incluindo 10,5 µl de água Milli-Q (Millipore, MA, EUA), 6,25 µl de Go Taq Hot Start 5X PCR buffer (2,5 mM MgCl₂) (Promega, WI, EUA), 0,25 µl de cada primer (10 µM), 2,5 µl de cada dNTP (1 mM), 0,25 µl de GoTaq Hot Start polymerase (Promega, WI, EUA) (5 U/µl), 2,5 µl de MgCl₂ 25mM (Promega, WI, EUA) e 2,5 µl de DNA molde (50 ng/µl). O protocolo de amplificação utilizado foi: 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C 30s e 72°C por 1 minuto e um ciclo final de extensão de 72°C por 10 minutos.

Análise de fragmentos

A metodologia de análise de fragmentos por eletroforese capilar foi escolhida para a identificação de nematoides em nível de gênero. A utilização se baseou nos polimorfismos de inserção e deleção (InDels) observados entre os diferentes gêneros de nematoides strongilídeos que geram amplicons de comprimento gênero-específicos.

O DNA amplificado foi submetido à eletroforese capilar em um sequenciador automático de DNA ABI 3130 (Thermo Fisher, CA, EUA) e os fragmentos analisados no software GeneMapper (Thermo Fisher, CA, EUA). Os gêneros dos nematoides foram determinados de acordo com o tamanho particular de cada fragmento gerado na amplificação da região do ITS-2 (figura 2). A proporção dos nematoides é proporcional à fluorescência emitida pelos amplicons, que apresentam diferentes tamanhos de acordo com os gêneros presentes na amostra. Dessa forma, a proporção das alturas dos picos da fluorescência referente a cada gênero é proporcional à quantidade de DNA e conseqüentemente do gênero no pool larvar. O percentual do gênero foi calculado atribuindo-se 100% à soma dos picos dos gêneros encontrados na amostra e um percentual aos picos correspondetes a cada gênero (figura 3).

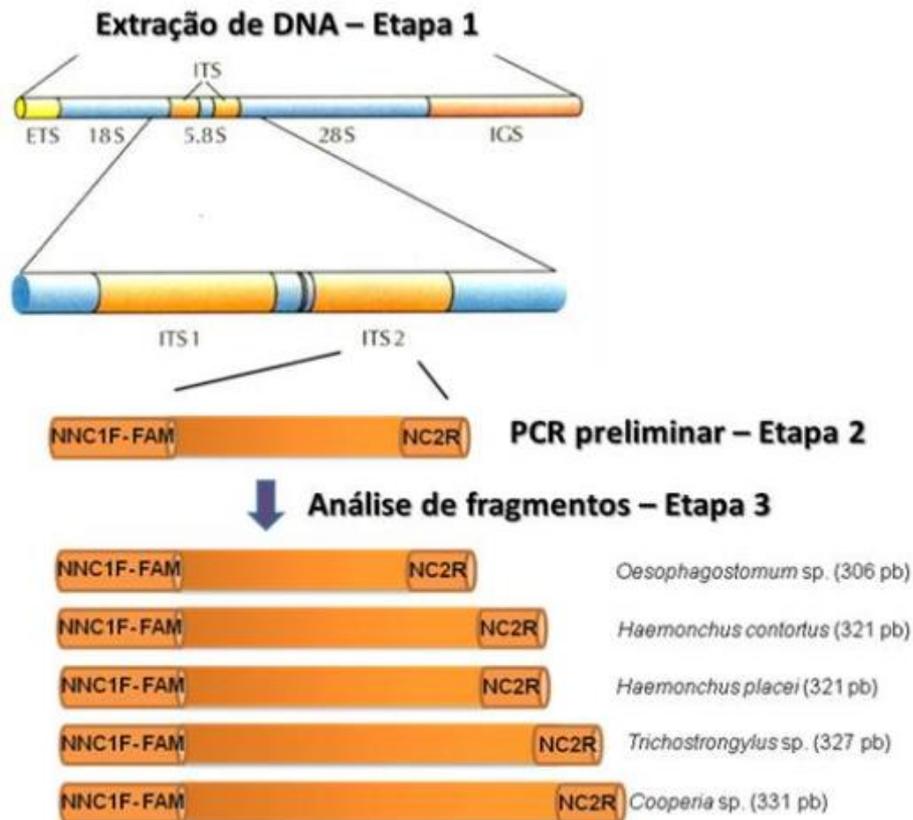


Figura 2. Esquema da identificação de nematoides por meio da análise de fragmentos (região ITS 2). Fonte: Santos (2016).

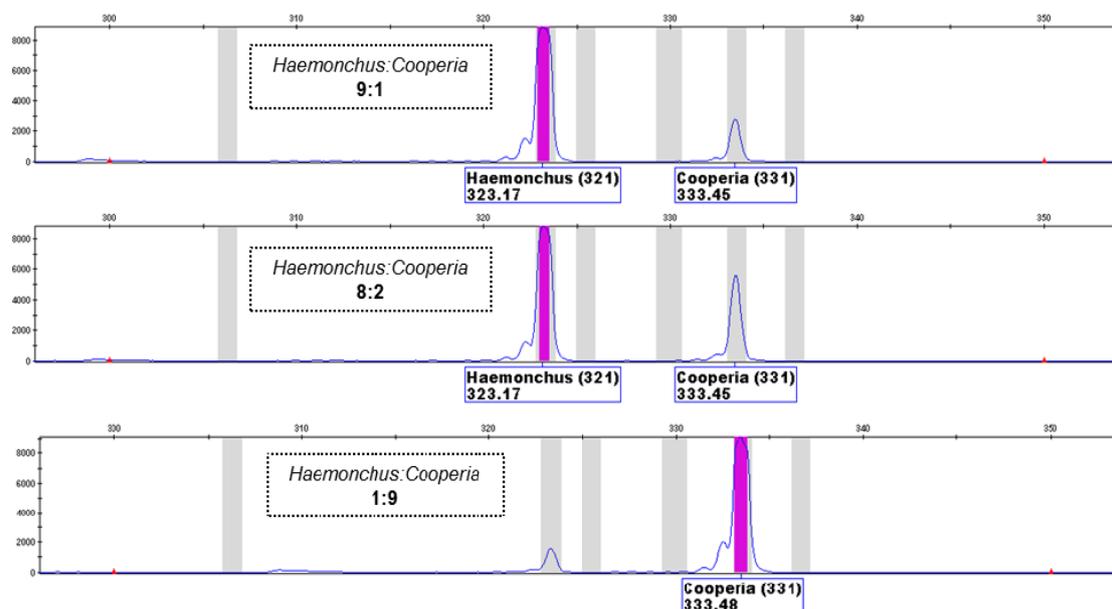


Figura 3. Determinação quantitativa de gêneros de nematoides. A fluorescência emitida pelos amplicons é proporcional ao percentual de cada nematoide na amostra. Fonte: Santos, 2016.

Análise estatística:

Inicialmente, as aferições foram dicotomizadas com o objetivo de avaliar o poder de detecção da presença de nematoides pelos dois métodos. Para cada método, e para cada nematoide, foram contadas as amostras em que se registrou presença ou ausência de cada nematoide. Procedeu-se, então, com o cálculo da proporção de classificações concordantes. Além disso, foi calculado o coeficiente Kappa de Cohen (Sim e Wright., 2005) por este configurar uma medida de concordância que leva em consideração a possibilidade de concordância meramente casual. Foram calculadas, ainda, as probabilidades de detecção pelo método morfológico dada a detecção pelo método molecular.

Num segundo momento, foram considerados, efetivamente, os valores aferidos. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para quantificar a correlação entre as aferições produzidas pelos dois métodos. Para quantificar a concordância das aferições utilizou-se o coeficiente de correlação e concordância baseado na estatística U, conforme apresentado em Carrasco (2013). A opção por esta metodologia baseou-se no fato dele ser indicado para dados com distribuição assimétrica, o que ocorre com as aferições analisadas. Por fim, calculou-se a média e o erro padrão para as diferenças das aferições produzidas pelos dois métodos (molecular e morfológico).

Todas as análises foram realizadas usando o programa R (Core Team). O pacote psych foi usado para o cálculo do coeficiente Kappa e o pacote cccrm para o cálculo do coeficiente de correlação e concordância (Revelle, 2015; Carrasco e Martinez; 2015). Os resultados apresentados foram acompanhados de intervalos de confiança 95%. A média geral das

análises morfológicas e moleculares e o número de vezes em que uma técnica detectou a presença do nematoide e a outra não foram descritas.

Resultados

Detecção qualitativa dos gêneros:

Os gêneros encontrados nas análises (molecular e morfológica) foram: *Haemonchus* spp. *Trichostrongylus* spp. *Cooperia* spp. e *Oesophagostomum* spp. (Tabela 1 e Figura 4). A concordância da detecção de nematoides pelas duas técnicas foi alta para todos os gêneros (*Oesophagostomum*, *Haemonchus*, *Trichostrongylus* e *Cooperia*) com valores de 0,84; 0,99; 0,84; 0,90 respectivamente (Tabela 1). Os valores do índice kappa para *Oesophagostomum*, *Haemonchus*, *Cooperia* e *Trichostrongylus* foram de 0,56; 0,50 e 0,66 e 0,18 respectivamente. A sensibilidade e especificidade das técnicas (considerando a técnica morfológica como padrão) para *Oesophagostomum*, *Trichostrongylus* e *Cooperia* foram respectivamente de 0,72 e 0,87; 0,92 e 0,25; 0,79 e 0,92 (tabela 1).

Tabela 1. Concordância e probabilidade da detecção de gêneros de nematóides por análise morfológica segundo o proposto por Van wyk e Mahie (2013) e molecular por meio da análise de fragmentos (região ITS 2).

NEMATÓIDE	Concordância	Kappa		PROBABILIDADE			
		E ¹	IC ²	Sensibilidade ³		Especificidade ⁴	
				E	IC	E	IC
<i>Oesophagostomum</i>	0,84	0,56	(0,41; 0,70)	0,72	(0,55; 0,85)	0,87	(0,8; 0,92)
<i>Haemonchus</i>	0,99	0,50	(-0,10; 1,10)	nc ⁵	nc	nc	nc
<i>Trichostrongylus</i>	0,84	0,18	(-0,02; 0,38)	0,92	(0,87; 0,96)	0,25	(0,09; 0,49)
<i>Cooperia</i>	0,90	0,66	(0,51; 0,81)	0,79	(0,59; 0,92)	0,92	(0,87; 0,96)

¹Estimativa;

²Intervalo de confiança de 95%;

³Probabilidade de detecção no teste molecular dada a detecção no teste morfológico;

⁴Probabilidade de não detecção no teste molecular dada a não detecção no teste morfológico;

⁵Não calculado pela impossibilidade estatística.

A figura 4 mostra o percentual de amostras nas quais não foi detectada presença de nematoides dos gêneros indicados pelas técnicas morfológica, molecular ou em ambas simultaneamente. Gêneros não detectados para as duas técnicas obteve-se em 67%, 0%, 3% e 77% das amostras para *Oesophagostomum*, *Haemonchus*, *Trichostrongylus* e *Cooperia* respectivamente, indicando maior prevalência de *Haemonchus*, *Trichostrongylus*. *Oesophagostomum* e *Cooperia* em ordem decrescente. Para todos os gêneros, a técnica molecular detectou os nematoides em mais análises onde a morfológica não detectou, ou seja, apresentou menor número de gêneros não detectados. A diferença entre as detecções

negativas entre as técnicas foi de 3%, 1% 3% e 2% para *Oesophagostomum* spp., *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp. e *Cooperia* spp. respectivamente (figura 4). Em 91% das amostras em que houve divergência na detecção ou não dos gêneros, o percentual quantitativo do nematoide era abaixo de 10%.

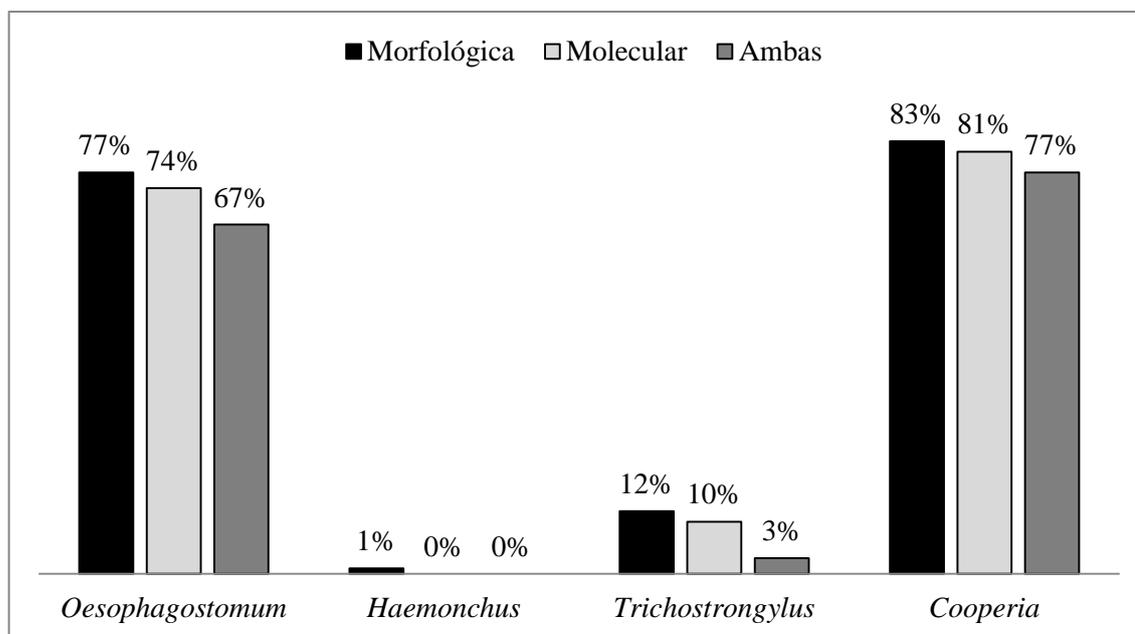


Figura 4. Percentual de amostras com resultado negativo (0%) para a detecção dos nematoides pelas técnicas morfológica, molecular ou em ambas simultaneamente.

Detecção quantitativa dos gêneros de nematoides:

A proporção geral dos gêneros de nematoides de todas as amostras (n=171) está apresentada na figura 5. As médias gerais para a análise morfológica e molecular com os valores para os gêneros *Haemonchus* spp.; *Trichostrongylus* spp., *Oesophagostomum* spp. e *Cooperia* spp. de respectivamente: 78,6% e 77,2%; 17,3% e 18,6%; 2,7% e 1,9%; 1,4% e 2,3%. A média intra-amostra, representando o quanto uma amostra detecta a mais um gênero do que a outra diferiu em cerca de 1% para todos os nematoides. A figura 5 apresenta a correlação e concordância do percentual dos dados pelas técnicas morfológicas e moleculares para cada gênero de nematoides.

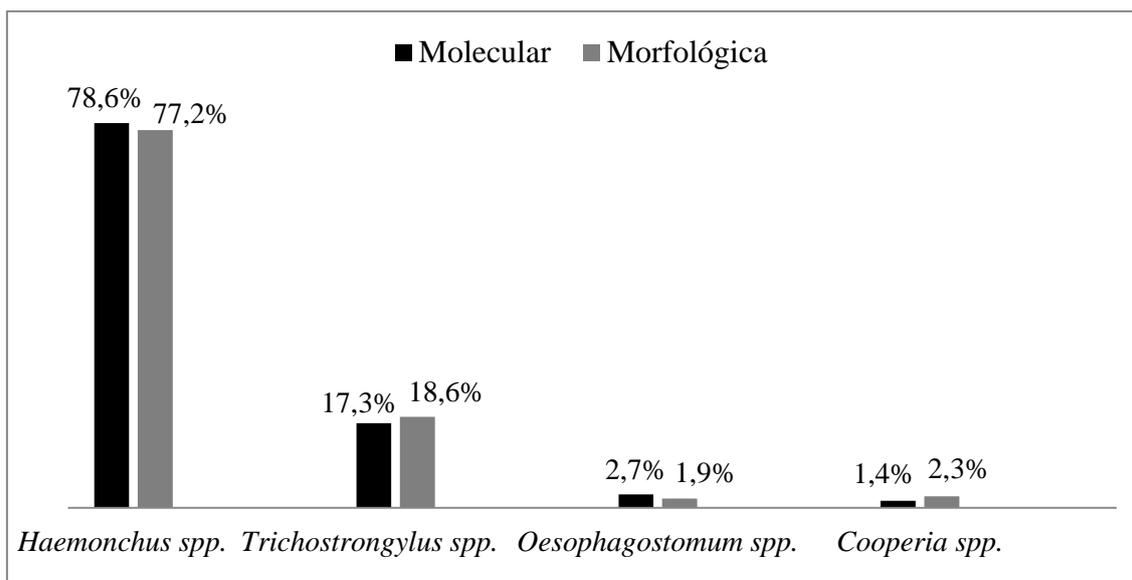


Figura 5. Identificação quantitativa de gêneros de nematoides gastrointestinais de ovinos pela análise morfológica e molecular de fragmento em 171 amostras provenientes de pools de L3.

Os valores da correlação entre amostras apresentados na figura 6 para os gêneros *Oesophagostomum spp.*, *Haemonchus spp.*, *Trichostrongylus spp.* e *Cooperia spp.* foram respectivamente de 0,77; 0,84; 0,85 e 0,80. A concordância entre os dados para a mesma sequência de gêneros foi de respectivamente 0,75; 0,84; 0,88 e 0,68 (Tabela 2).

Tabela 2. Correlação, concordância e média intra-amostra da identificação quantitativa de gêneros de nematoides por análise morfológica e molecular com intervalos de confiança a 95%.

Nematoide	Correlação		Concordância		Diferença	
	E	IC (95%)	E	IC (95%)	X (intra-amostra)	Erro Padrão
<i>Oesophagostomum</i>	0,77	0,74; 0,85	0,75	0,51; 0,88	0,75	0,45
<i>Haemonchus</i>	0,84	0,79; 0,88	0,84	0,78; 0,89	1,42	1,07
<i>Trichostrongylus</i>	0,85	0,84; 0,91	0,88	0,83; 0,91	-1,13	0,82
<i>Cooperia</i>	0,80	0,74; 0,85	0,68	0,53; 0,79	-0,88	0,4

E: estimativa. IC: Intervalo de confiança. X (média).

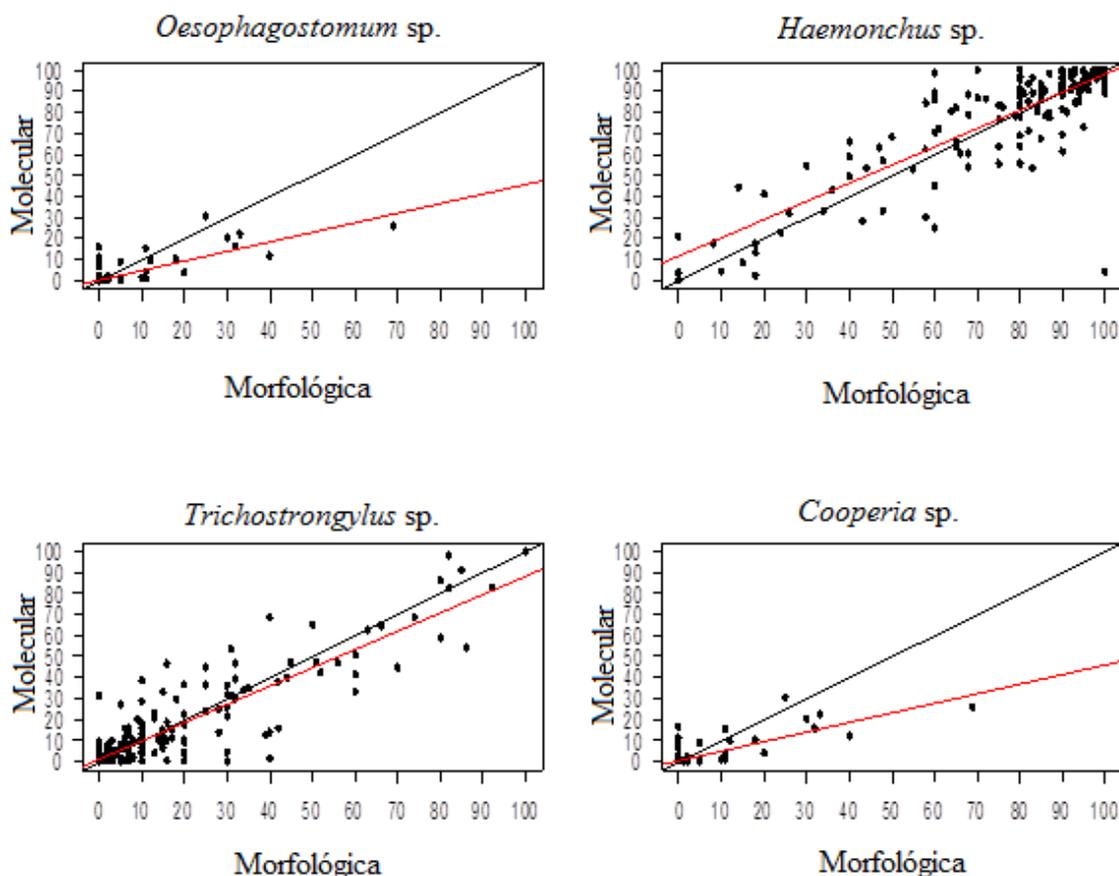


Figura 6. Concordância e correlação entre as técnicas morfológica e molecular de detecção de gêneros de nematoides a 95% de intervalo de confiança. A linha em preto refere-se à reta identidade (concordância exata) enquanto a linha em vermelho representa a reta da regressão linear simples ajustada, indicando a tendência linear das aferições.

