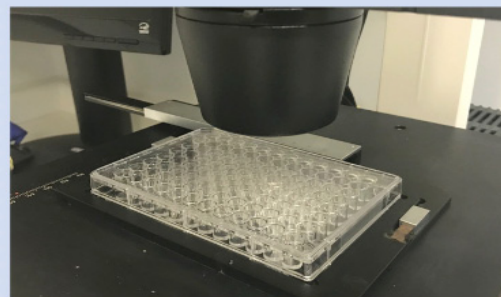


Padronização do teste de desenvolvimento larvar
(TDL) para diagnóstico da resistência
anti-helmíntica em *Haemonchus contortus*



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

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
44**

Padronização do teste de desenvolvimento larvar (TDL) para diagnóstico da resistência anti-helmíntica em *Haemonchus contortus*

*Yosmel Alemán Gainza
Rafaela Regina Fantatto
Ana Cláudia Alexandre de Albuquerque
Alessandro Francisco Talamini do Amarante
Reinivaldo Sergio Ferraz Júnior
Simone Cristina Méo Niciura
Ana Carolina de Souza Chagas*

**Embrapa Pecuária Sudeste
São Carlos, SP
2019**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pecuária São Carlos
Rod. Washington Luiz, km 234
13560-970 , São Carlos, SP
Fone: (16) 3411-5600
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente

Alexandre Berndt

Secretário-Executivo

Simone Cristina Méo Niciurea

Membros

*Emília Maria Pulcinelli Camarnado, Mara Angélica
Pedrochi, Maria Cristina Campanelli Brito,
Milena Ambrosio Telles*

Revisão de texto
Milena Ambrosio Telles

Normalização bibliográfica

Mara Angélica Pedrocchi

Editoração eletrônica

Maria Cristina Campanelli Brito

Foto da capa

Ana Carolina de Souza Chagas

1ª edição on-line: 2019

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Pecuária Sudeste

Alemán Gainza, Yousmel

Padronização do teste de desenvolvimento larvar (TDL) para diagnóstico da resistência anti-helmíntica em *Haemonchus contortus*. / Yousmel Alemán Gainza et al. — São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2019.

23p. — (Embrapa Pecuária Sudeste. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 44). ISSN 1981-2078

1. *Haemonchus contortus*. 2. Ruminante. 3. Variedade resistente. I. Alemán Gainza, Yousmel. II. Fantatto, Rafaela Regina. III. Albuquerque, Ana Cláudia Alexandre de. IV. Amarante, Alessandro Francisco Talamini do. V. Ferraz Júnior, Reinivaldo Sergio. VI. Niciura, Simone Cristina Méo. VII. Chagas, Ana Carolina de Souza. VIII. Título. IX. Série.

CDD: 636.089

© Embrapa, 2019

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	13
Conclusões.....	20
Referências	21

Padronização do teste de desenvolvimento larvar (TDL) para diagnóstico da resistência anti-helmíntica em *Haemonchus contortus*

Yousmel Alemán Gainza¹

Rafaela Regina Fantatto²

Ana Cláudia Alexandre de Albuquerque³

Alessandro Francisco Talamini do Amarante⁴

Reinivaldo Sergio Ferraz Júnior⁵

Simone Cristina Méo Niciura⁶

Ana Carolina de Souza Chagas⁷

Resumo – O objetivo do estudo foi desenvolver um diagnóstico *in vitro* da resistência de *Haemonchus contortus* aos principais grupos de anti-helmínticos disponíveis comercialmente no Brasil. Por meio do teste de desenvolvimento larvar (TDL), avaliou-se a eficácia das bases químicas tiabendazol (TBZ), levamisol (LEV), ivermectina (IVM) e monepantel (MOP) sobre isolados susceptíveis (McMaster e Echevarria1991) e resistentes (Embrapa2010 e BotucatuF3) de *H. contortus*. As menores concentrações inibitórias – CI_{50} – foram obtidas sobre o isolado Echevarria1991 para o MOP (0,001 $\mu\text{g/mL}$) e para o LEV (0,002 $\mu\text{g/mL}$), e as menores CI_{99} foram obtidas sobre Echevarria1991 para o MOP (0,05 $\mu\text{g/mL}$) e sobre McMaster para o LEV (0,104 $\mu\text{g/mL}$). Por outro lado, as maiores CI_{50} e CI_{99} foram alcançadas para o TBZ sobre Embrapa2010 ($CI_{50} = 4,551 \mu\text{g/mL}$), BotucatuF3 ($CI_{50} = 0,953 \mu\text{g/mL}$), Embrapa2010 ($CI_{99} = 78,817 \mu\text{g/mL}$) e BotucatuF3 ($CI_{99} = 47,387 \mu\text{g/mL}$). O cálculo dos fatores de resistência permitiu a diferenciação de isolados susceptíveis e resistentes, especialmente para o TBZ e para a IVM, e de maneira bem menos acentuada para o LEV e o MOP. O TDL mostrou-se confiável para uso na rotina laboratorial e sua validação com amostras de campo permitirá um controle parasitário mais racional e guiado em ovinos e caprinos, de modo a retardar o desenvolvimento da resistência e a preservar as classes químicas.

Termos para indexação: técnica *in vitro*, diagnóstico da resistência, *Haemonchus contortus*, pequenos ruminantes.

¹ Médica Veterinária. yousmel@gmail.com

² Bióloga. rrfbio@hotmail.com

³ Médica Veterinária. ac.alb@hotmail.com

⁴ Médico Veterinário. alessandro.amarante@unesp.br

⁵ Químico, analista da Embrapa Pecuária Sudeste. reinivaldo.ferraz@embrapa.br

⁶ Médica Veterinária, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste. simone.niciura@embrapa.br

⁷ Bióloga, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste. carolina.chagas@embrapa.br

Standardization of the larval developmental test (LDT) for the diagnosis of anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*

Abstract – The goal of the study was to develop an in vitro diagnostic for the resistance of *Haemonchus contortus* to the main commercially anthelmintic groups available in Brazil. The efficacy of the chemical bases thiabendazole (TBZ), levamisole (LEV), ivermectin (IVM) and monepantel (MOP) on susceptible (McMaster and Echevarria1991) and resistant (Embrapa2010 and BotucatuF3) isolates of *H. contortus* were evaluated using the larval development test (LDT). The lowest inhibitory concentrations – IC₅₀ – were obtained on Echevarria1991 to MOP (0.001 µg/mL) and to LEV (0.002 µg/mL) and the lowest IC₉₉ were obtained on Echevarria1991 to MOP (0.05 µg/mL) and on McMaster to LEV (0.104 µg/mL). On the other hand, the highest IC₅₀ and IC₉₉ levels were reached to Embrapa2010 (IC₅₀ = 4.551 µg/mL), BotucatuF3 (IC₅₀ = 0.953 µg/mL), Embrapa2010 (IC₉₉ = 78.817 µg/mL) and BotucatuF3 (IC₉₉ = 47.387 µg/mL). The resistance factor calculation allowed the differentiation of susceptible and resistant isolates, especially for TBZ and for IVM and much less marked for LEV and MOP. LDT proved to be reliable in detecting anthelmintic resistance for use in laboratory routine and its validation with field samples will allow a more rational/monitored parasite control in sheep and goats, leading to slow the development of anthelmintic resistance and preserving chemical classes.

