

**Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Colegiado de Programas de Pós-Graduação
Ronaldo Luiz Nunes**

**Análise genética de isolados do *Haemonchus* sp
de ruminantes domésticos para identificação da
resistência ao anti-helmíntico Benzimidazol**

**Belo Horizonte – Minas Gerais
Escola de Veterinária da UFMG**

2012

Belo Horizonte – Minas Gerais

2012

Ronaldo Luiz Nunes

**Análise genética de isolados do *Haemonchus* sp isolados de ruminantes
domésticos para identificação da resistência ao anti-helmíntico
Benzimidazol**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade
Federal de Minas Gerais como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Zootecnia

Área de concentração Melhoramento

Professora Orientadora Denise Aparecida Andrade de Oliveira

Nunes, Ronaldo Luiz, 1959-

N972a

Análise genética de isolados do *Haemonchus sp* isolados de ruminantes domésticos para identificação da resistência ao anti-helmíntico Benzimidazol / Ronaldo Luiz Nunes. – 2012.

70 p. : il.

Orientadora: Denise Aparecida Andrade de Oliveira

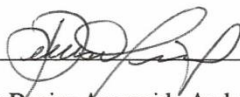
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Ruminante – Parasito – Teses.
2. Haemonchus – Teses.
3. Anti-helmínticos – Teses.
4. Helminologia veterinária – Teses. I. Oliveira, Denise Aparecida Andrade de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

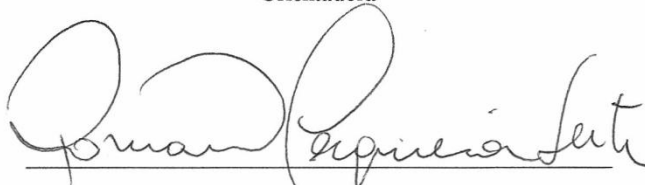
CDD – 636.089 696

Tese defendida e aprovada em 12 de Março de 2012 pela Comissão Examinadora composta por:

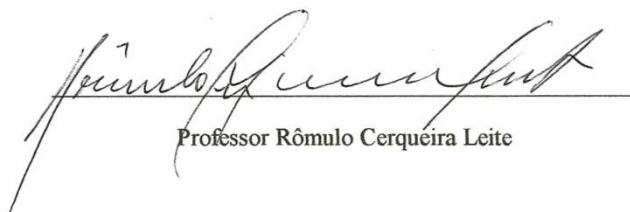


Professora Denise Aparecida Andrade de Oliveira

Orientadora



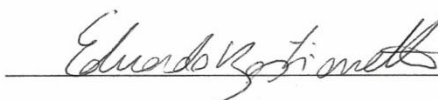
Professor Romário Cerqueira Leite



Professor Rômulo Cerqueira Leite



Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil



Dr. Eduardo Bastianetto

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”*

Chico Xavier

*Dedico aos meus pais Nélio e Ilza, aos meus
Irmãos Gladyston, Nelma e Maurício, aos
meus filhos João Vitor e Luiz Felipe e a Leila.*

Agradecimentos

À Deus por me mostrar o caminho, me dar força, paciência e fé perseverando ao longo de minha difícil caminhada.

À professora Denise Aparecida Andrade de Oliveira, pela confiança ao longo dos anos de convivência, e amizade e a oportunidade para a realização deste trabalho sob sua orientação.

Ao professor Romário Cerqueira Leite por disponibilizar o Laboratório de Endo e Ectoparasitose do Departamento de Medicina Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, para realização de parte dos experimentos.

Ao Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil, pela competência e colaboração no desenvolvimento de todo o trabalho.

Ao Dr. Eduardo Bastianetto pela colaboração efetiva e entusiasmo na realização do deste trabalho.

Ao Dr. Eduardo Geraldo Alves Coelho pela competente coorientação e amizade durante esta jornada de trabalho.

A professora Ângela Maria Quintão Lana pela coorientação e amizade.

Aos meus pais Nélio e Ilza pelo incentivo em mais esta etapa importante de minha carreira.

Aos meus irmãos, Gladyston, Nelma e Maurício pelo apoio e confiança.

Aos meus filhos João Vítor e Luiz Felipe pelo incentivo.

À Leila em especial pelo carinho, compreensão, incentivo e apoio durante essa jornada e sempre.

Ao Ângelo Marcos Vicente e Msc Diana Villas-Boas, pela colaboração e amizade durante a realização deste trabalho.

À Dr^a. Claudia Teixeira, Dr^a. Sandra Guimarães e Dr^a. Marcela Drummond, Dr. Daniel Carvalho pelo convívio e amizade.

As estagiárias e alunas de veterinária do Laboratório de Endo e Ectoparasitose do Departamento de Medicina Preventiva da Escola de Veterinária Luiza Bossi, Talita Pila Rezende e Juliana Marques Bicalho e ao veterinário Caio Henrique Souza de Oliveira.

Maria da Conceição Miranda Caldeira, Farmacêutica, técnica do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG, pela colaboração na identificação dos vermes.

Aos colegas de curso Juliana Nobre, Danilo Pimenta e Lissandra Souza pelo convívio e amizade.

As secretárias Bruna Diane, Sarah Cristina e Daiane Zacharias pelo carinho.

SUMÁRIO

	Página
1 - INTRODUÇÃO	17
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2-1 – O rebanho de ruminantes no Brasil	21
2-1.1– O Gênero <i>Haemonchus</i> sp	22
2-1.2- Hemoncose em ruminantes	22
2- 1.3- Ciclo biológico do <i>Haemonchus</i> sp	23
2-2- Resistência do parasito aos anti-helmínticos	24
2-2.1 – Histórico de resistência do parasito no Brasil	24
2-2.2- Diferenças fisiológicas entre os parasitos resistentes e sensíveis	26
2-3 – Mecanismo de ação dos anti-helmínticos Benzimidazóis e Pro-benzimidazóis	27
2-3.1- Mecanismo de Resistência dos benzimidazóis	27
2-3.2- Mutação da β -tubulina em nematódeos resistentes	27
2-4 – Teste para a detecção da resistência	30
2-4.1 – Teste ” <i>in vivo</i> ”	30
2-4.1.1 – Teste controlado	30
2-4.1.2 – Teste de redução na contagem de ovos nas fezes	30
2-4.2 – Teste “ <i>in vitro</i> ”	30
2-4.2.1 – Teste de eclosão de ovos	31
2-4.2.2 - Diagnóstico genético	31
2-4.2.3 – Reação em cadeia da polimerase alelo específica	32
2-5 – O controle anti-helmíntico e a resistência anti-helmíntica	33
3- MATERIAS E MÉTODOS	35
3-1 – Coleta de material e área de estudo	35
3-1.1- Rebanho Bovino	35
3-1.2– Rebanho Ovino	35
3-1.3- Rebanho Caprino	35

3-1.4- Rebanho Bubalino	35
3-2 – Estratégia de Trabalho	36
3-3 – Obtenção dos isolados	37
3-3.1 – Ovos	37
3-3.2 – Larvas	37
3-3.3 - Vermes adultos	38
3-4 – Extração do DNA	38
3-5 – Sequenciamento dos isolados	38
3-6 – Genotipagem dos isolados	39
3-6.1 – Primeira reação Nested-PCR	39
3-6.2 – Segunda reação Nested-PCR	40
3-6.3 – ARMS-PCR – reação específica para a identificação da resistência	41
3-7 – Eletroforese em gel de Gel de Poliacrilamida para a identificação da resistência	42
3-7.1 – Preparo do gel 8%	42
3-8- Análises dos dados	42
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4-1 – Genotipagem dos isolados	43
4-2- Resistência ao Benzimidazol em nematódeos isolados de rebanhos de ruminantes na Região Sudeste do Brasil	46
4-2.1 - Bovinos	46
4-2.2 – Caprinos	49
4-2.3 – Ovinos	51
4-2.4 – Bubalinos	53
4-3- Comparação da resistência ao Benzimidazol em nematódeos isolados nos rebanhos de ruminantes infectados por <i>Haemonchus</i> sp	55
CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE FIGURAS GRÁFICOS e TABELAS

Figura – 1 – Mutações não-sinônimas capazes de conferir resistência aos Benzimidazóis, na porção terminal da proteína. **Página** - 28

Figura – 2 – Estratégia de trabalho realizada durante os testes de padronização da técnica de genotipagem e na identificação dos genótipos e alelos resistentes e susceptíveis na população de *Haemonchus* no rebanho de ruminantes estudados.