Discussão:

Devido às diferenças na patogenicidade dos nematoides gastrointestinais, a identificação pelo menos ao nível do gênero é essencial para avaliar a importância da infecção parasitária e nortear o tratamento anti-helmíntico (Van Wyk, 2004). No presente trabalho a técnica molecular detectou os mesmos gêneros comparados à técnica morfológica o que é demonstrado pelos altos valores de concordância para todos os gêneros (Tabela 1). A concordância foi máxima para *Haemonchus* spp., parasito predominante em prevalência e quantidade nas amostras (Tabela 1). Em alguns casos, houve detecção do gênero em uma técnica e em outra não, e isso ocorreu onde o percentual do gênero indicativo era abaixo de 10% (Figura 4). Nestes casos, a pequena quantidade larvar no pool pode ter dificultado a observação na análise morfológica. Sendo assim, a técnica molecular foi mais sensível na detecção de gêneros principalmente quando estes estavam em baixa quantidade nas amostras.

Técnicas de biologia molecular têm sido descritas com maior precisão e confiabilidade no diagnóstico de gêneros e espécies de nematoides (Gasser, 2008; Amarante, 2016).

A sensibilidade e especificidade da detecção dos métodos foram altas para todos os gêneros, exceto para *Haemonchus*, em que o valor não foi calculado devido à presença do parasito em 99% dos casos. Para *Trichostrongylus*, o valor de especificidade foi baixo devido aos poucos negativos encontrados para ambas as amostras, fato que também reduziu o índice kappa (tabela 2). De acordo com a classificação de Landis e Koch (1977), os valores do índice kappa foram medianos para *Oesophagostomum*, *Haemonchus* e *Cooperia* e baixo para *Trichostrongylus* (0,18). Esse fato ocorreu porque, principalmente no caso do *Trichostrongylus* e *Haemonchus*, a grande maioria das amostras testou positivo para os dois métodos, não havendo uma predominância acentuada de negativo-negativo. Sendo assim, o coeficiente acaba "descontando" a possibilidade de coincidência casual (fortemente relacionada a casos positivo-positivo) e então o nível de concordância é menor.

Do ponto de vista epidemiológico e clínico, a simples detecção dos gêneros ou espécies parasitárias não é suficiente devido às diferenças entre patogenicidades dos gêneros. De acordo com a classificação de Mukaka (2012), os índices de correlação entre os percentuais dos gêneros foram fortes (tabela 2 e figura 4). A concordância entre os percentuais também foi alta especialmente quando o percentual do gênero era alto no "pool" larvar, como foi o caso de *Haemonchus* e *Trichostrongylus* (Tabela 2). Sendo assim, o percentual de larvas no "pool" afetou não somente o diagnóstico qualitativo, mas também o quantitativo. Esse fato diminui a concordância dos valores para *Oesophagostomum* e *Cooperia* que apresentaram valores medianos, abaixo de 3% do percentual total. Mesmo assim, houve grande proximidade da média geral dos percentuais e da média intra-amostra (Tabela 2 e Figura 5) reafirmando que quanto maior o número de avaliações, menor a chance de erro no caso da avaliação morfológica. E esse fato é especialmente importante quando há percentuais baixos de nematoides. A técnica morfológica por nós empregada avaliou 100 L₃ por amostra, o que já foi extremamente dispendioso considerando um grande número material a ser diagnosticado em um laboratório parasitológico de rotina.

Cada vez mais se busca a substituição de testes convencionais por testes moleculares mais confiáveis e padronizados. Elevados níveis de semelhança foram identificados entre os testes de diagnóstico coparassitológicos convencionais para nematoides gastrointestinais em ovinos e os baseados em PCR (Sweeny et al., 2011). Avanços em estudos com nematoides avaliando diagnósticos quantitativos ou semi-quantitativos em humanos e equinos também têm fornecido importantes contribuições (Verweij et al., 2007; Nielsen et al., 2008). Uma

análise semi-quantitativa de qPCR visando ITS2 do DNA ribossomal foi descrito para identificação e semi-quantificação de dois importantes nematoides de bovinos, *Cooperia oncophora* e *Ostertagia Ostertagi* (Hoglung et al., 2013). Progressos com PCR vêm sendo obtidos para diferenciar nematoides de ruminantes para fins de diagnóstico semi-quantitativo por meio de análise nas sequências ITS2 de DNA ribossomal (Christensen et al., 1994; Zarlenga et al., 1998; Schnieder et al., 1999). Porém, a maioria dos estudos requer eletroforese em gel para análise, o que torna dispendioso o diagnóstico (von Samson-Himmelstjerna et al., 2002). Diante disso, o presente trabalho propôs uma forma de identificação molecular quali-quantitativa de “pools” de L₃ obtidas diretamente das fezes de ovinos compatível à análise morfológica, porém mais rápida e sensível, sendo possivelmente aplicável a outros estádios parasitários, como ovos, facilitando ainda mais o diagnóstico.

Conclusão:

A avaliação molecular de fragmentos demonstrou compatibilidade com diagnóstico morfológico padrão e maior sensibilidade quando os parasitos estavam em baixo percentual na amostra. Além disto, requer menor tempo para análise de um grande número de amostras e possivelmente maior segurança. Portanto, a mesma demonstrou ter potencial de uso de diagnóstico quali-quantitativo para identificação de gêneros de nematoides de ovinos em amostras contendo “pools” de L₃. Estudos de viabilidade econômica são necessários para indicar a aplicabilidade da técnica molecular no uso rotineiro de diagnósticos parasitológicos.

Referências:

- AMARANTE, A. F. T.; AMARANTE, M. R. V. Advances in the diagnosis of the gastrointestinal nematode infections in ruminants. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 2, p. 127-137, 2016.
- AMARANTE, M. R. V.; BASSETO, C. C.; NEVES, J.H.; AMARANTE, A.F.T. Species-specific PCR for the identification of *Cooperia curticei* (Nematoda: Trichostrongylidae) in sheep. **Journal of Helminthology**, v. 88, p. 447-452, 2014.
- BESIER, R. B.; KAHN, L. P.; SARGISON, N. D.; VAN WYK, J. A. Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. **Advances in Parasitology**, v. 93, p. 181-238. doi: 10.1016/bs.apar.2016.02.024, 2016.
- BOTT, N. J.; CAMPBELL, B. E.; BEVERIDGE, I.; CHILTON, N. B.; REES, D.; HUNT, P. W.; GASSER, R. B. A combined microscopic-molecular method for the diagnosis of strongylid infections in sheep. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 1277-87, 2009.

- CARRASCO, J. L.; MARTINEZ, J. P. cccrm: Concordance Correlation Coefficient for Repeated (and Non-Repeated) Measures. R package version 1.2.1. Disponível em: <http://CRAN.R-project.org/package=cccrm>. 2015.
- CARRASCO, J. L.; PHILLIPS, B. R.; PUIG-MARTINEZ, J.; KING TS, CHINCHILLI, V. M. Estimation of the concordance correlation coefficient for repeated measures using SAS and R. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 109, n. 3, p. 293-304, 2013.
- CHARLIER, J.; MORGAN, L.; RINALDI, E.R.; VAN DIJK, J.; DEMELER, J.; HÖGLUND, J.; HERTZBERG, H.; VAN RANST, B.; HENDRICKX, G.; VERCRUYSSSE, J.; KENYON, F. Practices to optimise gastrointestinal nematode control on sheep, goat and cattle farms in Europe using targeted (selective) treatments. **Veterinary Record**, v. 175(10) p.:250-5, 2014.
- CHRISTENSEN, C. M.; ZARLENGA, D. S.; GASBARRE, L. C. *Ostertagia*, *Haemonchus*, *Cooperia*, and *Oesophagostomum*: construction and characterization of genus-specific DNA probes to differentiate important parasites of cattle. **Experimental Parasitology**, v. 78, p. 93–100, 1994.
- DRAG, M.; HÖGLUND, J.; NEJSUM, P.; THAMSBORG, M. M.; ENEMARK, H. L. The level of embryonation influences detection of *Ostertagia ostertagi* eggs by semi-quantitative PCR. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 368, 2016.
- FALZON, L. C.; O'NEILL, T. J.; MENZIES, P. I.; PEREGRINE, A. S.; JONES-BITTON, A.; VANLEEUEWENE, J.; MEDEROS. A. A systematic review and meta-analysis of factors associated with anthelmintic resistance in sheep. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 15, p. 388-402. 2014.
- GASSER, R. B. Molecular tools—advances, opportunities and prospects. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 2, p. 6989, 2006.
- GASSER, R. B.; BOTT, N. J.; CHILTON, N. B.; HUNT, P.; BEVERIDGE, I. Toward practical, DNA-based diagnostic methods for parasitic nematodes of livestock — Bionomic and biotechnological implications. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 4 p. 325-334, 2008.
- GASSER, R. B.; MONTI, J. R. Identification of parasitic nematodes by PCR-SSCP of ITS-2 rDNA. **Molecular and Cellular Probes**., v. 11, p. 201-9, 1997.
- GASSER, R. B.;SCHWARZ, E. M.; KORHONEN, P. K.; YOUNG, N. D.Understanding *Haemonchus contortus* Better Through Genomics and Transcriptomics. **Advances in Parasitology**, v. 93, p. 519-67, 2016.
- HANSEN, J.; PERRY, B. The epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of ruminants. **International Laboratory on Animal Diseases**, p. 83-90. Disponível em: <http://www.fao.org/wairdocs/ILRI/x5492E/x5492e04.htm#2.2.1> life cycles, 1994.
- HÖGLUND, J.; ENGSTRÖMA, A.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; DEMELER, J.; TYDÉN, E. Real-time PCR detection for quantification of infection levels with *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in cattle faeces. **Veterinary Parasitology**, v. 197, p. 251–257, 2013.
- KAHN, L. P.; KNOX, M.R.; WALKDEN-BROWN, S.W.; LEA, J.M. Regulation of the resistance to nematode parasites of single- and twin-bearing Merino ewes through nutrition and genetic selection. **Veterinary Parasitology**, v.114, p.15–31, 2003.

- LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159-174, 1977.
- MCMURTRY, L. W.; DONAGHY, M. J.; VLASSOFF, A.; DOUCH, P. G. C. Distinguishing morphological features of the third larval stage of ovine *Trichostrongylus* spp.', **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 73–81, 2000.
- MOLENTO, M. B.; FORTES, F. S.; PONDELEK, D. A. S.; BORGES, F. A.; CHAGAS, A. C. S.; TORRES-ACOSTA, J. F.; GELDHOFF, P. Challenges of nematode control in ruminants: focus on Latin America. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 126–132, 2011.
- MUKAKA, M. M. Statistics Corner: A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research". **Malawai Medical Journal**. DOI:PMC3576830. 2012.
- NIELSEN, M. K.; PETERSON, D. S.; MONRAD, J.; THAMSBORG, S. M.; OLSEN, S. N.; KAPLAN, R. M. Detection and semi-quantification of *Strongylus vulgaris* DNA in equine faeces by real-time quantitative PCR. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 443–53, 2008.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>, 2015.
- RAZA, A.; KOPP, S. R.; BAGNALL, N. H.; JABBAR, A.; KOTZE, A. C. Effects of in vitro exposure to ivermectin and levamisole on the expression patterns of ABC transporters in *Haemonchus contortus* larvae. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 23, p. 103-115, 2016.
- REVELLE, W. psych: Procedures for Personality and Psychological Research, Northwestern University, Evanston, Illinois, USA, <http://CRAN.R-project.org/package=psych> Version = 1.5.8, 2015.
- ROBERTS, F.; O'SULLIVAN, P. Methods for egg counts and larval culture for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1, p. 99–102. 1950.
- ROEBER, F.; JEX, A. R.; CAMPBELL, A. J. D.; CAMPBELL, B. E.; ANDERSON, G. A.; GASSER, R. B. Evaluation PCR to identify *Cooperia curtiei* 451 and application of a molecular method to assess the composition of strongylid nematode populations in sheep with naturally acquired infections. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, p. 849–854, 2011.
- ROEBER, F.; JEX, A. R.; GASSER, R. B. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 153, 2013.
- SANTOS, L. L. Identificação molecular de estrogilídeos gastrointestinais de ruminantes domésticos e sequenciamento do genoma mitocondrial de *Haemonchus placei*. Tese de doutorado defendida na Universidade Federal de Minas Gérias-UFMG em Belo Horizonte, março de 2016.
- SCHNIEDER, T.; HEISE, M.; EPE, C. Genus-specific PCR for the differentiation of eggs or larvae from gastrointestinal nematodes of ruminants. **Parasitology Research**, v. 85, p. 895–8, 1999.
- SIM, J.; WRIGHT, C. C. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. **Physical therapy**, v. 85, n. 3, p. 257-268, 2005.

- SOUZA, M. F.; PIMENTEL-NETO, M.; PINHO, A. L. S.; SILVA, R. M.; FARIAS, A. C. B.; GUIMARÃES, M. P. Seasonal distribution of gastrointestinal nematode infections in sheep in a semiarid region, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 351-359, 2013.
- SWEENEY, J. P. A.; ROBERTSON, I. D.; RYAN, U. M.; JACOBSON, C.; WOODGATE, R. G. Comparison of molecular and Mc Master microscopy techniques to confirm the presence of naturally acquired strongylid nematode infections in sheep. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 180, p. 62–67, 2011.
- VAN WYK, J. A.; CABARET, J.; MICHAEL, L. M. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. **Veterinary Parasitology**, v.119, p. 277–306, 2004.
- VAN WYK, J. A.; MAYHEW, E. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide, Onderstepoort **Journal of Veterinary Research**, v. 80, n. 1, p. 539-553, 2013.
- VERWEIJ, J. J.; BRIENEN, E. A.; ZIEM, J.; YELIFARI, L.; POLDERMAN, A. M.; VAN LIESHOUT, L. Simultaneous detection and quantification of *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, and *Oesophagostomum bifurcum* in fecal samples using multiplex real-time PCR. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, p. 685–90, 2007.
- VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. A.; HARDER, A.; SCHNIEDER, T. Quantitative analysis of ITS2 sequences in trichostrongyle parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 12, p. 1529-1535, 2002.
- VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; HARDERB, A.; SCHNIEDER, T. Quantitative analysis of ITS2 sequences in trichostrongyle parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 32, 1529–1535, 2002.
- ZARLENGA, D.S.; GASBARRE, L. C.; BOYD, P.; LEIGHTON, E.; LICHTENFELS, J.R. Identification and semi-quantitation of *Ostertagia ostertagi* eggs by enzymatic amplification of ITS-1 sequences. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p. 245– 57, 1998.

6) TRABALHO DE EXTENSÃO DA PESQUISA DE TESE:

PROMOÇÃO DE AÇÕES EDUCATIVAS PARA O CONTROLE AOS NEMATOIDES GASTROINTESTINAIS DO REBANHO OVINO FLUMINENSE.

Resumo

Parasitoses gastrointestinais são limitantes a ovinocultura, pois ocasionam perdas e desanimam os produtores frente à situação de resistência parasitária. Em face ao grave problema de resistência anti-helmíntica múltipla nos ovinos do estado do Rio de Janeiro, aliado a prevalência de nematoides com alta patogenicidade tornou-se urgente à necessidade de medidas para disseminar o adequado controle parasitário e retardar o aparecimento da resistência anti-helmíntica no rebanho ovino do Rio de Janeiro. Neste sentido, o trabalho teve como objetivo promover ações educativas visando o controle aos nematoides gastrointestinais do rebanho ovino Fluminense. Para isto, laudos parasitários, cartilhas informativas, cursos e palestras, textos informativos em revistas “on line” para produtores rurais foram realizados. Tais medidas foram importantes para conscientizar o produtor diante a situação do seu rebanho frente aos anti-parasitários bem como auxilia-lo na tomada de decisão de um controle helmíntico mais eficaz.

Palavras-chave: Anti-helmíntico, ovinos, resistência anti-helmíntica, controle de nematoides, nematoides gastrointestinais.

Como forma de repassar o conhecimento científico gerado através da pesquisa de tese, o projeto de doutorado envolveu a parte de extensão ao ovinocultor composta pelos seguintes trabalhos:

6.1) Laudos Parasitários:

Todos os 22 ovinocultores que contribuíram para a pesquisa e coleta de dados para esta tese, receberam um laudo com o diagnóstico da situação parasitária do seu rebanho. O laudo foi composto por: coprocultura e população parasitária do rebanho; OPG, escore de condição corporal, Famacha, pesagem do rebanho e teste de eficácia de cinco anti-helmínticos. Sendo assim, o produtor rural recebeu a indicação do anti-helmíntico a ser usado no rebanho e orientações de práticas de manejo adequadas à sua situação. A seguir está o exemplo de um laudo:

TESTE DE EFICÁCIA DE ANTI-HELMÍNTICOS PARA OVINOS			
Proprietário:		Data:	
Localidade: - RJ			
Nº	1ª Coleta: 01/07/2014.	2ª Coleta:	Material:
<ul style="list-style-type: none"> • Resultado da média das coproculturas realizadas de acordo com a técnica adaptada de Roberts e O'Sullivan (1950) e classificação morfológica das larvas de acordo com VAN WYK et al (2004): <ul style="list-style-type: none"> -71% <i>Haemonchus</i> spp. -21% <i>Cooperia</i> spp. - 5% <i>Trichostrongylus</i> spp. -3% <i>Oesophagostomum</i> spp. • Nas próximas folhas estão os resultados do teste de eficácia de anti-helmínticos que utilizou o exame coproparasitológico da contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de estrongilídeos, realizado pela técnica de Gordon e Whitlock modificada (UENO e GONCALVES. 1998). e as coproculturas de cada anti-helmíntico 			

Teste de Eficácia de LEVAMISOL

EFICÁCIA GERAL: 50%

***Número de animais considerados no teste: 10.**

Eficácia por gênero: 83% *Haemonchus* spp., 0% *Trichostrongylus* spp.

N. ANIMAL	AVALIAÇÕES						
	1º Famacha	2º Famacha	1º ECC	2º ECC	Peso	1ª OPG	2ª OPG
A7	1	3	2.5	3	46	100	100
D9	1	1	4	3,5	41	200	200
D10	2	1	3	3	44	500	300
D11	1	1	3	3	45	300	0
0030	2	1	2.5	3	55	100	100
001	1	1	2	2	38	100	100
002	2	2	2	2	40	100	0
006	1	1	3.5	3,5	50	200	100
049	2	1	2	2	40	300	0
14	1	1	2.5	2,5	58	300	200
Médias	1,40	1,3	2,7	2,8	45,52	220	110

Outros parasitos encontrados:

- 1ª Avaliação: não foram encontrados outros ovos de helmintos ou coccídeos.
- 2ª Avaliação: não foram encontrados outros ovos de helmintos ou coccídeos.

Teste de Eficácia de IVERMECTINA

EFICÁCIA GERAL: 0%

***Número de animais considerados no teste: 10.**

Eficácia por gênero: 1% *Haemonchus* spp., 9% *Trichostrongylus* spp.

Nº ANIMAL			AVALIAÇÕES		Peso	1ª OPG	2ª OPG
	1º Famacha	2º Famacha	1º ECC	2º ECC			
A3	1	1	3	3	60	200	300
D6	1	1	2.5	2,5	39	1000	15100
0031	1	1	3	3	55	100	100
0034	2	1	3	2	47	2000	1000
0036	2	1	2.5	2,5	50	400	600
0039	1	1	2.5	3,5	61	300	200
093	4	4	2	2	43	22500	12000
36	1	1	3	2,5	47	1800	1500
173	1	1	4	4	83	100	500
302/1	4	1	2	2,5	42	2500	300
Médias	1,8	1,3	2,9	2,8	52,7	3090	3160

Outros parasitos encontrados:

- 1ª Avaliação: não foram encontrados outros ovos de helmintos ou coccídeos.
- 2ª Avaliação: não foram encontrados outros ovos de helmintos ou coccídeos.

Teste de Eficácia de MOXIDECTINA

EFICÁCIA GERAL: 90%

***Número de animais considerados no teste:** 10.

Eficácia por gênero: 94% *Haemonchus* spp., 38% *Trichostrongylus* spp., 100%

Oesophagostomum spp., 100% *Cooperia* spp.

