



UFRPE

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM NEMATÓDEOS
GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES NO
ESTADO DE PERNAMBUCO**

RODOLFO LUIZ GODOY DO AMARAL

**RECIFE - PE
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

RODOLFO LUIZ GODOY DO AMARAL

**RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM NEMATÓDEOS
GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES NO
ESTADO DE PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida da Gloria Faustino

**RECIFE - PE
2016**

Ficha catalográfica

A485r Amaral, Rodolfo Luiz Godoy do
Resistência anti-helmíntica em nematódeos gastrintestinais
de pequenos ruminantes no Estado de Pernambuco / Rodolfo Luiz
Godoy do Amaral. – Recife, 2016.
75 f. : il.

Orientadora: Maria Aparecida da Gloria Faustino.
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de
Medicina Veterinária, Recife, 2016.
Inclui anexo(s) e referências.

1. Eficácia anti-helmíntica 2. Diagnóstico molecular 3. Caprino
4. Ovino 5. Haemonchus contortus 6. PCR I. Faustino, Maria
Aparecida da Gloria, orientadora II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM NEMATÓDEOS
GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES NO
ESTADO DE PERNAMBUCO

Tese de Doutorado elaborada por
RODOLFO LUIZ GODOY DO AMARAL

Aprovada/...../.....

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida da Gloria Faustino
Orientadora

Dr^a. Vânia Lucia de Assis Santana
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA/PE

Prof^a. Dr^a. Marilene Maria de Lima
Unidade Acadêmica de Serra Talhada – UFRPE

Prof^a. Dr^a. Gílcia Aparecida de Carvalho
Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE

Prof. Dr. José Pompeu dos Santos Filho
Departamento de Biologia - UFRPE

Dedico:
Àqueles que
fazem da minha vida uma grande caminhada:
Ao meu grandioso Deus,
aos meus queridos pais(Amaral e Edileuza Godoy),
à minha amada esposa (Ericka Alves)
e aos meus queridos filhos
(Júlia Godoy, Rafael Godoy e o pequeno Benício Godoy)

Agradecimentos

Em 2012, eu entrava no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais domésticos do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE. Iniciava uma nova etapa da minha vida, meu tão sonhado doutorado. Hoje, terminando o Doutorado, neste período adquiri conhecimentos essenciais para a minha formação profissional e pessoal. Nesta pequena jornada fortaleci amizades existentes e conquistei amigos, pessoas para as quais vão os meus sinceros agradecimentos e que nunca esquecerei.

Antes de tudo agradeço a **Deus** pela grande obra que fez e faz na minha vida.

Ao meu pai, **Luiz Benício do Amaral**. Sem sua ajuda nada disso seria possível. Tornou meu sonho em realidade. Meu agradecimento ao meu velho marinheiro, pessoa fundamental na minha formação profissional e pessoa que sou.

À minha mãe, **Edileuza Godoy do Amaral**. Hoje falo: “quem diria ... aquele que teve dificuldades em nascer, hoje termina um doutorado”. Quanto trabalho dado a esta mulher maravilhosa e paciente. Eu te amo, minha mãe! Sem você nada seria.

Aos meus irmãos, **Carmem Albertina Godoy do Amaral** e **Fábio Luiz Godoy do Amaral**, meu muito obrigado.

A minha prima irmã querida **Evanily Godoy Laureano** e a minha grande amiga **Dona Sônia Ribeiro** (GBrennand), destas duas pessoas recebi durante este tempo palavras de conselho e incentivos diversos.

Aos meus filhos, **Júlia V. Godoy do Amaral**, **Rafael V. Godoy do Amaral**, e ao pequeno **Benício A. Godoy do Amaral**, esses são responsáveis pela força que recebo de Deus. Por eles acordo e luto incansavelmente todos os dias da minha vida.

À minha esposa, **Ericka Patricia Alves Godoy do Amaral**, mulher que pegou em minha mão e me levantou. Minha amada, muito obrigado por tudo que me fez e faz.

Aos meus familiares pelo apoio e incentivo.

Jamais poderia esquecer de duas pessoas que me levaram a descobrir como é bom pesquisar, como é bom descobrir um novo mundo. Estas pessoas foram minhas

orientadoras na iniciação científica/PIBIC, **Dr^a. Alzira Maria Paiva de Almeida e Dr^a. Nilma Cintra Leal**, ambas pesquisadoras do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães /FIOCRUZ/RECIFE.

Também gostaria de agradecer aos meus ex-orientadores do mestrado, **Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza e Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota**, estou aqui hoje graças a eles também.

Agradeço a todos os amigos conquistados durante o doutorado, em especial; **Ivanise Santana, Gisele Ramos, Débora Miranda, Silvia Marques, Carol Messias, Jussara Alencar, Victor Fernando, Rodrigo Tenório, Cristiane Maia, Neurisvan Guerra, Edenilse Romeiro e Glenda Marinho**.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Beltão Molento** / Universidade Federal Paraná - UFPR, pela fundamental contribuição na realização desta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Leucio Câmara Alves**, meu muito obrigado pelo auxílio durante doutorado, de extrema importância.

Agradeço imensamente, à Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida da Gloria Faustino. Não tenho palavras para expressar o respeito e admiração que lhe tenho. Meu eterno agradecimento, por toda dedicação, paciência. Foram diversos os momentos difíceis enfrentados, mas sempre guiados da melhor forma por sua orientação.

À **FACEPE**, pela bolsa concedida durante o doutorado.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, pela oportunidade de realização do doutorado e toda atenção recebida durante o curso.

A vocês, minha gratidão !

*Você não sabe o quanto eu caminhei,
pra chegar até aqui.
Percorri milhas e milhas antes de dormir.
Eu nem cochilei,
os mais belos montes escalei,
nas noites escuras de frio
chorei, ei, ei.*

“Cidade Negra”

RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES NO ESTADO DE PERNAMBUCO

RESUMO

A caprinovinocultura sofre grande prejuízo econômico devido ao parasitismo por nematódeos gastrintestinais, chegando a inviabilizar esta exploração em algumas regiões. O controle desse parasitismo é feito basicamente com a utilização de drogas anti-helmínticas. A ineficiência neste tipo de controle são os primeiros sinais do aparecimento de resistência anti-helmíntica (RA), que se constitui em um dos principais fatores negativos e limitantes para a produção animal, uma vez que inviabiliza o controle efetivo da helmintose dos pequenos ruminantes, com reflexos desfavoráveis nos índices produtivos. A resistência anti-helmíntica em nematódeos de pequenos ruminantes para os três grupos de drogas mais comumente utilizados: benzimidazóis (BZs), imidazotiazóis (LEV) e lactonas macrocíclicas (LMs) vem sendo relatada e têm crescido rapidamente em diferentes regiões do mundo. O controle eficiente destes parasitos e o diagnóstico precoce da resistência anti-helmíntica, especialmente em *Haemonchus contortus*, devem ser preconizados a fim de viabilizar economicamente a criação de ovinos e caprinos. O conhecimento dos vários aspectos genéticos deste fenômeno poderá aumentar a vida útil dos fármacos atualmente utilizados, e consequentemente tentar preservar a susceptibilidade dos parasitos. Neste trabalho tem-se como objetivo diagnosticar a resistência anti-helmíntica em propriedades de criação de ovinos e caprinos e analisar a relação com o manejo instituído nas propriedades e identificar a presença do DNA responsável pela resistência anti-helmíntica em populações de helmintos de pequenos ruminantes no estado de Pernambuco. Os procedimentos metodológicos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – UFRPE. Amostras de espécimes adultos de *H. contortus* foram obtidas de animais naturalmente parasitados por helmintos gastrintestinais pertencentes a propriedades localizadas nas cidades do estado de Pernambuco: Sairé (Agreste), Recife (Região Metropolitana), Bonito (Agreste), Moreno (Região Metropolitana), Gameleira (Mata Sul), Camocim de São Félix (Agreste), Serra Talhada (Sertão). Nas propriedades de Recife e Bonito criavam-se apenas caprinos e nas demais apenas ovinos. Para realização da PCR, amostras de espécimes adultos de *H. contortus* foram obtidas de animais naturalmente parasitados por helmintos gastrintestinais, os quais foram estocados em tubos de eppendorf com PBS a 4°C, identificados e sexados no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos – UFRPE. Formou-se um pool de 20 indivíduos machos adultos de *H. contortus* de cada propriedade, dos quais procedeu-se à extração de DNA. As amostras de DNA extraídas foram analisadas no Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal do Paraná. Foi realizada a PCR com o objetivo amplificar fragmentos de genes que codificam o isotipo 1 da β -tubulina que possuíam as sequências de códon 200, realizando-se também uma PCR para identificação das espécies dos helmintos coletados. As duas reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti Life com gradiente. Uma amostra de 20 μ l de cada reação foi analisada sobre um gel de agarose 0,8 % e visualizada sob luz UV. Os produtos de PCR foram purificados com o kit comercial PureLink® Quick Gel Extraction (Invitrogen, USA) e sequenciados por eletroforese capilar (Método de Sanger) utilizando a plataforma ABI3130 (Life Technologies, USA).

Avaliou-se também a eficácia anti-helmíntica por método “in vivo” por meio do teste de redução do número de ovos por grama de fezes (TRCOF), usando a fórmula: % eficácia = [(média de OPG^{pré-tratamento} - média de OPG^{pós-tratamento}) / média de OPG^{pré-tratamento}] X 100. Detectou-se DNA responsável pela resistência anti-helmíntica aos benzimidazóis (BZ) em todas as propriedades analisadas. Os percentuais de eficácia anti-helmíntica para a moxidectina apresentaram-se como efetivos apenas aos sete dias pós-tratamento. Diversas falhas de manejo do controle das helmintoses gastrintestinais foram encontradas. Os resultados obtidos confirmam a resistência anti-helmíntica aos benzimidazóis em *H. contortus* de caprinos e ovinos no estado de Pernambuco, constituindo-se no primeiro registro de diagnóstico molecular da RA em ruminantes no Estado. Caracterizam também o declínio da efetividade anti-helmíntica da moxidectina nos rebanhos. Ambas as situações são favorecida por práticas de manejo inadequadas e uso indiscriminado de produtos químicos para o controle de helmintos gastrintestinais.

Palavras-chave: Eficácia anti-helmíntica, diagnóstico molecular, caprinos, ovinos, *Haemonchus contortus*, PCR

ABSTRACT

The sheep and goat farming suffer great economic losses due to parasitism by gastrointestinal nematodes, reaching derail this exploration in some regions. The control of such parasites is done primarily with the use of anthelmintic drugs. The inefficiency of this type of control are the first signs of anthelmintic resistance appearance (AR), which constitutes one of the main negative and limiting factors for animal production, since it prevents the effective control of helminths in small ruminants, with adverse consequences on production rates. The anthelmintic resistance in nematodes of small ruminants for the three groups most commonly used drugs: benzimidazole (BZs) imidazotiazóis (LEV) and macrocyclic lactones (MLs) has been reported and have grown rapidly in different regions of the world. The efficient control of these parasites and the early diagnosis of anthelmintic resistance, especially in *Haemonchus contortus* should be recommended in order to economically viable sheep and goat breeding. Knowledge of various genetic aspects of this phenomenon can increase the shelf life of drugs currently used, and therefore try to preserve the susceptibility of parasites. This work has the objective of diagnosing anthelmintic resistance in properties of sheep and goats and to analyze the relationship with the management of the properties and identify the presence of DNA responsible for anthelmintic resistance in helminth populations of small ruminants in the state of Pernambuco. The methodological procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use - CEUA - UFRPE. Samples from adult specimens of *H. contortus* were obtained from animals naturally infected with gastrointestinal helminths belonging to properties located in the cities of the state of Pernambuco: Sairé (Agreste), Recife (Metropolitan Region), Bonito (Agreste), Moreno (Metropolitan Region) Gameleira (South Forest), Camocim de São Félix (Agreste), Serra Talhada (Sertão). The properties of Recife and Bonito created only goats and the others only sheep. For PCR, samples from adult specimens of *H. contortus* were obtained from animals naturally infected with gastrointestinal helminths, which were stored in Eppendorf tubes with PBS at 4 ° C, identified and sexed in Parasitic Diseases Laboratory of Domestic Animals - UFRPE. It was performed a pool of 20 adult males of *H. contortus* from each property for the extraction of DNA. The extracted DNA samples were analyzed in Parasitic Diseases Laboratory at the Federal University of Parana. PCR in order to amplify gene fragments encoding 1 isotype of β -tubulin which held the sequence of codon 200 was performed; it was also performing a PCR to identify the species of helminths collected. Both amplification reactions were performed in a thermocycler Veriti Life gradient. A sample of 20 μ L of each reaction was analyzed on a 0.8% agarose gel and visualized under UV light. PCR products were purified with the commercial PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA) and sequenced by capillary electrophoresis (Sanger method) using the ABI3130 platform (Life Technologies, USA). Anthelmintic efficacy by "in vivo" method was also evaluated the by means of Fecal Egg Counting Reduction Test (FECRT) using the formula: % efficacy = $[(\text{mean OPG}^{\text{pre-treatment}} - \text{average OPG}^{\text{post-treatment}}) / \text{average OPG}^{\text{pre-treatment}}] \times 100$. It was detected DNA responsible for anthelmintic benzimidazole resistance (BZ) in all the evaluated properties. The percentage of anthelmintic efficacy for moxidectin presented

as effective only seven days after treatment. Several management failures of control of gastrointestinal helminths were found. The results obtained confirm the anthelmintic benzimidazole resistance in *H. contortus* goats and sheep in the state of Pernambuco - Brazil, becoming the first record of molecular diagnosis of RA in ruminants in the State. also characterize the decline of the anthelmintic efficacy of moxidectin in herds. Both situations are favored by inadequate management practices and indiscriminate use of chemicals for the control of gastrointestinal helminths.

Keywords: anthelmintic efficacy, molecular diagnostics, goats, sheep, *Haemonchus contortus*, PCR

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo 1

- Fig.1.** Eletroforese em gel de agarose 0,8% com produto de PCR resultante da amplificação de fragmento do isotipo 1 da β -tubulina em amostras de *Haemonchus contortus* dos rebanhos (1. Marcador molecular, 2. Controle negativo, 3. Sairé, 4. Recife, 5. Bonito e 6. Moreno). **54**
- Fig.2.** Eletroforese em gel de agarose 0,8% com produto de PCR resultante da amplificação de fragmento do isotipo 1 da β -tubulina em amostras de *Haemonchus contortus* dos rebanhos (1. Marcador molecular, 2. Controle negativo, 3. Gameleira, 4. Camocim de São Félix e 5. Serra Talhada) **54**
- Fig.3.** Eletroforese do produto de PCR das amostras de DNA de Pernambuco para sequência NC1 dos rebanhos de (1. Sairé, 2. Recife, 3. Bonito, 4. Moreno, 5. Gameleira, 6. Camocim de São Félix e 7. Serra Talhada) **54**
- Fig.4.** Sequenciamento dos isolados de *Haemonchus contortus* do estado de Pernambuco. **55**

LISTA DE TABELAS

Artigo 2

Tabela 1 – Média e desvio-padrão das contagens de ovos por grama de fezes em ovinos dos municípios de Camocim de São Félix e Moreno – PE submetidos a tratamento com moxidectina segundo os dias pós-tratamento **61**

Tabela 2 – Média e desvio-padrão das contagens de larvas de *Haemonchus* sp. por grama de fezes em ovinos dos municípios de Camocim de São Félix e Moreno – PE submetidos a tratamento com moxidectina segundo os dias pós-tratamento **62**

Tabela 3. Eficácia anti-helmíntica (%) da moxidectina em rebanhos ovinos do estado de Pernambuco nos 7º, 14º e 21º dias pós-tratamento. **62**

ANEXO

Anexo 1 Questionário aplicado nas fazendas de ovinos e caprinos do estado de Pernambuco	69
Anexo 2 Protocolo do Kit comercial utilizando na extração de DNA	72

LISTA DE SIGLAS

µl	Microlitro
BZs	Grupo dos benzimidazóis
CIP	Controle integrado de parasitos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FECRT	Faecal egg count reduction test
HCl	Ácido clorídrico
HGI	Helmintos gastrintestinais
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IVM	Ivermectina 1%
ITS	Espaçador interno transcrito
L ₃	Larva de terceiro estágio – larva infectante
LEv	Grupo dos imidazotiazóis
LMs	Grupo das lactonas macrocíticas
LPG	Larvas por gramas de fezes
mg	miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésico
ml	mililitros
mM	Massa molar
MOX	Moxidectina
°C	Temperatura em Grau Celsius
OPG	Contagem de ovos por grama de fezes
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, “polymerase chain reaction”)
pH	Potencial hidrogeniônico
RA	Resistência Anti-helmíntica
RAM	Resistência anti-helmíntica múltipla
RDM	Resistência a múltiplas drogas
rpm	Medida de rotação por minuto
TAC	Aminoácido tirosina
TEO	Teste de eclodibilidade de ovos
TTC	Aminoácido fenilalanina
TDL	Teste de desenvolvimento larval

TRCOF
WAAVP

Teste de redução na contagem de ovos nas fezes
World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Controle de helmintos gastrintestinais	20
2.1.1 Classes de anti-helmínticos	20
2.1.2 Resistência anti-helmíntica	21
2.1.2.1 Histórico da resistência anti-helmíntica	23
2. 1.2.1.1 No mundo	23
2. 1.2.1.2 No Brasil	24
2.1.2.2 Mecanismo de instalação da resistência anti-helmíntica	24
2.1.2.3 Métodos de diagnósticos da resistência anti-helmíntica para nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes	26
2.1.3 Alternativas de controle das helmintoses	27
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	31
4 ARTIGOS	45
Artigo 1 - Detecção de DNA de resistência anti-helmíntica para benzimidazóis em <i>Haemonchus contortus</i> de caprinos e ovinos do estado de Pernambuco	46
Artigo 2 - Avaliação da eficácia do anti-helmíntico moxidectina em criações de ovinos no estado de Pernambuco	56
5 – CONCLUSÃO FINAL	67
6 – ANEXO	68

1 - INTRODUÇÃO

A caprinovinocultura é uma exploração econômica em vasta expansão no Nordeste do Brasil, considerada uma nova fonte de proteína de origem animal com importante relevância socioeconômica.