Index terms: *in vitro* technique, resistance diagnosis, *Haemonchus contortus*, small ruminants.

Introdução

A produção de pequenos ruminantes desempenha papéis diferentes e importantes de acordo com as regiões brasileiras. Em comparação aos bovinos, os ovinos e caprinos são amplamente adaptados a condições de clima variado, além de consumirem menor quantidade de alimentos em razão do menor tamanho corporal (SILANIKOVE, 1997; 2000; MARKOS, 2006). Esses fatores permitem fácil integração dos pequenos ruminantes a diversos sistemas de produção.

O crescimento da população humana mundial tem forçado a conversão de muitas áreas em terras agrícolas para o aumento da produção de alimentos, o que pode ser um obstáculo à criação de grandes ruminantes em razão da necessidade de maiores áreas de pastagem. Além disso, propriedades em áreas densamente povoadas podem ter tamanhos inferiores a 0,5 ha e, nesses locais, a importância de ovinos e caprinos em relação ao fornecimento de carne e leite tem sido reconhecida, principalmente nas criações de subsistência. O intervalo de geração curto, associado à alta frequência de nascimentos múltiplos, permite o rápido aumento do número de animais. Isso gera renda e permite a venda de excedentes, melhorando a qualidade de vida dos pequenos produtores (LAKEW; MELESSE; BANERJEE, 2017). Assim, qualquer intervenção que aumente a produtividade dos ovinos e caprinos é necessária (HIRPA; ABEBE, 2008).

Apesar da importância dos pequenos ruminantes para a agricultura familiar e do potencial desse sistema de produção para os mercados emergentes, as infecções causadas por nematoides gastrintestinais (NGI) e a resistência aos anti-helmínticos utilizados em seu controle são grandes problemas sanitários e econômicos. As infecções por NGI são comuns em todo o mundo e estudos têm demonstrado perdas consideráveis no ganho de peso vivo, em especial durante a primeira estação de pastoreio (AMARANTE et al., 2004). Parasitas como *Haemonchus* e *Trichostrongylus* acarretam milhões em perdas econômicas a cada ano à cadeia de produção ovina. Em levantamento realizado na região sul do Rio Grande do Sul, as perdas econômicas geradas por esses parasitas foram estimadas em R\$ 2.016.000/ano (OLIVEIRA et al., 2017). Como forma de minimizar os prejuízos, o controle de parasitas tem sido amplamente realizado por meio de anti-helmínticos, mas a excessiva

dependência dessas substâncias tem levado ao desenvolvimento de resistência anti-helmíntica (RA) múltipla e, portanto, essa abordagem não tem sido considerada sustentável para o controle de NGI (SUTHERLAND; LEATHWICK, 2011; VAN WYK; REYNECKE, 2011).

O estabelecimento de medidas racionais para prevenir e controlar NGI em pequenos ruminantes é um grande desafio, especialmente em regiões tropicais, onde a espécie predominante é *Haemonchus contortus*, causador de intensa anemia (AMARANTE et al., 2004). O conhecimento precoce do status de resistência nas propriedades é importante para a manutenção da atividade dos grupos químicos de anti-helmínticos que ainda são eficazes. Portanto, a validação de técnicas para monitorar e controlar a RA em rebanhos é extremamente importante, pois conduz ao manejo sanitário mais racional e permite a orientação de ações futuras para o controle parasitário em cada propriedade. Há consenso na comunidade científica de que os programas de controle de NGI e o retardo no estabelecimento da RA dependem da disponibilidade de testes sensíveis e eficazes para a detecção da resistência (TAYLOR; HUNT; GOODYEAR, 2002). Entretanto, a investigação da resistência nos helmintos é uma tarefa árdua, uma vez que os mecanismos de resistência são complexos e os métodos adequados de detecção e avaliação da resistência são limitados.

O Brasil destaca-se como um dos pioneiros nas publicações relacionadas à RA no mundo e por ter o maior número de relatos da ocorrência da mesma em pequenos ruminantes na América. Essas pesquisas envolvem, principalmente, o Teste de Redução da Contagem de Ovos nas Fezes (TRCOF) e sua correlação com as práticas de manejo utilizadas no campo (SALGADO; SANTOS, 2016). O TRCOF permite o diagnóstico *in vivo* da resistência aos anti-helmínticos, baseia-se na comparação de contagens de ovos pré e pós-tratamento e deve atender às recomendações feitas pela Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária, *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (WAAVP) (COLES et al., 1992). O TRCOF, no entanto, apresenta diversas restrições em termos de sensibilidade entre diferentes espécies animais, variações individuais e presença de infecções múltiplas (TRAVERSA; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, 2016; GEORGE et al., 2017; WANG et al., 2017). Isso ocorre especialmente quando espécies com baixas taxas de fecundidade, como, por exemplo, *Teladorsagia circumcincta* ou *Trichostrongylus* spp., estão

envolvidas em infecções naturais de ovinos descritas como resistentes aos fármacos (PALCY et al., 2010). Além disso, o TRCOF é considerado um teste laborioso e demorado e, portanto, ensaios *in vitro* têm sido desenvolvidos para a avaliação da resistência a diferentes classes de drogas (BABJÁK et al., 2018).

Assim, a validação de métodos laboratoriais de diagnóstico da RA em rebanhos é extremamente importante. As análises *in vitro* são menos onerosas, relativamente fáceis e capazes de fornecer parâmetros reprodutíveis na mensuração da resistência aos medicamentos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de estratégias baseadas em resultados *in vitro* torna o diagnóstico da resistência menos dependente dos experimentos *in vivo* com animais (CHAGAS et al., 2013). O teste de desenvolvimento larvar (TDL) é considerado sensível e prático, e permite a avaliação da eficácia de mais de um grupo químico ao mesmo tempo, e não depende de ovos embrionados (KAPLAN et al., 2007). Os resultados podem ser comparados com isolados de referência (susceptíveis e resistentes), o que permite determinar as concentrações inibitórias (CIs) e anular a interferência interensaios (CRAVEN et al., 1999). Apesar do uso de testes *in vitro* para o diagnóstico da RA, o intervalo de diluição das drogas a serem avaliadas e dos isolados de referência não estão descritos e, portanto, nenhum teste foi padronizado e validado para uso rotineiro no Brasil. Existe um teste comercial disponível no exterior (TANDON; KAPLAN, 2004), entretanto, seu custo associado ao custo de sua importação inviabiliza economicamente a realização do diagnóstico.

A Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE) possui isolados de *H. contortus* com extremos de sensibilidade (susceptíveis e resistentes) aos principais grupos químicos de anti-helmínticos de uso no Brasil, além de protocolos padronizados para sua diluição. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo a determinação das curvas dose-resposta dos isolados extremos às diferentes drogas, de modo que, no futuro, amostras de parasitas de outras propriedades poderão ser avaliadas *in vitro* e sua resposta às drogas poderá ser comparada aos isolados extremos, para que o diagnóstico da situação de resistência possa ser gerado. Isso permitirá o monitoramento da RA, o que pode ser uma chave para desacelerar seu estabelecimento nas propriedades e preservar as classes anti-helmínticas, efeitos considerados de grande interesse para a indústria de antiparasitários veterinários.

1 Material e métodos

1.1 Determinação dos parâmetros de referência da resistência aos anti-helmínticos

Todos os procedimentos que envolveram animais doadores de parasitas foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Embrapa Pecuária Sudeste (Protocolo n°. 06/2012).

A fim de estabelecer as concentrações inibitórias (CIs) dos anti-helmínticos em isolados de *H. contortus* susceptíveis e resistentes, ensaios *in vitro* foram padronizados para o tiabendazol (Sigma-Aldrich T8904), levamisol (Sigma-Aldrich 31742), ivermectina (Sigma-Aldrich I8898) e monepantel (PGS P11144). Para a realização do TDL, foram preparadas soluções estoque e pelo menos 12 diluições seriadas para cada droga, utilizando-se protocolos previamente estabelecidos no CPPSE (N° 8/2012, N° 9/2013, N° 10/2014, N° 19/2016).

As diluições estoques (10^{-2} M = 10 mM) foram preparadas por dissolução dos princípios ativos em dimetilsulfóxido (DMSO) seguida por diluições seriadas 1:2 em água destilada. Foram utilizadas as concentrações finais de 50,0 a 0,024 µg/mL para tiabendazol, de 3,12 a 0,006 µg/mL para levamisol, de 10,0 a 0,005 µg/mL para ivermectina e de 2,0 a 0,0009 µg/mL para monepantel.

1.2 Isolados de *Haemonchus contortus*

- McMaster: isolado de origem sul africana susceptível aos anti-helmínticos (GILL et al., 1995).

- Echevarria1991: isolado de origem do Estado do Rio Grande do Sul susceptível aos anti-helmínticos (ECHEVARRIA; ARMOUR; DUNCAN, 1991).

- Embrapa2010: originalmente do rebanho CPPSE, mantido desde 2006, isolado em 2010 e caracterizado como resistente ao benzimidazol (20% de eficácia), à ivermectina (52%), à moxidectina (85%), ao levamisol (93%) e susceptível ao closantel (100%) e ao monepantel (100%), registrado no CARS (*Consortium on Anthelmintic Resistance SNPs–Parasite Isolate Database*).

- BotucatuF3: isolado multirresistente obtido após introgressão de genes de resistência ao monepantel (NICIURA et al., 2018) por intercruzamento entre os isolados Botucatu (ALBUQUERQUE et al., 2017) e Embrapa2010 (CHAGAS et al., 2013).

1.3 Animais doadores de parasitas

Oito ovinos Santa Inês procedentes do rebanho do CPPSE, com idade entre três e quatro meses e peso médio de 27 kg, foram tratados com Zolvix® (monepantel, 2,5 mg/kg PV) para eliminação da infecção natural por NGI. No sétimo e no décimo quinto dias após o tratamento foram realizadas contagens de ovos por grama de fezes (OPG), colhidas da ampola retal individualmente, executando-se a técnica de McMaster X 50 (ROBERTS; O'SULLIVAN, 1950) para conferência do status livre de parasitas. No 15º dia pós-tratamento, dois animais foram infectados artificialmente com 4000 L₃ de cada um dos isolados de *H. contortus*: McMaster, Echevarria1991, Embrapa2010 e BotucatuF3. Os animais foram mantidos em duplas em baias separadas, suplementados diariamente com 400 g de silagem de milho e com livre acesso a água e sal mineral. Com o estabelecimento da infecção, fezes foram coletadas dos animais para recuperação dos ovos dos parasitas para os testes *in vitro*.

1.4 Recuperação e preparação dos ovos de *H. contortus*

A fim de recuperar os ovos de *H. contortus*, seguiu-se o procedimento descrito por Coles et al. (1992) e adaptado por Chagas; Niciura; Molento (2011). Aproximadamente 5 g de fezes coletadas diretamente da ampola retal dos animais foram dissolvidas em água morna (37°C) e filtradas com o uso sequencial de peneiras (1 mm, 106 µm, 53 µm e 25 µm). Acrescentou-se solução de NaCl saturada aos ovos retidos na última peneira e centrifugou-se a 3.000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi lavado com água destilada na peneira de 25 µm. Os ovos foram, então, quantificados em cinco alíquotas, e 100 ovos em suspensão foram adicionados a cada poço de placas de 24 poços.

1.5 Teste de desenvolvimento larvar (TDL)

O TDL foi realizado de acordo com o protocolo (04/09 R12 CPPSE) do Laboratório de Parasitologia Veterinária, adaptado da metodologia descrita por Hubert; Kerboeuf (1992). Os testes foram realizados em placas de 24 poços, nas quais 10 µL de solução contendo cerca de 100 ovos de *H. contortus* foram adicionados em cada poço, que também recebeu 80 µL de meio de cultura (*Escherichia coli* [EC11303] e anfotericina B [A9528] - Sigma-Aldrich) e 160 µL de água destilada (volume total de 250 µL). As placas foram identificadas, seladas com filme de PVC e mantidas em incubadora durante um período de 24h a 27h, a $\pm 1^\circ\text{C}$ e umidade $\geq 80\%$ para o desenvolvimento das larvas (L1). Após esse período, cada poço recebeu 250 µL das diluições seriadas dos anti-helmínticos e as placas foram novamente incubadas por mais seis dias. O controle negativo foi composto de água destilada e meio nutritivo.