Nº ANIMAL	AVALIAÇÕES						
	1º Famacha	2º Famacha	1º ECC	2º ECC	Peso	1ª OPG	2ª OPG
D2	41	1	1	2.5	50	2400	200
D5	5	2	2	3	60	100	100
035	42	2	1	3	52	2700	200
040	58	2	1	3	63	200	0
051	46	1	1	2.5	48	200	0
054	45	1	1	2.5	39	100	0
121	47	1	1	2	47	200	100
400	55	1	1	3.5	64	300	100
28/2	58	1	1	3	58	800	0
328/2	50	1	1	3	56	300	0
Médias	45	1,3	1,1	2,8	53,7	730	70

Outros parasitos encontrados:

- 1ª Avaliação: não foram encontrados outros ovos de helmintos ou coccídeos.
- 2ª Avaliação: não foram encontrados outros ovos de helmintos ou coccídeos.

Teste de Eficácia de CLOSANTEL

EFICÁCIA GERAL: 61%

***Número de animais considerados no teste:** 10.

Eficácia por gênero: 92% *Haemonchus* spp., 0% *Trichostrongylus* spp., 87% *Oesophagostomum* spp., 76% *Cooperia* spp.

Nº ANIMAL	AVALIAÇÕES						
	1º Famacha	2º Famacha	1º ECC	2º ECC	Peso	1ª OPG	2ª OPG
A7	4	1	2	2	42	700	0
D8	1	1	2.5	2,5	43	3800	500
0012	1	2	2	3	40	100	100
0050	3	2	2.5	3	51	500	300
051	2	2	2	2	44	100	100
0600	1	1	2.5	2,5	47	200	0
171	1	2	2.5	2	48	300	100
3/3	2	1	3	2,5	45	300	300
6/1	1	1	3	3	36	100	100
323/1	3	2	2	2	31	500	1000
Médias	1,9	1,5	2,3	2,4	43	660	267

Outros parasitos encontrados:

- 1ª Avaliação: não foram encontrados outros ovos de helmintos ou coccídeos.
- 2ª Avaliação: não foram encontrados outros ovos de helmintos ou coccídeos.

Teste de Eficácia de ALBENDAZOL

EFICÁCIA GERAL: 0%

***Número de animais considerados no teste: 10.**

Eficácia por gênero: 0% *Haemonchus* spp. 100% *Cooperia* spp.

Nº ANIMAL	AVALIAÇÕES						
	1º Famacha	2º Famacha	1º ECC	2º ECC	Peso	1ª OPG	2ª OPG
D4	1	1	3	2,5	33	1400	1200
D7	1	1	3	3	41	100	100
L1	1	1	3	3	30	100	100
0087	1	1	3	3	43	200	300
004	2	1	2	2	51	7300	7200
073	3	1	2,5	2	48	1000	1800
097	3	2	2	2	44	500	600
12	2	2	3	3	44	300	300
143	2	1	3	3	60	500	800
412	2	2	2,5	2,5	48	300	200
Médias	1,8	1,3	2,7	2,6	44	1170	1260

Outros parasitos encontrados:

- 1ª Avaliação: animal D4: 400 OPG de *Moniezia* sp.; Animal 12: + *Eimeria* sp.
- 2ª Avaliação: não foram encontrados outros ovos de helmintos; Animal 12: + *Eimeria* sp.

6.2) Cartilha Informativa:

Foi desenvolvida uma cartilha informativa para a distribuição aos produtores rurais e estudantes em cursos, palestras e dias de campo:

BOAS PRÁTICAS NO CONTROLE DA VERMINOSE PARA O REBANHO OVINO FLUMINENSE



Jordana Andrioli Salgado

Clóvis de Paula Santos

APRESENTAÇÃO:

Esse material consta de uma cartilha educativa para o produtor de ovinos do estado do Rio de Janeiro, sendo o fruto de um estudo que avaliou a epidemiologia e a resistência anti-helmíntica no rebanho ovino do estado. O objetivo principal é dar um retorno ao produtor rural que contribuiu para o estudo e ajudá-lo no manejo antiparasitário do rebanho, já que em muitas propriedades a resistência anti-helmíntica é um problema sério na ovinocultura.

Jordana Andrioli Salgado

Médica Veterinária formada pela UFPR, Mestre em Ciências Veterinárias (Sistemas de Produção Animal em Meio Ambiente) UFPR e doutoranda em Biociências e Biotecnologia pela UENF. jormedvet@hotmail.com.

Clóvis de Paula Santos

Biólogo formado pela UFJF, Doutor em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária, Professor Associado da UENF.

O QUE É VERMINOSE?

Verminoses são doenças causadas por parasitos que acometem principalmente o sistema gastrointestinal dos animais. Os pequenos ruminantes (ovinos e caprinos) são susceptíveis às verminoses, sendo muito acometidos, o que causa grande prejuízo econômico ao produtor.

QUAIS OS VERMES QUE MAIS ACOMETEM OS OVINOS?

Os principais vermes que acometem os ovinos são os nematoides gastrointestinais. Esses parasitos possuem o corpo em formato cilíndrico, de tamanhos variados e que se fixam no estômago ou intestinos dos animais se alimentando de sangue, células ou do próprio alimento que o ovino consome. Sendo assim, em grande quantidades, ocasionam diarreia, anemia, perda de peso, diminuição nos índices zootécnicos e morte nos animais seriamente afetados (Fig.1).

No estado do RJ, nossa pesquisa apontou que *Haemonchus contortus* é o nematoide mais prevalente, seguido por *Trichostrongylus* spp., *Cooperia* spp. e *Oesophagostomum* spp.

ONDE PARASITAM E O QUE CAUSAM ESSES VERMES?

Tabela 1. Localização e principal sinal clínico dos nematoides prevalentes no rebanho ovino Fluminense:

Verme	Localização	Principal sinal clínico
<i>Haemonchus</i> spp.	Abomaso (estômago verdadeiro)	Anemia
<i>Trichostrongylus</i> spp.	Intestino delgado	Diarreia.
<i>Cooperia</i> spp.	Intestino delgado	Diarreia.
<i>Oesophagostomum</i> spp.	Intestinos delgado e grosso	Nódulos intestinais, diarreia.



Figura 1. Óbito do animal com anemia profunda, diarreia e perda de peso por verminose.

COMO OS ANIMAIS SE INFECTAM COM VERMINOSE?

A maioria dos vermes possui um ciclo de vida direto, pois há uma fase no ambiente (geralmente na pastagem) e outra no animal (Fig 2). O ovino ao pastejar ingere a larva infectante (L_3) que se desenvolve e fixa-se no órgão alvo onde ocorre a alimentação e reprodução. Os ovos produzidos pelas fêmeas são eliminados nas fezes do ovino e no ambiente fecal irão evoluir para três estádios larvais (L_1 , L_2 e L_3). A L_3 é quem migra das fezes para pastagem e acaba infectando o ovino novamente durante o pastejo. A migração e fixação, juntamente com o ato do parasito em se alimentar, ocasionam danos ao hospedeiro (ovino), seja por perda de sangue, células ou diminuição na absorção dos alimentos.

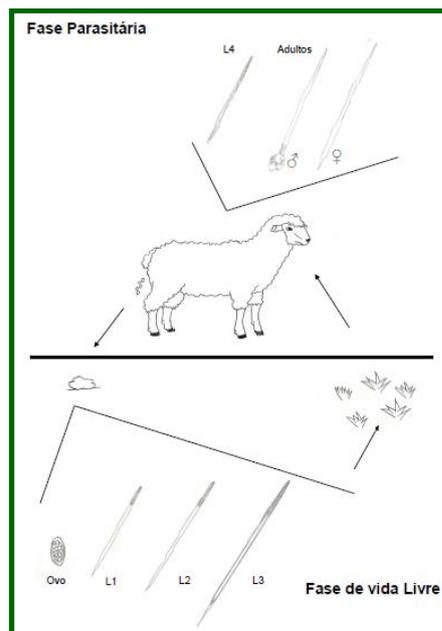


Figura 2. Ciclo dos principais vermes que acometem ovinos.

DO QUE DEPENDEM OS VERMES PARA FECHAREM O CICLO?

Os parasitos dependem basicamente de temperatura e umidade adequados para fecharem o ciclo (Fig 3). Essas condições são facilmente alcançadas em regiões de clima tropical e subtropical, como é o caso do estado do RJ, tornando a verminose um problema sério. Nas pastagens é onde ocorre maior desenvolvimento do ciclo parasitário, pois há microclima favorável para que haja evolução rápida (5-7 dias) dos ovos a L₃ (Fig 4). Entretanto, em algumas situações, pode ocorrer fechamento do ciclo no confinamento. Isso ocorre quando há acúmulo de fezes, umidade e temperatura adequadas, juntamente com instalações impróprias e falta de limpeza (Fig 5 e 6).

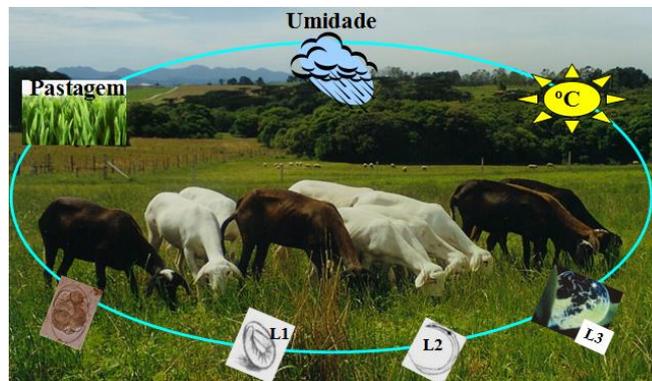


Figura 3. A fase de vida livre do ciclo vital dos nematoides gastrointestinais depende, sobretudo, de fatores como a temperatura e umidade favoráveis.



Figura 4. Na pastagem o verme encontra condições propícias para fechar o ciclo.



Figura 5. Falta de limpeza das baias, acúmulo de umidade e instalações impróprias podem ocasionar infecções parasitárias em animais confinados.



Figura 6. Instalações limpas e bem planejadas evitam infecções parasitárias (LAPOC/UFPR).

USUALMENTE, COMO SE CONTROLA OS VERMES?

A forma mais usual de controle é por meio dos vermífugos (anti-helmínticos), que são os medicamentos que eliminam os vermes do organismo do animal. Os vermífugos são agrupados em classes, de acordo com o modo de ação, das quais há quatro principais utilizadas no rebanho do estado:

Tabela 2. Classes de anti-helmínticos suas respectivas bases químicas e nomes comerciais mais conhecidos para ovinos no estado do RJ:

CLASSE	BASES	NOME COMERCIAL MAIS CONHECIDO
Lactonas Macrocíclicas	Ivermectina Moxidectina Doramectina	Ivomec Cydectin Dectomax
Imidazotiazóis	Levamisol Tetramisol	Ripercol
Benzimidazóis	Albendazol Thiabendazol Mebendazol Oxifendazole	Albendathor Ricobendazole Systemex
Salicilanilidas	Closantel Disofenol	Galgosantel Disofen

Entretanto, esses medicamentos ao longo do tempo, e com o uso supressivo, foram perdendo sua eficácia, ocasionando o que chamamos de *RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA*.

COMO OS VERMES ADQUIREM RESISTÊNCIA AOS VERMÍFUGOS?

Em uma população parasitária, assim como em todas as populações, há os vermes sensíveis e os resistentes a determinado vermífugo. Quando se utiliza muito esse vermífugo, com intervalos curtos, em todos os animais e com a dose errada eliminam-se os vermes sensíveis e só sobram os resistentes, que se multiplicam e povoam as pastagens e os animais. Assim, quando novamente tenta-se utilizar esse vermífugo, ele não fará mais efeito porque os vermes já adquiriram resistência.

Essa é uma situação preocupante, pois esse processo é muito rápido e inevitável para todos anti-helmínticos, e não há muita opção para mudança do tipo do vermífugo, uma vez que a descoberta de uma nova classe demora anos de pesquisa e muito investimento financeiro. Entretanto, podemos retardar o aparecimento da resistência e melhorar o manejo dos animais para que eles possam conviver melhor com a verminose; além disso, os exames laboratoriais e a avaliação clínica do animal são parâmetros importantes que devem fazer parte de um manejo integrado de controle parasitário.

MANEJOS QUE AUXILIAM NO CONTROLE DA VERMINOSE:

Ovinos manejados inadequadamente, mal nutridos, com elevado grau de estresse, são mais susceptíveis às infecções parasitárias e adoecem rapidamente. O problema torna-se ainda mais grave com o uso de anti-helmínticos ineficazes vinculado à falta de adequados programas de controle parasitário. Por isso, o tratamento da verminose passa a ser muito mais amplo do que somente a administração de vermífugos (Fig 7 e 8).

Alguns manejos que podem auxiliar dando suporte ao animal e ajudando no controle da verminose:

- **Nutrição:** animais bem nutridos têm melhor resistência aos vermes, adoecendo menos;
- **Desmame com idade e peso adequados:** o leite materno e a presença da mãe são importantes no desenvolvimento da imunidade cordeiro. Recomenda-se desmamar o cordeiro não antes dos 2 meses de vida e dar-lhe suporte alimentar adequado;
- **Categorias sensíveis:** as categorias mais sensíveis são cordeiros jovens e fêmeas em terço final de gestação. Atenção especial a esses animais com nutrição e ambiente adequados podem diminuir a verminose;
- **Seleção de animais resistentes:** algumas raças e linhagens são mais resistentes à verminose, a seleção genética ajuda no controle da doença;

- Adequada lotação: altas lotações (muitos animais por área) aumentam a chance de infecção por vermes, dificultando o controle;
- Estresse: práticas estressantes como castração, descorna e transporte diminuem a imunidade do animal, favorecendo a verminose.
- Instalações adequadas e limpeza do confinamento: animais confinados têm menor chance de infecções parasitárias, mas é necessário que o ambiente esteja limpo e que as instalações sejam adequadas de forma a evitar o contato com as fezes.

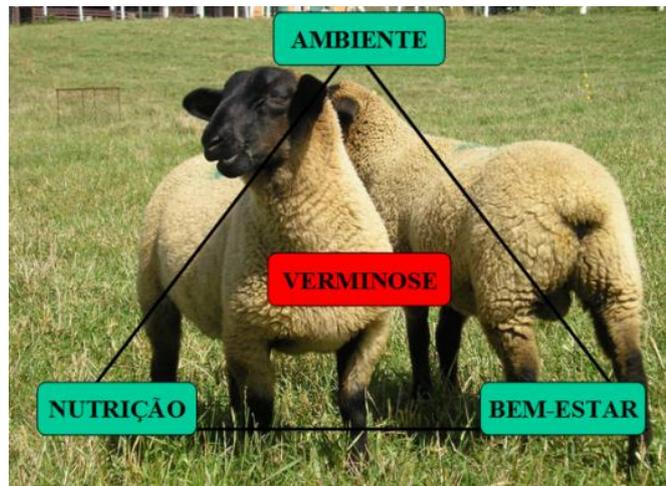


Figura 7. O controle da verminose vai muito além do uso isolado de antiparasitários, englobando manejo nutricional, ambiental e bem-estar animal.



Figura 8. Animais com boa condição nutricional, adequada oferta e qualidade da pastagem, são menos afetados pela verminose.

QUAIS SÃO OS EXAMES QUE AUXILIAM NO DIAGNÓSTICO DA VERMINOSE?

- Exames de fezes: é a forma mais fiel de se diagnosticar a verminose. Para isto, as fezes devem ser coletadas diretamente do reto do animal (Fig 9). O OPG (contagem de ovos por grama de fezes) é o exame mais comum, ele é quantitativo e diz o quanto o animal está infectado (Fig 10). Além disso, a comparação do OPG antes e depois (14 dias) de ter aplicado o vermífugo é o método mais utilizado para saber a eficácia do medicamento, esse teste é chamado teste de redução da contagem de ovos nas fezes, considerando-se eficaz o medicamento que reduzir cerca de 95% do OPG. A coprocultura é o exame qualitativo, ou seja, indica quais os vermes que acometem o rebanho.
- Método Famacha: é avaliação do grau de anemia do animal e foi desenvolvido para quando o verme predominante é *Haemonchus*. Utiliza-se uma tabela de coloração da mucosa ocular indicando-se o tratamento apenas dos animais acometidos com anemia. Esse método funciona muito bem quando vinculado a outras formas de controle e manejo (Fig.11).
- Avaliação da condição corporal: animais com verminose perdem peso e condição corporal; sendo assim, a avaliação dos animais que destoam do restante do lote em escore de condição corporal pode indicar que estejam acometidos. Como esse parâmetro é totalmente dependente da nutrição, apenas quando esta estiver adequada, a condição corporal pode ser utilizada como critério de tratamento (Fig. 12).
- Diarreia: como vimos na tabela 1, alguns vermes causam diarreia e a observação desse parâmetro pode indicar verminose. Contudo, cuidado com essa avaliação, pois, outras causas como nutricional e infecciosa (bactérias e vírus) podem ocasionar diarreia.



Figura 9. Coleta de fezes para realização de exames.



Figura 10. Exame de OPG.

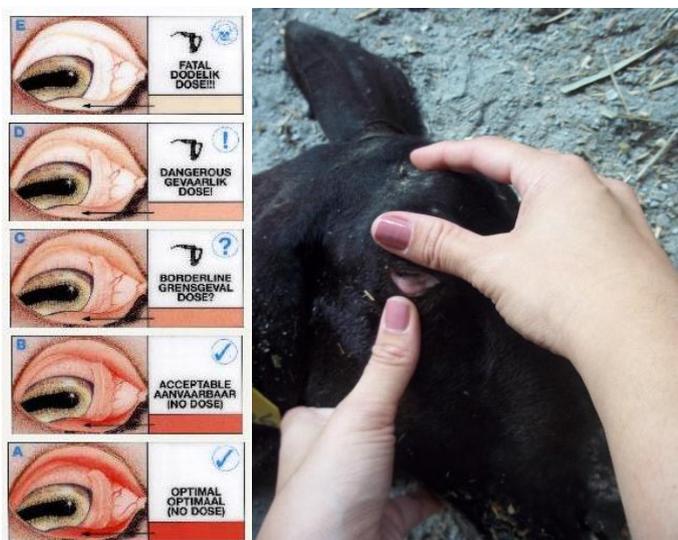


Figura 11. Tabela Famacha (Van Wyk et al., 1997) e exposição da mucosa ocular para avaliação do grau de anemia.



Figura 12. Avaliação do escore de condição corporal.

ENTÃO, QUANDO VERMIFUGAR???

Como foi visto, há várias ferramentas que podem auxiliar no tratamento anti-helmíntico, e quanto melhor o diagnóstico melhor será o resultado:

- Para tratar o rebanho é necessário saber qual o vermífugo que apresenta melhor eficácia (próximo a 95%), por meio da realização do teste de redução da contagem dos ovos nas fezes mencionado no item 9 a.
- Com vermífugo em mãos, utilizam-se as ferramentas de diagnóstico (OPG, coprocultura, Famacha, avaliação do escore corporal e da diarreia), e aplica-se o medicamento apenas nos animais que estão acometidos, nunca em todos e somente quando necessário. A vermifugação de todo o rebanho de uma só vez aumenta o processo de resistência.
- Mesmo após ter comprovada a eficácia do vermífugo, é importante utilizar de boas práticas na aplicação para que ele funcione.
- Lembre-se que o vermífugo é apenas uma das ferramentas utilizadas no controle da verminose, não deve nunca ser a única; pois quanto mais se trata, mais rápido ocorre o aparecimento de resistência.

QUAIS SÃO AS BOAS PRÁTICAS NA ADMINISTRAÇÃO DOS VERMÍFUGOS?

Após saber qual o vermífugo que mais funciona no rebanho, agora é preciso zelar para que ele seja administrado da melhor forma para que chegue ao alvo e cumpra o seu papel de eliminar os parasitos. Para isso, é fundamental utilizar as boas práticas na administração:

- Sempre se deve pesar (Fig. 13) o animal antes e calcular a dose exata para cada um (Fig. 14), a bula do medicamento indica a dose que deve ser utilizada por peso.
- Observar se o vermífugo está na validade e em boas condições de uso;
- Agitar o frasco antes de usar;
- Observar a via de aplicação: na bula do vermífugo há a indicação da via que deve ser aplicado: oral, intramuscular ou subcutânea, deve ser respeitada para que o medicamento cumpra sua função.
- Vermífugos orais requerem jejum (12 horas), posicionamento correto da cabeça do animal e verificação se não há refluxo;
- Vermífugos injetáveis (Fig. 15) requerem seringas e agulhas limpas, mãos limpas e administração correta para evitar refluxo. A pele do animal deve ser limpa com álcool 70% e na aplicação subcutânea o medicamento deve ser depositado em baixo da pele de cima para baixo.