Diversos são os fatores que prejudicam economicamente as criações de ovinos e caprinos, dentre eles o parasitismo por helmintos gastrintestinais (HGI) constitui um dos fatores limitantes desta atividade em diversas regiões do mundo (ROSALINSKI-MORAES et al., 2012), tais nematódeos podem levar à diminuição na produção de carne, leite e alta mortalidade nos animais jovens principalmente nos períodos chuvosos, prejudicando zootecnicamente e o bem-estar animal (LIMA et al., 2010_b; MILLER et al., 2012; FORTES et al., 2013).

Os benefícios da utilização de medicamentos antiparasitários estão intimamente ligados à contabilidade de uma propriedade. Quando esta tecnologia é utilizada de maneira correta, levando em consideração também os aspectos epidemiológicos, todos os setores envolvidos na cadeia de produção ganham em produtividade e qualidade. Entretanto após a observação do avanço rápido da resistência anti-helmíntica nas principais regiões produtoras brasileiras (ECHEVARRIA et al., 1996), se conclui que este princípio tem sido insuficiente em se tratando da frequência de tratamento e da utilização correta das drogas antiparasitárias. O controle desse parasitismo é feito, basicamente, com a utilização de drogas anti-helmínticas (VIEIRA & CAVALCANTE, 1999; MOLENTO et al., 2011), o uso indiscriminado de drogas anti-helmínticas favorece o aparecimento e desenvolvimento da resistência anti-helmíntica (RA), assim os nematódeos que sobreviverem a esse tratamento apresentam características biogenéticas que os tornam resistentes aos efeitos tóxicos das drogas (GEARY, 2013).

A adoção de programas alternativos de controle parasitário vem crescendo com o objetivo de diminuir a aplicação dos diversos compostos químicos, entretanto, atualmente, as medidas de controle ainda dependem da utilização de anti-helmínticos. Sabe-se que o processo de seleção de parasitos resistentes após sua exposição aos produtos químicos é inevitável e, além disso, para os laboratórios, a elaboração até a comercialização de novas drogas anti-parasitárias é extremamente cara e lenta (GEARY, 2013; MOLENTO et al., 2013).

A resistência a anti-helmínticos (RA) em diversos países é tão impactante que ameaça toda produtividade do rebanho, ocorrendo em todas as classes de drogas utilizadas no controle de nematódeos (MOLENTO et al., 2011). A maior parte dos relatos de resistência aos anti-helmínticos provém de regiões onde *Haemonchus contortus*, parasito abomasal, é endêmico. Isso inclui as regiões com verão chuvoso como Austrália, algumas áreas da África do Sul e Brasil (WALLER et al., 1995; ECHEVARRIA et al., 1996).

O primeiro relato de resistência a anti-helmínticos no Brasil, foi no Rio Grande do Sul em ovinos (DOS SANTOS & GONÇALVES, 1967). No Nordeste brasileiro, a primeira suspeita de nematódeos gastrintestinais de caprinos resistentes aos anti-helmínticos foi relatada por VIEIRA (1986) no estado do Ceará, ocorrendo, posteriormente, relatos de resistência anti-helmíntica de caprinos em Pernambuco ao levamisole, albendazole e parbendazole (CHARLES et al., 1989) e na Bahia aos anti-helmínticos albendazol e ivermectina (BARRETO & SILVA, 1999). Bevilaqua & Melo, (2003) demonstraram que esse problema está se disseminado em toda Região Nordeste.

Estudos mais recentes continuam demonstrando ineficácia de produtos à base de ivermectina e albendazole na região nordeste (PEREIRA et al., 2008; COELHO et al., 2010). VILELA et al. (2012) apontam a resistência anti-helmíntica como resultado da aplicação de anti-helmínticos diversas vezes em curto tempo no semi-árido do Nordeste brasileiro.

Este trabalho tem-se como objetivo diagnosticar a resistência anti-helmíntica em propriedades de criação de ovinos e caprinos e analisar a relação com o manejo instituído nas propriedades e identificar a presença do DNA responsável pela resistência anti-helmíntica em populações de helmintos de pequenos ruminantes no estado de Pernambuco.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

A caprinovinocultura é uma atividade econômica de forte representação no Nordeste brasileiro, com 90% do rebanho caprino do Brasil e mais da metade dos ovinos. A região sul ficou em segundo lugar no caso de ovinos, com larga participação do Rio Grande do Sul, cujo rebanho de 4,9 milhões de cabeças é o maior do país (IBGE, 2012).

Na região nordeste um efetivo caprino de 8,779 milhões foi registrado em 2013, com crescimento de 1,5% em relação ao número de cabeças de 2012. Bahia foi o estado brasileiro com o maior efetivo desta espécie (28,0%), seguido pelo estado de Pernambuco (22,5%). Os maiores efetivos municipais estavam localizados em Floresta (PE), com 3,6%, Casa Nova (BA), com 2,6%, e Petrolina (PE), com 2,4%, observando-se grande dispersão municipal.

Entre os 10 municípios com os maiores efetivos do nordeste, metade situava-se no estado da Bahia e a outra metade, no estado de Pernambuco, cujo efetivo caprino foi a que mais cresceu em relação ao ano anterior (10,3%) (IBGE, 2013).

A população de ovinos no Brasil encontrava-se, sobremaneira, localizado nos estados do Rio Grande do Sul (24,6%), Bahia (16,9%), Ceará (11,9%) e Pernambuco (10,6%). No comparativo entre 2012 e 2013, registrou-se significativo crescimento do efetivo nos estados do Rio Grande do Norte (32,0%), Pernambuco (10,8%) e Bahia (4,1%), gerando um crescimento de 4,8% na Região Nordeste, (IBGE, 2013).

No Brasil, os gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Oesophagostomum*, *Strongyloides*, *Cooperia* e *Ostertagia* figuram como os nematódeos de maior importância para os pequenos ruminantes nas regiões sul (RAMOS et al., 2004; SPRENGER et al., 2013), sudeste (SILVA et al., 2004; DUARTE et al., 2012), centro-oeste (SCZESNY-MORAES et al., 2010) e nordeste (AHID et al., 2008; BRITO et al., 2009; LIMA et al., 2010; MELO et al., 2013).

Segundo Amarante (2011), as helmintoses gastrintestinais são um dos principais problemas sanitários em pequenos ruminantes, não só no Brasil como no mundo, principalmente pela dificuldade no controle, em função da rapidez com que os nematódeos desenvolvem resistência aos anti-helmínticos comerciais. No entanto apesar de toda rentabilidade já confirmada neste tipo de exploração agropecuária, os problemas de saúde são causas principais do baixo desempenho zootécnico e econômico dos rebanhos, destacando-se as helmintoses gastrintestinais como principal fator negativo enfrentado pelos criadores de caprinos e ovinos no Brasil. Os animais apresentam queda no desempenho produtivo devido à diminuição no consumo de alimentos e absorção de nutrientes, podendo ser observadas altas taxas de mortalidade principalmente em animais jovens (MOLENTO, 2011), os quais são mais susceptíveis que os adultos, que são menos predispostos devido à imunidade estabelecida pelas infecções anteriores (AHID et al., 2008).

Uma boa nutrição energética e protéica aumenta a resistência dos animais às infecções parasitárias, portanto, sempre que for viável economicamente, a correta suplementação do rebanho diminui o grau de infecção. Por outro lado períodos de carência alimentar aumentam a susceptibilidade aos parasitos e favorecem a ocorrência de sinais clínicos (TORRES-ACOSTA & HOSTE, 2012). Alguns minerais apresentam efeito direto contra aos parasitos. Fausto et al. (2014) observaram que ovinos suplementados com cobre e selênio aumentaram

as concentrações plasmáticas de proteínas totais e de gama albuminas, e diminuíram a carga parasitária, tomada pela redução das contagens de OPG.

2.1 – CONTROLE DE HELMINTOS GASTRINTESTINAIS

A utilização de medicamentos anti-helmínticos é a prática mais utilizada pelos produtores para tentar controlar a infecção por nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes (MELO et al., 2004, FORTES & MOLENTO, 2013), apesar do crescente desenvolvimento e adoção de programas alternativos de controle para reduzir o uso de anti-helmínticos químicos (MOLENTO et al., 2011; FORTES & MOLENTO, 2013).

2.1.1 – CLASSES DE ANTI-HELMÍNTICOS

Os três grupos de anti-helmínticos de amplo ação ou espectro disponíveis no mercado são: 1.(BZs) benzimidazóis (thiabendazol, mebendazol, parabendazol, albendazol, fenbendazol, oxbendazol, oxfendazol e triclabendazol), que se ligam à β -tubulina e evitam a polimerização dos dímeros de tubulina em microtúbulos, e também inibem a fumarato-redutase e o transporte de glicose; 2. (LEV) imidazotiazóis (levamisol e tetramisol) e pirimidinas (pirantel e morantel), que são agonistas de receptores de acetilcolina e provocam contração muscular e paralisia; e 3.(LMs) lactonas macrocíclicas (avermectinas: ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina e selamectina; e milbemicinas: moxidectina, nemadectina e milbemicina oxima), que abrem canais de cloro direcionados por glutamato e ocasionam paralisia da neuromusculatura, inclusive da faringe (COLES et al., 1992; ALMEIDA e AYRES, 1999). Os anti-helmínticos de pequeno espectro são: (1) salicilanilidas (closantel, radoxanida niclosamida e oxiclozamida) e nitrofenóis ou substitutos fenólicos (disofenol, nitroxinil, niclofan, nitroscanato e bitionol), desacopladores de fosforilação oxidativa; e (2) organofosforados (diclorvós, triclorfon, coumafós e fention), inibidores da acetilcolinesterase (ALMEIDA & AYRES, 1999).

Recentemente, duas novas classes de anti-helmínticos – monepantel (KAMINSKY et al., 2008) e derquantel, este em combinação com a abamectina (LITTLE et al., 2010), com novos modos de ação, foram lançados no mercado na Nova Zelândia, sendo uma alternativa promissora para o futuro do controle de nematódeos gastrintestinais.

A resistência anti-helmíntica constitui-se em um dos principais fatores negativos e limitantes para a produção animal, uma vez que inviabiliza o controle efetivo da helmintose dos pequenos ruminantes, com reflexos desfavoráveis nos índices produtivos (TAYLOR et

al., 2002), envolvendo os diversos gêneros de parasitos e classes de drogas, como os benzimidazois, imidazotiazois e lactonas macrocíclicas (CHANDRAWATHANI et al., 2004; KAPLAN, 2004; VÁRADY et al., 2011).

2.1.2 – RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA

Define-se como resistência anti-helmíntica o aumento do número de indivíduos em uma população, capazes de suportar doses de um composto químico que tenha comprovado ser letal à maioria de uma população normalmente sensível, da mesma espécie. O aumento do número de indivíduos resistentes numa população é o resultado de trocas na frequência gênica causada pelo cruzamento daqueles indivíduos que tenham sobrevivido à exposições da droga. A mais importante característica da resistência é hereditariedade (ECHEVARRIA, 1996).

Segundo Vieira & Cavalcante (1999), a resistência anti-helmíntica é definida como o aumento significativo na habilidade de uma estirpe de parasitos para tolerar doses de uma droga que são letais para a maioria dos indivíduos de uma população da mesma espécie.

De acordo com Molento (2004), a resistência anti-helmíntica é um fenômeno pelo qual alguns organismos de uma população são capazes de sobreviver após constante utilização de um composto químico.

Vieira (2008) apresenta o conceito de resistência anti-helmíntica como a capacidade de uma população de parasitos em sobreviver a doses de anti-helmínticos que poderiam ser letais para populações susceptíveis.

Outra definição de resistência anti-helmíntica é a mudança genética na habilidade do parasito em sobreviver a tratamentos nas doses recomendadas da droga, ou seja, os helmintos gastrintestinais herdam a habilidade de sobreviver e evitar os efeitos tóxicos das drogas após administrações repetidas (VÁRADY et al., 2011).

A partir das evidências de resistência às drogas, os registros de problemas com a helmintoses gastrintestinais começaram a ser mais comuns, incluindo relatos de resistência múltipla. Van Wyk et al., (1999) descreveram uma população de *H. contortus* resistente a cinco grandes grupos de anti-helmínticos, incluindo a moxidectina. Atualmente, é comum encontrar resistência às lactonas macrocíclicas e outros grupos químicos no Brasil e no mundo (VERÍSSIMO et al., 2012).

Quando a resistência anti-helmíntica ocorre entre produtos do mesmo grupo químico é chamada de lateral. Ocorrendo entre duas drogas, de grupos diferentes, este fenômeno é chamado de resistência anti-helmíntica cruzada. A resistência anti-helmíntica múltipla (RAM)

ocorre quando um parasito é resistente a mais de duas bases farmacológicas (MOLENTO, 2011).

Atualmente já existem relatos de resistência múltipla a drogas (RMD) em várias regiões do Brasil, como Sul (CEZAR et al., 2010), Sudeste (VERÍSSIMO et al., 2012) e Centro-Oeste (SCZESNY-MORAIS et al., 2010), ressaltando a gravidade desse problema. Conforme verificado em testes de eficácia a campo, 100% das propriedades já apresentam RMD (VERÍSSIMO et al., 2012). O primeiro relato brasileiro do *Haemonchus contortus* resistente aos benzimidazóis em ovinos foi publicado no Rio Grande do Sul por Santos e Gonçalves, (1967).

No Ceará (VIEIRA et al., 1992), observaram a presença de *H. contortus* resistente à ivermectina 1% e ao netobimin (derivado guanidínicos que se converte em fembendazol e albendazol) , em ovinos provenientes do Paraná e do Rio Grande do Sul. Também no Ceará MELO et al. (1998) registraram a presença de resistência anti-helmíntica em caprinos e ovinos, mais tarde Vieira e Cavalcante (1999), com caprinos, realizaram um levantamento em 34 rebanhos e observaram que em sete (20,6%) propriedades havia resistência aos anti-helmínticos do grupo dos imidazóis, em seis (17,6%) aos benzimidazóis e 12 (35,3%) revelaram resistência múltipla. Apenas em nove (26,5%) rebanhos, os nematódeos foram sensíveis aos anti-helmínticos avaliados.

Diversas pesquisas em populações de *H. contortus* resistente e sensível aos benzimidazóis indicaram a ocorrência de diferenças específicas do DNA genômico destas populações (ROOS et al., 1990). KWA et al., (1994) demonstraram que a resistência aos benzimidazóis envolve uma mutação no aminoácido 200 e 167 (SILVESTRE & CABARET, 2002) (Fenilalanina/Tirosina) do gene isotipo 1 β -tubulina, que parece ser o maior implicado no mecanismo da resistência anti-helmíntica aos benzimidazóis.

H. contortus tem uma taxa de mutação do DNA mitocondrial dez vezes maior que nos vertebrados e o DNA nuclear extremamente diverso. Este parasito mostra grande variabilidade genética, tanto em uma população quanto entre populações geograficamente separadas, sendo encontrado em várias espécies de ruminantes desde os trópicos úmidos até as áreas de clima com temperaturas mais frias. Além disso, apresenta uma elevada prolificidade, sua fêmea pode chegar a eliminar mais de 10.000 ovos/dia. O tamanho da sua população efetiva é enorme, sendo mais encontrada no meio do que nos seus hospedeiros (PRICHARD, 2001).

A resistência em nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes assume perfil cosmopolita. O controle eficiente destes parasitos e o diagnóstico precoce da resistência anti-helmíntica, especialmente em *Haemonchus contortus*, devem ser preconizados a fim de viabilizar economicamente a criação de ovinos e caprinos. O conhecimento dos vários aspectos genéticos deste fenômeno poderá aumentar a vida útil dos fármacos atualmente utilizados, e conseqüentemente tentar preservar a susceptibilidade dos parasitos, principalmente nas populações onde os alelos para resistência apresentam baixa prevalência (VIEIRA et al., 2001).

Os compostos anti-helmínticos devem ser respeitados como recursos preciosos para serem usados frugalmente e estrategicamente, porque o uso excessivo de qualquer ferramenta pode torná-la sem efeito. É importante salientar que, para a indústria farmacêutica, a busca por novas moléculas anti-helmínticas que venham a colaborar com o rodízio com as atuais drogas é um processo difícil, oneroso e uma possibilidade considerada remota nos próximos anos (GEARY, 2013), portanto a pesquisa de formas alternativas para o controle das helmintoses gastrintestinais torna-se imprescindível.

2.1.2.1 – HISTÓRICO DA RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA

2.1.2.1.1 – NO MUNDO

Inicialmente os relatos de resistência dos nematódeos gastrintestinais aos anti-helmínticos foram descrita no Texas, Estados Unidos (DRUDGE et al., 1964; THEODORIDES et al., 1970, ANDERSEN & CHRISTOFFERSON, 1973, GEORGE et al., 2011; KAPLAN & VIDYASHANKAR, 2012). Posteriormente foram feitos outros relatos na Austrália (McGREGOR et al., 1980; HALL et al., 1981; BARTON et al., 1985), Nova Zelândia (KETTLE et al., 1983; BADGER & McKENNA, 1990), França (KERBOUEF & HUBERT, 1985), Inglaterra (HUNT et al., 1994), Malásia (DORNY et al., 1994) e Tailândia (KOCHAPAKDEE et al., 1995).