Após o período de incubação, as larvas L₁, L₂ e L₃ de cada poço foram quantificadas com auxílio de microscópio invertido. Todas as concentrações de anti-helmínticos e o controle negativo foram testados em seis repetições (seis poços) e em três experimentos independentes (em datas diferentes), totalizando 18 repetições para cada diluição e controle (CHAGAS; NICIURA; MOLENTO, 2011).

Após a determinação do desenvolvimento larvar frente aos quatro grupos de anti-helmínticos, procedeu-se à adaptação do TDL, previamente realizado em placas de 24 poços, para placas de 96 poços, a fim de tornar o teste mais rápido, com o uso de menos consumíveis e, portanto, com redução de custos. Consequentemente, ajustes de volume das soluções utilizadas foram realizados até a obtenção de pelo menos 80% do desenvolvimento larvar nos poços controle.

1.6 Análises estatísticas

A eficácia de cada anti-helmíntico em cada isolado foi determinada com base na média aritmética \bar{X} do desenvolvimento das larvas, de acordo com a seguinte equação (COLES et al., 1992): $Inibição(\%) = 100(\bar{X}_{test} / \bar{X}_{total})$ onde \bar{X}_{test} refere-se ao número de larvas que não alcançaram a fase L₃, e total corresponde ao número de L₁+L₂+L₃.

Os resultados do teste de desenvolvimento larvar foram apresentados como valores de concentrações inibitórias (CI_{50} e CI_{99}), que são definidos como as concentrações anti-helmínticas em que 50% e 99%, respectivamente, do desenvolvimento das L_1 até o estágio L_3 são inibidos. Os dados foram analisados por modelo de regressão logística Probit do SAS, para determinar as CI_{50} e CI_{99} . A CI_{50} fornece informações sobre a resistência média na população do parasita e a CI_{99} mostra qual a proporção da população é a mais resistente. O grau de RA foi expresso como o fator de resistência (FR), calculado como o valor CI_{50} ou CI_{99} para o isolado resistente dividido pelo respectivo valor para o isolado susceptível (DOLINSKÁ et al., 2013).

2 Resultados e discussão

O presente estudo descreve as doses-respostas dos anti-helmínticos para os estádios larvais do parasita de maior importância para os pequenos ruminantes, *H. contortus*. Ao avaliar a eficácia de cada droga utilizando ensaios *in vitro*, o estudo permite que os fármacos sejam comparados em termos de sua interação com o parasita alvo, independentemente dos efeitos farmacocinéticos relacionados ao hospedeiro. Assim, as respostas obtidas podem ser decorrentes da ação dos anti-helmínticos nos isolados de *H. contortus* em relação à: 1) afinidade de ligação às proteínas alvo; 2) atividade de proteínas de transporte e dos canais de membrana; 3) atividade de enzimas de detoxificação para os vários medicamentos (KWA; VEENSTRA; ROOS, 1994; KAMINSKY et al., 2008; CVILINK; LAMKA; SKÁLOVÁ, 2009; NEVEU et al., 2010; LESPINE et al., 2012; LLOBERAS et al., 2013).

Para que o teste seja validado, a caracterização de isolados brasileiros é imperativa, pois ocorre uma interação complexa entre as diferentes populações de espécies parasitas com outros fatores (hospedeiro, drogas, condições de manejo e meio ambiente). A resistência aos fármacos pode, então, evoluir como resultado da sinergia entre todos esses fatores (VADLEJCH et al., 2014; TRAVERSA; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, 2016). Assim, as diferenças na taxa de desenvolvimento da RA nas espécies de NGI, bem como o padrão desse desenvolvimento em cada propriedade, sugerem que as medidas para limitar ou prevenir o aparecimento e a expansão da RA devem ser individualizadas, pois cada propriedade possui uma situação em particular.

No presente estudo, o comportamento dos isolados frente aos anti-helmínticos pode ser visualizado na Figura 1. Pode-se observar que, para o tiabendazol, o isolado McMaster e o Echevarria1991 apresentaram inibição do desenvolvimento larvar praticamente idêntica, até aproximadamente 99% de inibição. O isolado Echevarria1991 mostrou-se o mais susceptível para o levamisol e para o monepantel, enquanto o McMaster foi o mais susceptível para a ivermectina. Nesse último caso, os isolados susceptíveis também tiveram comportamento bem semelhante até aproximadamente 90% de inibição. O isolado Embrapa2010 foi o mais resistente para todos os anti-helmínticos, alcançando as maiores CIs, ou seja, maior quantidade dos anti-helmínticos foi necessária para a inibição do seu desenvolvimento, com destaque para o monepantel. O que se esperava para o isolado Botucatu é que o mesmo tivesse resistência semelhante ao Embrapa2010 para todas as drogas e resistência superior para o monepantel. Entretanto, isso não foi observado.

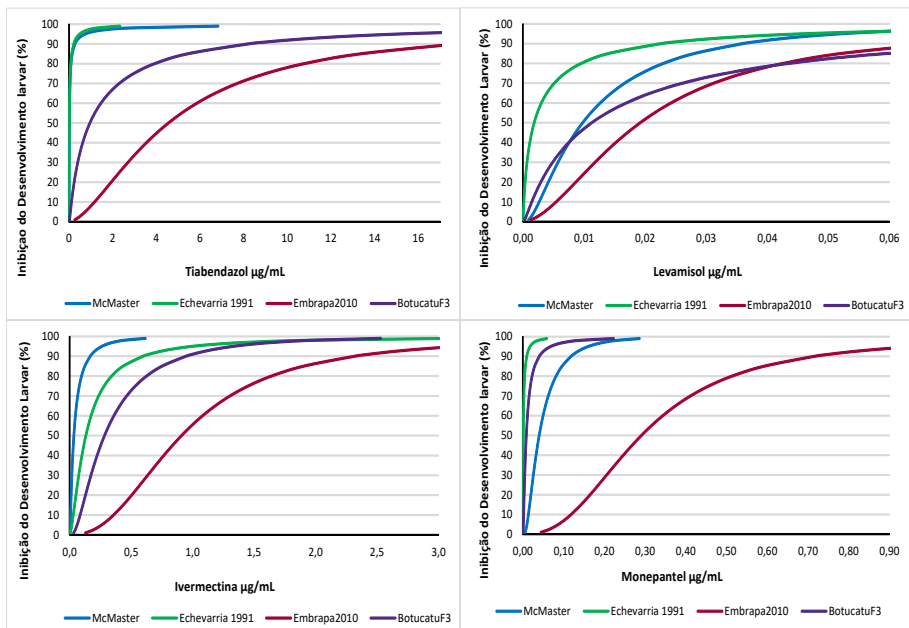


Figura 1. Concentrações inibitórias dos anti-helmínticos para os isolados susceptíveis (McMaster e Echevarria1991) e resistentes (Embrapa2010 e BotucatuF3) que inibiram o desenvolvimento larvar de *Haemonchus contortus*.