Página - 36

Figura – 3 – Resultado do sequenciamento da região ITS-2 de isolados de *Haemonchus* sp. **Página** - 44

Figura – 4 - Identificação das espécies de *Haemonchus* sp. Árvore Filogenética **Página** - 44

Figura - 5 - Genotipagem do códon 200 do gene da β -tubulina isotipo presente em populações de *Haemonchus* sp, sensíveis ou resistentes ao BZ. **Página** - 45

Tabela -1 - Distribuição do rebanho de ruminantes por região no Brasil **Página** - 21

Tabela -2 Genótipos envolvidos na resistência ao Benzimidazol em *Haemonchus contortus* **Página** - 29

Tabela – 3 - Histórico de uso de anti-helmínticos nos rebanhos de ruminantes nas propriedades em estudo **Página** - 43

Tabela – 4 – Teste equilíbrio Hardy-Weinberg e parâmetros estatística F nos helmintos *Haemonchus placei* no rebanho de bovinos de Teófilo Otoni – MG-2010 **Página** - 48

Tabela – 5 – Teste equilíbrio Hardy-Weinberg e parâmetros estatística F nos helmintos *Haemonchus contortus* no rebanho de caprinos – MG- 2011 **Página** - 49

Tabela – 6 - Teste equilíbrio Hardy-Weinberg e parâmetros estatística F nos helmintos *Haemonchus contortus* no rebanho de ovinos de São José do Rio Preto – SP-2011 **Página** - 51

Tabela – 7 - Teste equilíbrio Hardy-Weinberg e parâmetros estatística F nos helmintos *Haemonchus placei* no rebanho de bubalinos de Campos Altos – MG - 2011 **Página** - 55

Gráfico – 1 - Frequência de genótipos por animal com OPG positivo infectado por *Haemonchus placei* no rebanho de bovino de Teófilo Otoni –MG-2010

Página - 47

Gráfico – 2 - Frequência de alelos resistentes e susceptíveis por animal OPG positivo infectado por *Haemonchus placei* no rebanho de bovino de Teófilo Otoni – MG-2010.

Página - 47

Gráfico – 3 - Frequência de genótipos por animal OPG positivo infectado por *Haemonchus contortus* no rebanho de caprino de Pedro Leopoldo – MG-2011

Página - 50

Gráfico – 4 - Frequência de alelos resistentes e susceptíveis por animal OPG positivo contaminado pela subpopulação de *Haemonchus contortus* no rebanho de caprinos de Pedro Leopoldo – MG - 2011

Página - 50

Gráfico – 5 - Frequência de genótipos por animal OPG positivo infectado por *Haemonchus contortus* no rebanho de ovinos de São José do Rio Preto – SP-2011

Página - 52

Gráfico – 6 - Frequência de alelos resistentes e susceptíveis por animal OPG positivo infectado por *Haemonchus contortus* no rebanho de ovinos de São José do Rio Preto – SP-2011

Página - 52

Gráfico – 7 - Frequência de genótipos por animal OPG positivo infectado por *Haemonchus contortus* no rebanho de bubalinos de Campos Altos – MG-2011

Página - 54

Gráfico – 8 - Frequência de alelos resistentes e susceptíveis por animal infectado por *Haemonchus contortus* no rebanho de bubalinos de Campos Altos – MG

Página - 54

Gráfico – 9 - Frequência genotípica em animais OPG positivos por rebanho de ruminantes infectados por *Haemonchus* sp

Página - 56

Gráfico – 10 - Frequência alélica em animais OPG positivos por rebanho de ruminantes infectados por *Haemonchus* sp

Página - 56

LISTA DE ABEVIATURAS E SIMBOLOS

%	Porcentagem
=	igual
>	Maior que
μl	Microlitros
ARMS-PCR	PCR específica para identificação da resistência
AS-PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase Alelo Específica
BZ	Benzimidazol
DE50	Dose efetiva para inibir 50% a eclosão de ovos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxorribonucleotídeo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
g	Gramma
HCl	Ácido clorídrico
He	Heterozigosidade esperada
Ho	Heterozigosidade observada
HWE	Equilíbrio Hardy-Weimberg
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ITS-2	Internal Transcribed Spacer
mA	Mileamper
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio

ml	mililitro
mtDNA	DNA mitocondrial
ng	Nanograma
°C	Graus Celsius
OPG	Ovos por grama de fezes
PAGE	Gel de Poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Phe	Fenilalanina
PSA	Persulfato de Amônio
qsp	Quantidade suficiente para
R	Resistente
RAPD	Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
rDNA	external-spacer region
rr	Genótipo homocigoto resistente
rs	Genótipo heterocigoto
S	Sensível
ss	Genótipo homocigoto sensível
TBE	Tris Ácido Básico EDTA
TEM	Tampão Tris EDTA Cloreto de Sódio
TEMED	N' N' N' N' tetramethyl ethylenediamine
Tris-HCl	2 Amino-2(Hydroxymethyl) 1,3 – propanodiol - HCl
Tyr	Tirosina

U/ μ l	unidade por microlitros
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPGMA	Undweighted Pair Gpoup Method With Aritmetic Meam
WAAVP	World Association for Advancement of Veterinary Parasitology
β	Letra grega beta
μ M	Micromolar
χ^2	Qui-quadrado

RESUMO

O objetivo deste trabalho é caracterizar geneticamente a resistência ao anti-helmíntico benzimidazol (BZ) em helmintos *Haemonchus* sp isolados de ruminantes. Para tanto trinta animais pertencentes a um rebanho de bovinos, um rebanho de Caprinos, um rebanho de Ovinos e um rebanho de Bubalinos, tiveram amostras de fezes coletadas e analisadas para a presença de ovos de Tricostrongilídeos. As propriedades foram avaliadas quanto ao histórico de uso de BZ para controle de nematódeos. Nos rebanhos bovinos e ovinos é utilizado BZ a mais de dez anos enquanto que nos rebanhos de bubalinos e caprinos não se utiliza este fármaco a pelo menos cinco anos. Dentre os 120 animais testados, dezoito (~15%) apresentaram ovos de Tricostrongilídeos nas fezes, com contagens de 200 a 33000 ovos por grama de fezes. A presença da mutação Phe200Tyr no gene da β -tubulina, que confere a resistência ao BZ foi avaliada em todas as amostras e suas frequências variaram de 0,074 a 0,476 (N= ~20 larvas/hospedeiro). Para a identificação do helminto que infectava os rebanhos foi realizado o sequenciamento do DNA nuclear na região ITS-2 de ovos e larvas. No rebanho de bovinos o principal nematódeo presente foi identificado como *Haemonchus placei* e nos demais rebanhos foi identificado a espécie *Haemonchus contortus*. O estudo revelou a presença de alelos resistentes em alta frequência entre espécimes de *Haemonchus* sp, principalmente nas propriedades que mantêm contínua pressão seletiva por meio do uso de BZ. A identificação da resistência nas subpopulações dos rebanhos de ruminantes foi realizada por genotipagem, os testes estatísticos χ^2 realizados revelaram não haver diferença significativa entre os isolados de *Haemonchus* presentes em diferentes animais de um mesmo rebanho. Todavia, foram encontradas diferenças significativas entre rebanhos. Este estudo reforça a necessidade do uso de métodos moleculares para o monitoramento da ocorrência da resistência anti-helmíntica, visando o uso racional de antiparasitários.

Palavras chaves: Benzimidazol, Resistência, *Haemonchus*

ABSTRACT

The purpose of this study is to genetically characterize the resistance to benzimidazole (BZ) anthelmintic in *Haemonchus* sp helminths isolated from ruminants. With this purpose, thirty animals from herds of cattle, goats, sheep and buffalos, had stool samples collected and analyzed for the presence of trichostrongylus eggs. Properties were evaluated as for the history of using BZ to control nematodes. In herds of cattle and sheep, BZ has been used for over ten years whereas in herds of buffalos and goats, it has not been used for at least five years. Among the 120 animals tested, eighteen (~15%) had trichostrongylus eggs in their feces, with counts from 200 to 33000 eggs per gram of feces. The presence of Phe200Tyr mutation in the β -tubulin gene, which confers a resistance to BZ was evaluated in all samples and its frequencies ranged from 0.074 to 0.476 (N= ~20 larvae/host). In order to identify the helminth which infected herds, nuclear DNA was sequenced at the ITS-2 region of eggs and larvae. In the herd of cattle, the main nematode was identified as *Haemonchus placei* and in the other herds, it was the *Haemonchus contortus* species. The study has shown the presence of resistant alleles in a high frequency among specimens of *Haemonchus* sp, particularly in properties which maintain a continuous selective pressure by using BZ. Resistance in isolates of ruminant livestock was identified through genotyping; χ^2 statistical tests were carried out and have not shown a significant difference among isolates of *Haemonchus* present in different animals from the same herd. However, significant differences were observed among herds. This study emphasizes the need to use molecular methods for monitoring the occurrence of anthelmintic resistance, encouraging the rational use of anti-parasitic drugs.