Recentemente os relatos de resistência anti-helmíntica em nematódeos de pequenos ruminantes para os três grupos de drogas mais comumente utilizados, BZs, LEV e LMs, têm crescido rapidamente em diferentes regiões do mundo, incluindo América do Sul (MOLENTO et al., 2011, TORRES-ACOSTA et al., 2012), África do Sul (VAN WYK et al. 1999), Austrália (LOVE & COLES, 2002), Nova Zelândia (McKENNA, 2010) e Europa (PAPADOPOULOS et al., 2012), representando uma séria ameaça à produção animal, desde então, esse problema vem sendo detectado no mundo (ALKA et al., 2004; LE JAMBRE et

al., 2005; SARGISON et al., 2007; PALCY et al., 2010; GEORGE et al., 2011; KAPLAN e VIDYASHANKAR, 2012).

2.1.2.1.2 – NO BRASIL

No Brasil, o primeiro relato de resistência anti-helmíntica a benzimidazóis foi no Rio Grande do Sul (DOS SANTOS & GONÇALVES, 1967). Nesta região também foi feito o primeiro relato de nematódeos resistentes à ivermectina (ECHEVARRIA & TRINDADE, 1989).

No nordeste a primeira suspeita de nematódeos gastrintestinais resistentes aos anti-helmínticos foi descrita por Vieira (1989) no estado do Ceará em caprinos, na mesma espécie posteriormente em Pernambuco, à levamisol, albendazol e parbendazol (CHARLES et al., 1989; BARRETO & SILVA, 1999), confirmados em levantamento realizado por Pompeu e Padilha (1999), em 169 propriedades pertencentes a 28 municípios, envolvendo quatro microrregiões que compõem as principais bacias leiteiras da mesorregião agreste do estado de Pernambuco.

Depois destes relatos surgiram outras pesquisas em Alagoas (AHID et al., 2007), Maranhão (BRITO et al., 2009), Paraíba (RODRIGUES et al., 2007), Pernambuco (SANTOS et al., 1993; LIMA et al., 2010_a), Rio Grande do Norte (PEREIRA et al., 2008; COELHO et al., 2010), Piauí (COSTA JÚNIOR et al., 2005). Especialmente no Ceará, existem alguns trabalhos que relataram a RA, em sua maioria a benzimidazóis (VIEIRA; CAVALCANTE, 1999; MELO et al., 2003; MELO et al., 2004; MELO et al., 2009)

Os relatos de resistência múltipla a drogas (RMD) no Brasil vem aumentando em vários locais, como as regiões Sul (CEZAR et al., 2010), Sudeste (VERÍSSIMO et al., 2012) e Centro-Oeste (SCZESNY-MORAES et al., 2010), evidenciam a gravidade desse problema. Conforme verificado em testes de eficácia a campo, 100% das propriedades já apresentam RMD (VERÍSSIMO et al., 2012).

2.1.2.2 – MECANISMO DE INSTALAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA

Existem três componentes envolvidos na formação da resistência anti-helmíntica. Inicialmente ocorre o estabelecimento da resistência, que sofre ampla influência do tamanho e da diversidade da população parasitária, sendo uma fase na qual não se tem controle quanto ao estabelecimento da resistência. Segue-se o desenvolvimento, conseqüente à utilização dos agentes selecionadores como os compostos químicos, nesta situação, aqueles com ação anti-

helmíntica. A pressão de seleção exercida pelo uso frequente de anti-helmínticos levará a um aumento numérico de alelos resistentes. Finalmente, diante da continuidade deste processo, sucede-se a dispersão dos genes na população helmíntica, culminando com a manifestação da resistência, evidenciando-se as falhas no controle que se constituem no primeiro sinal da resistência anti-helmíntica (SUTHERST & COMINS, 1979; BARNES & DOBSON, 1990; HUMBERT et al., 2001; SANGSTER, 2001; MELO & BEVILAQUA, 2003; MELO, 2005; MOLENTO, 2005).

Apesar das formas alternativas de controle para helmintoses gastrintestinais em pequenos ruminantes, o uso quase exclusivamente de anti-helmínticos é ainda fortemente empregado, caracterizando-se como agente seletivo (SANGSTER, 2001). Sem falar das falhas desta alternativa, o uso frequente e continuado de uma mesma base farmacológica como também rotação rápida de principio ativo são inevitáveis (FORTES et al., 2013).

Segundo Molento (2004), a RA pode ser agravada pela frequência de tratamentos anti-helmínticos e a aquisição de animais infectados. Acrescenta-se ainda o uso de subdoses, que também pode ser um fator para a formação da RA (VIEIRA et al., 2001), associado à falta de exames coproparasitológicos para monitoramento da eficácia dos produtos utilizados.

A resistência a drogas anti-helmínticas é um fato crescente e difundido em todo mundo (CUNHA FILHO et al., 1998). A indústria farmacêutica vem, historicamente, encarando este desafio com o desenvolvimento de drogas que incluem os modernos antiparasitários de amplo espectro e alto poder residual.

O aumento da resistência anti-helmíntica é o resultado de trocas gênicas causadas pelo cruzamento daqueles que sobreviveram à exposição a droga (ECHEVARRIA, 1996). Os organismos resistentes passam os seus alelos para os seus descendentes. A frequência e intensidade do tratamento, aliada a maior ou menor disseminação dos alelos para resistência na população de parasitos, determinam a taxa de seleção da resistência (PRICHARD, 2001).

O parasito abomasal, *Haemonchus contortus*, é o maior responsável pelo rápido desenvolvimento da resistência em nematódeos de pequenos ruminantes (SANGSTER, 2001), provavelmente, devido ao seu alto potencial biótico (ECHEVARRIA & TRINDADE, 1989), grande variabilidade genética e por albergar o alelo que causa a diminuição da susceptibilidade a uma droga (BLACKHALL et al., 2011).

Objetivando retardar o surgimento da resistência, o uso de testes sensíveis para determinar o grau de eficácia de uma determinada droga, em uma população específica de parasitos, pode auxiliar o planejamento de estratégias de controle (TAYLOR et al., 2002),

como a simples opção de uso de compostos que ainda permaneçam eficazes. Contudo, mesmo sendo de fundamental importância, o diagnóstico da resistência anti-helmíntica, ou da redução de eficácia aos anti-helmínticos, ainda não é uma realidade bastante usada no campo (TORRES-ACOSTA et al., 2012).

2.1.2.3 – MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA PARA NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES

O monitoramento da eficácia dos produtos utilizados para o controle da infecção por helmintos gastrintestinais é uma das medidas imprescindíveis para se retardar o surgimento da resistência anti-helmíntica. Diversos métodos podem ser utilizados para este fim e de igual modo para detectar a presença de resistência anti-helmíntica em rebanhos. Testes *in vitro* e *in vivo* tem sido desenvolvidos cuja escolha deve ter como parâmetros os custos, a complexidade e consistência (CRAVEN et al., 1999; VÁRADY & CORBA, 1999; MELO & BEVILAQUA 2003; KAPLAN & VIDYASHANKAR, 2012; FORTES & MOLENTO, 2013; PEÑA-ESPINOZA et al., 2014).

Os testes *in vitro*, de maneira geral, baseiam-se na incubação de estágios de vida livre do parasito em uma série de concentrações do anti-helmíntico, seguido da avaliação de seus efeitos sobre os nematoides. Todavia, os relatos de testes *in vitro* padronizados até o momento são escassos (FORTES & MOLENTO, 2013), sendo atualmente disponíveis, principalmente, o teste da eclodibilidade de ovos (TEO), que avalia a eclosão; o teste de desenvolvimento larvar (TDL), avaliando o desenvolvimento; teste de motilidade e migração larvar que se baseia na avaliação da motilidade/migração das larvas e o teste de inibição da alimentação larvar, avaliando a alimentação (DEMELER et al., 2012; FORTES & MOLENTO, 2013).

Apesar de serem amplamente utilizados para monitorar resistência em nematódeos, os testes *in vivo* são onerosos e geralmente se caracterizam por baixa qualidade devido à variação interanimal e a farmacodinâmica da droga e, em determinadas situações, inviáveis para utilização a campo pela necessidade de sacrifício dos animais, como é o caso do teste *in vivo* controlado (CRAVEN et al., 1999, MELO & BEVILAQUA 2003; FORTES & MOLENTO, 2013). Desta forma, o teste fenotípico indireto *in vivo* de redução na contagem de ovos nas fezes (TRCOF) continua sendo o principal método de escolha para a detecção de resistência (COLES et al., 1992; MELO & BEVILAQUA, 2003; KAPLAN & VIDYASHANKAR, 2012; FORTES & MOLENTO, 2013), sendo amplamente aceito por

agências reguladoras e pela própria indústria farmacêutica, bem como para publicações científicas (FORTES & MOLENTO, 2013).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) apresenta uma série de vantagens em relação aos métodos clássicos *in vitro* e *in vivo*, sendo altamente específica e sensível, permitindo imediata estimativa da resistência aos benzimidazóis, além de demonstrar a frequência dos alelos para resistência nas espécies *T. colubriformis*, *T. circumcincta* e *H. contortus* (ELARD et al., 1999; SILVESTRE & HUMBERT, 2000; SANGSTER, 2001; MELO & BEVILAQUA, 2003).

Segundo Fortes & Molento, (2013), o desenvolvimento de técnicas moleculares a partir de alterações genômicas gerou avanços consideráveis nessa área de investigação, com o uso de mutações nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina como principais SNPs - polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphisms*) associados à resistência aos benzimidazóis. Essas mutações podem, então, ser utilizadas como marcadores para a detecção de resistência aos BZs em nematódeos tricostrongilídeos.

A alteração no códon 200 geralmente é a mais comum relacionada com as características da resistência. As cepas sensíveis e resistente aos benzimidazóis são caracterizadas, respectivamente, pela presença do aminoácido fenilalanina ou tirosina na posição 200 do gene da β -tubulina (ELARD et al., 1999). Helmintos sensíveis aos benzimidazóis apresentam o códon TTC na posição 200, ou seja, uma fenilalanina. A substituição da segunda timina por uma adenina causa alteração no códon, deixando de ser uma fenilalanina e tornando-se uma tirosina, podendo caracterizar o polimorfismo de resistência (RUFENER et al., 2009; BLACKHALL et al., 2011; BARRÈRE et al., 2012).

2.1.3 – ALTERNATIVAS DE CONTROLE DAS HELMINTOSES

É necessário implementação de programas integrados de controle parasitário, que assegurem saúde e segurança dos organismos vivos, por meio de tratamentos estratégicos baseados na epidemiologia, eliminação de vermifugações desnecessárias (ARAÚJO et al., 2004).

O controle integrado de parasitos (CIP) é o conjunto de medidas estratégicas adotadas que objetivam principalmente reduzir a infecção dos animais e contaminação da pastagem, assim como manter a eficácia das drogas antiparasitárias, retardando o surgimento da resistência anti-helmíntica. O CIP requer componentes importantes, como a disponibilidade de técnicas para o diagnóstico de resistência anti-helmíntica, verificação da eficiência dos anti-helmínticos, conhecimento da epidemiologia parasitária local e uma troca na mentalidade

de técnicos e produtores para utilizar métodos menos dependentes dos anti-helmínticos. A dependência de anti-helmínticos comerciais no controle dos nematódeos gastrintestinais tem demonstrado ser pouco sustentável e eficiente ao longo prazo (MOLENTO, 2005).

Recentemente foram revisadas algumas das técnicas alternativas a serem utilizadas, no Brasil, para o CIP, incluindo o manejo do rebanho e de pastagens, pastoreio rotacionado, descontaminação prévia das pastagens, pastoreio com alternância de categorias e ou espécies de hospedeiros, controle biológico, seleção genética e nutrição (CEZAR et al., 2008).

Uma boa forma de controle alternativo é o biológico onde utiliza espécies que sejam prejudiciais direta ou indiretamente aos parasitos. Dentre as espécies mais utilizadas e que demonstraram resultados positivos destacam-se a espécie de fungo *Duddingtonia flagrans* e a espécie de besouro *Digitonthophagus gazella*. Este método de controle ainda enfrenta barreiras no que se refere a custo/benefício, aplicabilidade e segurança na obtenção de resultados (CEZAR et al., 2008).

O processo seletivo de animais resistentes ou seleção genética baseia-se na escolha de raças resistentes (puras ou cruzadas) ou animais mais resistentes dentro de uma raça e que se destaca em termos produtivos ou de mercado, entretanto a seleção para o caráter resistência pode implicar negativamente em características relacionadas à produção (CEZAR et al., 2008). Além disto, não se recomenda o uso continuado de uma mesma classe de anti-helmíntico, assim como a rápida rotação de compostos, a introdução de vermes resistentes e a utilização de doses inferiores às recomendadas. A identificação de marcadores relacionados à resistência genética dos hospedeiros aos parasitos, vem sendo um meio de seleção para tomada de decisões sobre cruzamentos raciais. Práticas de manejo que contribuam para o aumento da imunidade, também podem ser úteis para incrementar os níveis produtivos.

Atualmente, estudos vêm sendo realizados para se observar o efeito anti-helmíntico de algumas plantas ou produtos delas obtidos. MINHO (2006) estudou o efeito anti-helmíntico de taninos condensados presentes no extrato de Acácia (*Acácia molissima*) em cordeiros naturalmente infectados por *H. contortus*. Os animais receberam taninos condensados duas vezes, por via oral, com intervalo de 30 dias. Ao final de 55 dias de observação, os cordeiros foram sacrificados para a determinação da carga parasitária. Ocorreu redução significativa no número de OPG durante todo o período experimental e na carga parasitária dos ovinos que receberam a condensação de taninos (GENNARI & AMARANTE, 2006).

Entre os vegetais ricos em metabólitos secundários denominados taninos, as mais pesquisadas têm sido forrageiras leguminosas da família *Fabacea* (HOSTE et al., 2006). Os

taninos podem exercer ação anti-helmíntica direta, ao interferir no ciclo natural dos helmintos, ou indireta, ao proteger a proteína ingerida da degradação do rúmen (com incremento da disponibilidade protéica no trato gastrintestinal inferior), o que dificulta a determinação do seu real efeito anti-parasitário (BUTTER et al., 2000; KETZIS et al., 2006).

Atualmente Schafer et al. (2015) pesquisaram a resposta imune de ovinos infectados experimentalmente com *Haemonchus contortus* e parentalmente tratados com uma combinação de zinco e de cobre, tiveram como resultado que administração destes elementos foi capaz de aumentar a resposta imune perante a infecção de *Haemonchus contortus*.

Outra medida alternativa para pequenos rebanhos é a adoção do método Famacha (MALAN et al., 2001), no qual os animais são medicados de acordo com a coloração da mucosa ocular. Este método é uma boa alternativa de tratamento seletivo, uma vez que são vermifugados apenas os animais que apresentam anemia clínica (MOLENTO, 2005). Além disso, permite identificar animais susceptíveis, resilientes e resistentes, proporcionando informações para um programa de seleção. No momento da avaliação, se define a coloração da conjuntiva frente a um cartão ilustrativo que acompanha a técnica e se determina o grau de anemia dos animais. Neste cartão, estão presentes cinco categorias, variando de 1 (coloração vermelho brilhante) até 5 (coloração pálida, quase branco), que representam diferentes valores de hematócrito, sendo 35, 25, 20, 15 e 10%, respectivamente, para os grupos de 1 a 5 (BATH et al. 2001, VAN WYK, 2002). Baseado nesta comparação são tratados somente os animais que apresentam coloração de mucosas compatíveis com os graus 4 e 5 e, em alguns casos, com o grau 3. Este procedimento permite que haja persistência de uma população de parasitos sensíveis no meio ambiente, mantém a eficácia anti-helmíntica por um período maior e com isso, o aparecimento de RA tende a ser retardado (VIEIRA, 2008). Em adição, o método, proporciona uma economia média de 58,4% nos custos com a aquisição de anti-helmínticos (VAN WYK et al., 2002).

No Brasil, trabalhos realizados no Paraná e Rio Grande do Sul comprovaram a eficiência do método, diminuindo o número de tratamentos com anti-helmínticos e mantendo a eficácia dos produtos (MOLENTO et al., 2004). Estudos realizados no Nordeste em caprinos comprovaram a viabilidade do Método FAMACHA nessa espécie, no entanto a coloração da conjuntiva de caprinos sadios tem menor intensidade quando comparada com ovinos sadios e o preenchimento capilar nos caprinos é mais demorado que em ovinos, devendo ser observada a mucosa por pelo menos oito segundos após sua exposição, o que na espécie ovina é realizada de imediato (REIS, 2004). Além disso, no início do

experimento *Haemonchus* spp. foi o parasito mais freqüente, enquanto que após um período de um ano, houve uma predominância de *Trichostrongylus* spp., que não é controlado pelo Método Famacha (REIS, 2004).

Ainda existe como forma de controle parasitário em pequenos ruminantes o uso constante de drogas antiparasitárias pertencentes a grupos químicos, na maioria das vezes utilizados sem considerar a epidemiologia da região, os quais interferem diretamente na população parasitária ambiental e, conseqüentemente, na reinfecção do rebanho. Boa parte dos criadores não adota o esquema de vermifugação estratégica, nem realiza anualmente, de forma racional, a alternância dos grupos químicos utilizados, com isso, os endoparasitos desenvolvem rapidamente a resistência às drogas utilizadas (MOLENTO, 2004).