Os resultados das CIs para as drogas anti-helmínticas para cada isolado de *H. contortus* foram resumidos na Tabela 1. A partir dos dados gerados por regressão logística, via procedimento Probit, as concentrações inibitórias estimadas (CI_{50} e CI_{99}) demonstraram as diferenças de sensibilidade dos isolados frente às drogas avaliadas, exceto no caso do monepantel que teve um comportamento incomum entre os diferentes isolados. As CIs obtidas podem ser consideradas parâmetros de referência para a resistência, ou seja, são valores que poderão ser comparados, no futuro, aos resultados obtidos com os parasitas de campo, indicando se seus valores estão mais próximos das CIs dos isolados susceptíveis ou dos isolados resistentes e, portanto, qual grupo químico ainda é eficaz naquela propriedade.

Tabela 1. Concentrações inibitórias \pm intervalos de confiança (CIs, $\mu\text{g/mL}$) obtidos no TDL frente aos diferentes anti-helmínticos, contra os isolados susceptíveis (McMaster e Echevarria1991) e resistentes (Embrapa2010 e BotucatuF3) de *Haemonchus contortus*.

Isolados	CIs	Tiabendazol	Levamisol	Ivermectina	Monepantel
McMaster	50	0,014 (0,013 – 0,015)	0,010 (0,009 – 0,011)	0,034 (0,031 – 0,036)	0,040 (0,039 – 0,042)
	99	6,819 (4,971 – 9,725)	0,104 (0,097 – 0,112)	0,615 (0,522 – 0,738)	0,286 (0,259 – 0,319)
Echevarria 1991	50	0,011 (0,010 – 0,012)	0,002 (0,001 – 0,002)	0,131 (0,124 – 0,139)	0,001 (0,0009 – 0,001)
	99	2,325 (2,058 – 2,640)	0,175 (0,149 – 0,207)	3,115 (2,647 – 3,654)	0,058 (0,050 – 0,067)
Embrapa 2010	50	4,551 (4,317 – 4,798)	0,019 (0,018 – 0,020)	0,909 (0,895 – 0,923)	0,291 (0,279 – 0,303)
	99	78,817 (67,112 – 94,238)	0,269 (0,236 – 0,311)	6,431 (6,154 – 6,734)	1,909 (1,711 – 2,157)
BotucatuF3	50	0,953 (0,909 – 0,998)	0,011 (0,011 – 0,012)	0,283 (0,275 – 0,291)	0,008 (0,008 – 0,009)
	99	47,397 (42,203 – 53,554)	0,471 (0,419 – 0,534)	2,529 (2,375 – 2,700)	0,222 (0,203 – 0,244)

Tendo como base a inibição do desenvolvimento das larvas infectantes L_3 nos ensaios com o tiabendazol, os resultados das CIs demonstraram diferenças entre os isolados resistentes e susceptíveis (Tabela 1). A diferença significativa entre os isolados foi bem clara, pois o valor da CI_{50} do isolado resistente Embrapa2010 é muito superior em relação às CI_{50} dos dois isolados susceptíveis (Tabela 1). Os resultados obtidos nos ensaios com o tiabendazol estão próximos aos reportados por Várady; Corba (1999), estudo no qual obtiveram CI_{50} de 0,030 $\mu\text{g/mL}$ para um isolado susceptível de *H. contortus*. No entanto, para o isolado resistente, a CI_{50} obtida por eles (0,668 $\mu\text{g/mL}$) é bem inferior ao nosso resultado para o isolado resistente Embrapa2010 (4,551 $\mu\text{g/mL}$) e próxima ao isolado resistente BotucatuF3 (0,953 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 1).

Dolinská et al. (2013) declararam que os valores de fator de resistência (FR) superiores a 3 demonstram que o teste foi capaz de distinguir isolados susceptíveis e resistentes. Assim, quanto ao FR₅₀ (Tabela 2), os nossos valores (Embrapa2010: 325,07 e 413,72; BotucatuF3: 68,07 e 86,64) são superiores aos obtidos (14,3) por Várady; Corba (1999).

Tabela 2. Fatores de resistência (FRs) ao tiabendazol, levamisol, ivermectina e ivermectina dos isolados resistentes e susceptíveis de *Haemonchus contortus*.

Isolados	FRs*	Tiabendazol	Levamisol	Ivermectina	Monepantel
Embrapa2010/McMaster	FR ₅₀	325,07	1,90	26,74	***
	FR ₉₉	11,56	2,59	10,46	***
Embrapa2010/ Echevarria1991	FR ₅₀	413,72	9,50	6,94	***
	FR ₉₉	33,90	1,54	2,06	***
BotucatuF3/McMaster	FR ₅₀	68,07	1,10	8,32	0,20
	FR ₉₉	6,95	4,53	4,11	0,78
BotucatuF3/Echevarria1991	FR ₅₀	86,64	5,50	2,16	8,00
	FR ₉₉	20,39	2,69	0,81	3,83
BotucatuF3/Embrapa2010	FR ₅₀	**	**	**	0,03
	FR ₉₉	**	**	**	0,12

* CI₅₀ e CI₉₉ dos isolados resistentes divididas pelos respectivos valores dos isolados susceptíveis. Valores de FR superiores a três demonstram que o teste foi capaz de distinguir isolados susceptível e resistentes.

** Ambos são isolados resistentes a esses fármacos e, portanto, não há sentido em se calcular FR.

*** Ambos são isolados susceptíveis ao monepantel e, portanto, não há sentido em se calcular FR.

As diferenças entre os resultados dos autores supracitados e os do presente estudo quanto à CI₅₀ e FR₅₀ no isolado resistente deve-se, provavelmente, à pressão de seleção dessa droga nos diferentes países. Lembrando que no Brasil (em São Paulo, especificamente), os benzimidazóis são os anti-helmínticos mais utilizados, com alto percentual de resistência nas propriedades do estado (VERÍSSIMO et al., 2012). Na maioria dos estudos nos quais os benzimidazóis (o tiabendazol é a droga de referência) foram avaliados para a detecção da RA, o teste de eleição era o teste de eclosão de ovos (TEO). Embora existam poucos relatos de TDL para detectar resistência aos benzimidazóis, Amarante et al. (1997) obtiveram valores de CI₅₀ próximos aos do presente estudo para isolados susceptíveis (0,008 a 0,019 µg/mL) e inferiores para isolados resistentes (0,040 a 0,203 µg/mL) de *Ostertagia circumcincta*. Já em estudos com *Cooperia oncophora*, Demeler; Küttler; Von Samson-Himmelstjerna (2010) obtiveram resultados superiores

aos nossos para o isolado susceptível (0,0051 µg/mL) e inferiores para o isolado resistente (0,0056 µg/mL).