Keywords: Benzimidazole, Resistance, *Haemonchus*

1 – INTRODUÇÃO

Os rebanhos de ruminantes no mundo são acometidos de infecções causadas por helmintos. Estas infecções provocam perdas de animais e conseqüentemente prejuízos à produção. No entanto, a aplicação incorreta de anti-helmínticos usados comumente no controle das principais helmintoses nestes rebanhos, desencadeou o aumento da resistência aos principais fármacos comercializados.

Infectando os rebanhos de ruminantes, o *Haemonchus* sp é o helminto mais prevalente dentre os tricostrongilídeos. Em pequenos ruminantes o *Haemonchus contortus* causa perdas consideráveis nos rebanhos e a resistência aos anti-helmínticos é um problema grave. Já nos rebanhos de bovinos o problema de infecções por helmintos está distribuído entre os animais mais jovens infectados por *Haemonchus placei* e *Haemonchus similis* que são helmintos menos agressivos a estes animais. Já em bubalinos, a escassez de relatos de resistência às parasitoses compromete o crescimento dos rebanhos em várias regiões do país e a aceitação no mercado da carne, leite e derivados requer maior atenção quanto à sanidade destes animais.

Entre as classes de anti-helmínticos os benzimidazóis (Bz) são os mais usados a muito tempo. A facilidade de aplicação associada ao reduzido custo culminou no uso inadequado de doses insuficientes tanto em volume, quanto em número de aplicações, implicando na redução da eficiência da droga e conseqüente seleção dos indivíduos resistente ao fármaco.

A caracterização da resistência por procedimentos clássicos como contagem de ovos nas fezes ou teste da redução de ovos é importante, porém pouco sensível, uma vez que a identificação da resistência procede quando a carga parasitária é alta. A técnica molecular que identifica a presença da mutação que confere resistência ao Benzimidazol é sensível e específica detectando a mutação (F200Y) no isotipo 1 do gene da proteína β -tubulina. Mesmo assim, nos moldes que é realizada, ainda é muito onerosa como rotina no diagnóstico laboratorial.

A proposta de mudança na metodologia visa melhorar o processo de execução reduzindo custos e tempo, além de fornecer diagnóstico preciso ao estimar a frequência da resistência no rebanho utilizando número reduzido de animais. Dessa forma a

infecção pode ser detectada antes da expressão dos sinais subclínicos da infecção nos animais.

Sendo assim, diante do exposto, este estudo visa caracterizar molecularmente a resistência ao anti-helmíntico benzimidazol nos isolados de *Haemonchus* sp, provenientes dos rebanhos de bovinos, ovinos, caprinos e bubalinos e o aprimoramento da técnica molecular como ferramenta para uso no diagnóstico desta resistência.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As helmintoses estão entre as doenças que mais afetam a produtividade dos ruminantes em várias regiões do mundo. Os nematódeos tricostrongilídeos são importantes parasitos de ruminantes domésticos e causam perdas econômicas significativas em regiões tropicais e temperadas (Charlier, *et.al*, 2009).

Os índices elevados de infecção por *Haemonchus* sp estão atribuídos principalmente ao alto número de ovos e larvas presentes nas pastagens, exacerbados pela capacidade de sobrevivência destes parasitos no ambiente. Além das variações regionais e sazonais que dependem de vários fatores, como regime pluvial, ecossistema, tipo de manejo, condições sanitárias e idade dos animais principalmente em bovinos onde animais jovens são mais susceptíveis às infecções assim colaborando na elevação destes índices.

As helmintoses representam um problema sanitário para os rebanhos, pois além da morte de animais, provocam redução no desempenho reprodutivo, na qualidade da carcaça e na eficiência do sistema imune (Hawkins, 1993). Nas infecções por helmintos há inibição de apetite dos hospedeiros e diminuição da digestibilidade dos nutrientes provocando infecções secundárias no trato digestivo, comprometendo à absorção de alimentos.

O gênero *Haemonchus*, abrange as espécies de maior importância sanitária dentre os helmintos que acometem o abomaso de ruminantes, principalmente em cabras e ovelhas (Gibs e Hend, 1986; O'Connor *et al.*, 2006). Estes nematódeos reproduzem-se sexuadamente e suas fêmeas possuem alta prolificidade produzindo cerca de 10.000 ovos por dia. Esta característica gera um grande tamanho efetivo da população de helmintos e uma alta variabilidade genética aumentando em muito a população do

parasito no ambiente, quando comparada com a população dentro do animal (Prichard, 2001).

A domesticação dos rebanhos de ruminantes restringe a sua movimentação, provocando modificações significativas no ambiente para a adaptação destes animais. Este fato gera aumento da densidade populacional e conseqüentemente o desequilíbrio natural entre parasita e hospedeiro. A indústria de fármacos se viu incentivada a buscar medicamentos eficientes e de largo espectro de ação para ser aplicado no controle das parasitoses. O uso indiscriminado destes fármacos aliado ao custo reduzido e fácil aplicabilidade, acarretou na queda de sua eficiência selecionando parasitas resistentes (Leathwick *et.al*, 2011, Molento, 2004) e em alguns casos de resistência múltipla, provocada pelo uso de supressivos de diferentes classes químicas sobre uma população de helmintos (Meija *et.al*, 2003).

A resistência aos anti-helmínticos, amplamente disseminada entre nematódeos parasitas, principalmente tricostrongilídeos de pequenos ruminantes e equinos, também já é um problema encontrado em bovinos em diversas partes do mundo (Sangaster and Gill, 1999; Prichard, 2001; Kaplan, 2004). Para as três maiores classes de anti-helmínticos: benzimidazóis, imidazóis e lactonas macrocíclicas a resistência tem sido comumente relatada (Melo e Bevilaqua, 2002).

Das três maiores classes de anti-helmínticos o mecanismo de resistência mais bem conhecido é o do benzimidazol (Bz). A droga age no parasita ao ligar-se aos sítios de ligação na proteína β -tubulina, degenerando ou impedindo a formação dos microtúbulos nas células, estes têm papel importante na redistribuição das vesículas celulares além de orientar o processo de divisão celular Martin (1997), também os Bz podem bloquear de forma irreversível a captação de glicose nos helmintos. Esta redução no estoque de energia pode levar o helminto a óbito (Lanusse, 1996). Para as demais classes há o envolvimento de um grande número de genes possivelmente implicados na resistência, sendo que a importância seletiva de cada um não é bem conhecida. O mecanismo de resistência, o surgimento e a disseminação de alelos resistentes em uma população de parasitos pode diferir entre os isolados de algumas espécies de parasitas sendo estas informações importantes para elaboração de alternativas de controle da resistência (Gilleard, 2006).

A resistência anti-helmíntica em *Haemonchus* ameaça a produção do rebanho de ruminantes em todo o mundo. O problema é sério, pois a aplicação de anti-helmínticos deixa resíduos nas propriedades e nas carcaças de animais, interferindo nos lucros dos agricultores e na saúde do consumidor (Van Wyr *et al.*, 2006). Há perdas na produção em infecções clínicas, custos com tratamentos e em casos extremos mortalidade de animais, especialmente jovens e fêmeas ovinas no peri-parto. As doenças parasitárias podem ainda, forçar a seleção de animais menos susceptíveis em detrimento de seu desempenho produtivo (Motta *et al.*, 2003). O controle destas infecções é, portanto, imprescindível para o sucesso dos sistemas de produção dos ruminantes (Cezar, *et al.*, 2008).

No Brasil a resistência aos anti-helmínticos está associada ao uso indiscriminado das principais drogas disponíveis no mercado. A falta de controle nestas aplicações, tanto no volume das doses, quanto no número de aplicações, além do trânsito de animais sem o devido controle da carga parasitária, colaboram para a disseminação da resistência aos anti-helmínticos (Paiva e Neves, 2009). Muito se gasta no Brasil e em diversos países anualmente, com tratamentos de rebanhos principalmente em rebanhos de pequenos ruminantes, contaminados por helmintos gastrointestinais, sendo que a resistência aos principais fármacos presentes no mercado é o principal causador de prejuízos aos produtores. A redução desses prejuízos, passa pelo controle destas infecções (Ahid *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2010).

Para a eficiente formulação de um programa de controle é indispensável conhecer as particularidades regionais tornando possível realizar o diagnóstico do grau de infecção da contaminação ambiental por meio de exames clínicos e laboratoriais (Eysker e Poegler, 2000). Além disso, deve-se comprovar a eficácia dos anti-helmínticos eleitos para uso no rebanho (Bianchin *et al.*, 1993; Waller 1999).