3 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHID, S. M. M.; SUASSUNA, A. C. D.; MAIA, M. B.; COSTA, V. M. M.; SOARES, H. S. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da região Oeste do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**. v.9, p.212-218, 2008.

ALKA, GOPAL, R. M.; SANDHU, K. S.; SIDHU, P. K. Efficacy of abamectin against ivermectina resistant strain of *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**. v.121, p.277-283, 2004.

ALMEIDA, M. A. O.; AYRES, M. C. C. SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. Considerações gerais sobre anti-helmínticos. In: **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2. ed. São Paulo: Guanabara Koogan. v.2, p.437-439, 1999.

AMARANTE, A. F. T. Why is it important to correctly identify *Haemonchus* species. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 20, p. 263–268, 2011.

ANDERSEN, F. L.; CHRISTOFFERSON, P. V. Efficacy of haloxon and thiabendazole against gastrointestinal nematodes in sheep and goats in the Edwards Plateau area of Texas. **American Veterinary Research**. v.34, p.1395-1398, 1973.

ARAÚJO, J. V.; GUIMARÃES, M. P.; CAMPOS, A. K.; SÁ, N. C.; SARTI, P.; ASSIS, C. L. Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. **Ciência Rural**. v.34, p.457-463, 2004.

BADGER, S. B.; McKENNA, P. B. Resistance to ivermectin in a field strain of *Ostertagia* spp. in goats. **New Zealand Veterinary Journal**. v.38, p.72-74, 1990.

BARRÈRE, V.; ALVAREZ, L.; SUAREZ, G.; CEBALLOS, L.; MORENO, L.; LANUSSE, C.; PRICHARD, R. K. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the β -tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**. v.186, p.344-349, 2012.

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, Salvador. **Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária**. p.160, 1999.

BARNES, E. H.; DOBSON, R. J. Population dynamics of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: Computer model stimulate grazing systems and the evaluation of anthelmintic resistance. **International Journal for Parasitology**. v 20, p.823-831, 1990.

BARTON, N. J.; TRAINOR, B. L.; URIE, J. S.; ATKINS, J. W.; PYMANS, M. F. S.; WOLSTENCROFT, I. R. Anthelmintic resistance in nematode parasites of goats. **Australian Veterinary Journal**. v.62, p.224-227, 1985.

BATH, G. F.; HANSEN, J. W.; KRECEK, R. C.; VAN WYK, J. A.; VATTA, A. F. Sustainable approaches for managing haemonchosis in sheep and goats. FAO (Technical Cooperation Project No TCP/SAF/8821A), FAO. 2001.

BEVILÁQUA, C. M. L.; MELO, A. C. F. L. Eficácia antihelmíntica a base de oxfendazol e ivermectin em ovinos no Estado do Ceará, Brasil. **Revista Ciência Rural**. v. 33, 2003.

BLACKHALL, W. J.; POULIOT, J. F.; PRICHARD, R. K.; BEECH, R. N. *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin and moxidectin selected strains. **Experimental Parasitology**. v.90, n. 1, p.42-48, 1998.

BLACKHALL, W. J.; KUZMINA, T.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. β -tubulin genotypes in six species of cyathostomins from anthelmintic-naïve Przewalski and benzimidazole-resistant brood horses in Ukraine. **Parasitology Research**. DOI: 10.1007/s00436-011-2426-0, 2011.

BUTTER, N. L.; DAWSON, J. M.; WAKELIN, D. Effect of dietary tannin and protein concentration on nematode infection (*Trichostrongylus columbriformis*) in lambs. **Journal of Agricultural Science**. v.134, p.89-99, 2000.

CEZAR, A. E.; CATTO, J. B.; BIANCHIN, I. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. **Ciência Rural**. v.38, n.7, p. 2083-2091. 2008.

CEZAR, A. S.; VOGEL, F. S. F.; SANGIONI, L. A.; ANTONELLO, A. M.; CAMILLO, G.; TOSCAN, G.; ARAÚJO, L. O. Ação anti-helmíntica de diferentes formulações de lactonas macrocíclicas em cepas resistentes de nematódeos de bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.30, p.523–528, 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**. v.62, p.1-6, 2013.

CHANDRAWATHANI, P.; YUSOFF, N.; WAN, L. C.; HAM, A.; WALLER, P. J. Total anthelmintic failure to control nematode parasites of small ruminants on government breeding farms in Sabah, East Malaysia. **Veterinary Research Communications**. v. 28, n. 6, p. 479-489, 2004.

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.

COELHO, W.A.C.; AHID, S.M.M.; VIEIRA, L.S.; FONSECA, Z.A.A.S.; SILVA, I.P. Resistencia anti-helmíntica em caprinos no município de Mossoró, RN. **Ciência Animal Brasileira**. v.11, n.3, p.589-599,2010.

COLES, G. C.; BAUER C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**. v.44, p.35-44, 1992.

COSTA JUNIOR, G. S.; MENDONÇA, I. L.; CAMPELO, J.E.G.; CAVALCANTE, R.R.; FILHO, L.A.D.; NASCIMENTO, I.M.R.; ALMEIDA, E.C.S.; CHEVES, R.M. Efeito de vermifugação estratégica, com princípio ativo à base de ivermectina na incidência de parasitos gastrintestinais na rebanho caprino da UFPI. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, n.4, p.279-286, 2005.

CRAVEN, J.; BJORN, H.; BARNES, E. H.; HENRIKSEN, S. A.; NANSEN, P. A comparison of in vitro tests and faecal egg count reduction test in detecting anthelmintic resistance in horse strongyles. **Veterinary Parasitology**. v.85, p.49- 59, 1999.

CUNHA FILHO, L. F. C.; YAMAMURA, M. H.; PEREIRA, A. B. L. Resistência a anti-helmínticos em ovinos da região de Londrina Brasil. **Semina**. v.19, p.31-37, 1998.

DEMELER, J.; KLEINSCHMIDT, N.; KÜTTLER, U.; KOOPMANN, R.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Evaluation of the Egg Hatch Assay and the Larval Migration Inhibition Assay to detect anthelmintic resistance in cattle parasitic nematodes on farms. **Veterinary Parasitology**. v.61, p.614-618, 2012.

DORNY, P.; CLAEREBOUT, E.; VERCRUYSSSE, J.; SANI, R.; JALILA, A. Anthelmintic resistance in peninsular Malaysia. **Veterinary Parasitology**. v. 55, p.327-342, 1994.

DOS SANTOS, V. T.; GONÇALVES, P. C. Verificação de estirpes de *Haemonchus contortus* resistentes ao thiabendazole no Rio Grande do Sul (Brasil). **Revista da Faculdade Agronomia e Veterinária**. v. 9, p.201-211, 1967.

DRUDGE, J. H.; SZANTO, J.; WYATT, Z. N.; ELAM, G. Field studies on parasite control in sheep: comparison of thiabendazole, ruelene and phenotiazine. **American Journal of Veterinary Research**. v.25. p.1512-1518, 1964.

DUARTE, E. R.; SILVA, R. B.; VASCONCELOS, V. O.; NOGUEIRA, F. A.; OLIVEIRA, N. J. F. Diagnóstico do controle e perfil de sensibilidade de nematódeos de ovinos ao albendazol e ao levamisol no norte de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.32, p.147-152, 2012.

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. A. M.; BORBA, M. F. S. A.; PINHEIRO, A.; WALLER, B.; HANSEN J. W. C. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brasil. **Veterinary Parasitology**. v.62, p.199-206, 1996.

ELARD, L.; CABARET, J.; HUMBERT, J. F. PCR diagnosis of benzimidazole susceptibility or resistance in natural populations of the small ruminant parasite, *Teladorsagia circumcincta*. **Veterinary Parasitology**. v.80, p.231-237, 1999.

FAUSTO, G. C.; PIVOTO, F. L.; COSTA, M. M.; LOPES, S. T. A.; FRANÇA, R. T.; MOLENTO, M. B.; MINERVINO, A. H. H.; ROCHA, J. B. T.; LEAL, M. L. R. Protein profile of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* and supplemented with selenium and copper, **Parasites & Vectors**.v.7,n.1,p.355-341, 2014.

FORTES, F. S.; KLOSTER, F. S.; SCHAFER, A. S.; BIER, D.; BUZATTI, A.; YOSHITANI, U. Y.; MOLENTO, M. B. Evaluation of resistance in a selected field strain of *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin using the Larval Migration on Agar Test. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33, p.183-187, 2013.

GEARY T. Comunicação pessoal (**Institute of Parasitology**. McGill University, Canada), 2013.

GEORGE, N.; ERSAD, K.; SAGAM, R.; OFFIAH, V. N.; ADESIYUN, A. A.; HAREWOOD, W.; LAMBIE, N.; BASU, A. K. Efficacy of commonly used anthelmintics: First report of multiple drug resistance in gastrointestinal nematodes of sheep in Trinidad. **Veterinary Parasitology**. v.183, p.194-197, 2011.

GENNARI, S. M.; AMARANTE, A. F. T. Helminhos de ovinos e caprinos. **Biológico**, São Paulo, v.68, p.13-17, 2006.

HALL, C. A.; KELLY, J. D.; WHITLOCK, H. V. Prolonged effect of closantel and disophenol against thiabendazole selected resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. **Research in Veterinary Science**. v.31, p.104-306, 1981.

HOSTE, H.; RULIE, A. C.; PREVOT, F.; BERGEAUD, J. P.; GRISEZ, C.; DE LA FARGE, F.; JACQUIET, P.; DORCHIES, P. Differences in receptivity to gastrointestinal infections with nematodes in dairy ewes: Influence of age and of the level of milk production. **Small Ruminant Research**. v.63, p.150-155, 2006.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Record**. v.130, p.442-446, 1992.

HUMBERT, J. F.; CABARET, J.; ELARD, L.; LEIGNEL, V.; SILVESTRE, A. Molecular approaches to studying benzimidazole resistance in trichostrongylid nematode parasites of small ruminants. **Veterinary Parasitology**. v.101, p.405-414. 2001.

HUNT K. R.; HONG, C.; COLES, G. C.; JONES, T. O. Benzimidazole resistant *Trichostrongylus colubriformis* from goats in Central England. **Veterinary Record**. v.16, p.420-422. 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE.
Pesquisa Pecuária Municipal. 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE.
Pesquisa Pecuária Municipal. 2013.

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.; MASER, P. A new class of anthelmintics effective against drug resistant nematodes. **Nature**. v.452, p.176-180, 2008.

KAPLAN, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**. v. 20, p. 477–481, 2004.

KAPLAN, R. M.; VIDYASHANKAR, A. N. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**. v.186, p.70-78, 2012.

KERBOUEF, D.; HUBERT, J. Benzimidazole resistance of field strains of nematodes from goats in France. **Veterinary Record**. v.116, p.133, 1985.

KETTLE, P. R.; VLASSOFF, A.; REID, T. C.; HORTON, C. T. A survey of nematode control of measures used by milking goat farmers and of anthelmintic resistance on their farms. **New Zealand Veterinary Journal**. v.31, p.139-143, 1983.

KETZIS, J. K.; VERCRUYSSSE, J.; STROMBERG, B. E.; LARSEN, M.; ATHANASIADOU, S.; HOUDIJK, J. G.. Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminth control strategies in ruminants. **Veterinary Parasitology**. v.139, p. 321-335, 2006.

KOCHAPAKDEE, S.; PANDEY, V. S.; PRALOMKAM, W.; CHOLDUMRONGKUL, S.; NGAMPONGSAI, W.; LAWPETCHARA, A. Anthelmintic resistance in goats in southern Thailand. **Veterinary Record**. v.137, p.124-125,1995.

KWA, M. S.; VEENSTRA, J. G.; ROOS, M. H. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in β -tubulin isotype 1. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 63, p. 299-303, 1994.

LE JAMBRE.; L. F.; GEOGHEGAN, J.; LYNDAL-MURPHY, M. Characterization of moxidectin resistant *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus*. **Veterinary Parasitology**. v.128, p.83- 90, 2005.

LEVECKE, B.; DOBSON, R.J.; SPEYBROECK, N.; VERCRUYSSSE, 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.

LEWIS, M. J.; TURCO, S. J.; GREEN, M. Structure and assembly of the endoplasmic reticulum: Biosynthetic sorting of endoplasmic reticulum proteins. **Journal of Cell Science**. v.260, p.6926-6931, 1985.

LIMA, M. M.; FARIAS, M. P. O. F.; ROMEIRO, E. T.; FERREIRA, D. R. A.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Eficácia da Moxidectina, ivermectina e albendazole contra helmintos gastrointestinais em propriedades de criação caprina e ovina no estado de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**. Goiânia, v. 11, n. 1, p. 94-100, 2010_a.

LIMA, W.C.; ATHAYDE, A.C.R.; MEDEIROS, G.R.; DAYANNE, A.S.D.; BORBUREMA, J.B.; SANTOS, E.M.; VILELA, V.L.R.; AZEVEDO, S.S. Nematódeos resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.12, p.1003-1009, 2010_b.

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**. v.58, p.121-129, 2010.

LOVE S, J. C.; COLES, G. C. Anthelmintic resistance in sheep worms in New South Wales, Australia. **Veterinary Record**. v.150, p.87, 2002.

MALAN, F. S.; VAN WYK, J. A.; WESSELS, C. D.; Clinical evaluation of anaemia in sheep: early trials, **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. v.68, p.165-174, 2001.

MARTÍNEZ-VALLADARES, M.; MARTÍNEZ-PÉREZ, J. M.; ROBLES-PÉREZ, D.; CORDERO-PÉREZ, C.; FAMULARO, M. R.; FERNÁNDEZ-PATO, N.; CASTAÑÓN-ORDÓÑEZ, L.; ROJO-VÁZQUEZ F. A. The present status of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematode infections of sheep in the northwest of Spain by *in vivo* and *in vitro* techniques. **Veterinary Parasitology**. v.191, p.177-181, 2013.

McGREGOR, B. A.; ADOLPH, A. J.; CAMPBELL, N. J. Occurrence of anthelmintic resistance in goats in Victoria. **Australian Society of Animal Production**. v.13, p.159. 1980.

McKENNA, P. B. Update on the prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**. v.58, p.172-173, 2010.

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L.; VILLAROEL, A. S. & GIRÃO M. D. Resistência a anti-helmínticos em nematóides gastrintestinais de ovinos e caprinos, no município de Pentecoste, Estado do Ceará. **Ciência Animal**. v.8, p.7-11, 1989.

MELO, A. C. F. L.; 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, p. 339-344, 2003.

MELO, A.C.F.L.; RONDON F.C.M.; REIS I.F.; BEVILAQUA, C.M.L. Desenvolvimento da resistência ao oxfendazol em propriedades rurais de ovinos na região do baixo e médio Jaguaribe, Ceará, Brasil. **Revista Parasitologia Veterinária**. v.13, p.137-141. 2004.

MELO, A.C.F.L.; BEVILAQUA, C.M.L.; REIS, I.F. Resistência aos anti-helmínticos benzimidazóis em nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes do semiárido nordestino brasileiro. **Ciência Animal Brasileira**. v.10, n.1, p.294-300. 2009.

MELO, L.R.B.; VILELA, V.L.R.; FEITOSA, T.F.; ALMEIDA NETO, J.L.; MORAIS, D.F. Resistência anti-helmíntica em pequenos ruminantes do semiárido da Paraíba, Brasil, **Ars Veterinária**. v.29, 2013.

MOLENTO, M. B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.13, p.82-85, 2004.

MOLENTO, M. B. Resistência parasitária em helmintos de equinos e propostas de manejo. **Ciência Rural**. v.35, p. 1469-1477, 2005.

MOLENTO, M. B.; FORTES, F. S.; PONDELEK, D. A. S.; BORGES, F. A.; CHAGAS, A. C. S.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; GELDHOF, P. Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. **Veterinary Parasitology**. v.180, p.126-132, 2011.

MOLENTO, M. B.; VERÍSSIMO, C. J.; AMARANTE, A. T.; WYK, J. A. VAN.; CHAGAS, A. C. S.; ARAÚJO, J. V.; DE BORGES, F. A. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.80, p. 253-263, 2013.

MINHO, A. P.; BUENO, I. C. S.; LOUVANDINI, H.; JACKSON, F.; GENNARI, S. M.; ABDALLA, A. L. Potential uses of acacia tannin extract to control gastrointestinal parasites in sheep. **Animal Feed Science**. 2006.

PALCY, C.; SILVESTRE, A.; SAUVE, C.; CORTET, J.; CABARET, J. Benzimidazole resistance in *Trichostrongylus axei* in sheep: long-term monitoring of affected sheep and genotypic evaluation of the parasite. **Veterinary Journal** . v.183, p.68-74, 2010.

PEÑA-ESPINOZA, M.; THAMSBORG, S. M.; DEMELER, J.; ENEMARK, H. L. 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.A.; AHID, S.M.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 caprinos e ovino do RN. *Acta Veterinária Brasilica*, v.2, n.1,p.16-19, 2008.

POMPEU, J.; PADILHA, T. N. Utilização de anti-helmínticos nas principais bacias leiteiras da mesorregião Agreste do Estado de Pernambuco – Brasil, **SEMINARIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINARIA**, 1999.

PRICHARD, R. K. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trends in Parasitology**. v.17, p.445-452, 2001.

RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; SOUZA, A. P.; AVILA, V. S.; COUTINHO, G. C.; DALAGNOL, C. A. et al. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no planalto Catarinense. **Ciência Rural**. Santa Maria, RS, v. 34, p.889-1895, 2004.