Figura 13. Pesagem do animal para o cálculo de doses do vermífugo.



Figura 14. Cálculo e preparação da dose de vermífugo de acordo com o indicado pelo fabricante.

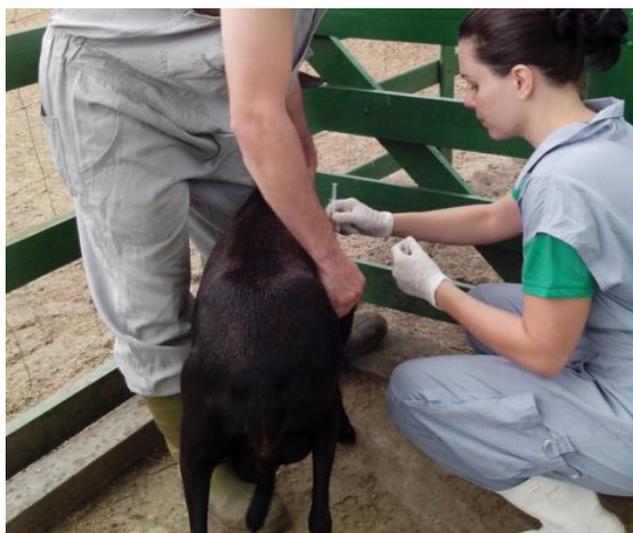


Figura 15. Aplicação de vermífugo por via subcutânea.

POR QUANTO TEMPO DEVE-SE UTILIZAR O MESMO VERMÍFUGO?

Levando-se em conta o processo rápido de resistência anti-helmíntica, indica-se utilizar o mesmo vermífugo até que ele pare de funcionar, isso leva em torno de um ano. Somente após esse período, indica-se um novo teste de eficácia e então a troca de princípios. A rotação rápida dos princípios ativos e sem critérios aumenta o processo de resistência e dificulta o controle da verminose.

CONCLUINDO:

Verminose é um sério problema que acomete os ovinos em todo o país, no estado do Rio de Janeiro detectou-se em muitas propriedades grave situação de resistência anti-helmíntica. Com isso, é necessário lançar mão do uso de um programa integrado de controle parasitário que englobe práticas de manejo, exames e boas práticas na aplicação dos anti-helmínticos, para que estes possam funcionar por mais tempo. Para a escolha do medicamento, é necessário testar a sua eficácia por meio do teste de redução da contagem de ovos nas fezes.

AGRADECIMENTOS:

Essa cartilha é dedicada a todos aqueles que contribuíram para o projeto:

- À UENF que propiciou estrutura física e transporte para a realização da pesquisa;
- Ao Sr. Ricardo Lomardo, maior incentivador do projeto dando apoio em todas as etapas de realização;
- À FAPERJ: pela bolsa de doutorado.
- Aos ovinocultores que contribuíram para o estudo;
- Aos funcionários que incondicionalmente ajudaram no dia das coletas;
- À toda equipe do laboratório que trabalhou junto no projeto.

6. 3) Cursos e Palestras:

No decorrer do projeto de tese, foram ministrados cursos, palestras e dias de campo para estudantes e produtores rurais. Abordaram-se temas referentes ao controle parasitário e higiene e profilaxia do rebanho ovino. Esses eventos foram de suma importância tanto para o repasse de informações quanto para o recrutamento de interessados em participar do projeto. Em algumas dessas ocasiões, foram entregues as cartilhas informativas.

A) Palestra: “Monitoramento e controle de nematoides gastrointestinais de ovinos do estado do Rio de Janeiro”.

Local: Três Rios-RJ

Data: 14 de agosto de 2011

Evento: Três Rios Expo Fest: V Seminário de Ovinocaprinocultura da Região Centro Sul Fluminense.

O seminário apresentou os cenários, tendências e tecnologias para o agronegócio da cadeia produtiva da Ovíno/caprinocultura no Brasil. Com objetivo de fomentar a atividade junto ao público consumidor e atrair novos produtores. Além de buscar estimular a discussão da cadeia produtiva, custos, processos e propor estratégias para o fomento da atividade no Estado do Rio de Janeiro. Nesta ocasião, além da palestra ministrada sobre controle parasitário, foram recrutados ovinocultores da região interessados em participar do projeto de tese.



**MONITORAMENTO E CONTROLE DE
NEMATÓIDES GASTROINTESTINAIS
DE OVINOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**



Jordana Andrioli Salgado
Três Rios -RJ - 13/08/2011

Figura 1. Slide inicial da palestra ministrada em Três Rios.

B) Dia de Campo: “Higiene e Profilaxia na Ovinocultura”.

Local: Areal-RJ;

Data: 05/11/2011.

Evento: Dia de Campo.

Esse evento foi feito com base na demanda e interesse demonstrados pelos ovinocultores na palestra em Três Rios. Com intuito de recrutar maior público participante para trabalho de tese e abordar um tema mais abrangente referente ao manejo básico de higiene e profilaxia, esse curso ocorreu na Fazenda Jaqueiras em Areal-RJ. Sendo assim, foi realizado um dia de campo onde os ovinocultores puderam além de assistir à palestra, participar do manejo dos animais e conhecer uma fazenda ovinocultora.



Curso:
Higiene e profilaxia na ovinocultura

Conheça conceitos e manejos importantes relacionados à saúde animal. Este curso será ministrado pela Vet. *Jordana Andrioli* e ocorrerá em formato “**dia de campo**” contendo uma parte teórica e outra prática.

Abaixo alguns temas que serão abordados:

- ✓ Infecção, inflamação, infestação, agente etiológico, hospedeiro, sinal clínico e sintoma;
- ✓ Principais tipos de medicamentos: vacinas, antibióticos, anti-inflamatórios e antiparasitários;
- ✓ Limpeza, desinfecção e anti-sepsia.

Data: 05/11/2011
Horário: 09:30h
Local: Fazenda Boa Vista (Areal)

Figura 2. Folder de divulgação do dia de campo sobre Higiene e Profilaxia realizado em Areal.

C) Palestra em Encontro de Ovinocultores: “Parasitoses no Rebanho Ovino Fluminense”.

Local: Paraíba-Sul-RJ;

Data: 30 de maio de 2014;

Evento: 1º Encontro de Ovinocultores da Região Centro Sul Fluminense.

Esse encontro foi promovido pela prefeitura de Paraíba do Sul juntamente com a EMATER, convidando vários palestrantes para discutirem a cadeia produtiva e o manejo de ovinos. Nesta ocasião, boa parte da pesquisa de tese já havia sido realizada no campo. Dessa forma, a palestra buscou apresentar uma parte dos resultados e discutir a cartilha que foi entregue aos produtores rurais. Após a palestra, os participantes se reuniram na fazenda Bode Bravo, onde se pode demonstrar a parte prática da cartilha: avaliação sanitária dos animais (escore de condição corporal, grau de diarreia, método Famacha), teste de eficácia e boas práticas na administração de anti-helmínticos.

**1º Encontro de Ovinocultores
da Região Centro - Sul Fluminense**



Dia 30 de Maio de 2014
Local: Cinema Popular Nivea Stelman
Estação Ferroviária S/N - Centro
Contatos: (0xx24) 2263-8788
Paraíba do Sul



Programação

8h30 - Chegada dos Participantes.
9h - Credenciamento.
9h30 - Abertura Oficial.
10h - Panorama da Ovinocultura no RJ e o Programa Estadual RBO OVINOS - Médico Veterinário José Henrique Moraes - EMATER-RIO.
10h30 - Vantagens da Ovinocultura na Região Centro - Sul Fluminense - Ricardo Lomardo - Presidente da Associação dos Ovinocultores do sul - Fluminense - NOCSUL.
11h - Perfil dos Criadores de Ovinos no Centro-Sul Fluminense - Dr. José Cardoso Macedo Filho - Médico Veterinário UFB - Diretor da CRIE - Consultoria Técnica.
12h - Intervalo Para o Almoço.
13h - Manejo em Ovinos de Leite - Luiz Francisco Menezes - Criador e Empresário da Quejaria Sítio Solidão.
13h30 - Parasitoses no Rebanho Ovino Fluminense - Drª Jordana Andrioli Salgado - Médica Veterinária - UFPR - Mestre em Ciências Veterinárias/Sistema de Produção de Ovinos - UFPR - Doutoranda em Biotecnologia e Biotecnologia/ Parasitologia - UENF.
14h - Manejo Sanitário de Ovinos - Drª Glenda Ribeiro - Médica Veterinária da Defesa Sanitária Animal do RJ.
14h30 - Ovinocultura - Desafios e Oportunidades- Dr. Arnaldo Dantas - Consultor da CNA; Diretor Técnico da Associação dos Ovinocultores do Sergipe; Coordenador do Programa de Melhoramento Genético da Raça Santa Inês (USP - M.A.P.A.).
15h45 - Mesa Redonda - Visão da Acoerj para Estimular a Ovinocultura do RJ - Moderador: Dr. Antônio Lopes - Diretor Técnico da Acoerj.
16h30 - Encerramento e Inscrições para o DIA DE CAMPO.

Dia 31 de Maio de 2014 - Sábado
Das 10h às 13h - DIA DE CAMPO NO SÍTIO BODE BRAVO do Ovinocultor Ricardo Lomardo em Paraíba do Sul (Reprodução e Manejo)








Figura 3. Folder de divulgação do encontro de ovinocultores realizado em Paraíba do Sul.



Figura 4. Palestra ministrada aos produtores rurais em Paraíba do Sul.



Figura 5. Público participante da palestra em Paraíba do Sul.



Figura 6. Apresentação da Cartilha em Paraíba do Sul.



Figura 7. Entrega das cartilhas em Paraíba do Sul.



Figura 8. Produtores rurais reunidos em Dia de Campo na Fazenda Bode Bravo.



Figura 9. Apresentação do método Famacha na Fazenda Bode Bravo.



Figura 10. Demonstração do método Famacha na Fazenda Bode Bravo.



Figura 11. Demonstração da avaliação de Escore de Condição Corporal na Fazenda Bode Bravo.



Figura 12. Demonstração do teste de eficácia de anti-helmínticos na Fazenda Bode Bravo.



Figura 13. Boas práticas na administração de anti-helmínticos na Fazenda Bode Bravo.

D) Palestra na UNIFESO: Parasitoses Gastrointestinais em Pequenos Ruminantes.

Local: Teresópolis

Data:08/06/2014

Evento: 11 Jornada científica da UNIFESO

Essa palestra foi dada na semana acadêmica de medicina Veterinária da UNIFESO (Centro Universitário Serra dos Órgãos). Com publico voltado para estudantes, buscou-se focar no diagnóstico e controle das parasitoses gastrointestinais. Ainda, foi entregue a cartilha e discutidas atualidades relacionadas à parasitologia em pequenos ruminantes.



Figura 14. Estudantes participantes da palestra na UNIFESO.



Figura 15. Palestra sendo ministrada na UNIFESO.



Figura 16. Palestra sendo ministrada na UNIFESO.



Figura 17. Palestra sendo ministrada na UNIFESO.

E) Curso na Semana do produtor Rural da UENF: “Controle Parasitário do Rebanho Ovino”.

Local: Campos dos Goytacazes-RJ

Data: 31/08/2014

Evento: 11ª Semana do Produtor Rural da UENF

Esse evento é dirigido ao produtor rural e à comunidade em geral, visando à melhoria da produtividade, da produção e ao bem-estar social. Promovido pela Coordenação de Extensão do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da UENF, a 11ª Semana do produtor constou de 47 minicursos, abordando diversos temas. Juntamente com prof. Clóvis, abordou-se o tema focado em Controle Parasitário do rebanho Ovino. O Curso foi dividido em duas partes, a parte teórica no período da manhã e a parte prática no período da tarde. Na prática, foram vistos o manejo dos animais, coleta de fezes e boas práticas na aplicação de anti-helmínticos. Além disso, com suporte dos laboratórios da UENF, exames coproparasitológicos foram feitos para a observação de ovos e larvas de parasitos. As cartilhas foram entregues aos produtores rurais e estudantes que participaram do curso.



Figura 18. Folder de divulgação da Semana do Produtor Rural.



Figura 19. Slide da palestra teórica na Semana do Produtor Rural.



Figura 20. Parte prática de realização de exames coproparasitológicos na Semana do Produtor Rural.

6.4) Textos Informativos:

Foram escritos quatro textos informativos voltados para produtores rurais com temas relacionados ao manejo, diagnóstico e controle de parasitoses em pequenos ruminantes. Os textos foram escrito em parceria com especialistas da área e foram publicado na revista Online Farmpoint (ponto de encontro da cadeia produtiva de Ovinos e Caprinos) atualmente vinculada ao MilkPoint:

A) Sistemas de produção e verminose - Parte I de II

Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos-e-caprinos/sistemas-de-producao-e-verminose-parte-i-de-ii-77369n.aspx>

Postado em 12/01/2012

Autoria: Jordana Andrioli Salgado, Edson Evaristo de Paula (zootecnista) e Dra. Alda Lúcia Gomes Monteiro (Professora UFPR).

B) Sistemas de produção e verminose Parte II de II:

Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos-e-caprinos/sistemas-de-producao-e-verminose-parte-ii-de-ii-77790n.aspx>

Postado em: 06/02/2012;

Autoria: Jordana Andrioli Salgado, Edson Evaristo de Paula (zootecnista) e Dra. Alda Lúcia Gomes Monteiro (Professora UFPR).

C) Coprocultura: um exame importante no controle de verminose:

Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos-e-caprinos/vale-a-pena-ler-de-novo-coprocultura-um-exame-importante-no-controle-de-verminose-78933n.aspx>

Postado em: 25/09/2014.

Autoria: Jordana Andrioli Salgado e Fernanda Rosalinski Moraes (Professora UFU).

D) Como escolher o vermífugo para o seu rebanho?

Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos-e-caprinos/como-escolher-o-vermifugo-para-o-seu-rebanho-95383n.aspx>

Postado em: 16/06/2015.

Autoria: Jordana Andrioli Salgado.

7) CONSIDERAÇÕES FINAIS:

O rebanho ovino do Rio de Janeiro é pequeno e carece de organização em vários elos da cadeia produtiva, assim como ocorre em muitas regiões do Brasil. No estado, a atividade não é principal na maioria das fazendas sendo caracterizada por *hobby* ou produção secundária à outra atividade pecuária ou agrícola. Os sistemas de produção mais utilizados são os semi-intesivos com uso predominante de pastagem. Pastagens nativas e braquiárias predominam na produção, havendo dificuldade do cultivo de pastos de melhor valor nutricional devido à escassez de chuvas principalmente nos meses de inverno. A raça mais criada é a nativa Santa Inês, à qual se adaptou melhor ao clima quente e às doenças tropicais. Apesar disso, os animais são muito acometidos por infecções endoparasitárias, havendo prejuízo produtivo com essas enfermidades.

Alta morbidade e mortalidade dos animais foram vistas em muitas fazendas percorridas no decorrer deste projeto. Carência de assistência técnica qualificada e falta na periodicidade desta ocasionaram falhas de manejo referentes à sanidade e nutrição dos animais. Desta forma, em todas as fazendas havia o uso de anti-helmínticos não eficazes de forma incorreta no rebanho, não solucionando o problema e ocasionando excesso de resíduos no meio ambiente e nos produtos de origem animal, principalmente na carne que é o produto mais explorado no estado. Sendo assim, nos quatro anos de projeto e vivenciando a problemática, buscou-se um diagnóstico profundo com a finalidade de tornar a pesquisa aplicada e auxiliar o ovinocultor no controle das parasitoses do seu rebanho. Com a parte de extensão do projeto, melhorias foram notáveis por meio dos relatos dos criadores o que tornou gratificante este projeto, apesar de extremamente trabalhoso. Após a defesa da tese e encerramento do projeto, é necessário que a educação e auxílio ao produtor rural sejam permanentes. Ressalta-se a importância da aplicabilidade da pesquisa e retorno do conhecimento à comunidade.

8) ANEXOS:

8.1) Artigo de revisão publicado:

Review Article

Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 3-17, jan.-mar. 2016
 ISSN 0103-846X (Print) / ISSN 1984-2961 (Electronic)
 Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016008>

Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil

Panorama da resistência anti-helmíntica em nematoides gastrointestinais de pequenos ruminantes no Brasil

Jordana Andrioli Salgado¹; Clóvis de Paula Santos^{1*}

¹ Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologia – CBB, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil

Received November 12, 2015

Accepted January 18, 2016

Abstract

Frequent and inappropriate use of all classes of antiparasitic drugs in small ruminants has led to failures in their effectiveness, culminating in a global problem of anthelmintic resistance. Brazil stands out as one of the world's leaders in publications about anthelmintic resistance, and for having the most numerous reports of this resistance in small ruminants in the Americas. These studies have involved mainly the fecal egg count reduction test (FECRT) and its correlation with field management practices. *In vivo* effectiveness testing is conducted in areas where livestock is of greater economic significance, e.g., in the South (sheep) and Northeast (goats), or is important for research and economic centers, such as the Southeast (sheep). The most widely studied species is sheep, for which the widest range of drugs is also evaluated. Despite significant advances achieved in molecular research, laboratory analyses should include knowledge about the reality in the field so that they can become feasible for the producer. Moreover, molecular studies can be underpinned by the analysis of field studies, such as the maintenance of antiparasitic effectiveness over time and the mechanisms involved in this process.

Keywords: Small ruminants, anthelmintic resistance, sheep, goat, gastrointestinal nematodes.

Resumo

O uso frequente e inapropriado de todas as classes de antiparasitários em pequenos ruminantes levou a falhas de eficácia, culminando na problemática global de resistência anti-helmíntica. O Brasil destaca-se como sendo um dos pioneiros nas publicações com resistência anti-helmíntica no mundo e por ter o maior número de relatos em pequenos ruminantes na América. Essas pesquisas envolvem principalmente o teste da redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF) e sua correlação com as práticas de manejo utilizadas no campo. Os estudos de testes de eficácia *in vivo* localizam-se em áreas onde há maior importância dos rebanhos como nas Regiões Sul (ovinos) e Nordeste (caprinos), ou com importância em polos de pesquisa e econômicos, como a região Sudeste (ovinos). Ovina é a espécie mais estudada e com maior gama de drogas avaliadas. Mesmo com grande avanço em pesquisas moleculares, as análises laboratoriais devem envolver o conhecimento da realidade do campo para que possam se tornar viáveis ao produtor. Além disso, a análise dos estudos de campo pode nortear estudos moleculares como, por exemplo, a manutenção da eficácia das drogas ao longo dos anos e os mecanismos envolvidos em tal processo.

Palavras-chave: Pequenos ruminantes, resistência anti-helmíntica, ovelha, cabra, nematoides gastrointestinais.

Introduction

The worldwide production of small ruminants is strongly impacted by gastrointestinal parasites that cause high mortality rates (HOSTE & TORRES-ACOSTA, 2011; STEAR et al., 2011; KNOX et al., 2012; FALZON et al., 2014), as well as losses resulting from subclinical infections that are reflected in low productivity (CHARLIER et al., 2014). In tropical countries, *Haemonchus contortus*

is the most prevalent nematode in herds, causing severe losses due to the high pathogenic pressure it exerts through hematophagy (KASSAI, 1999). Other parasites also contribute to losses through diarrhea, spoliation of intestinal mucosa and anemia, mainly because of mixed infections, which cause a variety of clinical signs and low productivity (MOLENTO et al., 2009). In Brazil, the productive potential for ruminants that are suitable for animal husbandry is hampered by endoparasitic infections. In the cattle sector, where the country is a world leader in commercial herds, annual losses caused by gastrointestinal parasites are estimated to reach up to

*Corresponding author: Clóvis de Paula Santos. Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologia – CBB, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, Av. Alberto Lamego, 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. e-mail: cps@uenf.br

\$ 7.11 billion (GRISI et al., 2014). Sheep and goats, for which there is a developing production chain in the country, are even more susceptible, and their high mortality rate is a significant deterrent to agribusiness.

Over the years, parasitic diseases in livestock have been controlled based on the use of broad-spectrum and widely accessible antiparasitics. The main classes of anthelmintics available in recent years are: benzimidazoles, imidazothiazoles, macrocyclic lactones, salicylanilides and nitrophenols (COLES et al., 2006). According to Molento (2009), the use of antiparasitic drugs in farm animals over the years offers benefits; however, the continuous and inappropriate use of these drugs has resulted in the loss of effectiveness of many active ingredients. Macrocyclic lactones were launched on the market in the 1980s (CHABALA et al., 1980), but just a few years later, there were reports of the loss their efficiency in Brazil (ECHEVARRIA & TRINDADE, 1989). Recently, two new classes of anthelmintics were launched, an amino-acetonitrile derivative, monepantel (KAMINSKY et al., 2008), and derquantel, which was marketed in association with abamectin (LITTLE et al., 2010). However, there have been reports of resistance to monepantel (SCOTT et al., 2013; MEDEROS et al., 2014a; VAN DEN BROM et al., 2015) and to derquantel (KAMINSKY et al., 2011), indicating the high vulnerability of these drugs. Additional to the loss of effectiveness there are the effects of toxic residues on non-target organisms in the environment (LUMARET et al., 2012) and of residues in meat (COOPER et al., 2011), milk and other animal products associated to anthelmintics (IMPERIALE et al., 2004; ANASTASIO et al., 2005; WHELAN et al., 2010).