Na avaliação do levamisol (Tabela 1), foram estimadas CI_{50} que variaram de 0,002 µg/mL para o isolado Echevarria1991 a 0,019 µg/mL para o isolado Embrapa2010, sendo possível, portanto, a distinção de ambos como susceptível e resistente, respectivamente. Os isolados McMaster e BotucatuF3 apresentaram CI_{50} intermediárias (0,010 e 0,011 µg/mL). Amarante et al. (1997) realizaram o TDL para a detecção de RA em *O. circumcincta* e obtiveram para o levamisol valores de CI_{50} de 0,12 a 1,17 µg/mL, valores bem superiores aos obtidos no presente estudo para os quatro isolados.

Os valores do FR_{50} para o levamisol (Tabela 2) permitiram a distinção de resistência e susceptibilidade entre os isolados Embrapa2010 e Echevarria1991 (FR_{50} de 9,50) e BotucatuF3 e Echevarria1991 (FR_{50} de 5,50), mas não entre Embrapa2010 e McMaster (FR_{50} de 1,90) e BotucatuF3 e McMaster (FR_{50} de 1,10). Acredita-se que os FRs não foram tão elevados porque tanto Embrapa2010 quanto BotucatuF3 (isolado Embrapa2010 com indução de resistência ao monepantel) não possuem uma resistência tão destacada para ao levamisol (93% de eficácia de acordo com CHAGAS et al., 2013). Gill; Lacey (1998) citam resultados de FR_{50} de 0,5 a 1,7 para o levamisol em isolados susceptível e resistente de *H. contortus* e em outros trichostrongilídeos, resultados próximos aos obtidos no presente estudo para Embrapa2010 e McMaster. Amarante et al. (1997) obtiveram para o levamisol valores de CI_{50} de 0,12 a 1,17 µg/mL sobre *O. circumcincta*, resultados também próximos aos obtidos em nosso estudo frente a ambos os isolados.

Para a ivermectina, os isolados susceptíveis McMaster e Echevarria1991 apresentaram CI_{50} , aproximadamente, 27 vezes (0,034 µg/mL) e 7 vezes (0,131 µg/mL) menor, respectivamente, do que a do isolado Embrapa2010 (0,909 µg/mL) (Tabela 1). Esses resultados reforçam o caráter susceptível e resistente dos isolados avaliados e a factibilidade do TDL para determinar resistência a esse fármaco, tornando-se uma ferramenta útil e necessária no monitoramento da eficácia dos anti-helmínticos.

Os valores do FR_{50} para a ivermectina (Tabela 2) demonstram distinção entre Embrapa2010 e McMaster (FR_{50} 26,74), Embrapa2010 e Echevarria1991 (FR_{50} de 6,94) e BotucatuF3 e McMaster (FR_{50} de 8,32). Gill et al. (1995) e Gill; Lacey (1998), ao avaliarem a eficácia da ivermectina

frente ao isolado McMaster e isolados resistentes de *H. contortus*, obtiveram valores de CI_{50} bem inferiores aos obtidos em nossos estudos ($9,2 \times 10^{-9}$ e $3,19 \times 10^{-9}$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) e, conseqüentemente, os FR_{50} obtidos entre McMaster e os isolados resistentes também foram bem menores (0,7 e 1,0, respectivamente).

Para o monepantel, observou-se uma destacada diferença entre as CI_{50} dos isolados McMaster (0,040 $\mu\text{g/mL}$) e Echevarria1991 (0,001 $\mu\text{g/mL}$) em relação ao isolado Embrapa2010 (0,291 $\mu\text{g/mL}$), teoricamente susceptível a esse fármaco. Além disso, BotucatuF3 apresentou uma baixa CI_{50} (0,008 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 1). Tais resultados tiveram reflexo nos FRs obtidos. Na Tabela 2 pode-se observar que os resultados variaram de 0,03 a 8,00, e a distinção só foi possível entre os isolados BotucatuF3 e Echevarria1991 (FR_{50} de 8,00). Entretanto, de todos os isolados avaliados, somente o isolado BotucatuF3 foi considerado resistente ao monepantel por TRCOF e, apesar disso, as CI s obtidas para o isolado Embrapa2010 foram mais elevadas. Dessa maneira, as diferenças observadas entre as CI_{50} do monepantel frente aos diferentes isolados foram contrárias às esperadas.

Lecová et al. (2013) determinaram a eficácia *in vitro* do monepantel através do TDL em micro-agar (MALDT) contra isolados resistente e susceptível de *H. contortus*. CI_{50} muito similares foram obtidas para ambos os isolados (0,0034 e 0,0037 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) e, dessa maneira, esses autores também não conseguiram detectar a resistência ao monepantel pelo teste *in vitro*.

Recentemente Kotze et al. (2018) avaliaram a resistência ao monepantel em isolados susceptíveis e resistentes por meio do TDL, mas em vez de utilizar a base química pura (monepantel), foi utilizado o produto comercial Zolvix® (monepantel comercial). Os autores conseguiram detectar resistência ao MOP e foi possível diferenciar os isolados, obtendo-se FR de seis. Por causa desses resultados e com o resultado inesperado obtido no presente estudo, decidimos avaliar no TDL o monepantel comercial (Zolvix®) sobre os isolados Echevarria1991 e BotucatuF3, considerados susceptível e resistente ao monepantel, respectivamente. Assim, os resultados poderiam ser comparados aos dados já obtidos para sua base química pura (monepantel). Os resultados das CI s estimadas e FRs podem ser visualizados comparativamente na Tabela 3. As drogas tiveram efeito dose-dependente e foram diferentes

entre os isolados. Na avaliação de Echevarria1991, o monepantel comercial apresentou CIs superiores à sua base química, mas para o isolado resistente BotucatuF3 as CIs foram muito maiores, refletindo drasticamente sobre os FRs. Dessa forma, os resultados indicam o uso do produto comercial no TDL para a distinção entre isolados com extremos de resistência.

Tabela 3. Concentrações inibitórias (CIs) e fatores de resistência* (FRs) para os isolados susceptível (Echevarria1991) e resistente (BotucatuF3) de *Haemonchus contortus*, em estudo comparativo da base química monepantel e seu produto comercial.