REIS, I. F. Controle de nematóides gastrintestinais em pequenos ruminantes: método estratégico *versus* Famacha©. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2004.

ROOS, M. H.; BOERSEMA, J. H.; BORGSTEED, F. H. M.; CORNELISSEN, I.; TAYLOR, M.; RUITENBERG, E. I. Molecular analysis of selection for benzimidazole resistance in sheep parasite *Haemonchus contortus*. **Molecular Biochemical Parasitology**. v. 43, p. 77-88. 1990.

RODRIGUES, A.B.; ATHAYDE, A.C.R.; RODRIGUES, O.G.; SILVA. W.W.; FARIA, E.B. Sensibilidade dos nematóides gastrintestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.27,n.4, p.162-166, 2007.

ROOS, M. H.; BOERSEMA, J.H.; BORGSTEED, F. H. M.; CORNELISSEN, I.; TAYLOR, M.; RUITENBERG, E.I. Molecular analysis of selection for benzimidazole resistance in sheep parasite *Haemonchus contortus*. **Molecular Biochemical Parasitology**. v.43, p.77-88. 1980

ROSALINSKI-MORAES, F.; FERNANDES, F. G.; MUNARETTO, A.; DE OLIVEIRA, S.; WILMSEN, M. O.; PEREIRA, M. W.; MEIRELLES, A. C. F. Método FAMACHA©, escore corporal e de diarreia como indicadores de tratamento anti-helmíntico seletivo de ovelhas em reprodução. **Bioscience Journal**. v.28, p.1015-1023, 2012.

RAUFENER, L.; KAMINSKY, R.; MASER, P. In vitro selection of *Haemonchus contortus* for benzimidazole resistance reveals a mutation at amino acid 198 of β -tubulin. **Molecular Biochemical Parasitology**. v.168, p.120-122, 2009.

SANGSTER, N. C. Managing parasiticide resistance. **Veterinary Parasitology**. v.98, p. 89-109, 2001.

SANGSTER, N. C.; WHITLOCK, H. V.; RUSS, I. G.; GUNAWAN, M.; GRIFFIN, D. L.; KELLY, J. D. *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* resistant to levamisole, morantel tartrate and thiabendazole: occurrence of field strains. **Research in Veterinary Science**. v.27, p.106-110, 1979.

SARGINSON, N. D.; JACKSON, F.; BARTLEY, D. J.; WILSON, D. J.; STENHOUSE, L. J.; PENNY, C. D. Observations on the emergence of multiple anthelmintic resistance in sheep flocks in the south-east of Scotland. **Veterinary Parasitology**. v. 145, p. 65-76, 2007.

SCHAFER, A. S.; LEAL, M. L. R.; MOLENTO, M. B.; AIRES, A. R.; DUARTE, M. M. M. F.; CARVALHO, F. B.; TONIN, A. A.; SCHMIDT, L.; FLORES, E. M. M.; FRANÇA, R. T.; GRANDO, T. H.; MINHO, A. P.; KRAUSE, A.; ANTONIAZZI, A. Q.; LOPES, S. T. A. Immune response of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* and parenterally treated with a combination of zinc and copper. **Small Ruminant Research**, Amsterdam. v. 123, p.183-188, 2015.

SCZESNY-MORAES, E. A.; BIANCHIN, I.; SILVA, K. F.; CATTO, J. B.; HONER, M. R.; PAIVA, F. Resistência anti-helmíntica de nematóides gastrointestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30, p. 229-236, 2010.

SILVA, W. W.; BEVILAQUA, C. M. L.; RODRIGUES, M. L. A. Variação sazonal de nematóides gastrintestinais em caprinos traçadores no semi-árido Paraibano – Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.12, p. 71-75, 2004.

SILVESTRE, A.; CABARET, J. Mutation in position 167 of isotype 1 β -tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance - **Molecular and Biochemical Parasitology**. v.120, p.297-300, 2002.

SPRENGER, L. K.; DO AMARAL, C. H.; FILHO, R. V. L.; AGUIAR, T. N.; MOLENTO, M. B. Eficácia do fosfato de levamisol em nematódeos gastrintestinais de caprinos e ovinos. **Archives of Veterinary Science**. v.18, p.29-39, 2013

SUTHERLAND, I. A.; LEE, D. L. A larval paralysis assay for the detection of thiabendazole resistance in trichostrongyles. **Parasitology**. v.100, p.131-135.1990.

TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**. v.103, p.183-194, 2002.

THEODORIDES, V. J.; SCOTT, G. C.; LANDERMAN, M. Strains of *Haemonchus contortus* resistant against benzimidazole anthelmintic. **American Journal of Veterinary Research**. v.31, p.857-863, 1970.

TORRES-ACOSTA, J. F. J.; MENDOZA DE GIVES, P.; AGUILAR-CABALALLERO, 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 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.; STENSON, S. O.; VAN DER MREWE, J. S.; VORDSETR, R. J.; VILJOEN, P. G. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. v. 66, p. 273-284, 1999.

VÁRADY, M.; CORBA, J. Comparison of six in vitro tests in determining benzimidazole and levamisole resistance in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* of sheep. **Veterinary Parasitology**. v.80, p.239-249, 1999.

VÁRADY, M.; PAPADOPOULOS, E.; DOLINSKA, M.; KONIGOVÁ, A. Anthelmintic resistance in parasites of small ruminants: sheep versus goats. **Helminthologia**. v. 48, p. 137-144, 2011.

VERÍSSIMO, C.J.; NICIURA, S.C.; ALBERTI, A.L.; RODRIGUES, C.F.; BARBOSA, C.M.; CHIEBAO, D.P.; CARDOSO, D.; DA SILVA, G.S.; PEREIRA J.R.; MARGATHO, L.F.; DA COSTA R.L.; NARDON, R.F.; UENO T.E.; CURCI V.C.; MOLENTO M.B. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.187, p. 209-216, 2012.

VIEIRA, L. S. Atividade ovicida in vitro e in vivo dos benzimidazóis: oxfendazole, fenbendazole, albendazole e thiabendazole em nematodeos gastrintestinais de caprinos. 1986. 115 f. Tese, (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Departamento de Ciências animais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1986.

VIEIRA, L. S. Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Revista Ciência e Tecnológica Agropecuária**. v.2, p.28-31, 2008.

VIEIRA, L. S.; BERNE, M. E. A.; CAVALCANTE, A. C.; COSTA, C. A.; *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 antihelmíntica em rebanhos caprinos no estado do Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.19, p.19-103, 1999.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R.; XIMENDES, L. F. Epidemiologia e controle das principais parasitoses de caprinos nas regiões semi-áridas do Nordeste. Sobral: **EMBRAPA-CNPC**. 2001.

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.

4 ARTIGOS

ARTIGO 1

Detecção de DNA de resistência anti-helmíntica para benzimidazóis em *Haemonchus contortus* de caprinos e ovinos do estado de Pernambuco

(FORMATADO PARA O PERÍODICO PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA)

Detecção de DNA para a resistência anti-helmíntica a benzimidazóis em *Haemonchus contortus* de caprinos e ovinos do estado de Pernambuco

ABSTRACT.- [Detection of DNA for anthelmintic resistance to benzimidazole in *Haemonchus contortus* of goats and sheep from state of Pernambuco - Brazil] Detecção de DNA para a resistência anti-helmíntica a benzimidazóis em *Haemonchus contortus* de caprinos e ovinos do estado de Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmaos, Recife, PE 52171-900, Brazil. E-mail: godoyrodolfo@hotmail.com

The Pernambuco state is a large national representative in sheep and goat farming, but suffered heavy losses in the production of this agro-economic exploitation caused by the high prevalence of gastrointestinal nematodes, particularly *Haemonchus contortus*, reaching derail the creations in some parts of the state due to the high morbidity and mortality, especially in young animals. The use of chemicals for the control of gastrointestinal helminths indiscriminately has favored the emergence of anthelmintic resistance (AR). Early diagnosis of AR is essential so that it can indicate control measures that economically enable the sheep and goat breeding. Thus, the aim of this study was to diagnose the (AR) to benzimidazole by polymerase chain reaction (PCR) in populations of *Haemonchus contortus* in sheep and goats of the Pernambuco state. specimens samples adult *Haemonchus contortus* were obtained from animals naturally infected with gastrointestinal helminths belonging to properties located in the cities of Recife, Sairé, Camocim de São Félix, Gameleira, Moreno, Bonito, and Serra Talhada, Pernambuco state. After sexing, separated pools of 20 helminth males for DNA extraction. For PCR were used primers F / 5` AAT GCT TCC ACC CTT GTC CAT C- 3` reverse: R / 5` CAA CAA CGG GCA TGA AGA AG - 3` for Research β - tubulin and NC1 / ITS-2 - F / 5'ACG TCT GGT TCA GGG GTT TT-3 'and R / 5' TTA TCT GTT TTT CCT GCC CT - 3 'for identification of helminth. Samples were subjected to sequencing looking for mutations in codon 200 of isotype 1 gene of β -tubulin A questionnaire composed of closed questions to obtain information on the management practices of the properties was applied. The results confirmed the presence of DNA responsible for anthelmintic benzimidazole resistance in all surveyed herds. These findings constitute the first record of molecular diagnosis of anthelmintic resistance in ruminants in Pernambuco and corroborate previous research using in vivo tests that detected the anthelmintic benzimidazole resistance in small ruminants in Pernambuco.

INDEX TERMS: molecular diagnostics, anthelmintic resistance, PCR.

Recebido em

Aceito para publicação em

² Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco(UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmaos, Recife, PE 52171-900 , Brasil. *Autor para correspondência: godoyrodolfo@hotmail.com.

³ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua dos Funcionários, 1540, Curitiba, PR - CEP: 80035-050

RESUMO – O estado Pernambuco é um grande representante nacional na ovinocaprinocultura, porém sofre grandes prejuízos na produção desta exploração agro-econômica provocado pela alta prevalência de nematódeos gastrintestinais, em especial o *Haemonchus contortus*, chegando a inviabilizar as criações em algumas regiões do Estado devido à alta morbidade e mortalidade, principalmente em animais jovens. A utilização de produtos químicos para o controle das helmintoses gastrintestinais de forma indiscriminada tem favorecido o surgimento da resistência anti-helmíntica (RA). O diagnóstico precoce da (RA) é imprescindível para que se possam indicar medidas de controle que viabilizem economicamente a criação de ovinos e caprinos. Assim, objetivou-se com este estudo diagnosticar a (RA) ao benzimidazóis pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em populações de *Haemonchus contortus* de ovinos e caprinos do estado de Pernambuco. Amostras de espécimes adultos de *Haemonchus contortus* foram obtidas de animais naturalmente parasitados por helmintos gastrintestinais pertencentes a propriedades localizadas nas cidades de Recife, Sairé, Camocim de São Félix, Gameleira, Moreno, Bonito, e Serra Talhada, estado de Pernambuco. Após a sexagem, separaram-se pools de 20 helmintos machos para extração DNA. Nas PCR realizadas, foram utilizados os primers F/5` AAT GCT ACC CTT TCC GTC CAT C- 3` reverse: R/5` CAA AAC CGG GCA TGA AGA AG - 3` para pesquisa da β - tubulina e para identificação dos helmintos NC1/ITS-2 - F/ 5`ACG TCT GGT TCA GGG TTG TT -3' e R/5' TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT - 3'. As amostras foram submetidas a sequenciamento buscando mutações no códon 200 do gene isotipo 1 da β -tubulina. Um questionário composto por questões fechadas, para obtenção de informações sobre as práticas de manejo das propriedades foi aplicado. Os resultados obtidos confirmaram a presença do DNA responsável pela resistência anti-helmíntica aos benzimidazóis em todos os rebanhos pesquisados. Estes achados constituem-se no primeiro registro de diagnóstico molecular da resistência anti-helmíntica em ruminantes em Pernambuco e corroboram pesquisas anteriores utilizando testes *in vivo* que detectaram a resistência anti-helmíntica aos benzimidazóis em pequenos ruminantes em Pernambuco.

Termos de indexação: diagnóstico molecular, resistência anti-helmíntica, PCR.

INTRODUÇÃO

Diversos fatores prejudicam economicamente as criações de ovinos e caprinos em diversas regiões do mundo, sendo as helmintoses gastrintestinais (HGI) um dos principais problemas sanitários em pequenos ruminantes em todos os continentes (Amarante 2011). A prevalência dos helmintos gastrintestinais é o principal fator que contribui para este quadro negativo, entre eles o gênero *Haemonchus*, sendo este heminto o mais patogênico e de grande variabilidade genética (Rosalinski-Moraes et al. 2012). A haemoncose pode levar à diminuição na produção de carne, leite, podendo ser observadas altas taxas de morbidade e mortalidade principalmente em animais jovens, representando, assim, uma séria ameaça à produção animal (Ahid et al. 2008, Molento 2011, Miller et al. 2012, Fortes & Molento 2013).

A importância das HGI como problema sanitário eleva-se principalmente pela dificuldade no controle, em função da rapidez com que os nematódeos desenvolvem resistência aos anti-helmínticos comerciais (Amarante 2011), devido à prática frequente do uso de drogas anti-helmínticas de forma indiscriminada. Os helmintos que sobrevivem a esse tratamento apresentam características biogenéticas que os tornam resistentes aos efeitos tóxicos dos anti-helmínticos (Geary, 2013). Assim, a resistência anti-helmíntica (RA) em nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes assume perfil cosmopolita. O controle eficiente dos parasitos e o diagnóstico precoce da (RA), especialmente em *Haemonchus contortus*, devem ser preconizados a fim de viabilizar economicamente a criação de ovinos e caprinos (Fortes & Molento 2013).

A resistência anti-helmíntica em nematódeos de pequenos ruminantes para os três grupos de drogas mais comumente utilizados, benzimidazóis (BZs), imidazotiazóis (LEV) e lactonas macrocíclicas (LMs) vem sendo relatada e têm crescido rapidamente em diferentes regiões do mundo, incluindo América do Sul Molento et al. (2011), Torres-Acosta et al. (2012), África do Sul Van Wyk et al. (1999), Austrália Love & Coles (2002), Nova Zelândia McKenna (2010) e Europa Papadopoulos et al. (2012).

Uma variedade de métodos *in vivo* e *in vitro* para o diagnóstico da resistência em muitas espécies de nematódeos vem sendo descritas nas últimas décadas, porém os testes moleculares apenas para poucas espécies de parasitos (Fortes & Molento, 2013), como em caso da (RA) aos (BZs) em nematódeos tricostrongilídeos. Diversas pesquisas em populações de *H. contortus* resistente e sensível aos benzimidazóis indicam a ocorrência de diferenças específicas do DNA genômico destas populações (Roos et al 1990), que podem ser utilizadas como marcadores para a detecção de (RA) aos (BZs), envolvendo mutações nos códons 167, 198 e 200 no isotipo 1 da β -tubulina nestes helmintos Elard et al. (1999), Silvestre & Cabaret (2002), Raufener et al. (2009), Barrère et al. (2012), Fortes & Molento (2013).

A presença da (RA) aos (BZs) em nível de campo em Pernambuco, já foi relatada em municípios das diferentes mesorregiões do Estado Charles et al. (1989), Barreto & Silva (1999), Pompeu & Padilha (1999), Lima et al. (2010), utilizando-se teste *in vivo* como forma de diagnóstico.

Assim, objetivou-se com este estudo diagnosticar a resistência anti-helmíntica (RA) aos (BZs) pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em populações de *H. contortus* de ovinos e caprinos do estado de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos metodológicos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – UFRPE, com licença nº 024/2013. Amostras de espécimes adultos de *H. contortus* foram obtidas de animais naturalmente parasitados por helmintos gastrintestinais pertencentes a propriedades localizadas nas cidades do estado de Pernambuco: Sairé (08°19'39" S 35°42'20" O/Agreste), Recife (08°03'14" S 34°52'51" O/ Região Metropolitana), Bonito (08°28'12" S 35°43'44" O/Agreste), Moreno (08°07'07" S 35°05'32" O/ Região Metropolitana), Gameleira (08°35'02" S 35°23'13" O/ Mata Sul), Camocim de São Félix (08°21'31" S 35°45'43" O/ Agreste), Serra Talhada (7°59'9" S, 38°17'45" O/Sertão). Nas propriedades de Recife e Bonito criavam-se apenas caprinos e nas demais apenas ovinos. Excluindo-se Serra Talhada, um questionário, adaptado de Niciura et al. (2009) foi aplicado, composto por questões fechadas, para obtenção de informações sobre as práticas de manejo das propriedades.

Os helmintos estocados em tubos de eppendorf com PBS a 4°C foram conduzidos ao Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos – UFRPE, sendo identificados e sexados. Formou-se um

pool de 20 indivíduos machos adultos de *H. contortus* de cada propriedade, os quais foram seccionados com auxílio de bisturi e macerados, procedendo-se à extração de DNA por meio do kit comercial promega/reliaprep™ gDNA Tissue, segundo informações do fabricante.