According to the guidelines of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology- WAAVP, occurs anthelmintic resistance (AHR) when the effectiveness of a drug against the target parasite load is lower than 95% (COLES et al., 1992, 2006). AHR occurs when there is high incidence of individuals in a parasite population that are able to tolerate

doses of a presumably lethal compound, and this characteristic is hereditary (PRICHARD et al., 1980). This decrease in susceptibility is caused by an increase in the genetic selection frequency, which results from repeated use of an anthelmintic (FLEMING et al., 2006). The greater the selective pressure of the drug, the greater the process of selection by resistant organisms. According to Blouin et al. (1995), gastrointestinal nematodes of small ruminants have genetic traits that promote the rapid development of AHR, such as rapid rates of selection and of gene flow and a high level of genetic diversity. As a result, these parasites have the genetic potential to quickly respond to the effect of anthelmintics and the means to ensure the dissemination of their resistant genes (FLEMING et al., 2006).

Increased AHR in herds has led to the need to identify management practices that can reduce the impact of the problem (FALZON et al., 2014), which requires a prior diagnosis of the situation. AHR in small ruminants has been reported in various regions of world: Argentina (EDDI et al., 1996); Uruguay (NARI et al., 1996; BONINO & MEDEROS, 2003), Paraguay (MACIEL et al., 1996); South Africa (VAN WYK et al., 1997); Mexico (TORRES-ACOSTA et al., 2003); Australia (SUTER et al., 2004; PLAYFORD et al., 2014); New Zealand (WAGHORN et al., 2006); Canada (FALZON et al., 2013); Denmark (PENA-

ESPINOZA et al., 2014); Uganda (NABUKENYA et al., 2014); Italy (ZANZANI et al., 2014); Ireland (KEANE et al., 2014); France, Greece and Italy (GEURDEN et al., 2014). The countries with the largest number of cross-sectional studies over time are New Zealand, the United Kingdom and Brazil (FALZON et al., 2014). Torres-Acosta et al. (2012) also highlight Brazil as the country with the largest number of publications in the area that offer up-to-date reports about the situation of AHR in the Americas. Thus, the purpose of this review is to provide an overview of the reports of AHR in small ruminants in Brazil, discussing the history and forms of diagnosis employed; and to analyze the distribution of surveys by region, as well as the evolution of the use, effectiveness and maintenance of these drugs over the years.

History of AHR in Small Ruminants in Brazil and Around the World

The world's first report of AHR involved the drug phenothiazine in sheep in the U.S. (LELAND et al., 1957). Among the classes of anthelmintics currently in use, benzimidazoles were the first drugs to lose their effectiveness in nematodes of small ruminants, and AHR in sheep to thiabendazole was first reported by Drudge et al. (1964). Soon thereafter, in Brazil, Santos & Gonçalves (1967) reported the first case of anthelmintic resistance in sheep to thiabendazole in the state of Rio Grande do Sul. In goats, first reported resistance to benzimidazole in the world occurred in the 1980s (LUTU, 1984; KETTLE et al., 1983; McKENNA, 1984). In Brazil, based on the necropsy of goats treated with albendazole, parbendazole and levamisole, Charles et al. (1989) reported resistance to all these active ingredients, and questioned whether the dosage was correct for the species. In the same year, Vieira et al. (1989) detected resistance to several classes of benzimidazole in goats in the state of Ceará.

The nematode strains resistant to benzimidazole were highly susceptible to imidazothiazoles, but in Australia, Le Jambre et al. (1976) reported the potential resistance of nematode strains selected *in vitro* to these drugs, and their report was soon followed by other reports about resistance around the world, including field strains (KELLY & HALL, 1979). In Brazil, a previous report by Santiago et al. (1977) identified a strain of *Trichostrongylus colubriformis* resistant to levamisole. Later, Green et al. (1981) published the first report of multiple resistance, including to benzimidazoles and imidazothiazoles, caused by the high selection pressure resulting from frequent treatments of sheep flocks in Queensland, Australia. In Brazil, articles about goats in the state of Pernambuco (CHARLES et al., 1989) and about sheep in the state of São Paulo (AMARANTE et al., 1992) reported resistance to levamisole as multiple with the other formulations of benzimidazoles.

With the advent of AHR to the two main classes of anthelmintics in the animal market, the emergence of a new class offered new prospects for Brazilian livestock. In the 1980s, macrocyclic lactones with endectocidal activity were launched on the French market (CHABALA et al., 1980), and were soon thereafter launched in Brazil in various formulations and concentrations. The first report of loss of ivermectin effectiveness in sheep was published in South

Africa (CARMICHAEL et al., 1987), and was soon followed by reports in Brazil (ECHEVARRIA & TRINDADE, 1989). In Brazil, the first report of ivermectin resistance in goats dates from the 1990s in the state of Rio Grande do Sul (MATTOS et al., 1997 cited by MATTOS et al., 2004). Melo et al. (2003) also reported resistance to ivermectin in sheep and goats in the state of Ceará, and this report was followed by others throughout the country.

Over time and with the use of new drugs, there have been numerous reports of multiple resistance worldwide, especially in countries with a tradition of breeding small ruminants. In Brazil, in addition to the aforementioned classes of drugs, Thomaz-Soccol et al. (1996) reported multiple resistances in sheep in the state of Paraná to the drugs closantel and disophenol, which are still considered specific and effective in the treatment of *H. contortus*. Also in the state of Paraná, Cunha et al. (1998) found resistance to moxidectin, a milbemectin of the class of macrocyclic lactones, which was effective against ivermectin resistant strains (CRAIG et al., 1992). Subsequent reports of multiple resistance to the macrocyclic lactones ivermectin and moxidectin (CONDER et al., 1993; SHOOP et al., 1993) raised the possibility of cross-resistance between them (MOLENTO et al., 1999). In addition to other

drugs, Cezar et al. 2010 and Cruz et al. 2010 reported resistance to nitroxylin, a narrow spectrum anthelmintic that had until then been effective against *Haemonchus* spp.

In the absence of the release of new drugs, and given the increasing status of AHR in small ruminants, combinations of drugs with different mechanisms of action began to be used in an effort to delay the development of resistance (SMITH, 1990; COLES & ROUSH, 1992). However, it was found that these combinations could fail, particularly when there was already resistance to one or more drugs, although the use of combinations was found to be valid when inserted in integrated programs of drug resistance management and underpinned by parasitological examinations (LEATHWICK & BESIER, 2014). In Brazil, resistance to various combinations of antiparasitics were reported in sheep in the state of Paraná by Thomaz-Soccol et al. (1996) and Thomaz-Soccol et al. (2004), in Rio Grande do Sul by Echevarria et al. (1996) and Cezar et al. (2010), and in Mato Grosso do Sul by Sczesny-Moraes et al. (2010) (see Table 1).

Recently, two new classes of anthelmintics were launched, a derivative of aminoacetonitrile with broad-spectrum activity, monepantel, Zolvix® (KAMINSKY et al., 2008) and derquantel

Table 1. Papers published regarding Anthelmintic Resistance, evaluated by the Fecal Egg Count Reduction Test (FECRT), in small ruminants in Brazil.

State	Anthelmintics evaluated	Drugs with AHR	Animal species	No. of farms/ animals	Source
RS	Th, Di, P	Th	Sheep	2/308	Santos & Gonçalves (1967)
RS	I	I	Sheep	1/89	Echevarria & Trindade (1989)
CE	O, F, A, Th.	O, F, A, Th	Goats	1/25	Vieira et al. (1989)
SP	O, I, L	O, I, L	Sheep	9/540	Amarante et al. (1992)
CE	Te, N, I	Ne, I	Sheep	1 / 20	Vieira et al. (1992)
PR	A, C, L, F, I, Te, Di + Te.	A, C, L, F, I, Te, D + Te	Sheep	6/480	Thomaz-Soccol et al. (1996)
RS	A, L, I, C, A + L	A, L, I, C, A + L	Sheep	182/NI	Echevarria et al. (1996)
RS	I, L, A, F, O, Me	L, A, F, O, Me	Sheep	29/870	Farias et al. (1997)
PR	I, A, M	I, A, M	Sheep	10/850	Cunha et al. (1998)
CE	C, O	C, O	Sheep	1/38	Melo et al. (1998)
CE	I, C	I, C	Goats	1/29	Melo et al. (1998)
CE	O, L	O, L	Goats	34/1020	Vieira & Cavalcante (1999)
RS	C, L (8 and 11mg/kg)	C, L (8 and 11mg/kg)	Goats	1/40	Mattos et al. (2000)
SC	I, L, C, A	I, L, C, A	Sheep	65/7529	Ramos, et al. (2002)
CE	O, L, I	O, L, I	Sheep	16/ 768	Melo et al. (2003)
CE	O, L, I	O, L, I	Goats	7/336	Melo et al. (2003)
CE	O	O	Sheep	6/144	Melo et al. (2004)
RS	I	I	Goats	2/12	Mattos et al. (2004)
PR	O, I, C, C + O, L, M	O, I, C, C + O, L, M	Sheep	42/NI	Thomaz-Soccol et al. (2004)
AL	I, A, M	I, A	Goats	1/40	Ahid et al. (2007)
SP	A+ L + I, M	M	Sheep	1/24	Buzzulini et al. (2007)
SC	I, A, M, C, L	I, A, M, C, L	Sheep	9/450	Rosalinski-Moraes et al. (2007)
PB	A, I, L, M	A, I	Goats	n/120	Rodrigues et al. (2007)
PR	C + A, I (3.5%)	C + A, I (3.5%)	Sheep	4/120	Cunha et al. (2008)
RN	A, I	A, I	Sheep	1/54	Pereira et al. (2008)
RN	A, I	A, I	Goats	1/54	Pereira et al. (2008)

A: albendazole; O: oxfendazole; F: febendazole; P: pyrantel tartrate; Th: thiabendazole; Te: tetramisole; L: levamisole; D: doramectin; I: ivermectin; M: moxidectin; C: closantel; Tr: trichlorfon; N: nitroxylin; Di: disophenol; Ne: netobimin (pre-benzimidazole); Me: mebendazole; Mo: monepantel; (+) associations of drugs. (NI): not informed. (-): no drug presented AHR. Remark: Goats require different doses of anthelmintics to sheep and in general this is not taken into account when considering the status of susceptibility or resistance.

Table 1. Continued...

State	Anthelmintics evaluated	Drugs with AHR	Animal species	No. of farms/ animals	Source
MG	A+ I+C, A+ I+C +L+ Selenium	-	Goats	1/27	Silva et al. (2008)
RS	Mo, I	I	Sheep	1/30	Bustamante et al. (2009)
PR	Tr, C	C	Sheep	1/27	Falbo et al. (2009)
CE	O	O	Sheep	18/432	Melo et al. (2009)
CE	O	O	Goats	7/168	Melo et al. (2009)
RS	A, I, N, Di, Tr, C, I+ L + A	A, I, N, Di, Tr, C, I+ L + A	Sheep	1/5000	Cezar et al. (2010)
RJ	N, D, L, I, A, C, M, F	N, D, L, I, A, C, M, F	Sheep	10/800	Cruz et al. (2010)
PB	I, L, A	I, L, A	Goats	8/264	Lima et al. (2010a)
PE	M, I, A	A	Sheep	3/NI	Lima et al. (2010b)
PE	M, I, A	M, I, A	Goats	6/NI	Lima et al. (2010b)
MS	A, I, L, Tr, M, C, A + I+ L	A, I, L, Tr, M, C, A + I+ L	Sheep	16/120	Szczesny-Moraes et al. (2010)
RN	I, A	I, A	Goats	30/1350	Coelho et al. (2010)
SP	I, A, M, C, L, Tr	I, A, M, C, L, Tr	Sheep	1/42	Almeida et al. (2010)
SP	I, A, M, C, L	I, A, M, C, L	Sheep	30	Verissimo et al. (2012)
SP	Tr, I, A, M, C, L	I, A, M, C, L	Sheep	1/42	Chagas et al. (2013)
PR	L (9 mg/kg, 6.75 mg/kg and 4.5 mg/kg)	L (4.5 mg/kg)	Sheep	1/28	Sprenger et al. (2013)
PR	L (9 mg/kg, 6.75 mg/kg and 4.5 mg/kg)	L (9 mg/kg, 6.75 mg/kg and 4.5 mg/kg)	Goats	1/28	Sprenger et al. (2013)
SC	C, Tr, A, Di, L, M, I, I+ C	C, T, A, L, M, I, I+ C	Sheep	1/82	Oliveira et al. (2014)
PR	N, I	N, I	Sheep	1/29	Vila Nova et al. (2014)
PR	Mo	Mo	Sheep	1/30	Cintra et al. (2016)

A: albendazole; O: oxfendazole; F: febendazole; P: pyrantel tartrate; Th: thiabendazole; Te: tetramisole; L: levamisole; D: doramectin; I: ivermectin; M: moxidectin; C: closantel; Tr: trichlorfon; N: nitroxylin; Di: disophenol; Ne: netobimin (pre-benzimidazole); Me: mebendazole; Mo: monepantel; (+): associations of drugs. (NI): not informed. (-): no drug presented AHR. Remark: Goats require different doses of anthelmintics to sheep and in general this is not taken into account when considering the status of susceptibility or resistance.

(Startect®), a medium-spectrum semisynthetic spiroindolone, which was marketed in association with abamectin (LITTLE et al., 2010, 2011). Sager et al. (2012) found 100% and 95% effectiveness, respectively, for these two products against *Haemonchus contortus* strains resistant to other drugs. Bustamante et al. (2009) found that monepantel was 100% effective in sheep in Brazil, Argentina and Uruguay. However, resistance to monepantel (SCOTT et al., 2013; MEDEROS et al., 2014a; VAN DEN BROM et al., 2015) and to derquantel (KAMINSKY et al., 2011) has been reported around the world, demonstrating the high vulnerability of these drugs. It is likely that reports of resistance to these anthelmintics will soon be published in Brazil. Therefore, the consensus of the scientific community is that, in view of the high vulnerability of the effectiveness of anthelmintics, allopathic treatment should not be the only form of antiparasitic treatment, and that the focus should be on correlating animal handling, nutrition and alternative forms of parasite control.

Diagnostic Methods Employed in Brazil to Detect AHR in Small Ruminants

The growing concern about AHR has led to the need for adequate and standardized methods for its detection (COLES et al., 1992). It is important to obtain an accurate and early diagnosis of resistance to assist in parasite control, so as to preserve the useful life

of anthelmintics and limit the development of parasitic resistance (TAYLOR et al., 2002; DEMELER et al., 2010). According to Coles et al. (2006), if there is a consensus about delaying the onset of AHR, tests are needed that are able to detect the status of the problem on farms, so that anthelmintic management actions can be planned. Over the years, the WAAVP has discussed methods for the evaluation of AHR in ruminants and other animals, which often involve *in vivo*, *in vitro*, and more recently, molecular methodologies (POWERS et al., 1982; COLES et al., 1992; WOOD et al., 1995; COLES et al., 2006).

In Brazil, a concern about standardizing tests has been demonstrated through the promotion of courses and technical manuals for the diagnosis of AHR in ruminants. The Brazilian Agricultural Research Corporation – EMBRAPA-Sudeste has offered courses on “*In vitro* methodologies for the evaluation of substances with antiparasitic potential on gastrointestinal nematodes of ruminants” given by professionals from around the country. EMBRAPA published a document entitled “Determination of Anthelmintic Effectiveness in Sheep Flocks: Methodology for Specimen Collection and Information on Animal Health Management” (NICIURA et al., 2009). In addition, it also launched the “Practical Manual: Diagnostic methodologies of resistance and detection of active substances in ruminant parasites” (CHAGAS et al., 2011). The document covers *in vivo* testing and field sampling of material, including questionnaires for producers, while the manual emphasizes *in vitro* and molecular laboratory

tests. Fortes & Molento (2013) wrote a review of the advances and limitations in the diagnosis of AHR in small ruminants, and pointed out the need for accurate diagnostics for the performance of antiparasitic management.

The new molecular biology tools, which are highly accurate, can be used for the diagnosis of susceptible and resistant parasites (CHAGAS et al., 2011). Molecular tests based on the analysis of polymorphisms in the target gene associated with resistance, using PCR, are highly sensitive (SILVESTRE & HUMBERT, 2000), do not require fecal cultures, and can supplement traditional diagnostic methods (NUNES et al., 2013). However, due to the extremely polygenic nature of populations, researchers have yet to discover the mechanism of drug resistance and pinpoint one or more candidates for specific markers (FORTES & MOLENTO, 2013). Knowledge about the molecular mechanisms of AHR is still limited mainly to benzimidazoles (COLES et al., 2006; TAYLOR et al., 2002), involving a mutation of tyrosine to phenylalanine in the beta-tubulin gene (SILVESTRE & HUMBERT, 2000). This polymorphism has also more recently been associated with resistance to avermectins (MOTTIER & PRICHARD, 2008). In Brazil, Nunes et al. (2013) evaluated goat, sheep and buffalo herds with respect to the presence of polymorphism which confers resistance to benzimidazole, and stated that molecular diagnosis is the guide of choice for anthelmintic drugs before they are used on the herd. Studies of molecular tests on AHR in Brazil have also been evaluated, involving testing of beta-tubulin mutations (NICIURA et al., 2012) or genetic evaluations of nematodes, corroborating researches into AHR (SILVA et al., 2015; SANTOS et al., 2014; AMARANTE et al., 2014; BRASIL et al., 2012).

In vitro tests, also called phenotypic tests, were developed to determine the efficacy of substances on parasites, according to the mode of action of the drug or substance, and also to identify new active ingredients (CHAGAS et al., 2011). The methodologies involve the assessment of the inhibition of hatchability, motility, development and larval feeding for nematodes of cattle, sheep, goats and horses (TAYLOR et al., 2002; COLES et al., 2006; ÁLVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2005). *In vitro* evaluations are also used to confirm or collaborate with field tests (VÁDARY et al., 2007). In Brazil, *in vitro* assays focus primarily on the evaluation of plants with anthelmintic potential. The search for natural substances with antiparasitic effects is justified by the widespread ineffectiveness of anthelmintic drugs in small ruminants in recent years, and numerous plants and their extracts have been tested in the country. In a review of the subject in Brazil, Nery et al. (2009) compiled *in vitro* data of studies on 64 plant species, 27 of which showed higher than 90% efficacy, and 15 showed more than 95% efficacy in inhibiting the development of trichostrongylids, indicating the potential for research in this area, given the country's vast array of flora.

In vivo trials assess the reduction of the parasite load in the host, by means of necropsy or by anthelmintic post-treatment parasitological examinations. The controlled reduced parasitic load test, which is performed after the autopsy of the animal, evaluates the real situation of parasite elimination in the host (WOOD et al., 1995). However, it requires killing the animals and its cost is high, so it is not widely used (FORTES & MOLENTO,

2013). The standard method is the fecal egg count reduction test (FECRT) and is the method most widely employed to evaluate the effectiveness of drugs in animals in the field (COLES et al., 2006; TAYLOR et al., 2002). This method enables several drugs to be evaluated simultaneously and consists in examining groups of animals treated with anthelmintics to determine eggs per gram of feces (EPG) before and after treatment; a drug that reduces 95% of the parasite load is considered effective (COLES et al., 2006). The FECRT can be performed by means of an overall count of strongyle eggs (Strongylida) or individual counts of parasitic genera through fecal culture (MCKENNA, 1997). Albeit very common, there are several limitations inherent to the interactions between host, parasite and the environment (LEVECKE et al., 2012), and there are variations in the calculation formula (MILLER et al., 2006), in the need for control groups (MCKENNA, 2013, 2014), and in use of arithmetic (COLES et al., 1992, 2006) or geometric means (SMOTHERS et al., 1999; DOBSON et al., 2009) in the calculation. According to Falzon et al. (2014), the various methods to calculate FECRT are influenced by the level of AHR and if a bias correction is used in the formula, so it is important to analyze each case. In Brazil, the FECRT is the test most widely used for the assessment of AHR in small ruminants, and is discussed in numerous publications in various regions of the country (Table 1).

Distribution of AHR Surveys in Brazil

Surveys on anthelmintic resistance in small ruminants around the world are distributed in countries where the species are of the greatest economic importance, such as Australia, New Zealand, South Africa, Uruguay and Brazil. Even with the production chain of small ruminants under development, Brazil stands out for the number of surveys on the subject (TORRES-ACOSTA et al., 2012), and it is a major producer of multidisciplinary scientific material on sheep and goats (RESENDE et al., 2010). In Brazil, surveys on anthelmintic resistance in small ruminants, evaluated by FECRT, are distributed in the regions that have the largest sheep and goat flocks, i.e., the South and Northeast, or where there are large economic centers of activity, as in the case of the Southeast region (Figure 1). The next sections describe the surveys that have been conducted in these areas, and the papers published in the country, which are listed in Table 1.