Isolados	CIs	Base química	Monepantel comercial
Echevarria1991	50	0,001 (0,0009 – 0,001)	0,003 (0,003 – 0,004)
	99	0,058 (0,050 – 0,067)	0,107 (0,096 – 0,120)
BotucatuF3	50	0,008 (0,008 – 0,009)	0,235 (0,229 – 0,242)
	99	0,222 (0,203 – 0,244)	2,141 (1,993 – 2,308)
BotucatuF3/Echevarria1991	FR ₅₀	8,00	78,33
	FR ₉₉	3,83	20,01

* FR= CI₅₀ e CI₉₉ dos isolados resistentes divididas pelos respectivos valores dos isolados susceptíveis. Valores de FR superiores a três demonstram que o teste foi capaz de distinguir isolados susceptíveis e resistentes.

Ao final do estudo também foi possível adaptar o Protocolo do Laboratório de Parasitologia Veterinária – N° 4/2009 - R 2012, originalmente em placas de 24 poços, para placas de 96 poços. Os resultados mostraram elevada sobrevivência e desenvolvimento das larvas no grupo controle negativo (80%). A adaptação do TDL para placas de 96 poços resultou em método mais prático e menos oneroso, pois quatro grupos químicos foram avaliados simultaneamente em 12 concentrações em uma única placa, em duas repetições por concentração (conforme teste comercial já existente). Já nas placas de 24 poços, foram necessárias doze placas (seis repetições para cada concentração para validação do teste). Foi feita uma estimativa de custo para a realização do diagnóstico da resistência de uma fazenda em ambas as placas, com duas repetições por concentração. Na placa de 24 poços, o custo seria de R\$ 220,92 e de R\$ 28,36, se o teste fosse feito com a base química do monepantel ou com o monepantel comercial (Zolvix®), respectivamente. Já na placa de 96 poços o custo seria de R\$ 104,54 e de R\$ 8,26, respectivamente. Portanto, com a execução do teste na placa de 96 poços ocorre uma redução de custo de 47% e de 29,1%, respectivamente,

em relação à placa de 24 poços. Deve-se levar em consideração que a síntese da base química precisa ser encomendada e importada, o que eleva os custos. No futuro, esse teste *in vitro* permitirá auxiliar a tomada de decisão em programas de controle parasitário, com o objetivo de preservar a vida útil dos anti-helmínticos e de limitar o desenvolvimento da resistência nas populações de nematoides.

Conclusões

Os estudos com isolados de *H. contortus* indicaram que o TDL foi capaz de detectar a resistência parasitária para os principais grupos de anti-helmínticos disponíveis no Brasil. Os isolados resistentes apresentaram valores de CIs mais elevados do que os isolados susceptíveis. A maioria dos FR gerados demonstrou que o teste foi capaz de distinguir isolados susceptíveis e resistentes. Para o monepantel, os resultados indicaram o uso do produto comercial (Zolvix®) para a distinção entre isolados com extremos de resistência, entretanto, tal situação ainda será mais bem investigada por nosso grupo de pesquisa. A adaptação do teste para placas de 96 poços resultou em economia de, pelo menos, 29,1% do custo. O valor de R\$ 8,26 para a realização de um diagnóstico de resistência, a partir do envio de amostras fecais para o teste, se mostra bastante acessível para os criadores. O TDL mostrou-se confiável para o uso na rotina laboratorial e sua validação com amostras de campo permitirá um controle parasitário mais racional e guiado em ovinos e caprinos, de modo a retardar o desenvolvimento da resistência e a preservar as classes químicas.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos 2016/07132-8 e 2014/25821-0) e à Embrapa, pelo apoio financeiro ao estudo.

Referências

- ALBUQUERQUE, A. C. A.; BASSETTO, C. C.; ALMEIDA, F. A.; AMARANTE, A. F. T. Development of *Haemonchus contortus* resistance in sheep under suppressive or target selective treatment with monepantel. **Veterinary Parasitology**, v.246, p.112–117, 2017.
- AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v.120, p.91–106, 2004.
- AMARANTE, A. F.; POMROY, W. E.; CHARLESTON, W. A.; LEATHWICK, D. M.; TORNERO, M. T. Evaluation of a larval development assay for the detection of anthelmintic resistance in *Ostertagia circumcincta*. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 3, p. 305–311, 1997.
- BABJÁK, M.; KÖNIGOVÁ, A.; DOLINSKÁ, M. U.; VADLEJCH, J.; VÁRADY, M. Anthelmintic resistance in goat herds: *in vivo* versus *in vitro* detection methods. **Veterinary Parasitology**, v.254, p.10–14, 2018.
- CHAGAS, A. C. S.; KATIKI, L. M.; SILVA, I. C.; GIGLIOTI, R.; ESTEVES, S. N.; OLIVEIRA, M. C. S.; BARIANI JUNIOR, W. *Haemonchus contortus*: a multiple-resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. **Parasitology International**, v.62, n.1, p.1-6, 2013.
- CHAGAS, A. C. de S.; NICIURA, S. C. M.; MOLENTO, M. B (Ed.). **Manual prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2011. 153 p.
- 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 (W.A.A.V.P) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.44, n.1-2, p.35-44, 1992.
- CRAVEN, J.; BJORN, H.; BARNES, E. H.; HENRIKSEN, S. A.; NANSEN, P. A. Comparison of *in vitro* tests and a faecal egg count reduction test in detecting anthelmintic resistance in horse strongyles. **Veterinary Parasitology**, v.85, n.1, p.49-59, 1999.
- CVILINK, V.; LAMKA, J.; SKÁLOVÁ, L. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. **Drug Metabolism Reviews**, v.41, n.1, p.8-26, 2009.
- DEMELER, J.; KÜTTLER, U.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Adaptation and evaluation of three different *in vitro* tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle. **Veterinary Parasitology**, v.170, n.1-2, p.61–70, 2010.
- DOLINSKÁ, M.; KÖNIGOVÁ, A.; LETKOVÁ, V.; MOLNÁR, L.; VÁRADY, M. Detection of ivermectin resistance by a larval development test-back to the past or a step forward? **Veterinary Parasitology**, v.198, n.1-2, p.154–158, 2013.
- ECHEVARRIA, F. M. A.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L. Efficacy of some anthelmintics on an ivermectin-resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v.39, n.3-4, p.279–284, 1991.
- GEORGE, M. M.; PARAS, K. L.; HOWELL, S. B.; KAPLAN, R. M. Utilization of composite fecal samples for detection of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of cattle. **Veterinary Parasitology**, v.240, p.24–29, 2017.
- GILL, J. H.; LACEY, E. Avermectin/milbemycin resistance in trichostrongyloid nematodes. **International Journal for Parasitology**, v.28, n.6, p.863–877, 1998.

GILL, J. H.; REDWIN, J. M.; VAN WYK, J. A.; LACEY, E. Avermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus* - effects of ivermectin resistance. **International Journal for Parasitology**, v.25, n.4, p.463-470, 1995.