As amostras de DNA extraídas foram analisadas no Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal do Paraná. Primeiramente foi realizada a PCR com o objetivo amplificar fragmentos de genes que codificam o isotipo 1 da β -tubulina que possuíam as sequências de códon 200, utilizando-se os primers: F/ 5` AAT GCT ACC CTT TCC GTC CAT C- 3` e reverse: R/ 5` CAA AAC CGG GCA TGA AGA AG - 3. Realizou-se também uma PCR para identificação das espécies dos helmintos coletados foi realizada, utilizando-se a sequência NC1/ ITS-2 F/ 5`ACG TCT GGT TCA GGG TTG TT -3` e R/5` TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT - 3`. As duas reações de amplificação foram conduzidas no volume final de 88 μ L - (3 μ L de cada primer, 10 μ L tampão, $MgCl_2$ 3 μ L, dNTP 20 μ L, Taq Polimerase 1 μ L, Água ultrapura 45 μ L), usando o protocolo de amplificação: 1ª etapa: 94°C por 02', 2ª etapa: 94°C por 30" - 50°C por 30" - 72°C por 01', 3ª etapa: 72°C por 5' em termociclador Veriti Life com gradiente em 35 ciclos. Uma amostra de 20 μ l de cada reação foi analisada sobre um gel de agarose 0,8 % e visualizada sob luz UV.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit comercial PureLink® Quick Gel Extraction (Invitrogen, USA) e sequenciados por eletroforese capilar (Método de Sanger) utilizando a plataforma ABI3130 (Life Technologies, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as amostras analisadas observaram-se bandas fortes e limpas evidenciando o DNA responsável pela resistência anti-helmíntica aos (BZs) (Figuras 1 e 2) em amostras de *H. contortus* de caprinos e ovinos. O resultado obtido confirmou tratar-se de *H. contortus* todo o material genético utilizado na pesquisa (Figura 3). Assim, estes dados constituem-se no primeiro registro de diagnóstico molecular da resistência anti-helmíntica em ruminantes em Pernambuco e corroboram pesquisas anteriores utilizando testes *in vivo* que detectaram a resistência anti-helmíntica aos benzimidazóis em pequenos ruminantes em Pernambuco (Charles et al. 1989, Lima et al. 2010).

Nunes et al. (2013) obtiveram resultado semelhante, confirmando a presença do DNA responsável pela resistência anti-helmíntica aos benzimidazóis em isolados de *H. contortus* em um rebanho ovino da região de São José do Rio Preto-SP, utilizando AS-PCR.

A existência de ampla dificuldade para o diagnóstico molecular é ter a certeza de que a mutação associada a resistência à determinada droga seja exclusivamente responsável em uma espécie particular. Esse desafio pode ser exemplificado pela existência de mais de um ponto de mutação de resistência aos BZs em certos helmintos Coles et al. (2006), Fortes & Molento (2013).

Analisando-se o questionário aplicado observou-se que a ovinocaprinocultura constitui-se em atividade recente, com as fazendas de ovino apresentando tempo de exploração de cinco anos (uma), três anos (uma) e 2 anos (duas) e, as de caprino, uma com um ano e outra com cinco anos. Niciura et al. 2012 registraram ocorrência do genótipo de alta resistência anti-helmíntica significativamente maior em fazendas de ovinos mais recentemente estabelecidas, sugerindo que isto poderia refletir a falta da experiência dos agricultores em lidar com controle de parasitos.

A ausência de quarentena para os animais recém-adquiridos foi observada em todas as propriedades, fato este que possibilita a entrada de helmintos resistentes na criação (Molento, 2004). Outro aspecto encontrado foi a alta frequência de aplicação de anti-helmíntico: três das quatro criações de ovino e uma de caprino faziam de dois em dois meses. Niciura et al (2009) afirmam que a alta frequência nos tratamentos anti-helmínticos favorece a instalação da resistência. As demais propriedades usavam intervalos de cinco meses. Em uma propriedade de ovinos e uma de caprinos eram tratados apenas os animais doentes. Vieira et al (2014) consideram esta última medida uma excelente alternativa para minimizar a resistência a anti-helmínticos, uma vez que resulta na presença de animais com parasitos adultos que não recebem tratamento químico, deixando uma parcela da população helmíntica em refugia. Nas outras quatro, dosificavam-se todos os animais do rebanho. A estimativa do peso dos animais para cálculo da dosagem do medicamento era feita de forma visual. Niciura et al. (2012)

observaram que o tratamento de todos os animais do rebanho aumentou a frequência do genótipo para alta resistência em comparação com o uso do tratamento selectivo utilizando como indicador clínico o método Famacha. Por outro lado, demonstraram ser a a estimativa visual do peso dos animais para tratamento a prática com maior fator de risco para o desenvolvimento de resistência (Niciura et al. 2012), por facilitar a subdosagem ou sobredosagem, causando mais pressão de seleção (Chartier et al., 1998, Costa et al. 2011).

Observou-se, também que nos rebanhos pesquisados não se realizava rotação de pastagem pós-vermifugação, contribuindo para uma elevada carga parasitária no hospedeiro e ambiente, Melo et al (2009). Também não mudavam os animais de pastagem após o tratamento, o que, segundo Niciura et al. (2012), resultou em alta resistência.

A troca de anti-helmínticos nas propriedades ocorria a cada vermifugação (uma/ovinos), quando não se obtinha efeito do produto (duas/ovinos) ou sem critério (uma/ovinos, duas/caprinos) e em nenhuma delas se utilizava se combinação de drogas. Em todas as propriedades o penúltimo anti-helmíntico foi do grupo das (LMs), sendo este também o último em três das propriedades de ovinos e uma de caprino. Em uma criação ovina e em uma caprina o último produto foi do grupo dos BZs. As propriedades não dispunham de assistência técnica e nunca havia sido realizado exame de OPG ou teste de eficácia anti-helmíntica.

Estudos demonstraram que a rotação de anti-helmínticos após um único tratamento aumentou o risco de alta resistência quando comparado à rotação do anti-helmíntico com base em em teste de eficácia ou na observação da falta de eficácia, verificando-se o mesmo com fazendas que não usavam combinações de medicamentos (Niciura et al. 2012).

Embora a presença do DNA para a (RA) aos (BZs) tenha sido detectada em todas as amostras de *H. Contortus* em caprinos e ovinos, no sequenciamento, apenas em uma amostra (rebanho ovino do município de Sairé) apresentou-se mutação no códon 200 do gene isotipo 1 da β -tubulina, caracterizando o polimorfismo TTC/TAC, não sendo detectadas tais mutações nas demais amostras (Figura 4). Convém ressaltar que nesta propriedade, a atividade havia se iniciado havia dois anos; o tratamento anti-helmíntico acontecia a cada seis meses, trocando-se de produto a cada dosificação e nos dois últimos tratamentos utilizou-se produto do grupo das (LMs), seguido dos (BZs), fatos que, somados às outras práticas inadequadas de manejo propiciaram a rápida manifestação da (RA).

Fortes e Molento (2013) citam que a grande dificuldade para o diagnóstico com base molecular é ter a certeza de que a mutação associada à resistência à determinada droga seja a única mutação responsável em uma espécie particular. Esse desafio pode ser exemplificado pela existência de mais de um ponto de mutação de resistência aos BZs em certos helmintos (Fortes & Molento, 2013). Assim, os dados ora obtidos são subsídios para estudos futuros com técnicas moleculares mais específicas para se caracterizar a (RA) aos benzimidazóis em pequenos ruminantes no estado de Pernambuco.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos confirmam a resistência anti-helmíntica aos benzimidazóis em *H. contortus* de caprinos e ovinos no estado de Pernambuco, favorecida por práticas de manejo inadequadas e uso indiscriminado de produtos químicos para o controle de helmintos gastrintestinais.

Estes achados constituindo-se no primeiro registro de diagnóstico molecular da resistência anti-helmíntica em ruminantes no estado de Pernambuco.

REFERÊNCIAS

- Ahid, S. M. M.; Suassuna, A. C. D.; Maia, M. B.; Costa, V. M. M.; Soares, H. S. 2008. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da região Oeste do Rio Grande do Norte, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*. 9:212-218.
- Amarante, A. F. T. 2011. Why is it important to correctly identify *Haemonchus* species. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 20:263-268.
- Barrère V., Alvarez L., Suarez G., Ceballos L., Moreno L., Lanusse C. & Prichard R.K. 2012. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the β -tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 186:344-349.
- Charles T.P., Pompeu J., Miranda D.B. 1989. Efficacy of these broad-spectrum anthelmintics against gastrointestinal nematode infections of goats. *Veterinary Parasitology*. 34:71-75
- Chatier C., Pors I., Hubert j., Rocheteau D., Benoit C., Bernard N. 1998. Prevalence of anthelmintic resistant nematodes in sheep and goats in Western France. *Small ruminant research*. 29(1):33-41.
- Coles G.C., Jackson F., Pomroy W.E., Prichard R.K., Von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor MA., Vercruysse J. 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. 136(3):167-185.
- Costa K.M.F.M., Ahid, S. M.M., Vieira, L. S., Vale A.M., Blanco, B. S. 2011. Efeitos do tratamento com closantel e ivermectina na carga parasitária, no perfil hematológico e bioquímico sérico e no grau Famacha de ovinos infectados com nematódeos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 31(12):1075-1082.
- Elard L., Cabaret, J., Humbert, J. F. 1999. PCR diagnosis of benzimidazole susceptibility or resistance in natural populations of the small ruminant parasite, *Teladorsagia circumcincta*. *Veterinary Parasitology*. 80:231-237.
- Fortes F.S., Kloster F.S., Schafer A.S., Bier D., Buzatti A., Yoshitani U.Y. & Molento M.B. 2013. Evaluation of resistance in a selected field strain of *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin using the Larval Migration on Agar Test. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(2):183-187.
- Geary T. Comunicação pessoal (Institute of Parasitology, McGill University, Canada). 2013.
- Lima M.M., Farias, M.P.O., Romeiro, E.T., Ferreira, D.R.A., Alves, L.C., Faustino, M.A.G. 2010. Eficácia da moxidectina, ivermectina e albendazole contra helmintos gastrintestinais em propriedades de criação caprina e ovina no estado de Pernambuco. *Ciência Animal Brasileira*. 11:94-100.
- Loves J.C., Coles G.C. 2002. Anthelmintic resistance in sheep worms in New South Wales, Australia. *Veterinary Record*. 150:87.
- Mckenna, P.B. 2010. Update on the prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*. 58:172-173.
- Melo A.C.F.L, Bevilaqua C.M.L & Reis I.F 2009. Resistência aos anti-helmínticos benzimidazóis em nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes do semiárido nordestino brasileiro. *Ciencia Animal Brasileira*. 10(1): 294-300.
- Miller C M., Waghorn, T. S., Leathwick, D. M., Candy, P. M., Oliver, A.M. B. & Watson, T. G. 2012. The production cost of anthelmintic resistance in lambs. *Veterinary Parasitology*. 186: 376-381.
- Molento M.B. 2004. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 13:82-85.
- Molento M.B., Fortes F.S., Pondelek D.A.S., Borges F.A., Chagas A.C.S., Torres-Acosta J.F.J. & Geldhof P. 2011. Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. *Veterinary Parasitology*. 180:126-132.
- Niciura S.C.M., Veríssimo C.J., Molento M.B. 2009. Determinação da Eficácia Anti-Helmíntica em Rebanhos Ovinos: Metodologia de Colheita de Amostras e de Informações de Manejo Zoossanitário. 91:29.
- 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., Nardon R. F., Ueno T.E.H., Molento M.B. 2012. 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. *Veterinary Parasitology*. 190, 608-612.

- Nunes R.L., Santos L.L., Bastianetto E., Oliveira D.A.A., Brasil B.S.F. 2013. Frequência da resistência ao benzimidazol em populações de *Haemonchus contortus* isoladas de rebanhos de bubalinos, caprinos e ovinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 22(4): 548-553.
- Papadopoulos E., Gallidis E., Ptochos, S. 2012. Anthelmintic resistance in sheep in Europe: a selected review. *Veterinary Parasitology*. 189, 85–88.
- Pompeu J., Padilha T. N 1999. Utilização de anti-helmíntico nas principais bacias leiteiras da mesorregião do Agreste do Estado de Pernambuco- Brasil, SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA.
- Roos M.H., Boersema J.H., Borgsteed F.H.M., Cornelissen I., Taylor M., Ruitenberg E.I. 1990. Molecular analysis of selection for benzimidazole resistance in sheep parasite *Haemonchus contortus*. *Molecular Biochemical Parasitology*.43:77-88.
- Rosalinski-Moraes F., Fernandes F.G., Munaretto, A., De Oliveira, S., Wilmsen M.O., Pereira M.W., Meirelles, A.C.F. . 2012. Método FAMACHA®, escore corporal e de diarreia como indicadores de tratamento anti-helmíntico seletivo de ovelhas em reprodução. *Bioscience Journal*. 28:1015-1023.
- Rufener L., Kaminsky R. & Mäser P. 2009. In vitro selection of *Haemonchus contortus* for benzimidazole resistance reveals a mutation at amino acid 198 of beta-tubulin. *Molecular Biochemical Parasitology*. 168:120-122
- Silvestre A., Cabaret J. 2002. Mutation in position 167 of isotype 1 B-tubulina gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance – *Molecular and Biochemical Parasitology*. 120:297-300.
- Torres-acosta J. F. J.; Mendoza de Gives, P.; Aguilar-Cabalallero, A. J.; Cuéllar-Ordaz J. A.2012. Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. *Veterinary Parasitology*. 189:89-96.
- Van wyk J.A., Stenson S.O., Van Der Mrewe J.S., Vordseth R.J., Viljoen P.G.1999. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*. 66:273–284.
- Vieira V.D., Feitosa T.F., Vilela V.L.R., Azevedo S.S., Almeida Neto J.L., Morais D.F., Ribeiro A.R.C. & Athayde A.C.R. 2014. Prevalence and risk factors associated with goat gastrointestinal helminthiasis in the Sertão region of Paraíba State, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*.46:355-361.

Legendas das Figuras

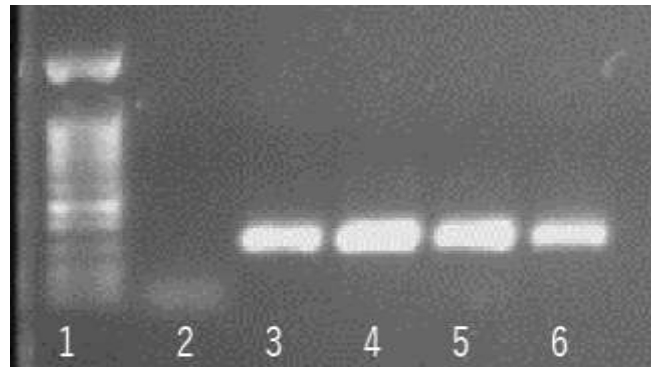


Fig.1. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, com produto de PCR resultante da amplificação de fragmento do isotipo 1 da β -tubulina de *Haemonchus contortus* dos rebanhos (1. Marcador molecular, 2. Controle negativo, 3. Sairé, 4. Recife, 5. Bonito e 6. Moreno).

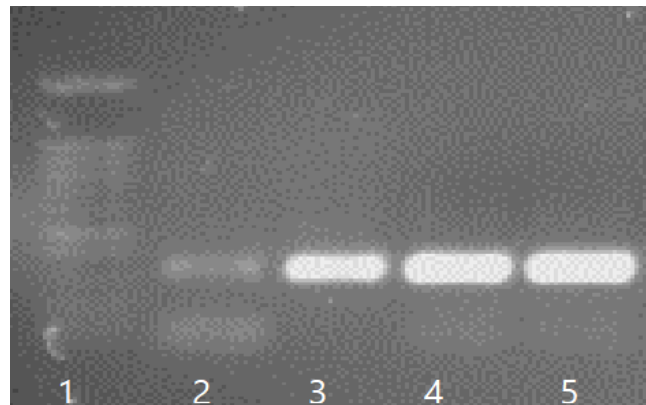


Fig.2. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, com produto de PCR resultante da amplificação de fragmento do isotipo 1 da β -tubulina de *Haemonchus contortus* dos rebanhos (1. Marcador molecular, 2. Controle negativo, 3. Gameleira, 4. Camocim de São Félix e 5. Serra Talhada)

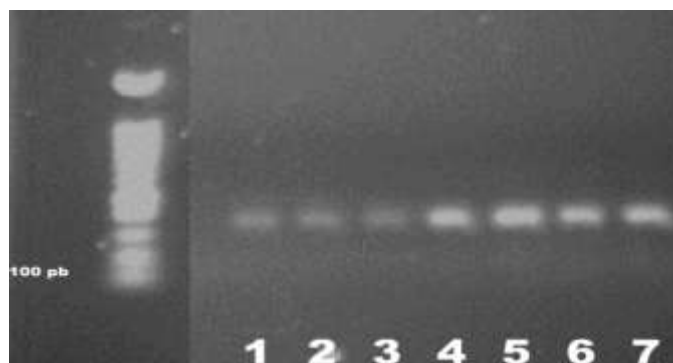


Fig.3. Eletroforese do produto de PCR das amostras de DNA de Pernambuco para sequência NC1 dos rebanhos de (1.Sairé, 2.Recife, 3.Bonito, 4.Moreno, 5.Gameleira, 6.Camocim de São Félix e 7. Serra Talhada)

Majority	TGTGCAATTGAAGTGTCTGTCACAATG-TCTGGGGTACGACCTGCCTTCCATTCCCTGGACAGCTGAATGCTGATCTTC
	170 180 190 200 210 220 230 240
6m_2015-10-19_H01.ab1	TGTGCAATTGAAGTGTCTGTCACAATG-TCTGGTGTACGACCTGCCTTCCATTCCCTGGACAGCTGAATGCTGATCTTC 235
7m_2015-10-19_A02.ab1	ACTGCG----AGTTCGTAGCAACTG-CTTGAATCTGACCTCGATCGGCTTGTCTATACG-TACTGGTATACCG 202
5m_2015-10-19_G01.ab1	TGTGCAATTGAAGTGTCTGTCACAATG-TCTGGGGTACGACCTGCCTTCCATTCCCTGGACAGCTGAATGCTGATCTTC 236
4m_2015-10-19_F01.ab1	GGTGCAITTTGAATGGCTGGTCAATGTTGGGGTCCGACTGGCTTCCATTCCCTGGGAGCTTAAAGGGGACTTTTC 238
2m_2015-10-19_D01.ab1	TGTGCAATTGAAGTGTCTGTCACAATG-TCTGGTGTACGACCTGCCTTCCATTCCCTGGACAGCTGAATGCTGATCTTC 235
3m_2015-10-19_E01.ab1	GGTGCAITTTGAATTTCTGTCCAAAG-TGGGGGTACAACTGCCTCCGATTCCCTGGACAGCTGAATGGCTGATCTTC 237
1m_2015-10-19_C01.ab1	TGTGCAATTGAAGTGTCTGTCACAATG-TGGGGGGCTTACCTCCGCTTCCATTCCCTTGAAGGCTGAATGCTTATCTTT 234