Northeast region

The production systems in the Northeast are characterized by family subsistence farming, and include the production of meat and milk, mostly for national school lunch programs and to combat child malnutrition among the poor (CARDOSO et al., 2010). Despite the semi-arid climate of the region, the brief rainy season is characterized by parasitic infections due to extensive systems and precarious sanitary management (PINHEIRO et al., 2000). In this region, due to the size of the herds, there are important research centers in small ruminants that significantly contribute to the national survey. Therefore, there are numerous publications about AHR in small ruminants, especially in goats, and the

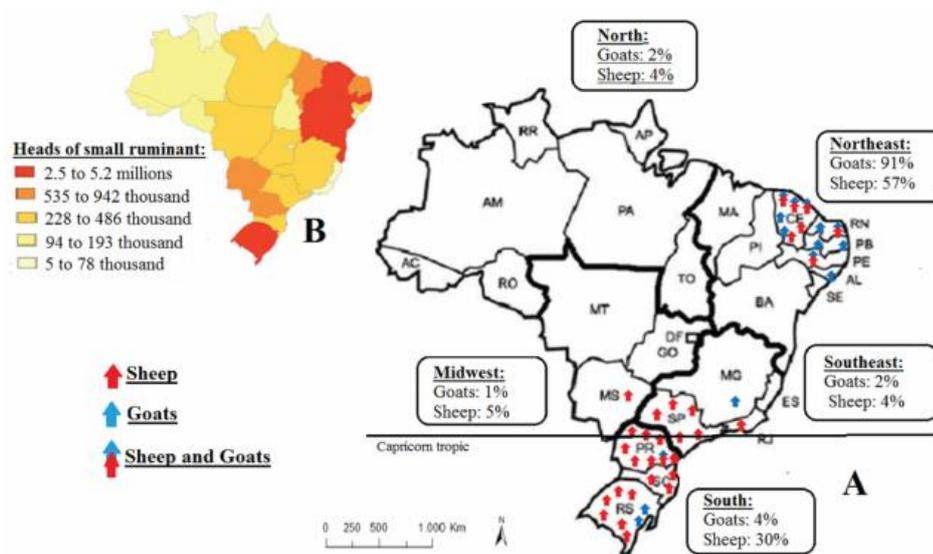


Figure 1. Distribution of surveys on anthelmintic resistance and correlation with the herd of small ruminants in Brazil. (A) The arrows indicate surveys on anthelmintic resistance determined by the fecal egg count reduction test in small ruminants in Brazil, and percent of goat and sheep herds* by region. (B) Small ruminant herds in Brazil, by state, in 2013. Source: Prepared by Center for Advanced Studies on Applied Economics – CEPEA (2014) based on data published by IBGE (2013). * Total Brazilian goat: (8,779,213 heads) and sheep herds: (17,290,519 heads), IBGE (2013).

percentage of the flock follows the same percentage as that found in publications in Brazil for the species (about 90%).

The state of Ceará (CE) stands out for the number of publications on AHR, a fact favored by the presence of researchers in this field and the EMBRAPA Goats and Sheep division in this state. Vieira et al. (1989) evaluated the effectiveness of four benzimidazoles in goats after collecting fecal samples at different times, and noted resistance mainly in *H. contortus*. In another experiment, Vieira et al. (1992) demonstrated the loss of effectiveness of ivermectin and of a pre-benzimidazole (netobimin) in sheep brought from the south, raising the question of exchanges of parasitic populations among regions. In the late 90s, Vieira & Cavalcante (1999) corroborated the findings published in 1989, including results of resistance to levamisole and oxfendazole in 34 goat herds in CE. Melo et al. (1998) detected resistance to ivermectin and closantel in goats and to oxfendazole and closantel in sheep. Resistance to oxfendazole (MELO et al., 2003, 2004), ivermectin and levamisole (MELO et al., 2004) was found in the region of Jaguaribe in sheep and goats. Completing this survey, resistance to oxfendazole was found in a survey of 25 herds in the state (MELO et al., 2009).

The state of Rio Grande do Norte (RN) stands out for its production of goat's milk, and was a pioneer in the introduction of government production incentive programs. Effectiveness trials in the state were performed primarily by Pereira et al. (2008), who tested the effectiveness of ivermectin and albendazole in sheep and

goats 7, 14 and 21 days post-treatment, and found resistance to two antiparasitics in both species in all the evaluations. In that study, the prevalence of resistant nematodes involved *Haemonchus* in sheep and goats, followed by *Strongyloides*, *Trichostrongylus* and *Oesophagostomum*. These two drugs were also tested by Coelho et al. (2010) on thirty goat farms in the municipality of Mossoró, state of Rio Grande do Norte (RN). These authors detected resistance to albendazole in *H. contortus* in goats on 90% of the farms and to ivermectin on 36.6% of the farms, and resistance to albendazole in *Trichostrongylus* at 42.8% of the farms, and to ivermectin on 33.3% of the farms.

In the Northeast, moxidectin was tested primarily in goats in the states of Alagoas (AL) (AHID et al., 2007) and Paraíba (PB) (RODRIGUES et al., 2007), and later in sheep and goats in Pernambuco (PE) (LIMA et al., 2010b). This antiparasitic presented the highest effectiveness among all the drugs cited so far in the region, although resistance was detected on some farms. Levamisole also presented effectiveness on goat farms in the Sertão region of PB (RODRIGUES et al., 2007) and in Cariri (LIMA et al., 2010a). After many years of ineffectiveness, Lima et al. (2010b) reported the effectiveness of ivermectin in sheep in PE, in the municipality of Vitória de Santo Antão, but this is the only report of effectiveness of this anthelmintic in sheep in Brazil in the last decade. Despite the large herds in the states of Bahia and Piauí, there are no articles about AHR.

Southern region

The southern region has the second largest herd of small ruminants in the country, corresponding to 30% of sheep and 4% of goats (IBGE, 2013). There is a strong presence of wool sheep breeds that are better adapted to the low temperatures prevailing in the region, where the activity focuses on wool and meat production. In subtropical climates, pasture production systems can be used all year round, with tropical and temperate forage species (OLIVEIRA et al., 2005); however, from the standpoint of parasites, this increases the risk of infection due to the longer grazing time of the animals. The wool sheep breeds originating from other countries are also more susceptible to endoparasites than the native breed Santa Inês, which predominates in the Northeast. Thus, numerous researches into anthelmintic resistance have been conducted in the region, involving large numbers of drugs and animals, with emphasis on sheep.

Rio Grande do Sul (RS) is the state with the largest sheep herd in the country, with about 4,250,932 heads, i.e., nearly double that of Bahia, which ranks second (IBGE, 2013). The state was the first in Brazil to report AHR in small ruminants, involving albendazole (SANTOS & GONÇALVES, 1967) and ivermectin (ECHEVARRIA & TRINDADE, 1989), both in sheep. The latter drug also showed effectiveness on sheep farms in the 90s, according to Echevarria et al. (1996) and Farias et al. (1997).

Even in combination, AHR in sheep occurred for albendazole and levamisole (ECHEVARRIA et al., 1996) and for ivermectin, levamisole, and albendazole (CEZAR et al., 2010). In the latter study, *H. contortus* was found to be resistant to nitroxylin, disophenol and closantel, which are drugs whose spectrum is specific for this nematode (COLES et al., 2006). The state also pioneered monepantel testing in a research conducted in South American countries by Bustamante et al. (2009), confirming the effectiveness of this new drug in sheep. Mattos et al. (2000) tested the effectiveness of two doses of levamisole and closantel in goats, and found resistance particularly to the latter drug. Subsequently, Mattos et al. (2004) tested ivermectin in this species and reported only 42% of effectiveness.

In the state of Paraná (PR), which has the seventh largest sheep herd in Brazil (IBGE, 2013), the production sector is organized in the form of cooperatives, which emphasize the mutton agribusiness in the state (SCHWAB, 2010). Geographically close to the Central-West and Southeast, PR has a varied climate, with well distributed rainfall throughout the year and hot summers, which favors gastrointestinal nematodiasis. The problem of resistance is so severe in this state that Thomaz-Soccol et al. (1996) tested several drugs (albendazole, closantel, levamisole, febendazole, ivermectin, tetramisole, and disophenol plus tetramisole) in six municipalities, and found that sheep were resistant to all these drugs, although levamisole showed better performance, since it was ineffective only in the municipality of Campo Largo. The aforementioned work represented a pioneering study in Brazil, from the standpoint of anthelmintic combinations and in closantel testing. The latter drug also showed ineffectiveness even when combined to oxfendazole (THOMAZ-SOCCOL et al., 2004), and in this work the highest effectiveness was obtained for moxidectin, a result similar to that found in Londrina by Cunha et al. (1998). Recently, the resistance

to Monepantel has been reported in sheep in the municipality of Fazenda Rio Grande (CINTRA et al., 2016).

The state of Santa Catarina (SC), which has the country's 11th largest sheep flock, is characterized by sheep and goat family farms, although they are organized and invest in technology and genetics, causing the state to stand out in the production of animal derivatives (DIÁRIO CATARINENSE, 2012). AHR problems were reported in a broad study by Ramos et al. (2002), who evaluated the activity of ivermectin (0.2 mg/kg), levamisole, closantel and albendazole in 65 sheep flocks in an area of extensive sheep production in the state (Planalto Sul, Planalto Norte, Meio Oeste and Alto Vale do Itajaí). Their study involved the largest number of herds and animals, assessing 7529 sheep, 77% of which were resistant to ivermectin, 65% to albendazole, 13% to closantel and 15% to levamisole. The genus *Haemonchus* sp. was resistant to the first three drugs, and *Trichostrongylus* sp. to levamisole. Rosalinski-Moraes et al. (2007) evaluated the situation of AHR on nine sheep farms in the western region of Santa Catarina (SC), and reported resistance to ivermectin, levamisole, moxidectin and albendazole at doses of 5 and 10 mg/kg. Oliveira et al. (2014) tested several drugs in sheep in the municipality of Concordia, and reported that only disophenol was effective.

Southeastern region

The Southeastern region, which has 4% of the country's sheep flock and 2% of its goat herd (IBGE, 2013), is an important center of meat and milk production technology, and stands out for its consumption and sale of these products (SEBRAE, 2005). The sheep flocks are directed at products with high added value, and currently stand out in the production of special lamb cuts. Although the region's goat herd is small (207,049 heads), it is a national leader in the industrial production of goat's milk, which is sold mostly in the states of São Paulo, Minas Gerais and Rio de Janeiro. The Southeast has a highly diverse climate, with rainy summers, which favors the development of the gastrointestinal nematode life cycle. Despite its large goat milk production, all the surveys of AHR in the region have involved sheep, which is explained by the fact that goats are raised mostly in confined production systems, thus limiting parasitic infections.

São Paulo (SP) is the state with the largest sheep flock in the region: 415,327 heads (IBGE, 2013), with a well organized and advanced sheep industry, particularly owing to the complexity of its development, and its important industrial park. This state also has the largest number of publications about AHR in sheep in the region. In the 90s, Amarante et al. (1992) evaluated the performance of oxfendazole, levamisole and ivermectin at nine sheep farms in the municipality of São Manuel and found resistance to these drugs at all of them. Buzzulini et al. (2007) raised the possibility of using associations of anthelmintics, upon ascertaining the effectiveness of the combination of levamisole, ivermectin and albendazole in sheep in the municipality of Jaboticabal. Almeida et al. (2010), who experimentally infected sheep with 4000 larvae of *H. contortus* and *T. colubriformis*, found multiple resistance, and published the first report of resistance of *Trichostrongylus* to macrocyclic lactones after experimental infection in Brazil. Veríssimo et al. (2012) evaluated 30 sheep farms in the state with respect to five drugs,

based on a questionnaire for producers, which revealed multiple resistance resulting from failures in antiparasitic management. Chagas et al. (2013) infected sheep experimentally with a strain of *H. contortus* from EMBRAPA-Southeast and found multiple resistance, except to trichloform; in their study, the authors raised the question of the cost of maintaining the production of nematode strains in sheep.

Rio de Janeiro (RJ) and Minas Gerais (MG) together have the largest dairy goat industry, and RJ is the country's largest producer of this product in industrialized form, as well as an important pole of lamb and mutton consumption. In MG, Silva et al. (2008) evaluated in dairy goats in the municipality of Viçosa with respect to the effectiveness of the combination of closantel, albendazole and ivermectin, and this combination associated with levamisole, vitamin B1, selenium, and cobalt, and found these combinations highly effective, particularly in the second one. In RJ, two publications about AHR in sheep complement each other. Cruz et al. (2010) found multiple AHR in 10 herds in the North and Northwest regions of RJ, with cases of resistance to the eight tested drugs (Nitroxynil, Doramectin, Levamisole, Ivermectin, Albendazole, Closantel, Moxidectin and Fenbendazole) and failures in antiparasitic management ascertained by questionnaire.

Central-Western and Northern regions

These two regions encompass the largest agricultural area in the country, containing more than half of the national herd of 209.5 million heads of cattle, according to the Brazilian Institute of Geography and Statistics – IBGE (2013). Among small ruminants, the herds are very small when compared to the vast productive potential, with sheep corresponding to 5% and goats to 1% of the overall national production in the Central-west and to 4% and 2% in the North. Even so, they each exceed the Southeast in herd size, albeit with few studies on AHR in small ruminants. The state of Mato Grosso do Sul (MS) has one article published in the area, and shows a great potential for growth in the sheep industry, especially as it is located close to the large consumer market in the state of São Paulo. In this state, Sczesny-Moraes et al. (2010) evaluated the effectiveness of albendazole, ivermectin, levamisole, trichloform, moxidectin, closantel, and a combination of the first three drugs. On 16 sheep farms. The authors concluded that multiple resistance to anthelmintics is already established in most sheep herds in MS, and that the species *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* are the most prevalent and resistant to antiparasitics.

Developments in Research and the Effectiveness of Anthelmintics in Small Ruminants in Brazil

Table 1 compiles the data on AHR, assessed by FECRT, in sheep and goats in Brazil. AHR has been evaluated in Brazil for almost 50 years, and the most widely used methodology has been FECRT. However, in recent years, attention has focused on other forms of diagnosis, particularly molecular biology. Sheep is the

more commonly studied species because the country's sheep herd is almost twice as large as its goat herd (IBGE, 2013). The drugs most commonly evaluated in sheep and goats consist of various formulations of benzimidazoles (the first anthelmintics to be studied), levamisole, ivermectin, moxidectin, closantel, and associations of these drugs. A broader range of drugs have been studied for sheep, including, besides the aforementioned ones, disophenol, nitroxynil, trichloform, doramectin and monepantel. These anthelmintics have been used more recently (monepantel and doramectin) or have a low safety margin (disophenol, nitroxynil and trichloform), which limits their study, and they have actually been tested only for cases in which tests with conventional antiparasitics have proved ineffective.

Table 2 presents a compilation of surveys on AHR in small ruminants in Brazil over time (1967-2016), listing the drugs that have shown a higher effectiveness ratio than the other studied drugs. Note that, starting in 2007, the number of surveys on AHR in small ruminants increased in Brazil, and the largest number of reports, involving mainly sheep, were published in 2010. In those days, Brazil stood out on the subject in review articles on AHR in America (TORRES-ACOSTA et al., 2012) and in Latin America (MOLENTO et al., 2011). The largest number of reports about effectiveness tests of anthelmintic associations in small ruminants in Brazil were published between 2007 and 2014 (Table 2). At the time, given the severe problem of AHR

around the world, there was a strong discussion about alternative control measures other than the sole use of allopathy (HOSTE & TORRES-ACOSTA, 2011) or selective forms of treatment (VAN WYK et al., 2006; MOLENTO et al., 2009; KENYON et al., 2009; MEDEROS et al., 2014b; LEATHWICK & BESIER, 2014). During the same period, two new formulations were released on the market: monepantel (Zolvix®) and derquantel (Startect®), in response to the global concern about AHR in small ruminants.

The anthelmintics ivermectin, moxidectin, albendazole, levamisole and closantel presented effectiveness in at least one survey involving sheep and goats. Trichloform, nitroxynil, disophenol and monepantel were only effective in sheep, although they have only been studied for this species. The organophosphate trichloform has shown high effectiveness in studies on AHR in Brazil, where it is marketed (Table 2), probably because it is rarely used due to its high toxicity (ALMEIDA et al., 2010), and it has not been approved for use in ruminants in many countries (COLES et al., 2006). Nitroxynil and disophenol, as well as closantel, are drugs with a specific spectrum for *H. contortus* (COLES et al., 2006), and are potentially effective only on farms where there is a high prevalence of this parasite. Of these three drugs, closantel has been used for the longest time and there are more reports about AHR, including *H. contortus* (CEZAR et al., 2010). Monepantel, which was released recently, has been its effectiveness reported primarily by Bustamante et al. (2009), in their studies of sheep in Latin American countries. In Brazil, although it was launched in 2012, the first case of resistance to Monepantel has been reported against *T. colubriformis* and *Oesophagostomum colombianum* (CINTRA et al., 2016).

Benzimidazoles (particularly albendazole) are the oldest class of drugs and have been the most widely studied anthelmintics from the 60s (SANTOS & GONÇALVES, 1967) until now

Table 2. Anthelmintics that presented the highest rates of effectiveness, by the Fecal Egg Count Reduction Test, in studies conducted in Brazil over the years (1967 to 2016).

Species	Anthelmintic	Year																		
		67	89	92	96	97	98	99	00	02	03	04	07	08	09	10	12	13	14	16
Sheep	I		*	X	X	X										X				
	M						X				X					XXX				
	A													X						
	O										*				*					
	L			X	X						X		X			X	X	X		
	C						X			X										
	Tr			X											X	X		X		
	Di	X																		X
	N																			X
	Mo															X				
Assoc.													X	X		XX				
Goats	I									X	*					X				
	M											XX				X				
	A		X											X						
	O		X					X							*					
	L								X				X			X		*		
Assoc.															X					

A: albendazole; O: oxfendazole; L: levamisole; I: ivermectin; M: moxidectin; C: closantel; Tr: trichlorform; N: nitroxylin; Di: disophenol; Mo: monopantel; Assoc. = associations of drugs. For this analysis, the anthelmintics that showed higher effectiveness rates than the other drugs under study were considered, albeit not necessarily effective (>95%). (Effectiveness Rate): the drug that presented the best percentage of anthelmintic effectiveness, not necessarily reaching 95% of effectiveness. Some studies reported more than one anthelmintic with the best effectiveness rate. X = most effective anthelmintic. * = Surveys conducted with a single anthelmintic, precluding a comparison of effectiveness. Remark: Goats require different doses of anthelmintics to sheep and in general this is not taken into account when considering the status of susceptibility or resistance.

(OLIVEIRA et al., 2014). Albendazole presented higher effectiveness in goats (VIEIRA et al., 1989) only when compared to the other benzimidazoles or when compared to ivermectin, in a test carried out on sheep and goats by Pereira et al. (2008); even so, its effectiveness rate in this review did not exceed 70%. Oxfendazole likewise showed effectiveness only in goats when compared to the other benzimidazoles (VIEIRA et al., 1989), or was found to be more effective than levamisole on one farm, in a study by Vieira & Cavalcante (1999). In sheep, oxfendazole was studied separately by Melo et al. (2004, 2009), showing low effectiveness rates over the years in CE. Generally speaking, the effectiveness of benzimidazoles in small ruminants has gradually declined in Brazil in recent years, which can be explained by the fact that they have been in use for many years and are widely used because of their broad spectrum and low cost. Findings about the low effectiveness of benzimidazoles have been routinely reported in Brazil and around the world since the 60s, when the first report was published.

Among the macrocyclic lactones, the most widely studied is ivermectin, the antiparasitic with endectocide activity most commonly used in Brazil, which is present in more than 65 types of formulations, showing great variability in quality and price and little restriction in sales (MOLENTO, 2004). As a result of its overuse, its effectiveness has declined over time, especially in sheep, for which reports of its effectiveness date back to the 90s, and the most recent reports of its effectiveness pertained only to the Northeast. Melo et al. (2003) found that ivermectin was effective

at seven out of 17 sheep farms in Ceará. In their study, levamisole showed superior performance, and was found to be effective on 10 farms. Nevertheless, theirs is the most comprehensive report about the effectiveness of ivermectin in sheep in the country after the 1990s. After this period, Lima et al. (2010b) reported the effectiveness of ivermectin on only one sheep farm located in Vitória do Santo Antão in the state of PE. The highest effectiveness rates of ivermectin in goats in recent years were also found in the Northeast, in the states of CE and RN, respectively, by Melo et al. (2003) and Coelho et al. (2010). Brazil's southern region, which pioneered reports on AHR to ivermectin (ECHEVARRIA & TRINDADE, 1989), showed the highest effectiveness rate of the drug until the late 1990s (AMARANTE et al., 1992; ECHEVARRIA et al., 1996; FARIAS et al., 1997). Since that period, the low effectiveness of ivermectin in small ruminants has been reported frequently (RAMOS et al., 2002; MATTOS et al., 2004; THOMAZ-SOCCOL et al., 2004; CEZAR et al., 2010; CUNHA et al., 2008; VILA NOVA et al., 2014), and the same applies to the southeast region (CRUZ et al., 2010; ALMEIDA et al., 2010; VERÍSSIMO et al., 2012; CHAGAS et al., 2013).