Existem técnicas moleculares disponíveis para diagnosticar a resistência aos benzimidazóis (Bz) por meio da reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), a partir da extração de DNA de isolados de larvas de *Haemonchus* sp, descrita por Silvestre e Humbert (2000). Tal técnica possibilita a identificação de resistência ao anti-helmíntico Bz e complementa os diagnósticos tradicionais como a contagem de OPG (contagem de ovos por grama de fezes), no levantamento da resistência ao anti-helmíntico nos rebanhos de ruminantes. Assim, estudos da genotipagem de isolados de

Haemonchus sp podem abrir possibilidades para realização do controle mais efetivo destas parasitoses, minimizando os prejuízos para a produção nacional além de possibilitar melhor conhecimento e controle da resistência nos rebanhos.

2 – 1 – O rebanho de ruminantes no Brasil

O Brasil é um país tropical que apresenta o maior rebanho bovino comercial do mundo, aproximadamente 205,3 milhões de animais em 2010. Os rebanhos de ovinos, caprinos e bubalinos são menores, mas expressivos e apresentam 16,9; 9,3; e 3 milhões de animais respectivamente em 2010 (IBGE 2011).

Estas espécies de ruminantes foram introduzidas no Brasil de forma exótica durante o período de colonização no Século XVI, exceto os búfalos foram introduzido no país pela região Norte no início do Século XX (Santiago, 2010).

A extensão territorial, as condições climáticas, o modo de criação e as boas pastagens promoveram a expansão destes animais por todos os estados, havendo maior concentração de pequenos ruminantes caprinos e ovinos no Nordeste, ovinos no Sul, bovinos no Centro-Oeste e Sudeste além de Búfalos no Norte e mais recentemente no Sudeste. A distribuição por região está mostrada na tabela 1.

Tabela 1: Distribuição do rebanho de ruminantes por região no Brasil

Regiões	Sul	Sudeste	Centro-Oeste	Norte	Nordeste
Animais	%	%	%	%	%
Bovinos	13,3	18,3	34,6	20,1	13,7
Ovinos	28,99	4,29	6,36	3,20	57,16
Caprinos	4,13	2,57	1,04	1,96	90,3
Búfalos	9	15	12	50	14

Fonte: IBGE 2010

Os rebanhos de ruminantes têm importância econômica no Brasil, sendo largamente explorados visando produção de carne, leite e derivados e couro. Entretanto, um dos entraves para a produção de ruminantes principalmente em ovinos, são as endoparasitoses gastrointestinais, hoje consideradas como problema na produção em todo mundo, especialmente nas regiões tropicais onde os prejuízos econômicos são mais acentuados.

As verminoses gastrointestinais são as endoparasitoses que representam maior importância na exploração de ruminantes e têm como principais agentes etiológicos as espécies de nematódeos. A manifestação dos efeitos do parasitismo no rebanho aparece de várias formas, conforme as espécies presentes podendo ser caracterizado pela intensidade de infecção, a categoria e ou estado fisiológico e nutricional do hospedeiro. O impacto global na produção de ovinos e caprinos tem como consequência o atraso no crescimento e da mortalidade que ocorrem nas categorias mais susceptíveis (Vieira, 2008).

Os nematódeos gastrointestinais de maior importância entre os pequenos ruminantes pertencem aos gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Strongyloides*. Entre os bovinos, além desses há também *Cooperia*, *Oseophagostomum*, *Bunostromum* e *Ostertágia* em búfalos, destacando como espécies de nematódeos do abomaso e de grande agressividade aos hospedeiros, o *Haemonchus contortus* nos ovinos, caprinos e búfalos e o *Haemonchus placei* e *Haemonchus similis* em bovinos.

2-1-1 – O Gênero *Haemonchus* sp

O gênero *Haemonchus* parasita o abomaso de ruminantes, causando uma doença denominada hemoncose. São parasitas que apresentam comprimento entre 10-30 mm. Possuem pequena cavidade bucal e apresentam um dente ou lanceta, papila cervical proeminente, bursa larga e lobo dorsal pequeno e assimétrico. A vulva na fêmea possui processos longiformes (Soulsby, 1982).

Segundo Amarante *et al.*, (1996) três espécies de *Haemonchus* acometem ruminantes domésticos no Brasil: *Haemonchus contortus* (Rudolfi, 1803; Cobb, 1898); *Haemonchus placei* (Place 1893) e *Haemonchus similis* (Travassos, 1914). Dos isolados de *Haemonchus* prevalecem *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes e búfalos, enquanto que em bovinos o *Haemonchus placei* e o *Haemonchus similis*.

2- 1-2 - Hemoncose em ruminantes

O *Haemonchus contortus* é o nematódeo mais patogênico nas regiões tropicais e a sua patogenia está associada ao hematofagismo realizado por este parasito, causando hemorragia na mucosa abomasal (Pradhan e Johnstone, 1972).

Em bovinos as lesões no epitélio gástrico causam redução na secreção de HCl e pepsinogênio, resulta em aumento no pH, inativando a pepsina e conseqüentemente, ocorre interrupção da digestão das proteínas (dispepsia). Um sinal clássico da redução das proteínas plasmáticas (especialmente albumina) é o edema submandibular (Costa e Borges, 2010).

Em pequenos ruminantes, observa-se também anemia e posteriormente, o animal pode apresentar o edema submandibular e a ascite. Na infecção crônica o animal apresenta uma queda progressiva no volume globular e redução no ganho de peso, quando comparado com animais livres de parasitos. Já durante a hemonose hiperaguda o animal pode morrer subitamente como consequência de gastrite hemorrágica grave. Diarreia não é um sintoma comum nas infecções por *Haemonchus* (Soulsby, 1987).

A baixa qualidade da dieta alimentar pode influenciar na intensificação da doença. Animais que recebem dietas pobres em proteínas apresentam sinais clínicos mais pronunciados apesar de apresentarem cargas parasitárias semelhantes àqueles que têm dieta rica em proteína (Abbott *et al.*, 1986).

2-1-3 - Ciclo Biológico do *Haemochus* sp

O ciclo do *Haemonchus* é muito similar ao de outros tricostrongilídeos. Apresenta um ciclo evolutivo direto sem hospedeiro intermediário. As fêmeas são ovíparas prolíferas. Os ovos são eliminados nas fezes em condições ideais (18^o a 26^oC, 80 a 100% de umidade) e se desenvolvem em um terceiro estágio infectante (L3) em aproximadamente cinco dias (Soulsby, 1982). A disponibilidade das formas infectantes L3 pode ser influenciada pela umidade e um grande número é encontrado no verão, em função das chuvas as pastagens tornam-se úmidas e as temperaturas giram em torno de 24^oC, favorecendo a eclosão dos ovos presentes no ambiente (Krevek, *et al.*, 1991).

Após a ingestão e desenvolvimento no rúmen, as larvas passam por mudanças desenvolvendo antes da mudança final, a lanceta perfurante que lhes permite a obtenção do sangue nos vasos da mucosa do abomaso, onde se fixam. O período pré-patente médio para *Haemonchus contortus* em ovinos e caprinos está avaliado em 15 dias, enquanto que para *Haemonchus placei* em bovinos está entre 26 e 28 dias (Soulsby, 1982).

2 – 2 - Resistência do parasita aos anti-helmínticos

O uso intensivo de anti-helmínticos, subdoses aplicadas, diagnósticos incorretos e a falta de rotatividade das bases farmacológicas, vêm provocando sérios problemas sanitários como a resistência dos nematódeos aos fármacos. Fiel *et al.*, (2003), definem este fenômeno como sendo a capacidade hereditária de uma população parasitária de reduzir a sua sensibilidade à ação de uma droga.

A resistência aos anti-helmínticos já foi relatada em todas as espécies de ruminantes domésticos. O primeiro relato de resistência aos anti-helmínticos em nematódeos gastrointestinais de ovinos foi para o tiabendazol (Drudge, 1964). Este problema se disseminou pelo mundo inteiro, em diversas espécies de nematódeos de diversos hospedeiros ocorrendo em áreas de período chuvoso onde o *Haemonchus contortus* é endêmico, principalmente na Austrália, África do Sul e América do Sul (Waller *et al.*,1995). No Brasil é recomendado medicar os rebanhos, principalmente de ovinos, quando as condições ambientais da região são desfavoráveis ao desenvolvimento e sobrevivência dos estágios de vida livre no ambiente. Em cada ecossistema do país, o esquema de vermifugação deve ser adaptado de acordo com as condições climáticas da região (Vieira, 2008).

Entre ovinos e caprinos a resistência aos anti-helmínticos é mais frequente. Contudo, este fato não é indicativo de que os relatos de parasitos de bovinos apresentem menor diversidade genética para expressão da resistência, mas sim reflete a menor frequência de tratamentos a que estes animais são submetidos (Paiva *et al.*, 2001).