HIRPA, A.; ABEBE, G. Economic significance of sheep and goats. In: YAMI, A.; MERKEL, R. C. (Eds.). **Sheep and goat production handbook for Ethiopia**. Ethiopia: Branna Printing Enterprise; ESGPIP, 2008. p.1-4.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Record**, v.130, n.20, p.442-446, 1992.

KAMINSKY, R.; DUCRAY, P.; JUNG, M.; CLOVER, R.; RUFENER, L.; BOUVIER, J.; WEBER, S. S.; WENGER, A.; WIELAND-BERGHAUSEN, S.; GOEBEL, T.; GAUVRY, N.; PAUTRAT, F.; SKRIPSKY, T.; FROELICH, O.; KOMOIN-OKA, C.; WESTLUND, B.; SLUDER, A.; MÄSER, P. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. **Nature**, v.452, n.7184, p.176-180, 2008.

Kaplan, R. M.; Vidyashankar, A. N.; Howell, S. B.; Neiss, J. M.; Williamson, L. H.; Terrill, T. H. A novel approach for combining the use of *in vitro* and *in vivo* data to measure and detect emerging moxidectin resistance in gastrointestinal nematodes of goats. **Int. J. Parasitol.**, v.37, n.7, p.795-804, 2007.

KOTZE, A. C.; RUFFELL, A.; LAMB, J.; ELLIOTT, T. P. Response of drug-susceptible and -resistant *Haemonchus contortus* larvae to monepantel and abamectin alone or in combination *in vitro*. **Veterinary Parasitology**, v.15, n.249, p.57-62, 2018.

KWA, M. S. G.; VEENSTRA, J. G.; ROOS, M. H. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.63, n.2, p.299-303, 1994.

LAKEW, A.; MELESSE, A.; BANERJEE, S. Traditional sheep production systems and breeding practice in Wolayita Zone of Southern Ethiopia. **African Journal of Agricultural Research**, v.12, n.20, p.1689-1701, 2017.

LECOVÁ, L.; STUHLÍKOVÁ, L.; LAMKA, J.; ŠPULÁK, M.; VÁRADY, M.; SKÁLOVÁ, L. Efficacy of monepantel against lower developmental stages of a multi-resistant and susceptible *Haemonchus contortus* isolates: an *in vitro* study. **Helminthologia**, v.50, n.2, p.91-95, 2013.

LESPINE, A.; MENEZ, C.; BOURGUINAT, C.; PRICHARD, R. K. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v.2, p.58-75, 2012.

LLOBERAS, M.; ALVAREZ, L.; ENTROCASSO, C.; VIRKEL, G.; BALLENT, M.; MATE, L.; LANUSSE, C.; LIFSCHITZ, A. Comparative tissue pharmacokinetics and efficacy of moxidectin, abamectin and ivermectin in lambs infected with resistant nematodes: impact of drug treatments on parasite P-glycoprotein expression. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v.3, p.20-27, 2013.

MARKOS, T. **Productivity and health of indigenous sheep breeds and crossbreed in the central highland of Ethiopia**. 2006. 74 f. Thesis (Doctoral) - Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 2006.

NEVEU, C.; CHARVET, C.; FAUVIN, A.; CORTET, J.; BEECH, R.; CABARET, J. Genetic diversity of levamisole receptor subunits in parasitic nematode species and abbreviated transcripts associated with resistance. **Pharmacogenetics and Genomics**, v.20, n.7, p.414-425, 2010.

NICIURA, S. C. M.; MORAES, C. V.; CRUVINEL, G. G.; ALEMÁN GAINZA, Y.; ALBUQUERQUE, A. C. A. de; SANTANA, R. C. M.; THOLON, P.; TIZIOTO, P. C.; CHAGAS, A. C. de S.; ESTEVES, S. N.; BENAVIDES, M. V.; AMARANTE, A. F. T. do. **Análise genômica da resistência ao monepantel e investigação epigenética em *Haemonchus contortus***. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2018. 94 p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 43).

OLIVEIRA, P. A.; RUAS, J. L.; RIET-CORREA, F.; COELHO, A. C. B.; SANTOS, B. L.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SALLIS, E. S. V.; SCHILD, A. L. Doenças parasitárias em bovinos e ovinos no sul do Brasil: frequência e estimativa de perdas econômicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, p.797-801, 2017.

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. **The Veterinary Journal**, v.183, n.1, p.68–74, 2010.

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, J. P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.1, p.99–102, 1950.

SALGADO, J. A.; SANTOS, C. P. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.25, n.1, p.3–17, 2016.

SILANIKOVE, N. The physiological basis of adaptation in goats to harsh environments. **Small Ruminant Research**, v.35, n.3, p.181–193, 2000.

SILANIKOVE, N. Why goats raised on harsh environment perform better than other domesticated animals. In: Lindberg, J. E.; Gonda, H. L.; Ledin, I. (Eds.). **Recent advances in small ruminant nutrition**. Zaragoza: CIHEAM, 1997. p.185-194.

SUTHERLAND, I. A.; LEATHWICK, D. M. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? **Trends in Parasitology**, v.27, n.4, p.176–181, 2011.

TANDON, R.; KAPLAN, R. M. Evaluation of a larval development assay (DrenchRite®) for the detection of anthelmintic resistance in cyathostomin nematodes of horses. **Veterinary Parasitology**, v.121, n.1-2, p.125–142, 2004.

TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, v.103, n.3, p.183-194, 2002.

TRAVERSA, D.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Anthelmintic resistance in sheep gastrointestinal strongyles in Europe. **Small Ruminant Research**, v.135, p.75–80, 2016.

VADLEJCH, J.; KOPECKÝ, O.; KUDRNÁČOVÁ, M.; ČADKOVÁ, Z.; JANKOVSKÁ, I.; LANGROVÁ, I. The effect of risk factors of sheep flock management practices on the development of anthelmintic resistance in the Czech Republic. **Small Ruminant Research**, v.117, n.3-4, p.183–190, 2014.

VAN WYK, J. A.; REYNECKE, D. P. Blueprint for an automated specific decision support system for countering anthelmintic resistance in *Haemonchus* spp. at farm level. **Veterinary Parasitology**, v.177, n.3-4, p.212–223, 2011.

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, n. 3, p. 239–249, 1999.

WANG, C.; TORGERSON, P. R.; HÖGLUND, J.; FURRER, R. Zero-inflated hierarchical models for faecal egg counts to assess anthelmintic efficacy. **Veterinary Parasitology**, v.235, p.20–28, 2017.

Embrapa

Pecuária Sudeste

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



CGPE: 15124