Fig.4. Sequenciamento dos isolados de *Haemonchus contortus* do estado de Pernambuco

ARTIGO 2

Avaliação da eficácia do anti-helmíntico moxidectina em criações de ovinos no estado de Pernambuco

(FORMATADO PARA O PERÍODICO CIENCIA ANIMAL BRASILEIRA)

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO ANTI-HELMÍNTICO MOXIDECTINA EM CRIAÇÕES DE OVINOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

RESUMO – A alta prevalência de nematódeos gastrintestinais é suficiente para inviabilizar esta exploração de pequenos ruminantes em algumas regiões do estado de Pernambuco, agravada pela resistência anti-helmíntica (RA) consequente ao uso indiscriminado de antiparasitários, sendo, portanto necessário o monitoramento da eficácia anti-helmíntica e diagnóstico precoce da RA para otimizar a vida útil das drogas. Assim, objetivou-se neste estudo avaliar a eficácia anti-helmíntica da moxidectina em ovinos do estado de Pernambuco. Em rebanhos nas cidades de Camocim de São Félix e Moreno – PE, a eficácia da moxidectina foi avaliada pelo TRCOF, por meio de contagens de ovos por grama de fezes antes da administração da droga, e aos sete, 14 e 21 dias subsequentes à dosificação e calculada pela fórmula: % de eficácia = $[(\text{média de OPG}^{\text{Pré-tratamento}} - \text{média de OPG}^{\text{Pós-tratamento}}) / \text{média de OPG}^{\text{Pré-tratamento}}] \times 100$. Aplicou-se um questionário investigativo nas propriedades enfatizando as práticas de manejo. Em ambos os rebanhos a moxidectina apresentou percentuais considerados efetivos apenas no 7º dia pós-tratamento (95,6%), e moderadamente efetivos nas avaliações seguintes. Aliadas à observação de formas inadequadas das práticas de manejo instituídas nas propriedades, tais condições favorecem a instalação da RA à moxidectina nos rebanhos analisados.

Palavras-chave: lactonas macrocíclicas; pequenos ruminantes; resistência anti-helmíntica.

EVALUATION OF ANTHELMINTIC EFFICACY OF MOXIDECTIN IN SHEEP FARMING IN THE STATE OF PERNAMBUCO

ABSTRACT – The high prevalence of gastrointestinal nematodes is sufficient to enable the exploration of small ruminants in some regions of the state of Pernambuco, aggravated by anthelmintic resistance (AR) consequent to the indiscriminate use of antiparasitic drugs. To optimize the life of the drug, it is necessary to monitor the anthelmintic efficacy and early diagnosis of (AR). Thus the aim of this study was to evaluate the anthelmintic efficacy of moxidectin in sheep from Pernambuco state – Brazil. In flocks in the cities of Camocim de São Félix and Moreno – PE, Brazil, the efficacy of moxidectin was evaluated by FECRT through egg counts per gram of feces before drug administration, and at seven, 14 and 21 subsequent days of dosing and calculated using the formula: % efficacy = $[(\text{mean OPG}^{\text{Pré-treatment}} - \text{average OPG}^{\text{Post-treatment}}) / \text{average OPG}^{\text{Pré-treatment}}] \times 100$. I was applied an investigative questionnaire on properties emphasizing management practices. In both herds moxidectin presented effective only on the 7th day post-treatment (95.6%), and moderately effective in the following evaluations. Combined with the observation of inappropriate forms of management practices used in the properties, such conditions favor the installation of RA to moxidectin in the analyzed herds.

Keywords : macrocyclic lactones; small ruminants; anthelmintic resistance.

Introdução

O parasitismo por nematódeos gastrintestinais em pequenos ruminantes causa sérios prejuízos econômicos em rebanhos do todo o mundo, colocando-se entre os fatores sanitários de maior importância por seu impacto negativo na saúde e produção dos animais^(1,2).

As medidas de controle ainda dependem basicamente da utilização de anti-helmínticos e mesmo nos dias atuais, quando se observa crescente desenvolvimento e adoção de programas alternativos de controle parasitário visando diminuir a aplicação de compostos químicos^(2,3).

O uso intensivo de anti-helmínticos à base de benzimidazóis (BZs), imidazotiazóis (LEV) e lactonas macrocíclicas (LMs) nas últimas décadas, que demonstrou inicialmente um impacto positivo, atualmente representa uma ameaça ao controle parasitário de médio e longo prazo, resultando na seleção e propagação de parasitos resistentes^(2,3).

O primeiro caso de resistência à lactonas macrocíclicas no mundo ocorreu em 1989 com a ivermectina em ovinos na África do Sul^(4,5), sendo o primeiro relato no Brasil no Rio Grande do Sul, em ovinos⁽⁶⁾. A resistência à moxidectina foi inicialmente registrada em 1995 em ovinos⁽⁷⁾. Desde então, registros vêm se sucedendo em caprinos e ovinos no mundo e no Brasil^(8,9). Embora o monitoramento da eficácia dos anti-helmínticos e o diagnóstico da resistência anti-helmíntica sejam imprescindíveis para auxiliar o planejamento de estratégias de controle, estas medidas, ainda não se constituem em realidade prática no campo⁽¹⁰⁾.

Desenvolveu-se este estudo com o objetivo de avaliar a eficácia da moxidectina em propriedades de criação ovina no estado de Pernambuco.

Material e Métodos

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – nº 024/2013 o mesmo foi conduzido em duas propriedades de criação ovina localizadas nas cidades de Camocim de São Félix (08°21'31"S 35°45'43"O) e Moreno (08°07'07"S 35°05'32"O). As propriedades foram selecionadas por conveniência, baseando-se na disposição dos proprietários em manter o esquema necessário para a execução da pesquisa. Utilizaram-se ovinos de ambos os sexos, idades e raças variadas, criados em sistema extensivo e intensivo. O anti-helmíntico testado foi um produto comercial à base de

moxidectina, administrado segundo recomendações do fabricante (1 mL para cada 50 kg de peso vivo por via subcutânea). Foi aplicado em cada propriedade um questionário adaptado ⁽¹¹⁾, para obtenção de informações sobre as práticas de manejo.

Para avaliação da eficácia anti-helmíntica utilizou-se o teste de redução do número de ovos por grama de fezes (TRCOF) ⁽¹²⁾. Amostras fecais foram retiradas diretamente da ampola retal sete dias antes do tratamento (dia -7), no dia do tratamento (dia 0), sete dias após o tratamento (dia +7), quatorze dias após o tratamento (+14) e vinte e um dias após tratamento (+21), sendo acondicionadas em caixas isotérmicas sob refrigeração, devidamente identificadas e enviadas ao Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos - Departamento de Medicina Veterinária - Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), onde foram processadas por meio da contagem de ovos por grama de fezes (OPG) ⁽¹³⁾, e coproculturas ⁽¹⁴⁾ quantitativas, utilizando-se 3g de fezes de cada amostra para a obtenção do número de larvas por grama de fezes (LPG).

Em cada rebanho pesquisado utilizou-se um grupo de sete animais ⁽¹¹⁾. A média aritmética do OPG antes (dia 0) e depois do tratamento para cada grupo foi utilizada para cálculo da eficácia dos produtos pela fórmula: % de eficácia = [(média de OPG^{pré-tratamento} - média de OPG^{pós-tratamento}) / média de OPG^{pré-tratamento}] X 100, classificando-se os percentuais de eficácia obtidos em altamente efetivo (> 98%), efetivo (entre 90% - 98%), moderadamente efetivo (> 80% - 89%) e não efetivo (≤ 80%) segundo literatura pertinente ⁽¹⁵⁾.

Os dados foram submetidos à análise estatística obtendo-se a média, e o desvio padrão dos valores de OPG e LPG. Para a comparação entre os dias pós-tratamento foi utilizado o teste estatístico de Friedman, realizando-se comparações múltiplas no caso de diferenças significativas.

O programa estatístico utilizado para digitação e obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 21. Nas decisões do teste estatístico utilizou-se a margem de erro de 5% e intervalos com 95% de confiança.

Resultados e Discussão

Analisando-se os valores médios de OPG entre os dias pré e pós-tratamento, comprova-se diferença significativa entre os tempos de avaliação para a moxidectina com médias correspondentemente mais elevadas na avaliação antes do tratamento que nas outras avaliações, e através dos testes de comparações múltiplas se comprova diferença significativa

na propriedade de Camocim de São Félix, com OPG significativamente menor aos sete dias pós-tratamento em relação aos 14 e 21 dias. Na propriedade de Moreno, houve situação semelhante em se tratando do valor de OPG pré-tratamento, no entanto nas avaliações seguintes apenas houve diferença significativa entre o sétimo e 21º dia (Tabela 1).

Tabela 1 – Média e desvio-padrão das contagens de ovos por grama de fezes em ovinos dos municípios de Camocim de São Félix e Moreno – PE submetidos a tratamento com moxidectina segundo os dias pós-tratamento

Localidade	Dias pós-tratamento				Valor p
	0	7	14	21	
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
Camocim de S. Félix	1328,57 ± 576,52 ^(a)	57,14 ± 78,68 ^(b)	142,86 ± 113,39 ^(c)	171,43 ± 95,12 ^(c)	p ⁽¹⁾ < 0,001*
Moreno	1328,57 ± 667,62 ^(a)	57,14 ± 113,39 ^(b)	142,86 ± 127,24 ^(bc)	171,43 ± 138,01 ^(c)	p ⁽¹⁾ < 0,001*

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%. (1): Teste de Friedman com comparações. Obs. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os dias.

Em ambos os rebanhos o helminto mais prevalente nas coproculturas foi *Haemonchus* sp. seguido de *Trichostrongylus* spp., confirmando estudo prévio em Pernambuco⁽¹⁾ e semelhante aos obtidos no estado do Ceará⁽¹⁶⁾, Bahia⁽¹⁷⁾, Paraná⁽¹⁸⁾ e Santa Catarina⁽¹⁹⁾ confirmando a alta prevalência de *Haemonchus* sp. em diversas regiões do Brasil⁽²⁰⁾, apesar da presença de outros gêneros além dos aqui registrados^(21,22,23,24).

Dos resultados sobre a LGP para *Haemonchus* sp. (Tabela 2), em Camocim de São Félix, apenas se observa diferença significativa entre a contagem do dia pré-tratamento e o 21º dia pós-tratamento, cujo valor foi superior ao inicialmente obtido. Em Moreno, embora os valores dos dias 7 e 14 tenham se apresentado significativamente inferiores ao anterior ao tratamento, no 21º dia já surge um aumento significativo em relação aos dias 7 e 14 e sem diferença em relação ao dia inicial.

Tabela 2 – Média e desvio-padrão das contagens de larvas de *Haemonchus* sp. por grama de fezes em ovinos dos municípios de Camocim de São Félix e Moreno – PE submetidos a tratamento com moxidectina segundo os dias pós-tratamento

Local	Dias pós-tratamento				Valor p
	0	7	14	21	
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
Camocim S. Félix	10,94 ± 15,39(a)	10,47 ± 13,46(a)	12,37 ± 16,70(a)	19,04 ± 32,36(b)	p ⁽¹⁾ = 0,023*
Moreno	17,59 ± 23,32(a)	1,90 ± 5,03 (b)	0,47 ± 0,81 (b)	9,76 ± 6,63 (a)	p ⁽¹⁾ < 0,001*

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%. (1): Teste de Friedman com comparações. Obs. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os dias.

Os percentuais de eficácia anti-helmíntica obtidos (Tabela 3) apresentaram-se como efetivos sete dias após o tratamento e reduzindo-se a moderadamente efetivos aos 14º e 21º.

Tabela 3. Eficácia (%) para moxidectina em rebanhos ovinos do estado de Pernambuco nos 7º, 14º e 21º dias após aplicação de anti-helmínticos

Local	Dia (+7)	Dia (+14)	Dia (+21)
Camocim S. Félix	95,7 %	89,25%	87,1%
Moreno	95,7%	89,25%	87,1%

Diversas foram as falhas encontradas no manejo de controle das helmintoses gastrintestinais. Nenhuma das fazendas possuía assistência técnica. É importante que profissionais capacitados sejam contratados e, por meio deles, os produtores devem tomar conhecimento de tratamentos sustentáveis, a fim de reduzir significativamente o uso de drogas anti-parasitárias⁽²⁵⁾

Em todas as criações pesquisadas não havia critérios para decidir sobre a vermifugação, o que caracteriza a forma indiscriminada das práticas de controle. Diferentes esquemas de tratamento anti-helmíntico são descritos na literatura, dentro os quais o uso de tratamento estratégicos baseados na epidemiologia garante maior vida útil ao princípio ativo aplicado⁽²⁶⁾.

Outras falhas encontradas nas propriedades estudadas incluem: não trocar os animais das pastagens após tratamento e ausência de quarentena. A troca dos animais de pasto após os tratamentos é uma forma segura para diminuir a carga parasitária dos ovinos e do ambiente ⁽²⁷⁾ e a falta da quarentena possibilita a entrada de helmintos resistentes no rebanho ⁽²⁸⁾. Em todas as propriedades a estimativa visual foi o critério para dosagem de anti-helmínticos e a frequência de vermifugação foi a cada 2 meses. A estimativa visual pode levar à administração de subdoses, assim contribuindo para o processo de seleção de helmintos resistentes ⁽²⁹⁾ e igualmente o curto espaço de tempo entre as aplicações do anti-helmíntico, devido à pressão de seleção exercida ^(11,30).

Em todas as propriedades o penúltimo e o último anti-helmíntico foi do grupo das (LMs) e nunca havia sido realizado exame de OPG ou teste de eficácia anti-helmíntica. Na propriedade de Camocim de São Félix tratavam-se apenas os animais doentes e na de Moreno todos os animais do rebanho recebiam anti-helmíntico. O tratamento unicamente dos animais doentes permite uma parte da população parasitária em refúgio devido a helmintos adultos que não têm contato com a droga, sendo portanto uma ótima alternativa para reduzir a (RA) ⁽³¹⁾. Por outro lado, o tratamento de todos os animais do rebanho aumenta as possibilidades do estabelecimento da (RA) ⁽³²⁾.

Os resultados quanto à eficácia anti-helmíntica da moxidectina aqui obtidos diferem dos observados em avaliações anteriores no estado de Pernambuco em que a referida droga manteve-se altamente efetiva até o 21º pós-tratamento em ovinos em Recife – PE, e efetiva até 43 dias pós-tratamento em ovinos de Riacho das Almas – PE ⁽¹⁾. Em Região de Londrina - PR, os autores detectaram eficácia de apenas 20% ⁽¹⁸⁾ registrando resistência à moxidectina em 93,7% das propriedades estudadas no Estado. No Mato Grosso do Sul, a moxidectina demonstrou eficiência acima de 95% em somente duas de 15 propriedades avaliadas ⁽³³⁾.

Estudos têm permitido a conclusão de que a moxidectina vem perdendo a efetividade no controle dos nematódeos gastrintestinais ⁽³⁴⁾, principalmente em populações onde *Haemonchus contortus* é mais prevalente, fato este justificado pela grande diversidade genética que este parasito possui e pelo tamanho de sua população devido ao seu alto potencial biótico ^(35,36,37).

Conclusões

Os resultados obtidos caracterizam declínio da efetividade anti-helmíntica da moxidectina em rebanhos ovinos do estado de Pernambuco nos quais prevalecem as infecções por *Haemonchus contortus*, embora *Trichostrongylus* spp. apareça em menor escala. Esta condição, associada à observação de formas inadequadas das práticas de manejo instituídas nas propriedades constituem-se em fortes indícios para favorecimento da instalação da RA à moxidectina em ovinos nos rebanhos analisados.

Referências

1. Lima MM, Farias MPOF, Romeiro ET, Ferreira DRA, Alves LC, Faustino MAG. Eficácia da moxidectina, ivermectina e albendazole contra helmintos gastrointestinais em propriedades de criação caprina e ovina no Estado de Pernambuco. *Ciência Animal Brasileira*. 2010;11:94-100.
2. Fortes FS, Kloster FS, Schafer AS, Bier D, Buzatti A, Yoshitani UY & Molento M B. Evaluation of resistance in a selected field strain of *haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin using the larval migration on agar test. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2013;33(2):183-187.
3. Veríssimo CJ, Méo SC, Cardoso D, Curci VCLM, Ueno THE, Costa RLD, Pereira JR, Margatho LFF, Molento MB. Monitoring the efficacy of anthelmintic drugs in small ruminants in the state of São Paulo, Brazil: preliminary results. In: World association for the advancement of Veterinary Parasitology Conference. 2009:22.
4. Carmichael I, Visser R, Schneider D, Sollm. *Haemonchus contortus* resistance to ivermectin. *Journal of the South African Veterinary Association*. 1987;58:93
5. Van Wyk J, Malan F. Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, radoxanide and the benzimidazoles in South Africa. *Veterinary Record*. 1988;123:226–228.
6. Echevarria FAM, Trindade GNP. Anthelmintic resistance by *Haemonchus contortus* to ivermectin in Brazil. *Veterinary Record*. 1989;124:147-148.
7. Leathwick D. A case of moxidectin failing to control ivermectin resistant *Ostertagia* species in goats. *Veterinary Record*. 1995;136:443–444.
8. Souza FP de, Thomas-Soccol, V, Castro. Contribuição para o estudo da resistência de helmintos gastrointestinais de ovinos (*Ovis aries*) aos anti-helmínticos, no estado do Paraná. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 1997;6(2):217.
9. Costa UC, Benevenga SF, Rue M.L. Avaliação, em ovinos da eficácia de uma mistura de albendazole e closantel, comparativamente a outros anti-helmínticos contra *Haemonchus contortus* resistente. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 1997;6(1):220.
10. Torres-Acosta JFJ, Mendoza de Gives P, Aguilar-Cabalallero AJ & Cuéllar-Ordaz JA. Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. *Veterinary Parasitology*. 2012;189:89-96.