The macrocyclic lactone that has presented the best effectiveness rates in small ruminants in Brazil is moxidectin. As can be seen in Table 2, this anthelmintic showed the highest effectiveness rate (stand-alone) in five studies involving sheep (CUNHA et al., 1998; THOMAZ-SOCCOL et al., 2004; CEZAR et al., 2010; LIMA et al., 2010b; SCZESNY-MORAES et al., 2010) and in three studies involving goats (AHID et al., 2007; RODRIGUES et al.,

2007; LIMA et al., 2010b). Although its mechanism of action is similar to that of ivermectin, several authors around the world have observed the greater effectiveness of moxidectin in strains resistant to ivermectin (BARNES et al., 2001; VICKERS et al., 2001; LLOBERAS et al., 2013). Prichard et al. (2012) ascribed the difference in the effectiveness of these two antiparasitics to different interactions in glutamate-gated ion channels where they act, and to different levels of expression of ABC proteins. However, these proteins can cause cross-resistance between the two anthelmintics, owing to an overexpression of P-glycoprotein in response to the ordinary use of ivermectin, which may interfere in the effectiveness of moxidectin (LLOBERAS et al., 2013). This may explain the low effectiveness of moxidectin found in recent studies in Brazil (BUZZULINI et al., 2007; ROSALINSKI-MORAES et al., 2007; VERÍSSIMO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014), where ivermectin is widely used. In Table 2, note that the effectiveness rate of moxidectin has declined over the last five years, suggesting it was overused in the preceding period, which has resulted in its current ineffectiveness at many small ruminant farms.

Levamisole, albeit a long-standing drug with reports of resistance around the world and in Brazil dating back to the 70s (LE JAMBRE et al., 1976; SANTIAGO et al., 1977), is reportedly the anthelmintic that has shown the highest effectiveness over the years in Brazil, including in recent surveys. In Brazil, its reported effectiveness rate was higher than that of other drugs tested in eight studies involving sheep (AMARANTE et al., 1992; THOMAZ-SOCCOL et al., 1996; MELO et al., 2003; ROSALINSKI-MORAES et al., 2007; CRUZ et al., 2010;

VERÍSSIMO et al., 2012; SPRENGER et al., 2013) and in three studies involving goats (MATTOS et al., 2000; RODRIGUES et al., 2007; LIMA et al., 2010a). Levamisole has also been reported to be more effective than other antiparasitics in Canada (FALZON et al., 2013), Denmark (PENA-ESPINOZA et al., 2014) and Australia (LYNDAL-MURPHY et al., 2014). It is worth noting that levamisole showed a higher effectiveness rate than other anthelmintics, but that it has not been entirely effective (95%) in most studies, and that resistance to this drug has been reported. Nevertheless, its effectiveness has persisted for longer than that of other antiparasitics in Brazil. Levamisole targets cholinergic receptors, acting as an agonist and inducing spastic paralysis of the nematode (LANUSSE, 1996). Studies involving molecular tests of AHR to levamisole are still quite recent. Martin et al. (2012) discussed the receptors involved in levamisole targets in different nematodes, arguing that cholinergic receptor subtypes vary widely in their range and plasticity. They also stated that resistance associated with the loss of expression or conductance of these receptors in the nematode membranes varies considerably from one parasite species to another and between antiparasitic drugs with similar mechanisms of action. Given such complexity, studies of the mechanisms of resistance to levamisole associated with its history of use are important tools in understanding the maintenance and loss of effectiveness of this anthelmintic.

Conclusions

The large number of studies on AHR in Brazil reflects the concern of the country, which has production potential and seeks to organize the sheep and goat production chain. The vast worldwide literature on AHR in small ruminants contributes to guidelines for controlling the situation. However, this requires an analysis of these studies with factors specific to each case, in order to establish a correlation between the diagnosis and the size of herds, management practices, animal species, parasite species, drugs that are used, and climate. The frequency of use and the maintenance of the effectiveness of anthelmintics over the years are important factors in understanding resistance mechanisms, but are only scantily reported in current studies. It is essential to calculate effectiveness by genus or species of nematode for studies involving combinations of drugs or new antiparasitics. Despite its many limitations, the FECRT is still the most widely used and most feasible test in the country, but should be standardized considering the differences between farms. Considering the high vulnerability of anthelmintics and the scanty prospects for the release of new ones, management practices should not only be evaluated in the diagnosis of AHR but should also be part of parasite control systems. *In vitro* and molecular effectiveness tests are very promising for the rapid and accurate diagnosis of AHR, but they should be performed with knowledge about the reality in the field to render them feasible for the producer. Molecular studies could be underpinned by analyses of data from field studies, for example, about the maintenance over time of the effectiveness of some antiparasitics such as levamisole in *in vivo* tests, which suggests that specific studies may contribute to prolong the effectiveness of anthelmintics.

Acknowledgements

The authors would like to thank reviewers for proof reading the manuscript.

References

- Ahid SMM, Cavalcante MDA, Bezerra ACD, Soares HS, Pereira RHM. Eficácia anti-helmíntica em rebanho caprino no Estado de Alagoas, Brasil. *Acta Vet Brasílica* 2007; 1(2): 56-59.
- Almeida FA, Garcia KCOD, Torgerson PR, Amarante AFT. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. *Parasitol Int* 2010; 59(4): 622-625. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2010.09.006>. PMID:20887800.
- Álvarez-Sánchez MA, Pérez García J, Bartley D, Jackson F, Rojo-Vázquez FA. The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. *Exp Parasitol* 2005; 110(1): 56-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2005.02.002>. PMID:15804379.
- Amarante AFT, Barbosa MA, Oliveira MAG, Carmello MJ, Padovanni CR. Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e Levamisol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. *Braz J Vet Res Anim Sci* 1992; 29(1): 31-38.

- Amarante MRV, Bassetto CC, Neves JH, Amarante AFT. Species-specific PCR for the identification of *Cooperia curticei* (Nematoda: Trichostrongylidae) in sheep. *J Helminthol* 2014; 88(4): 447-452. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022149X13000412>. PMID:23721998.
- Anastasio A, Veneziano V, Capurro E, Rinaldi L, Cortesi M, Rubino R, et al. Fate of Eprinomectin in goat milk and cheeses with different ripening times following pour-on administration. *J Food Prot* 2005; 68(5): 1097-1101. PMID:15895750.
- Barnes EH, Dobson RJ, Stein PA, Le Jambre LF, Lenane IJ. Selection of different genotype larvae and adult worms for anthelmintic resistance by persistent and short-acting avermectin/milbemycins. *Int J Parasitol* 2001; 31(7): 720-727. [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00174-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00174-6). PMID:11336754.
- Blouin MS, Yowell CA, Courtney CH, Dame JB. Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. *Genetics* 1995; 141(3): 1007-1014. PMID:8582607.
- Bonino J, Medeiros A. Resistencia antihelmíntica en ovinos. *Rev Plan Agropec* 2003; 42-44.
- Brasil BSAF, Nunes RL, Bastianetto E, Drummond MG, Carvalho DC, Leite RC, et al. Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. *Int J Parasitol* 2012; 42(5): 469-479. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.03.003>. PMID:22787588.
- Bustamante M, Steffan PE, Morlán JB, Echevarría F, Fiel CA, Cardozo H, et al. The efficacy of monepantel, an amino-acetonitrile derivative, against gastrointestinal nematodes of sheep in three countries of southern Latin America. *Parasitol Res* 2009; 106(1): 139-144. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-009-1638-z>. PMID:19789895.
- Buzzulini C, Silva AGS So, Costa AJ, Santos TR, Borges FA, Soares VE. Eficácia anti-helmíntica comparativa da associação albendazole, levamisole e ivermectina à moxidectina em ovinos. *Pesquisa Agropecu Bras* 2007; 42(6): 891-895. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2007000600017>.
- Cardoso MCC, Dantas ANA, Felix CBN. Sistema de produção e comercialização do leite de cabra produzido no Município de Currais Novos/RN. *Holos* 2010; 1: 31-40. <http://dx.doi.org/10.15628/holos.2010.214>.
- Carmichael I, Visser R, Schneider D, Soll M. *Haemonchus contortus* resistant to ivermectin. *J S Afr Vet Assoc* 1987; 58(2): 93. PMID:3681886.
- CEPEA. *Evolução da Caprino e Ovinocultura* [online]. Brasília: 2014 [cited 2015 Mar 09]. Available from: http://www.canaldoprodutor.com.br/sites/default/files/ativos_ovcapr_01_0.pdf.
- Cezar AS, Toscan G, Camillo G, Sangioni LA, Ribas HO, Vogel FSE. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. *Vet Parasitol* 2010; 173(1-2): 157-160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.013>. PMID:20619543.
- Chabala JC, Mrozik H, Tolman RL, Eskola P, Lusi A, Peterson LH, et al. Ivermectin, a new broad-spectrum antiparasitic agent. *J Med Chem* 1980; 23(10): 1134-1136. <http://dx.doi.org/10.1021/jm00184a014>. PMID:6893469.
- Chagas ACS, Katiki LM, Silva IC, Gigliotti R, Esteves SN, Oliveira MCS, et al. *Haemonchus contortus*: A multiple-resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. *Parasitol Int* 2013; 62(1): 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2012.07.001>. PMID:22809891.
- Chagas ACS, Niciura SCM, Molento MB. *Manual Prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; 2011. 153 p.
- Charles TP, Pompeu J, Miranda DB. Efficacy of three broad-spectrum anthelmintics against gastrointestinal nematode infections of goats. *Vet Parasitol* 1989; 34(1-2): 71-75. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017\(89\)90166-0](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(89)90166-0). PMID:2588471.
- Charlier J, Morgan ER, Rinaldi L, van Dijk J, Demeler J, Höglund J, et al. Practices to optimise gastrointestinal nematode control on sheep, goat and cattle farms in Europe using targeted (selective) treatments. *Vet Rec* 2014; 175(10): 250-255. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.102512>. PMID:25217603.
- Cintra MCR, Teixeira VN, Nascimento LV, Sotomaior CS. Lack of efficacy of monepantel against *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. *Vet Parasitol* 2016; 216: 4-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.11.013>. PMID:26801587.
- Coelho WAC, Ahid SMM, Vieira LS, Fonseca ZAAS, Silva IP. Resistência anti-helmíntica em caprinos no município de Mossoró, RN. *Cienc Anim Bras* 2010; 11(3): 589-599.
- Coles GC, Bauer C, Borgsteede FH, Geerts S, Klei TR, Taylor MA, 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. *Vet Parasitol* 1992; 44(1-2): 35-44.
- Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, et al. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 2006; 136(3-4): 167-185. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.11.019>. PMID:16427201.
- Coles GC, Roush RT. Slowing the spread of anthelmintic resistant nematodes of sheep and goats in the United Kingdom. *Vet Rec* 1992; 130(23): 505-510. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.130.23.505>. PMID:1641966.
- Coles GC, Roush RT, von Samson-Himmelstjerna G, Prichard RK, Taylor MA, et al. *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin. *Vet Rec* 1993; 132(26): 651-652. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.132.26.651>. PMID:8362470.
- Cooper KM, Whelan M, Danaher M, Kennedy DG. Stability during cooking of anthelmintic veterinary drug residues in beef. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2011; 28(2): 155-165. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2010.542775>. PMID:21240825.
- Craig TM, Hatfield TA, Pankavich JA, Wang GT. Efficacy of moxidectin against an ivermectin-resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet Parasitol* 1992; 41(3-4): 329-333. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90090-V](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(92)90090-V). PMID:1502793.
- Cruz DG, Rocha LO, Arruda SS, Palieriaqui JGB, Cordeiro RC, Santos E Jr, et al. Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol* 2010; 170(3-4): 340-343. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.030>. PMID:20356679.
- Cunha LFC Fo, Pereira ABL, Yamamura MH. Resistência a anti-helmínticos em ovinos da região de Londrina-Paraná-Brasil. *Semin Cienc Agrar* 1998; 19(1): 31-37. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.1998v19n1p31>.
- Cunha LFC Fo, Toledo GS, Grecco FCAR, Guerra JL. Efficacy of the Association of Closantel Albendazol and Ivermectin 3,5 in the Control of Ovine Elmintosis in Northern Paraná State. *UNOPAR Cienc. Ciênc Biol Saúde* 2008; 10(2): 23-28.
- Demeler J, Kuttler 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. *Vet Parasitol* 2010; 170(1-2): 61-70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.032>. PMID:20189310.
- Diário Catarinense. *Ovelhas ganham espaço em SC com preços diferenciados* [online]. 2012 [cited 2015 Mar 09]. Available from: <http://diariocatarinense.com.br>.

- clircbs.com.br/sc/economia/noticia/2012/09/ovelhas-ganham-espaco-em-sc-com-precos-diferenciados-3872004.html
- Dobson RJ, Sangster NC, Besier RB, Woodgate RG. Geometric means provide a biased efficacy result when conducting a faecal egg count reduction test (FECRT). *Vet Parasitol* 2009; 161(1-2): 162-167. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.12.007>. PMID:19135802.
- Drudge JH, Szanto J, Wyant ZN, Elam G. Field studies on parasite control in sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. *Am J Vet Res* 1964; 25: 1512-1518. PMID:14204835.
- Echevarria FAM, Borba MFS, Pinheiro AC, Waller PJ, Hansen JW. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. *Vet Parasitol* 1996; 62(3-4): 199-206. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017\(95\)00906-X](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(95)00906-X). PMID:8686165.
- Echevarria FAM, Trindade GNP. Anthelmintic resistance by *Haemonchus contortus* to ivermectin in Brazil: A preliminary report. *Vet Rec* 1989; 124(6): 147-148. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.124.6.147>. PMID:2929090.
- Eddi C, Caracostantogolo J, Peña M, Schapiro J, Marangunic L, Waller PJ, et al. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Argentina. *Vet Parasitol* 1996; 62(3-4): 189-197. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017\(95\)00905-1](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(95)00905-1). PMID:8686164.
- Falbo MF, Socol VT, Sandini IE, Neumann M, Ishiy T. Atividade anti-helmíntica do triclorfon e closantel em cordeiros naturalmente infectados por *Haemonchus* sp. *Ci Anim Bras* 2009; 10(3): 926-930.
- Falzon LC, Menzies PI, Shakya KP, Jones-Bitton A, Vanleeuwen J, Avula J, et al. Anthelmintic resistance in sheep flocks in Ontario, Canada. *Vet Parasitol* 2013; 193(1-3): 150-162. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.014>. PMID:23218224.
- Falzon LC, O'Neill TJ, Menzies PI, Peregrine AS, Jones-Bitton A, van Leeuwen J, et al. A systematic review and meta-analysis of factors associated with anthelmintic resistance in sheep. *Prev Vet Med* 2014; 117(2): 388-402. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.07.003>. PMID:25059197.
- Farias MT, Brodin EL, Forbes AB, Newcomb K. A survey on resistance to anthelmintics in sheep stud farms of southern Brazil. *Vet Parasitol* 1997; 72(2): 209-214. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)01111-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(97)01111-4). PMID:9404847.
- Fleming SA, Craig T, Kaplan RM, Miller JE, Navarre C, Rings M. Anthelmintic resistance of gastrointestinal parasites in small ruminants. *J Vet Intern Med* 2006; 20(2): 435-444. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-1676.2006.tb02881.x>. PMID:16594607.
- Fortes FS, Molento MB. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. *Pesqui Vet Bras* 2013; 33(12): 1391-1402. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2013001200001>.
- Geurden T, Hoste H, Jacquiet P, Traversa D, Sotiraki S, Regalbono AF, et al. Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy. *Vet Parasitol* 2014; 201(1-2): 59-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.016>. PMID:24560365.
- Green PE, Forsyth BA, Rowan KJ, Payne G. The isolation of a field strain of *Haemonchus contortus* in Queensland showing multiple anthelmintic resistance. 1981. *Aust Vet J* 1981; 57(2): 79-84. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-0813.1981.tb00451.x>. PMID:7259650.
- Grisi L, Leite CR, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PHD, et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Braz J Vet Parasitol* 2014; 23(2): 150-156. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014042>. PMID:25054492.
- Hoste H, Torres-Acosta JF. Non chemical control of helminths in ruminants: adapting solutions for changing worms in a changing world. *Vet Parasitol* 2011; 180(1-2): 144-154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.035>. PMID:21705144.
- Imperiale FA, Busetti MR, Suarez VH, Lanusse CE. Milk excretion of ivermectin and moxidectin in dairy sheep: assessment of drug residues during cheese elaboration and ripening period. *J Agric Food Chem* 2004; 52(20): 6205-6211. <http://dx.doi.org/10.1021/jf049117n>. PMID:15453688.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. *Produção da Pecuária Mundial*. Rio de Janeiro: IBGE; 2013. 108 p.
- Kaminsky R, Bapst B, Stein PA, Strehlau GA, Allan BA, Hosking BC, et al. Differences in efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against multi-resistant nematodes of sheep. *Parasitol Res* 2011; 109(1): 19-23. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-2216-0>. PMID:21161271.
- Kaminsky R, Ducray P, Jung M, Clover R, Rufener L, Bouvier J, et al. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature* 2008; 452(7184): 176-180. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06722>. PMID:18337814.
- Kassai T. *Veterinary Helminthology*. Oxford: Butterworth & Heineann; 1999. 260 p.
- Keane OM, Keegan JD, Good B, Waal T, Fanning J, Gottstein M, et al. High level of treatment failure with commonly used anthelmintics on Irish sheep farms. *Ir Vet J* 2014; 67(1): 16. <http://dx.doi.org/10.1186/2046-0481-67-16>. PMID:25140223.
- Kelly JD, Hall CA. Resistance of animal helminths to anthelmintics. *Adv Pharmacol Chemother* 1979; 16: 89-128. [http://dx.doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60243-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60243-4). PMID:382801.
- Kenyon F, Greer AW, Coles CG, Cringoli G, Papadopoulos E, Cabaret J, et al. The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Vet Parasitol* 2009; 164(1): 3-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.04.015>. PMID:19450930.
- Kettle PR, Vlassoff A, Reid TC, Horton CT. A survey of nematode control measures used by milking goat farmers and of anthelmintic resistance on their farms. *N Z Vet J* 1983; 31(8): 139-143. <http://dx.doi.org/10.1080/00480169.1983.34999>. PMID:16030989.
- Knox MR, Besier RB, Le Jambre LF, Kaplan RM, Torres-Acosta JFJ, Miller J, et al. Novel approaches for the control of helminth parasites of livestock VI: Summary of discussions and conclusions. *Vet Parasitol* 2012; 186(1-2): 143-149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.054>. PMID:22154257.
- Lanusse CE. Farmacologia dos compostos antihelmínticos. In: Padilha T. *Controle dos nematoides gastrintestinais em ruminantes*. Coronel Pacheco: EMBRAPA; 1996. p. 1-44.
- Le Jambre LF, Southcott WH, Dash KM. Resistance of selected lines of *Haemonchus contortus* to thiabendazole, morantel tartrate and levamisole. *Int J Parasitol* 1976; 6(3): 217-222. [http://dx.doi.org/10.1016/0020-7519\(76\)90037-0](http://dx.doi.org/10.1016/0020-7519(76)90037-0). PMID:1279076.
- Leathwick DM, Besier RB. The management of anthelmintic resistance in grazing ruminants in Australasia — Strategies and experiences. *Vet Parasitol* 2014; 204(1-2): 44-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.022>. PMID:24439840.
- Leland SE Jr, Drudge JH, Wyant ZN, Elam GW. Strain variation in the response of sheep nematodes to the action of phenothiazine. III. Field observations. *Am J Vet Res* 1957; 18(69): 851-860. PMID:13470241.