2-2-1 – Histórico de resistência de helmintos no Brasil

Desde o primeiro relato sobre a resistência aos anti-helmínticos em ovinos no Brasil (Dos Santos e Gonçalves, 1967) e em bovinos foi feito por Pinheiro e Echevarria (1990), não faltaram outros relatos sobre nematódeos resistentes aos principais fármacos comercializados e utilizados no país.

A resistência a anti-helmínticos na região Sul, foi detectada no Paraná (Thomaz-soccol *et al.*,2004), Santa Catarina (Ramos *et al.*, 2004) e no Rio Grande do Sul (Echevarria e Trindade, 1989; Echevarria *et al.*, 1996). Na região Sudeste, foi relatada em São Paulo (Farias *et al.*, 1997) e em Minas Gerais (Rangel *et al.*, 2005). No Nordeste, inicialmente a resistência a anti-helmínticos foi detectada em caprinos no Ceará (Vieira *et al.*, 1989).

Estudos posteriores indicaram resistência em Pernambuco, Bahia e Alagoas (Charles *et al.*, 1989). No Ceará, existem outros relatos de resistência em caprinos e ovinos (Vieira e Cavalcante, 1999; Melo *et al.*, 1998; Bevilaqua e Melo, 1999). E ainda no Ceará, foi observada a presença de *Haemonchus contortus* resistentes em ovinos provenientes do Paraná e Rio Grande do Sul (Vieira *et al.*, 1992), indicando a disseminação da resistência para todo país.

A explicação para o surgimento de isolados resistentes aos anti-helmínticos é entendida como a seleção natural de uma população original de parasitas contém alguns indivíduos com a capacidade genética de sobreviver ao tratamento (Griffiths *et al.*, 1998). Com a eliminação dos indivíduos sensíveis, a próxima geração consistirá da progênie daqueles poucos parasitos que sobreviveram ao tratamento e muitos destes terão herdado a capacidade de sobrevivência à exposição anti-helmíntica.

O efeito de seleção na frequência dos alelos resistentes na população é influenciado por alguns fatores, com a pressão de seleção, sendo determinada pela dosagem do anti-helmíntico e pela proporção da população exposta à droga (Waller, 1996).

Os principais fatores que levam ao rápido surgimento da resistência são operacionais, tais como subdosagem, frequência de tratamentos, rotação rápida de princípio ativo (Martin, 1987).

Quando os animais são tratados com dose inferior àquela recomendada, esta atingirá somente os indivíduos muito sensíveis da população parasitária, sobrevivendo indivíduos resistentes e medianamente resistentes, que darão origem a novas gerações (Craig, 1993).

A extrapolação da indicação da dosagem do fármaco de uma espécie para outra espécie animal exemplifica outra forma de subdosagem, assim ocorrendo desenvolvimento de resistência anti-helmíntica principalmente em rebanhos mistos de ovinos e caprinos. Em geral, as indicações do fabricante para aplicação do fármaco, são dirigidas aos ovinos e é realizada extrapolação para os caprinos (Gilham e Obendorf, 1985; Bogan e Armour, 1985).

Os fatores genéticos são também importantes no desenvolvimento da resistência. As migrações introduzem diferentes genes conferidores de resistência provenientes da população de origem e os incorporam ao conjunto gênico da nova população de

parasito. O mecanismo provoca a dispersão de alelos de uma população para outra (Silvestre e Humbert, 2002). Além disso, as altas taxas de mutação, aliadas aos grandes números populacionais efetivos frequentemente encontrados em tricostrongilídeos, também aumentam a chance de surgimento de alelos capazes de conferir resistência aos fármacos (Blouin *et al.*, 1995)

Sangster, (2001) e Coles (2005) indicaram como fatores que determinam a taxa de seleção, a dominância dos alelos para resistência, o número e a frequência inicial dos genes envolvidos, a diversidade genética da população, a relativa adaptabilidade dos organismos resistentes e a oportunidade para recombinação gênica. A resistência aos Bz foi identificada em estudos realizados com *Teladorsagia circumcincta*, onde a hereditariedade dos genes é incompletamente recessiva, com apenas uma mutação pontual no gene da proteína β -Tubulina (F200Y) (Elard *et al.*, 1996; Dobson *et al.*, 1996; Prichard, 2001). Além da mutação F200Y, Silvestre e Cabaret, (2002) identificaram a resistência ao Benzimidazol associada a uma mutação pontual F167Y. A mutação pontual E198A foi identificada por (Rufener *et al.*, 2009).

2-2-2 - Diferenças Fisiológicas entre os parasitos resistentes e sensíveis

Para comparar características de indivíduos resistentes e sensíveis, o nematódeo de vida livre *Caenorhabditis elegans*, vem sendo utilizado como modelo para estudo (Geary e Thompson, 2001; Hashmi *et al.*, 2001). Observa-se neste parasito que os indivíduos resistentes apresentam disfunção na sua mobilidade, ovoposição, músculo da faringe, entre outras características que chegam a ser letais para esse parasito, mas irrelevantes em outras espécies de tricostrongilídeos (Prichard, 2001).

Em *Teladorsagia circumcincta* não foi observada por Ellard *et al.* (1998) diferença entre os genótipos resistente e sensível na produção de ovos, taxa de desenvolvimento de ovos até L3, capacidade de estabelecimento destas larvas e sobrevivência dos adultos. Apresentaram, no entanto, diferença quanto ao comprimento dos adultos, sendo os parasitos resistentes maiores que os sensíveis aos 60 dias de infecção, esperando-se que haja, assim, aumento da fertilidade nas fêmeas (Leignel e Cabaret, 2001).

2-3 – Mecanismos de ação dos anti-helmínticos Benzimidazóis e Pro-benzimidazóis

Na classe de anti-helmínticos Benzimidazol estão o tiabendazol, o febendazol, o mebendazol e o oxfendazol. Entre os pro-benzimidazóis estão febantel, tiofanato e netobimim. Ambos os grupos pertencem à mesma classe de benzimidazóis. A absorção da droga pelo helminto afeta as células intestinais dos nematódeos. O principal efeito está na redistribuição das vesículas celulares, provocando mudanças nas células (Jasmer *et al.*, 2000; Bruce, 1987). Alguns processos celulares dependem da ação dos microtúbulos, essa modificação induzida pela droga na distribuição das vesículas celulares leva à morte desse organismo (Köhler, 2001). O fármaco liga-se a proteína tubulina (impedindo a formação dos microtubos), sendo que nos parasitos resistentes há uma diminuição dos sítios de afinidade nas subunidades proteicas dos microtubos (Lacey, 1988). Os microtubos formam o fuso mitótico durante a divisão celular e permitem o transporte de vesículas e organelas pelo citoplasma celular (Martin, 1997).

2-3-1 - Mecanismo de resistência dos Benzimidazóis

O mecanismo de ação do fármaco é a interrupção da formação dos microtúbulos no interior das células por meio da ligação na proteína β -tubulina, consequentemente, inibe-se o transporte de vesículas secretoras e a absorção e digestão de nutrientes fica comprometida, causando a morte do helminto por inanição (Costa e Borges, 2010).

A resistência aos Bz tem sido associada com modificações relacionadas à tubulina (Gutteridge, 1993). Estudos em populações de *Haemonchus contortus*, resistentes e sensíveis ao Benzimidazol, indicaram a existência de diferenças específicas no DNA genômico destas populações (Roos, *et al.*, 1990).

2-3-2 - Mutação da β -tubulina em helmintos resistentes

Alguns estudos mostraram que a resistência ao Bz em nematódeos tricostrongilídeos, relata em particular uma mutação no gene da β -tubulina no aminoácido 200 produzindo a substituição de Phe nos nematódeos susceptíveis por uma Tyr no nematódeo resistente (Beech *et al.*, 1994; Humbert *et al.*, 2001; Jabbar *et al.*, 2006). Outras mutações E198A e F167Y no mesmo gene também foram descritas como capazes de conferir resistência

aos Bz, porém são menos frequentes. Entretanto há um crescimento evidente da complexidade da resistência envolvendo outros loci gênicos (Prichard, 2001).

O gene da proteína β -tubulina apresenta expressão de diversos isotipos em nematódeos cada um com diferentes afinidades ligadas ao Bz. Estes genes demonstraram ser de alta variabilidade para outras regiões geográficas conferindo resistência ao Bz (Beech *et al.*, 1994). As mutações na β -tubulina na sequência de DNA em isolados de *Haemonchus contortus* promoveram mudanças na sequência do aminoácido, alterando a estrutura e propriedade da proteína em isolados resistentes (Ghise *et al.*, 2007).

A resistência ao Bz em alguns nematódeos, fungos e algumas espécies de protozoários, tem sido associada à substituição de aminoácidos na posição 167 da β -tubulina (Hollomon *et al.*, 1998; Silvestre and Humbert, 2002).