11. Niciura SCM, Veríssimo CJ, Molento MB. Determinação da eficácia anti-helmíntica em rebanhos ovinos: metodologia da colheita de amostras e de informações de manejo zoonosológico. São Carlos. Embrapa Pecuária Sudeste. 2009:1:1-29.
12. Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, Taylor MA & Vercruyse J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. 2006:136:167-185.
13. Gordon HMCL, Whitlock HV. A new technique for counting nematoda eggs in sheep faeces. *Journal Commonwealth Science and Industry Organization*. 1939:12:50-52.
14. Roberts FHS, O'sullivan JP. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Agriculture Research*. 1950:1:99-102.
15. BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico da Portaria nº 48/1997.
16. Melo ACFL, Bevilaqua CML. & Reis IF. Resistência aos anti-helmínticos benzimidazóis em nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes do semiárido nordestino brasileiro. *Ciência Animal Brasileira*. 2009:10(1):294-300.
17. Barreto MA, Silva JS. Avaliação da resistência anti-helmíntica de nematódeos gastrintestinais em ovinos deslançados do estado da Bahia. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2004:13:265.
18. Milczewski V, Sotomaior CS, Moraes FR, Schwartz MG, Caldas JS, Thomaz-Soccol V. Resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos e caprinos do estado do Paraná. In: congresso brasileiro de parasitologia veterinária, 2.; Simpósio latino-americano de rickettsioses, 14., Ribeirão Preto. Anais. Ribeirão Preto: [s.n.], p. 289, 2006.
19. Molento MB, Wang GT, Prichard RK. Decreased ivermectin and moxidectin sensitivity in *haemonchus contortus* selected with moxidectin over 14 generations. *Veterinary Parasitology*. 1999:86:77-81.
20. Melo ACFL, Reis IF, Bevilaqua CML, Vieira LS, Echevarria FAM, Melo, L M. Nematódeos resistentes a anti-helmínticos em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. *Ciência Rural*. 2003:33:339-344.
21. Radavelli WM, Rafael Pazinato R, Klauck V, Volpato A, Balzan A, Rossett J, Cazarotto CJ, Lopes LS, Kessler JD, Cucco DC, Tonin AA, Da Silva AS. Occurrence of gastrointestinal parasites in goats from the Western Santa Catarina, Brazil. *Braz. Journal Veterinary Parasitology*. 2014: 23(1): 101-104.
22. Veríssimo CJ, Niciura SC, Alberti AL, Rodrigues CF, Barbosa CM, Chiebao DP, Cardoso D, Da silva GS, Pereira JR, Margatho LF, Da costa RL, Nardon RF, Ueno TE, Curci VC, Molento MB.. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2012:187:209-216.
23. Silva WW, Bevilaqua CML, Rodrigues MLA. Variação sazonal de nematóides gastrintestinais em caprinos traçadores no semi-árido Paraibano – Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2004:12(2):71-75.
24. Brito DRB, Santos ACG, Teixeira WC, Guerra RMSNC. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da microrregião do Alto Mearim e Grajaú, no estado do Maranhão, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*. 2009:10(3):967-974.
25. Fortes FS, Kloster FS, Schafer AS, Bier D, Buzatti A, Yoshitani U Y, Molento MB. Evaluation of resistance in a selected field strain of *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin using the Larval Migration on Agar Test. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2012:33:183-187.

26. Araújo JV, Guimarães MP, Campos AK, Sá NC, Sarti P, Assis CL. Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. *Ciência Rural*. 2004;34:457-463.
27. Cezar AE, Catto JB, Bianchin I. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. *Ciência Rural*. 2008;38(7):2083-2091.
28. Molento MB. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2004;13(1):82-85.
29. Costa KMFM, Ahid SMM, Vieira LS, Vale AM, Blanco BS. 2011. Efeitos do tratamento com closantel e ivermectina na carga parasitária, no perfil hematológico e bioquímico sérico e no grau Famacha de ovinos infectados com nematódeos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2011;31:1075-1082.
30. Echevarria FAM, Borba MFSA, Pinheiro A, Waller B, Hansen JWC. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brasil. *Veterinary Parasitology*. 1996;62:199-206.
31. Vieira VD, Feitosa TF, Vilela VLR, Azevedo SS, Almeida Neto JL, Morais DF, Ribeiro ARC, Athayde ACR. Prevalence and risk factors associated with goat gastrointestinal helminthiasis in the Sertão region of Paraíba State, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*. 2014;46:355-361.
32. Niciura SCM, Veríssimo CJ, Gromboni JGG, Rocha MIP, Mello SS, Barbosa CMP, Chiebao DP, Cardoso D, Silva GS, Otsuk IP, Pereira JR, Ambrosio LA, Nardon RF, Ueno TEH, Molento MB. 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. *Veterinary Parasitology*. 2012;190:608-612.
33. Silva KF, Bianchin I, Catto JB, Sczesny-Moraes EA, Honer MR, Paiva F. Identificação das espécies de parasitos gastrintestinais de ovinos e avaliação da resistência a anti-helmínticos no Mato Grosso do Sul.. Comunicado Técnico. Embrapa Gado de Corte - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2007;108:7.
34. Borges SL, Oliveira AA, Mendonça LR, Lambert SM, Viana JM, Nishi SM, Julião FS, Almeida MAO. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos nos biomas Caatinga e Mata Atlântica *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2015;35(7):643-648.
35. Sangster NC. Managing parasiticide resistance. *Veterinary Parasitology*. 2001;98:89-109.
36. Blackhall WJ, Kuzmina T, Samson-himmelstjerna G. β -tubulin genotypes in six species of cyathostomins from anthelmintic-naïve Przewalski and benzimidazole-resistant brood horses in Ukraine. *Parasitology Research*. 2011.
37. Taylor SM, Edgar H, Kenny J. Prophylactic efficacy of moxidectin for periparturient ewes and mid-summer lambs. *Veterinary Record*. 1993;133:270-271.

5. CONCLUSÃO FINAL

Os resultados obtidos confirmaram a resistência anti-helmíntica aos benzimidazóis e *H. contortus* de caprinos e ovinos no estado de Pernambuco, constituindo-se, estes achados no primeiro registro de diagnóstico molecular da resistência anti-helmíntica em ruminantes no Estado.

Caracteriza-se declínio da efetividade anti-helmíntica da moxidectina em rebanhos ovinos do estado de Pernambuco nos quais prevalecem as infecções por *Haemonchus contortus*, embora *Trichostrongylus* spp. apareça em menor escala.

Práticas de manejo instituídas de forma inadequadas nas propriedades constituem-se em fortes fatores para favorecimento da instalação da RA em ovinos e caprinos nos rebanhos analisados.

6 - ANEXOS

Anexo 1

QUESTIONÁRIO PARA DETERMINAÇÃO DA SITUAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE HELMINTOS DE OVINOS A ANTI-HELMÍNTICOS

Nome da Propriedade: _____
Município: _____
Altitude: _____ Latitude: _____ Longitude: _____
Responsável pelas informações (proprietário, administrador ou técnico): _____
Nome, endereço completo ou telefone ou e-mail do responsável pelas informações: _____

I - Informações sobre a propriedade e o rebanho

1. Área total da propriedade: _____ ha.
2. Área de pastagem: _____ ha.
3. Há quanto tempo na atividade? _____ anos
4. Tipo de exploração: a) () carne; b) () leite; c) () lã; d) () venda de reprodutores, sêmen ou embriões
5. Criação: a) () intensiva; b) () semi-intensiva; c) () extensiva
6. A ovinocultura é a principal fonte de renda? a) () sim; b) () não
7. Cria outros animais além de ovinos? a) () sim; b) () não
7a. Se a resposta foi positiva, quais espécies? a) () bovinos; b) () equídeos; c) caprinos; d) () suínos; e) () aves; f) () outros: _____
8. Quais são as raças ovinas da propriedade? Qual é o número de fêmeas, de machos e de cordeiros de cada raça? (preencha a tabela abaixo)

Raça	Número de Fêmeas	Número de Machos	Número de Cordeiros	Total
TOTAL				

9. Possui aprisco ou galpão: a) ripado; b) chão batido ou cimentado com ou sem cama; c) não possui galpão para abrigar os animais
10. Faz rodízio de pastagens?: a) sim; b) não
11. Existem áreas de várzea, mangue ou alagadas na pastagem que os animais têm acesso?
a) sim; b) não
12. As pastagens são utilizadas somente por ovinos? a) sim b) não . Qual espécie compartilha os pastos com os ovinos? _____
13. Forrageira(s) predominante nas pastagens são: a) *Brachiaria*; b) *Panicum* (Aruana, Tanzânia, Áries, Colômbio, etc.); c) *Cynodon* (coast-cross, tifton, estrela, etc.); d) outro (nome popular ou científico): _____
14. Região de procedência do rebanho:
a) Sudeste; b) Nordeste; c) Sul; d) Centro-Oeste; e) Norte
15. Existe muita entrada de animais de fora do rebanho? a) sim; b) não
16. O que faz com os animais recém-adquiridos? a) quarentena; b) são imediatamente incorporados ao rebanho
17. Faz escrituração zootécnica? a) sim; b) não
18. Qual o índice de mortalidade de cordeiros e animais jovens na propriedade?
a) baixo; b) alto; c) não sei
19. Qual o índice de mortalidade de ovelhas adultas na propriedade?
a) baixo; b) alto; c) não sei
20. Sistema de criação?
a) totalmente a pasto o ano todo sem suplementação; b) pastagem no verão e suplementação no inverno (seca); c) alimentação no cocho o ano todo

II – Informações sobre a medicação antiparasitária

1. Qual a frequência de aplicação de vermífugos utilizada? a) mensal; b) a cada 2 meses; c) a cada 3 meses; d) a cada 4 meses; e) a cada 6 meses; f) anual; g) sempre que necessário, de acordo com o método Famacha®; h) em animais com sintomas de verminose; i) estratégica (ex.: ovelhas no periparto, cordeiros no desmame, borregas em crescimento e lotes em cobertura); j) de acordo com o resultado do OPG; k) não utilizo vermífugo; l) outra (mencionar): _____
2. Como o vermífugo é aplicado: a) a todos os animais do rebanho na mesma ocasião; b) somente a alguns animais ou lotes
3. Após o tratamento com vermífugo, muda os animais de pastagem? a) sim; b) não
4. Quando troca de vermífugo? a) a cada vermifugação; b) de acordo com teste de eficácia do vermífugo; c) quando o produto não faz mais efeito; d) sem critério
5. Como escolhe o medicamento antiparasitário? a) indicação do técnico que dá assistência à propriedade; b) Balconista de agropecuária ou cooperativa; c) pelo melhor preço; d) vendedor na fazenda; e) propaganda (revista, TV, folder, etc.); f) Outros (mencionar): _____
6. Como é feita a estimativa do peso dos animais para cálculo da dosagem do medicamento?
a) pesagem; b) estimativa visual

7. A que grupo pertencia o vermífugo utilizado na ÚLTIMA (1), na PENÚLTIMA (2) e na ANTEPENÚLTIMA (3) aplicação?
Nome comercial: 1) _____; 2) _____; 3) _____

a) () Benzimidazóis (albendazole, ricobendazole, febendazole e oxfendazole);
b) () Imiditiazol (levamisol);
c) () Lactonas macrocíclicas (ivermectina, abamectina, doramectina e moxidectina);
d) () Salicilanilidas e substitutos fenólicos (closantel, disofenol e nitroxinil);
e) () Organofosforado (triclorfon);
f) () Mistura de grupos químicos;
g) () Não lembro

8. Com que frequência realiza o exame de fezes (OPG)? a) () sempre que necessário; b) () a cada _____ meses; c) () utilizo somente para testar a eficácia do vermífugo; d) () não realizo exame de OPG; e) () nunca ouvi falar nesse exame

9. Já utilizou a combinação de drogas para tratar os animais (duas ou mais drogas ministradas ao mesmo tempo)? a) () sim; b) () não. Quais drogas utilizou (mencionar o nome comercial) ? _____

III - Informação sobre o conhecimento do produtor em resistência anti-helmíntica

1. Possui assistência técnica? a) () sim, frequente; b) () sim, esporádica; c) () não

2. Onde aprende novas informações? a) () programas de rádio ou TV; b) () internet; c) () livros e revistas; d) () feiras e exposições; e) () cursos e palestras

3. Está informado sobre o problema da resistência dos vermes aos vermífugos? a) () sim; b) () não

4. Conhece o método Famacha®? a) () sim, conheço e aplico; b) () sim, conheço, mas não aplico; c) () nunca ouvi falar

5. Já fez algum teste de eficácia de vermífugo na propriedade? a) () sim; b) () não

5a. Em caso de resposta afirmativa, que produtos deram BAIXA (1) ou ALTA EFICÁCIA (2) no último teste de eficácia realizado?
Baixa Eficácia (nome comercial): _____
Alta eficácia (nome comercial): _____

a) () Benzimidazóis (albendazole, ricobendazole, febendazole e oxfendazole);
b) () Imiditiazol (levamisol);
c) () Lactonas macrocíclicas (ivermectina, abamectina, doramectina, moxidectina);
d) () Salicilanilidas e substitutos fenólicos (closantel, disofenol e nitroxinil);
e) () Organofosforado (triclorfon);
f) () Mistura de grupos químicos;
g) () Não lembro

5b. Há quanto tempo realizou o último teste de eficácia? _____ meses

Data: ____/____/200__

Pesquisador responsável: _____

Instituição de pesquisa: _____

Anexo 2

TECHNICAL MANUAL

ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System

Instructions for Use of Products
A2050, A2051 and A2052



3.B. Standard Protocol for Animal Tissue

1. Weigh out 25mg of sample.
Note: Cut the sample into smaller pieces with a razor blade or scalpel before proceeding. If you wish to grind the tissue under liquid nitrogen, place sample into a chilled mortar and pestle, and grind under nitrogen until the tissue has a powder-like consistency.
2. Add 160µl of PBS to each sample to be processed, and mix by vortexing. If samples were ground under liquid nitrogen, add the PBS to the powdered sample.
3. Homogenize the sample with a Dounce or rotary homogenizer, or use a previously established homogenization method for your particular sample.
Note: This step is not necessary for tissues that were ground under liquid nitrogen.
4. Add 20µl of Proteinase K (PK) Solution to the homogenized sample.
5. Add 200µl of Cell Lysis Buffer (CLD) to the tube. Cap and mix by vortexing for at least 10 seconds.
6. Incubate at 56°C for 30 minutes to 2 hours.
Notes:
 1. Using a shaker/incubator set at 56°C will make lysis more effective. If one is not available, vortex the sample for 10 seconds every 30 minutes.
 2. If your samples are difficult to lyse or not completely homogenized, a longer incubation time may be required.
7. Add 20µl of RNase A Solution to each sample, mix by vortexing for 10 seconds and place microcentrifuge tube at 56°C for 10 minutes.
Note: If the presence of RNA is not a concern, skip this step.
! Incubating longer than 10 minutes is unnecessary.
8. Remove the tube from the heating block. Add 250µl of Binding Buffer (BBA), cap the tube and mix by vortexing for 10 seconds with a vortex mixer.
Note: If large amounts of intact tissue are still visible in the tube, centrifuge the sample in a microcentrifuge for 1 minute to pellet the debris.
9. Place a ReliaPrep™ Binding Column inside a collection tube for each sample. Transfer the liquid portion of the sample onto the binding column, cap the column and place it in a microcentrifuge.
10. Centrifuge for 1 minute at maximum speed. Check the binding column to make sure that the lysate has completely passed through the membrane. If lysate is still visible on top of the membrane, centrifuge the column for another minute.
column for another minute.
11. Remove the collection tube containing flowthrough, and discard the liquid as hazardous waste.
12. Place the binding column into a fresh collection tube. Add 500µl of Column Wash Solution (CWD) to the column, and centrifuge for 2 minutes at maximum speed. Discard the flowthrough.
Note: If any wash solution remains on the membrane, centrifuge the column for another minute.
13. Repeat Step 12 twice for a total of three washes.
14. Place the column in a clean 1.5ml microcentrifuge tube.
15. Add 50–200µl of Nuclease-Free Water to the column. Centrifuge for 1 minute at maximum speed.
Note: The lower the volume of eluant added, the higher the final DNA concentration will be. However, some DNA (15–20%) will be lost at the lower volumes.
16. Discard the ReliaPrep™ Binding Column, and save the eluate. Do not reuse binding columns or collection tubes. The genomic DNA can be placed at 4°C for short-term storage or –20°C for long-term storage.