- Leveck B, Dobson RJ, Speybroeck N, Vercruyse J, Charlier J. Novel insights in the faecal egg count reduction test for monitoring drug efficacy against gastrointestinal nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 2012; 188(3-4): 391-396. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.020>. PMID:22521979.
- Lima MM, Farias MPO, Romeiro ET, Ferreira DRA, Alves LC, Faustino MAG. Eficácia da moxidectina, ivermectina e albendazole contra helmintos gastrintestinais em propriedades de criação caprina e ovina do estado de Pernambuco. *Cienc Anim Bras* 2010b; 11(1): 94-100.
- Lima WC, Athayde ACR, Medeiros GG, Lima DASD, Borburema JB, Santos EM, et al. Nematóides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. *Pesqui Vet Bras* 2010a; 30(12): 1003-1009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010001200001>.
- Little PR, Hodge A, Maeder SJ, Wirtherle NC, Nicholas DR, Cox GG, et al. Efficacy of a combined oral formulation of derquantel-abamectin against the adult and larval stages of nematodes in sheep, including anthelmintic-resistant strains. *Vet Parasitol* 2011; 181(2-4): 180-193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.008>. PMID:21684691.
- Little PR, Hodge A, Watson TG, Seed JA, Maeder SJ. Field efficacy and safety of an oral formulation of the novel combination anthelmintic, derquantel-abamectin, in sheep in New Zealand. *N Z Vet J* 2010; 58(3): 121-129. <http://dx.doi.org/10.1080/00480169.2010.67513>. PMID:20514085.
- Lloberas M, Alvarez L, Entrocasso C, Virkel G, Ballent M, Mate L, et al. Comparative tissue pharmacokinetics and efficacy of moxidectin, abamectin and ivermectin in lambs infected with resistant nematodes: Impact of drug treatments on parasite P-glycoprotein expression. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2013; 3(3): 20-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpdr.2012.11.001>. PMID:24533290.
- Lumaret JP, Errouissi F, Floate K, Römbke J, Wardhaugh K. A Review on the Toxicity and Non-Target Effects of Macrocyclic Lactones in Terrestrial and Aquatic Environments. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13(6): 1004-1060. <http://dx.doi.org/10.2174/138920112800399257>. PMID:22039795.
- Lutu WZ. Internal parasitism in milk goats in Kenya. *Trop Anim Health Prod* 1984; 16(3): 153-157. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02252782>. PMID:6485105.
- Lyndal-Murphy M, Swain AJ, Pepper PM. Methods to determine resistance to anthelmintics when continuing larval development occurs. *Vet Parasitol* 2014; 199(3-4): 191-200. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.11.002>. PMID:24314600.
- Maciel S, Giménez AM, Gaona C, Waller PJ, Hansen JW. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Paraguay. *Vet Parasitol* 1996; 62(3-4): 207-212. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017\(95\)00907-8](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(95)00907-8). PMID:8686166.
- Martin RJ, Robertson AP, Buxton SK, Beech RN, Charvet CL, Neveu C. Levamisole receptors: a second awakening. *Trends Parasitol* 2012; 28(7): 289-296. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.04.003>. PMID:22607692.
- Mattos MJT, Oliveira CMB, Gouveia AS, Andrade CB. Macrocyclic lactone-resistant strains of *Haemonchus* in naturally infected goats. *Cienc Rural* 2004; 34(3): 879-883. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782004000300034>.
- Mattos MJT, Schmidt V, Bastos CD. Ovicidal activity of two medicaments against goat gastrointestinal nematode in RS, Brazil. *Cienc Rural* 2000; 30(5): 893-895. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-8478200000500026>.
- McKenna PB. Are multiple pre-treatment groups necessary or unwarranted in faecal egg count reduction tests in sheep? *Vet Parasitol* 2013; 196(3-4): 433-437. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.021>. PMID:23601665.
- McKenna PB. Further potential limitations of the undifferentiated faecal egg count reduction test for the detection of anthelmintic resistance in sheep. *N Z Vet J* 1997; 45(6): 244-246. <http://dx.doi.org/10.1080/00480169.1997.36038>. PMID:16031998.
- McKenna PB. Further studies on the necessity or otherwise of multiple pre-treatment groups in faecal egg count reduction tests in sheep. *Vet Parasitol* 2014; 200(1-2): 212-215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.11.009>. PMID:24332962.
- McKenna PB. Gastro-intestinal parasitism and "anthelmintic resistance" in goats. *Surveillance* 1984; 11(4): 2-4.
- Mederos AE, Kelton D, Peregrine AS, VanLeeuwen J, Fernández S, LeBoeuf A, et al. Evaluation of the utility of subjective clinical parameters for estimating fecal egg counts and packed cell volume in Canadian sheep flocks. *Vet Parasitol* 2014b; 205(3-4): 568-574. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.08.030>. PMID:25246364.
- Mederos AE, Ramos Z, Bancho G. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. *Parasit Vectors* 2014a; 7(1): 598. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-014-0598-z>. PMID:25515711.
- Melo ACFL, Bevilaqua CML, Reis IF. Resistência aos anti-helmínticos benzimidazóis em nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes no Semiárido Nordeste brasileiro. *Cienc Anim Bras* 2009; 10(1): 294-300.
- Melo ACFL, Bevilaqua CML, Selaive AV, Girão MD. Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes from sheep and goats, in Pentecoste county, State of Ceará. *Cienc Anim Bras* 1998; 8(1): 7-11.
- Melo ACFL, Reis IS, Bevilaqua CML, Vieira LS, Echevarria FAM, Melo LM. Nematódeos resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. *Cienc Rural* 2003; 33(2): 339-344. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782003000200024>.
- Melo ACFL, Rondon FCM, Reis IS, Bevilaqua CML. Desenvolvimento da resistência ao oxfendazol em propriedades rurais de ovinos na região do Baixo e Médio Jaguaribe, Ceará, Brasil. *Braz J Vet Parasitol* 2004; 13(4): 137-141.
- Miller CM, Waghorn TS, Leathwick DM, Gilmour ML. How repeatable is a faecal egg count reduction test? *N Z Vet J* 2006; 54(6): 323-328. <http://dx.doi.org/10.1080/00480169.2006.36718>. PMID:17151732.
- Molento MB, Fortes FS, Pondelek DAS, Borges FA, Chagas ACS, Torres-Acosta JF, et al. Challenges of nematode control in ruminants: focus on Latin America. *Vet Parasitol* 2011; 180(1-2): 126-132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.033>. PMID:21684690.
- Molento MB, Gavião AA, Depner RA, Pires CC. Frequency of treatment and production performance using the FAMACHA® method compared with preventive control in ewes. *Vet Parasitol* 2009; 162(3-4): 314-319. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.031>. PMID:19369007.
- Molento MB, Wang GT, Prichard RK. Decreased ivermectin and moxidectin sensitivity in *Haemonchus contortus* selected with moxidectin over 14 generations. *Vet Parasitol* 1999; 86(1): 77-81. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00131-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00131-4). PMID:10489206.
- Molento MB. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. *Vet Parasitol* 2009; 163(3): 229-234. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.06.007>. PMID:19560869.
- Molento MB. Resistência de Helmintos em Ovinos e Caprinos. *Braz J Vet Parasitol* 2004; 13(S1): 82.

- Mottier ML, Prichard RK. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18(2): 129-140. <http://dx.doi.org/10.1097/FPC.0b013e3282f4711d>. PMID:18192899.
- Nabukenya I, Rubaire-Akiiki C, Olila D, Muhangi D, Höglund J. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in goats and evaluation of FAMACHA diagnostic marker in Uganda. *Vet Parasitol* 2014; 205(3-4): 666-675. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.07.019>. PMID:25174992.
- Nari A, Salles J, Gil A, Waller PJ, Hansen JW. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Uruguay. *Vet Parasitol* 1996; 62(3-4): 213-222. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017\(95\)00908-6](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(95)00908-6). PMID:8686167.
- Nery PS, Duarte ER, Martins ER. Eficácia de plantas para o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes: revisão de estudos publicados. *Rev Bras Plantas Med* 2009; 11(3): 330-338. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722009000300016>.
- Niciura SCM, Veríssimo CJ, Gromboni JGG, Rocha MIP, Mello SS, Barbosa CMP, et al. F200Y polymorphism in the β -tubulin gene in field isolates of *Haemonchus contortus* and risk factors of sheep flock management practices related to anthelmintic resistance. *Vet Parasitol* 2012; 190(3-4): 608-612. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.07.016>. PMID:22858226.
- Niciura SCM, Veríssimo SJ, Molento MB. *Determinação da eficácia anti-helmíntica em rebanhos ovinos: metodologia de colheita de amostras e de informações de manejo zootécnico: documento 91* [online]. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste; 2009 [cited 2015 Mar 20]. Available from: www.cpps.embrapa.br/sites/default/files/principal.../Documentos91.pdf.
- Nunes RL, Santos LL, Bastianetto E, Oliveira DAA, Brasil BSAF. Frequency of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* populations isolated from buffalo, goat and sheep herds. *Braz J Vet Parasitol* 2013; 22(4): 548-553. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013000400015>. PMID:24473880.
- Oliveira PA, Pinto DM, Ruas GL, Santos TRB, Pappen FG, Salvadeo TA, et al. Eficácia de diferentes fármacos no controle parasitário em ovinos. *Sci Anim Health* 2014; 2(2): 126-136.
- Oliveira PPA, Primavesi AC, Camargo AC, Ribeiro WM, Silva ETM. *Recomendação da sobresemeadura de aveia forrageira em pastagens tropicais ou subtropicais irrigadas*. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste; 2005. Comunicado técnico, 61.
- Pena-Espinoza M, Thamsborg SM, Demeler J, Enemark HL. Field efficacy of four anthelmintics and confirmation of drug-resistant nematodes by controlled efficacy test and pyrosequencing on a sheep and goat farm in Denmark. *Vet Parasitol* 2014; 206(3-4): 208-215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.10.017>. PMID:25468020.
- Pereira RHMA, Ahid SMM, Bezerra ACDS, Soares HS, Fonseca ZAAS. Diagnosis of nematodes gastrointestinal resistance to anthelmintic in goats and sheep from Rio Grande do Norte state, Brazil. *Acta Vet Brasilica* 2008; 2(1): 16-19.
- Pinheiro RR, Gouveia AMG, Alves FSE, Haddad JAP. Epidemiological aspects of the raising goat in Ceará State, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2000; 52(5): 534-543. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352000000500021>.
- Playford MC, Smith AN, Love S, Besier RB, Kluver P, Bailey JN. Prevalence and severity of anthelmintic resistance in ovine gastrointestinal nematodes in Australia (2009-2012). *Aust Vet J* 2014; 92(12): 464-471. <http://dx.doi.org/10.1111/avj.12271>. PMID:25424758.
- Powers KG, Wood IB, Eckert J, Gibson T, Smith HJ. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). *Vet Parasitol* 1982; 10(4): 265-284. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017\(82\)90078-4](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(82)90078-4). PMID:6753316.
- Prichard R, Ménez C, Lespine A. Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2012; 2: 134-153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpdr.2012.04.001>. PMID:24533275.
- Prichard RK, Hall CA, Kelly JD, Martins ICA, Donald AD. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Aust Vet J* 1980; 56(5): 239-251. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-0813.1980.tb15983.x>. PMID:7002142.
- Ramos CI, Bellato V, Ávila VS, Coutinho GC, Souza AP. Gastro-intestinal parasites resistance in sheep to some anthelmintics in Santa Catarina state, Brazil. *Cienc Rural* 2002; 32(3): 473-477. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782002000300017>.
- Resende KT, Teixeira IAMA, Biagioli B, Lima LD, Boaventura O No, Pereira JD Jr. Progresso científico em pequenos ruminantes na primeira década do século XXI. *Rev Bras Zootec* 2010; 39(suppl spe.): 369-375.
- Rodrigues AB, Athayde ACR, Rodrigues OG, Silva WW, Faria EB. Sensibilidade dos nematóides gastrintestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. *Pesqui Vet Bras* 2007; 27(4): 162-166. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2007000400006>.
- Rosalinski-Moraes F, Moretto LH, Bresolin WS, Gabrielli I, Kafer L, Zanchet IK, et al. Resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos da região da associação dos municípios do alto Irani (AMAI), Oeste de Santa Catarina. *Cienc Anim Bras* 2007; 8(3): 559-565.
- Sager H, Bapst B, Strehlau GA, Kaminsky R. Efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against adult stages of a multi-resistant *Haemonchus contortus* isolate. *Parasitol Res* 2012; 111(5): 2205-2207. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012-2949-z>. PMID:22576857.
- Santiago MAM, Costa UC, Benevenga SF. *Trichostrongylus colubriformis* resistente ao levamisole. *Rev Centro Ciênc Rurais* 1977; 7(4): 421-422.
- Santos MC, Amarante MRV, Silva MRL, Amarante AFT. Differentiation of *Haemonchus placei* from *Haemonchus contortus* by PCR and by morphometrics of adult parasites and third stage larvae. *Braz J Vet Parasitol* 2014; 23(4): 495-500. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014085>. PMID:25517528.
- Santos VT, Gonçalves PC. Verificação de estirpe resistente de *Haemonchus* resistente ao thiabendazole no Rio Grande do Sul (Brasil). *Revista da FZVA* 1967; 9: 201-209.
- Schwab PA. *A ovinocultura brasileira e o Paraná* [online]. 2010 [cited 2015 Mar 09]. Available from: <http://www.farmpoint.com.br/cadeia-produtiva/espaco-aberto/a-ovinoocultura-brasileira-e-o-parana-63027n.aspx>
- Scott I, Pomroy WE, Kenyon PR, Smith G, Adlington B, Moss A. Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Parasitol* 2013; 196(1-2): 166-171. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.037>. PMID:23953148.
- Sczesny-Moraes EA, Bianchin I, Silva KF, Catto JB, Honer MR, Paiva F. Resistência anti-helmíntica de nematóides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. *Pesqui Vet Bras* 2010; 30(3): 229-236. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010000300007>.
- SEBRAE. *Informações de mercado sobre Caprinos e Ovinos: relatório completo* [online]. São Paulo: SEBRAE; 2005. [cited 2015 Mar 10]. Série Mercado. Available from: [http://www.dce.sebrae.com.br/bte/bte.nsf/40B65B09464CA07D032571540041EC16/\\$File/NT000B0062.pdf](http://www.dce.sebrae.com.br/bte/bte.nsf/40B65B09464CA07D032571540041EC16/$File/NT000B0062.pdf)

- Shoop W, Haines H, Michael B, Eary C. Mutual resistance to avermectins and milbemycins: oral activity of ivermectin and moxidectin against ivermectin-resistant and susceptible nematodes. *Vet Rec* 1993; 133(18): 445-447. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.133.18.445>. PMID:8291174.
- Silva AR, Araújo JV, Braga FR, Oliveira AC, Carvalho RO, Araújo JM, et al. Avaliação da eficácia de compostos anti-helmínticos sobre nematoides parasitos gastrintestinais (Strongyloidea) de caprinos. *Braz J Vet Parasitol* 2008; 17(1): 120-125.
- Silva MRL, Amarante MRV, Bresciani KDS, Amarante AFT. Host-specificity and morphometrics of female *Haemonchus contortus*, *H. placei* and *H. similis* (Nematoda: Trichostrongylidae) in cattle and sheep from shared pastures in São Paulo State, Brazil. *J Helminthol* 2015; 89(3): 302-306. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022149X14000078>. PMID:24589375.
- Silvestre A, Humbert JF. A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites. *Exp Parasitol* 2000; 95(4): 271-276. <http://dx.doi.org/10.1006/expr.2000.4542>. PMID:11038310.
- Smith G. A mathematical model for the evolution of anthelmintic resistance in a direct life cycle nematode parasite. *Int J Parasitol* 1990; 20(7): 913-921. [http://dx.doi.org/10.1016/0020-7519\(90\)90030-Q](http://dx.doi.org/10.1016/0020-7519(90)90030-Q). PMID:2276866.
- Smothers CD, Sun F, Dayton AD. Comparison of arithmetic and geometric means as measures of a central tendency in cattle nematode populations. *Vet Parasitol* 1999; 81(3): 211-224. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(98\)00206-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00206-4). PMID:10190865.
- Sprenger LK, Amaral CH, Leite RVL Fo, Aguiar TN, Molento MB. Eficácia do fosfato de levamisol em nematódeos gastrintestinais de caprinos e ovinos. *Arch Vet Sci* 2013; 18(1): 29-39.
- Stear MJ, Singleton D, Mathews L. An evolutionary perspective on gastrointestinal nematodes of sheep. *J Helminthol* 2011; 85(2): 113-120. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022149X11000058>. PMID:24650861.
- Suter RJ, Besier RB, Perkins NR, Robertson ID, Chapman HM. Sheep-farm risk factors for ivermectin resistance in *Ostertagia circumcincta* in Western Australia. *Prev Vet Med* 2004; 63(3-4): 257-269. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.01.005>. PMID:15158574.
- Taylor MA, Hunt KR, Goodyear KL. Anthelmintic resistance detection methods. *Vet Parasitol* 2002; 103(3): 183-194. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00604-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00604-5). PMID:11750111.
- Thomaz-Soccol V, de Souza FP, Sotomaior C, Castro EA, Milczewski V, Mocelin G, et al. Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). *Braz Arch Biol Technol* 2004; 47(1): 41-47. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132004000100006>.
- Thomaz-Soccol VT, Sotomaior C, Souza FP, Castro EA, Pessoa Silva MC, Milczewski V. Occurrence of resistance to anthelmintics in sheep in Parana State, Brazil. *Vet Rec* 1996; 139(17): 421-422. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.139.17.421>. PMID:8923717.
- Torres-Acosta JFJ, Dzul-Canche U, Aguilar-Caballero AJ, Rodriguez-Vivas RI. Prevalence of benzimidazole resistant nematodes in sheep flocks in Yucatan, Mexico. *Vet Parasitol* 2003; 114(1): 33-42. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00076-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00076-1). PMID:12732464.
- Torres-Acosta JFJ, Mendoza-de-Gives P, Aguilar-Caballero AJ, Cuéllar-Ordaz JA. Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. *Vet Parasitol* 2012; 189(1): 89-96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.037>. PMID:22520233.
- Vádary JA, Cudeková P, Corba J. *In vitro* detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*: egg hatch test versus larval development test. *Vet Parasitol* 2007; 149(1-2): 104-110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.011>. PMID:17697753.
- Van den Brom R, Moll L, Kappert C, Vellema P. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. *Vet Parasitol* 2015; 209(3-4): 278-280. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.026>. PMID:25770852.
- van Wyk JA, Hoste H, Kaplan RM, Besier RB. Targeted selective treatment for worm management - How do we sell rational programs to farmers? *Vet Parasitol* 2006; 139(4): 336-346. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.023>. PMID:16774807.
- van Wyk JA, Malan FS, Randles JL. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? *Vet Parasitol* 1997; 70(1-3): 111-122. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(96\)01147-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01147-8). PMID:9195715.
- Veríssimo CJ, Niciura SCM, Alberti AL, Rodrigues CFC, Barbosa CMP, Chiebao DP, et al. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. *Vet Parasitol* 2012; 187(1-2): 209-216. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.013>. PMID:22341829.
- Vickers M, Venning M, McKenna PB, Mariadass B. Resistance to macrocyclic lactone anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* in sheep in New Zealand. *N Z Vet J* 2001; 49(3): 101-105. <http://dx.doi.org/10.1080/00480169.2001.36211>. PMID:16032171.
- Vieira LS, Berne MEA, Cavalcante ACR, Costa CAF. *Haemonchus contortus* resistance to ivermectin and netobimin in Brazilian sheep. *Vet Parasitol* 1992; 45(1-2): 111-116. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90032-5](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(92)90032-5). PMID:1485411.
- Vieira LS, Cavalcante ACR. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará. *Pesqui Vet Bras* 1999; 19(3-4): 99-103. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X1999000300002>.
- Vieira LS, Gonçalves PC, Costa CAF, Berne MEA. Redução e esterilização de ovos de nematódeos gastrintestinais em caprinos medicados com anti-helmínticos benzimidazóis. *Pesquisa Agropecu Bras* 1989; 24(10): 1255-1265.
- Vila Nova LE, Costa ME, Melo PGCF, Cunha LFC Fo, Barca FA Jr, Silva LC, et al. Resistência de nematoides aos anti-helmínticos nitroxinil 34% e ivermectina 1% em rebanho ovino no município de São João do Ivaí, Paraná. *Rev Bras Hig Sanidade Anim* 2014; 8(1): 160-171.
- Waghorn TS, Leathwick DM, Rhodes AP, Lawrence KE, Jackson R, Pomroy WE, et al. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep farms in New Zealand. *N Z Vet J* 2006; 54(6): 271-277. <http://dx.doi.org/10.1080/00480169.2006.36710>. PMID:17151724.
- Whelan M, Chirollo C, Furey A, Cortesi ML, Anastasio A, Danaher M. Investigation of the persistence of levamisole and oxclozanide in milk and fate in cheese. *J Agric Food Chem* 2010; 58(23): 12204-12209. <http://dx.doi.org/10.1021/jf102725b>. PMID:21058728.
- Wood LB, Amara NK, Bairden K, Duncan JL, Kassai T, Malone JB, et al. World Association for the Advancement of Vet Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Vet Parasitol* 1995; 58(3): 181-213.
- Zanzani SA, Gazzonis AL, Cerbo AD, Varady A, Manfred AT. Gastrointestinal nematodes of dairy goats, anthelmintic resistance and practices of parasite control in Northern Italy. *BMC Vet Res* 2014; 10(1): 114. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-10-114>. PMID:24886141.