Silvestre e Cabaret, (2002) observaram outra mutação na posição 167 do gene da β -tubulina no isotipo-1 em dois isolados resistentes de *Haemonchus contortus*, também causada pela substituição de Phe por Tyr. Esta mutação foi observada em isolados resistentes de fungos *Neurospora crassa* em experimentos *in vitro*. O resíduo Tyr na posição 167 impede também a ligação Benzimidazol recombinante na β -tubulina do *Haemonchus contortus*.

Rufener *et al.*, 2009, demonstraram outra mutação para o isotipo-1 β -tubulina resistente ao Benzimidazol, como sendo a troca do Glutamato por Alanina na posição 198 (E198A), onde foram realizados testes controlados em laboratório para estudar a resistência à droga.

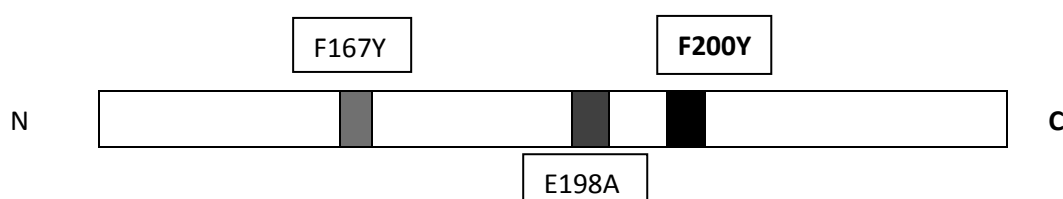


Figura -1 – Mutações não-sinônimas capazes de conferir resistência aos Benzimidazóis, na porção terminal da proteína

β -tubulina (Isotipo 1)

As mutações não sinônimas são tipos de mutações pontuais onde um único nucleotídeo é mudado provocando a substituição de um aminoácido. Isto por sua vez pode fazer

com que a proteína resultante não seja funcional. Nesse caso, as proteínas formadas podem ter novas funções, mas no geral estas têm maior potencial deletério (Calcagnotto, 2001). No caso da proteína β -tubulina (Isotipo-1) as modificações não sinônimas confere resistência ao Benzimidazol.

Os principais genótipos envolvidos na resistência ao benzimidazol associados à mutação no gene isotipo-1 da proteína β -tubulina, em *Haemonchus contortus* segundo Prichard (2001), são mostrados na tabela 2.

Tabela -2 Genótipos envolvidos na resistência ao Benzimidazol em *Haemonchus contortus*

Genótipos resistentes ao	Notas	Eficácia para as doses
Benzimidazol (Bz)		Recomendadas
Mais susceptíveis	Nematódeos susceptíveis	100%
S₁S₁/S₂S₂	Para baixas concentrações de Bz e menos potentes como albendazol	
Levemente resistente	Alta susceptibilidade para potentes Bzs, mas resistência evidente para Bz menos potente	90-98%
S₁R₁/S₂R₂		
Moderadamente resistente	Muito resistente para Bz e reduzida eficácia quando comparada aos Bzs potentes	20-90%
R₁/R₁, S₂/S₂, R₁/R₁, S₂/R₂		
Altamente resistentes	<i>Haemonchus contortus</i> apresenta alelos para resistência para o Bz	0%
R₁/R₁, R₂/R₂		

Adaptada de Prichard 2001

S1 e S2 são alelos Bz susceptíveis para β -tubulina nos isótipos I e II, os alelos R1 e R2 são alelos Bz resistentes para β -tubulina nos isótipos I e II

2-4 – Testes para detecção da resistência

2.4.1-Teste *in vivo*

Largamente utilizados para monitorar a resistência em nematódeos, os testes *in vivo* são onerosos e geralmente se caracterizam pela baixa sensibilidade devido à variação interanimal (Craven *et al.*, 1999). São testes necessários para o estudo da farmacologia da droga quanto ao papel da farmacodinâmica no hospedeiro, além da farmacologia bioquímica da droga ou seu modo de ação (Lacey, 1988).

2.4.1-1 - Teste controlado

A eficiência neste teste é determinada pela comparação da população de parasitos no grupo tratado da população com a do grupo não tratado. É o teste mais confiável para avaliação da atividade anti-helmíntica. Os animais são separados em grupos medicados, não medicados. Após a dosificação dos animais do grupo medicado é dado um intervalo entre o tratamento e faz-se o sacrifício dos animais. Estes são necropsiados e a carga parasitária encontrada é identificada e contada. Os adultos são diferenciados dos estágios larvais e se possível larvas hipobióticas (Wood *et al.*, 1995).

2.4.1-2 – Teste de redução na contagem de ovos nas fezes

Para a execução do teste de redução na contagem de ovos nas fezes distribuem-se aleatoriamente os animais parasitados em grupo tratado, não tratado conforme técnica descrita por Coles *et al.*, (1992). São necessários no mínimo dez animais por grupo a fim de permitir interpretação confiável dos dados. Após 10 a 14 dias do tratamento faz-se coleta de fezes comparando-se o percentual de redução na eliminação de ovos nas fezes nos dois grupos. Apesar de ser largamente utilizado para monitorar a resistência em nematódeos caracteriza-se por baixa sensibilidade, pois nem sempre existe uma boa correlação entre ovoposição e o número de parasitas adultos no hospedeiro, exceto para o nematódeo *Haemonchus contortus*, devido à alta prolificidade (Taylor, *et al.*, 2002).

2.4.2 – Testes *in vitro*

Na sua maioria os testes *in vitro* são de fácil execução e aplicação, podendo ser realizados em larga escala (O'Grady e Kotze, 2004). Dentre os testes *in vitro* o mais usado é o de eclosão de ovos (Craven *et al.*, 1999).

2.4.2.1 – Teste de eclosão de ovos

Baseado na atividade ovicida do fármaco, o tiabendazol é o composto padrão classicamente utilizado por ser mais solúvel que os demais compostos benzimidazóis. A incubação dos ovos é feita em soluções do anti-helmíntico em concentrações finais variando de 0 a 2 µg/ml. Ao final de 48 horas, é realizada a leitura do teste, classificando os achados em ovos ou larvas. Quando a DE50 (dose efetiva para inibir 50% a eclosão de ovos), for superior ou igual a 0,1µg/ml considera-se a presença de resistência na população de nematódeos testados (Coles *et al.*, 1992).

O teste de eclosão de ovos é indicado pela *World Association for Advancement of Veterinary Parasitology* (WAAVP), para detectar resistência aos Bz (Coles *et al.*, 1992). Por este teste estima-se melhor o nível de resistência, o que possibilita a mensuração dos efeitos dos anti-helmínticos nos processos fisiológicos dos nematódeos. Quando comparado ao teste de redução de ovos nas fezes, apresenta menor custo e fácil execução (Varady e Corba, 1999).

2.4.2.2 – Diagnóstico genético

Morfologicamente as espécies de *Haemonchus placei* de bovinos e *Haemonchus contortus* em ovelhas apresentam poucos traços que diferem as populações, o que torna importante a diferenciação individual do nematódeo.

Segundo Blouin *et al.*, (1997), há evidências moleculares que distinguem as duas espécies baseadas no estudo de sondas (rDNA external-spacer region: Zarlenga *et al.*, 1994) e clonagem do DNA genômico (Christensen *et al.*, 1994), no sequenciamento da região ITS-2 em amostras testadas de isolados da Austrália, Suécia, Reino Unido e China e estudos de marcadores RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) em amostras de *Haemonchus placei*, *Haemonchus contortus*, e *Haemonchus longistipes* em localidades da Mauritânia.

Estudando a variação entre indivíduos de cada uma das espécies nos Estados Unidos e comparando a estrutura genética dos tricostrongilídeos, foi observada a diversidade genética dentro da população de cada espécie sem, contudo comparar a relação filogenética entre as espécies. A avaliação percentual da diferença na medida do sequenciamento de indivíduos foi igual a 2,6% para *Haemonchus contortus* e 2,0% para *Haemonchus placei* e entre indivíduos das duas espécies iguais a 15,6%. O

sequenciamento do mtDNA destas duas espécies mostra o grande número de diferenças que as separam 43 sítios de 463 pb, 10 com resultado fixado em aminoácidos diferentes (Blouin *et al.*, 1997).

Claramente os estudos das populações de *Haemonchus* sp realizados por Blouin *et al.*, (1997), demonstraram a existência de duas linhagens diferentes ao longo da história evolutiva das espécies. Além de não haver nenhum caso em que a morfologia dos indivíduos determinasse a preferência por hospedeiros. O estudo molecular das populações de *Haemonchus placei* e *Haemonchus contortus*, mostrou que as populações mundiais destas espécies ao nível de DNA são claramente distintas.

As técnicas moleculares são altamente específicas, sensíveis, utilizam pequenas quantidades de DNA e têm potencial para identificação das espécies de parasitos, tornando-se vantajosas no diagnóstico de resistência (Sangster *et al.*, 2002).

2.4.2.3 – Reação em cadeia da polimerase alelo específica

Para diagnosticar a resistência aos benzimidazóis utiliza-se da amplificação do fragmento do isotipo 1 da β -tubulina. Emprega-se a PCR Alelo Específica (AS-PCR) para detectar esta mutação em parasitos adultos de *Haemonchus contortus* (Kwa *et al.*, 1994) e para larvas e adultos de *Teladorsagia circumcincta* (Elard *et al.*, 1999). No entanto, o método de genotipagem só poderia ser realizado em vermes adultos após necropsia ou em larvas, se fosse infecção monoespecífica. Silvestre e Humbert, (2000), modificaram a metodologia permitindo a identificação das três espécies de nematódeos mais prevalentes em ovinos e caprinos, (*Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylides colubriformis* e *Haemonchus contortus*). Esta ferramenta molecular pode identificar cada tipo de genótipo (rr = homozigoto resistente, rs= heterozigoto, ss= sensível). Desta forma o nível de resistência numa população de nematódeos pode ser definido pela proporção de homozigotos mutantes (rr) (Humbert *et al.*, 2001).

A presença do aminoácido fenilalanina ou tirosina na posição 200 no gene do isotipo 1 da proteína β -tubulina, caracteriza a cepa sensível ou resistente aos Bz, respectivamente (Elard *et al.*, 1999). Esse método baseia-se no uso da PCR, a qual amplifica produtos dos alelos específicos. Este sistema gera três fragmentos: um alelo não específico e dois alelos específicos para a sensibilidade e resistência aos Bz que são separados pela eletroforese em gel de agarose (Melo e Belivaqua, 2005).

Essa caracterização possibilitará estimar a proporção de cada genótipo na população de nematódeos (Humbert *et al.*, 2001). Assim há possibilidade de quantificar o número de indivíduos resistentes sendo, portanto, uma boa alternativa de diagnóstico (Elard *et al.*, 1999) e monitoramento da resistência (Sangster, 1999).

2-5 – O Controle com anti-helmínticos e a resistência a anti-helmínticos

Vários programas de controle da infecção de ruminantes por helmintos são utilizados na tentativa de reduzir ou eliminar os efeitos adversos do parasitismo. Os animais são tratados no controle curativo quando há sintomas clínicos evidentes ou morte pelo parasitismo (Melo e Bevilaqua, 2002). O controle tático é utilizado sempre que as condições ambientais favorecem o surgimento da verminose (Pinheiro, 1983). Neste caso há um retardo no desenvolvimento de resistência, mas existe uma perda importante de produção além da alta contaminação do meio ambiente com estágios infectantes de nematódeos (Melo e Bevilaqua, 2002).

Vermifugar os animais a cada duas ou quatro semanas consta do tratamento supressivo. É empregado em animais jovens de grande valor genético ou econômico (Pinheiro, 1983). Embora seja eficiente no controle do parasitismo, precipita o aparecimento da resistência anti-helmíntica. O controle estratégico é o mais usado. São aplicados tratamentos estratégicos antes que ocorra um aumento significativo da população de parasitos em épocas do ano pré-determinadas (Pinheiro, 1983). É praticado em caráter preventivo, baseando na epidemiologia dos nematódeos. De um modo geral, a recomendação é que os tratamentos devam ser concentrados na época seca do ano quando a maioria da população parasitária está nos hospedeiros e há menor proporção de nematódeos no ambiente (Bianchin, 1995).

Segundo a EMBRAPA, (1994), os tratamentos estratégicos devem ser realizados com um anti-helmíntico de alta eficácia. Um dos riscos deste controle refere-se à pequena ou nenhuma população de nematódeos em refúgio durante a época seca, período onde ocorrerá a predominância das dosificações (Melo e Bevilaqua, 2002). Diante destes fatos há possibilidades de um rápido desenvolvimento da resistência anti-helmíntica (Sangster, 2001).

O método FAMACHA[®] é um método alternativo de controle. Foi idealizado para identificar através da coloração da membrana conjuntiva, os animais capazes de

suportar uma infecção por *Haemonchus contortus*, tornando possível tratar somente os animais que sofrem um parasitismo severo e deixar sem tratamento aqueles que não têm anemia clínica. Desta forma a pressão de seleção para resistência aos anti-helmínticos será menos intensa (Van Wyk *et al.*, 1997; Vatta *et al.*, 1999).

Em estudo comparativo entre os métodos de controle estratégico e FAMACHA[®] observou-se que o método estratégico proporcionou o desenvolvimento da resistência anti-helmíntica, ao contrário do método FAMACHA[®], não interferindo na produtividade dos animais e possibilitando o retardamento do aumento da resistência anti-helmíntica melhorando a eficácia dos fármacos considerados ineficazes para a o controle do parasitismo na propriedade onde o fármaco foi testado.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3-1 – Coleta do Material e Área de Estudo

Foram coletadas 30 amostras de fezes por rebanho de ruminantes oriundos de propriedades assim distribuídos:

3-1-1- Rebanho bovino - amostras coletadas na região de Teófilo Otoni- MG (17°49'S/49°22'30 0) altitude 442m, propriedade tem histórico de uso de albendazol por mais de dez anos, com quatro aplicações do anti-helmíntico no ano (duas no período seco – Maio e Julho, duas no período úmido – Setembro), o rebanho formado por 1300 animais com uma área de pasto médio de 16 ha, a propriedade tem como característica a produção extensiva com a venda de reprodutores e produção de leite.

3-1-2- Rebanho de ovino - amostras coletadas na região de São José do Rio Preto-SP (20°49'S/49°22' 0) altitude 528m, propriedade tem histórico de uso de albendazol por mais de dez anos, rebanho e um total de 15 ha, divididos em pastos de tamanhos variados de um a três hectares e um rebanho de 70 animais.

3-1-3- Rebanho de caprino - amostras coletadas na região de Pedro Leopoldo-MG (19°37'S/44°26'0) altitude 800m, a propriedade tem histórico de mais de cinco anos de não uso de benzimidazol, sendo praticado nos últimos anos a aplicação de ivermectina como anti-helmíntico. Nesta propriedade existem outros pequenos rebanhos de bovinos, ovinos, e equinos separados por pastos cercados distanciados por cerca de 1 Km, o rebanho de caprino está em torno de 70 animais.

3-1-4- Rebanho de bubalino – amostras coletadas na região de Campos Altos- MG (19° 41S/46°10'0) altitude 1072m, os animais são adquiridos para engorda e recria sendo que os mesmos não têm informação do uso de benzimidazol antes da entrada na propriedade. Na propriedade os animais são tratados com ivermectina, esta prática vem sendo realizada há cinco anos, e o rebanho e formado por 60 animais.

3-2 - Estratégia de trabalho

Para a padronização dos testes realizados nos rebanhos estudados foi desenvolvida a estratégia de trabalho esquematizada abaixo:

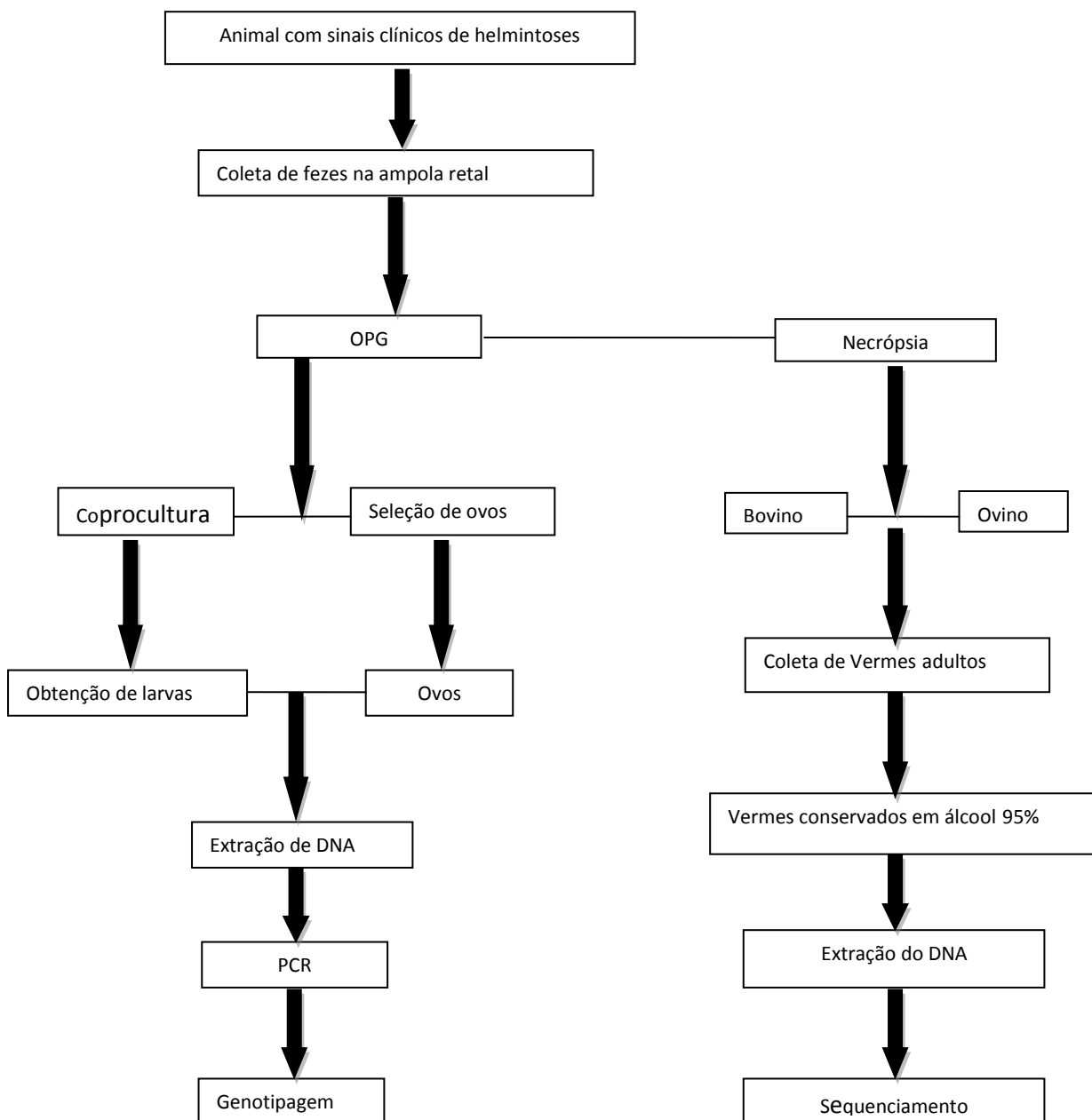


Figura -2 -Estratégia de trabalho realizada durante os testes de padronização da técnica de genotipagem e na identificação dos genótipos e alelos resistentes e susceptíveis na população de *Haemonchus* no rebanho de ruminantes estudados.

Do material coletado, foi realizada a contagem de ovos nas fezes (OPG) em Câmara McMaster de acordo com Gordon e Whitlock (1939), modificada por Whitlock (1948) de acordo com Ueno e Gonçalves (1998) e a produção de larvas através da cultura de larvas (coprocultura), onde foram realizadas coproculturas nas amostras de fezes positivas ao exame de OPG de acordo com a metodologia de Roberts e O'Sullivan (1950), descrita por Ueno e Gonçalves (1998). Estes procedimentos foram realizados no laboratório de Endo e Ectoparasitose do Departamento de Medicina Preventiva da UFMG. Os isolados foram fixados em álcool 95-100% e genotipado no Laboratório de Genética do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG

3-3 – Obtenção dos isolados

3.3.1 – Ovos:

Posteriormente à homogeneização, do material de fezes, dois gramas de fezes foram misturados a 28 ml de água, homogeneizado e peneirado. Dois ml do homogeneizado peneirado foi acrescido de dois ml de solução saturada de açúcar (Sheater), homogeneizada e distribuída em Câmara de Macmaster para a realização da contagem do número de ovos, o número de ovos encontrado no interior da câmara foi multiplicado por 100. Após a contagem os ovos foram separados e armazenados em álcool 95-100% para a realização posterior da genotipagem.

Para a genotipagem os ovos isolados foram transferidos para uma placa contendo solução de hipoclorito (250 µl de hipoclorito de sódio 2,5 % + 4,0 ml de H₂O) por 4 minutos. Este procedimento libera a bainha de cutina. Em seguida os mesmos foram capturados individualmente com 2 µl de volume em pipeta automática, transferido para Eppendorf acrescidos de 10 µl de tampão TEN e armazenados em freezer até a extração do DNA.

3.3.2 – Larvas

As larvas foram produzidas a partir da coprocultura de sete dias. As fezes foram bem homogeneizadas misturadas em igual quantidade de vermiculita e acondicionadas em vasilhames de vidro limpos e identificados, cobertos com gaze e colocados em estufa da marca Fanem a 27°C e umidade relativa de 75°. A mistura de fezes e vermiculita mantidos em estufa por sete dias. As larvas dos helmintos foram coletadas utilizando a técnica de Baermann, citado por Ueno e Gonçalves (1998).

O material foi centrifugado, descartando o sobrenadante. O sedimento contendo as larvas foi resuspenso em álcool 95%-100%. Posteriormente um pool de larvas (20-30 µl), foi transferido para uma placa contendo solução de hipoclorito (250 µl de hipoclorito de sódio 2,5 % + 4,0 ml de H₂O) por 4 minutos para a liberação da bainha de cutina e em seguida foram capturadas individualmente com 2 µl de volume em pipeta automática, transferido para Eppendorf acrescidos de 10 µl de tampão TEN e armazenados em freezer até a extração do DNA.

3.3.3 – Vermes adultos

Os vermes adultos foram obtidos por meio de necropsia de um bovino e um ovino, da Fazenda Experimental da UFMG localizada em Pedro Leopoldo – MG (19°37'S/44°26'0) altitude 800 m. Os animais apresentavam sinais clínicos de infecção parasitária.

Em ambos os animais foi separado o conteúdo do abomaso de onde foram coletados os vermes adultos. Posteriormente com auxílio de uma lente de aumento o material do abomaso foi examinado, e os vermes adultos machos recolhidos e estocados em álcool 95-100%. Após a estocagem os isolados foram armazenados em frascos Eppendorf com 50 µl de tampão TEN estocado em freezer até a extração do DNA.

3.4 – Extração do DNA dos isolados

Aos frascos contendo amostras de ovos e larvas estocadas em freezer com tampão TEN, foram acrescidos 5 µl de tampão de extração (1mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, 5 mg/ml proteinase K). Para os vermes adultos acrescentou-se 50 µl do mesmo tampão de extração e em seguida foram deixados a 41°C por uma noite. Após este procedimento os frascos foram deixados a 95°C por 20 minutos (Coles *et al.*, 2006). O DNA extraído foi quantificado e ajustado para 50ng com H₂O milli-Q estocado a -20°C até a genotipagem e sequenciamento.

3.5 – Sequenciamento dos Isolados

Para amplificação do DNA da região ITS-2 ribossômica (Internal Transcribed Spacer 2) foram utilizados os primers NC1F (5'ACGTCTGGTTCAGGGTTGTT3') e NC2R (5'TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT3') (Stevenson *et al.*, 1995). As reações de amplificação (PCR) foram conduzidas em um volume final de 25 µl, incluindo 17 µl de água ultrapura, 5 µl de GoTaq 5X PCR buffer (2.5 mM MgCl₂) (Promega), 0.25 µl de

cada primer (10 µM), 2.5 µl de cada dNTP (1 mM), 0.25 µl de GoTaq polymerase (Promega) (5 U/µl) e 1.0 µl DNA molde (50-100 ng/µl). O protocolo de amplificação utilizado foi: 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 50°C 30s e 72°C por 1 minuto. O produto de PCR (5 µl), foi visualizado em gel de agarose e selecionado direto para o sequenciamento.

Este procedimento foi utilizado para o sequenciamento e identificação de vermes adultos de bovinos e ovinos e ovos e larvas em estágio L3 de bubalinos e caprinos.

As seqüências foram determinadas bi-direcionalmente em ao menos dois amplicons distintos utilizando o *BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit* em um sequenciador automático de DNA *ABI 3130* (ambos da *Life Technologies*). Sequências senso e anti-senso (*Forward e Reverse*) foram alinhadas e editadas utilizando *SeqScape software* (*Life Technologies*). Sequências finalizadas foram alinhadas utilizando o *MEGA 5 software* (Tamura *et al.*, 2011) e depositadas no *GenBank* sob os números de acesso JN128895-JN128898.

3.6 – Genotipagem dos isolados

Devido a pequena quantidade de DNA inicial presente em larvas e ovos de helmintos para um fragmento gênico possa ser amplificado é necessário a realização de duas reações em cadeia da polimerase (Nested-PCR), o que vai permitir a amplificação do gene β -tubulina em *Haemonchus* sp. Foram então realizadas as reações da Nested:

3.6.1 – Primeira reação Nested-PCR

Foram sintetizados os primers para a primeira reação

36F: 5' -TCG TTC TTC AGG AGG CAA GT – 3' (primer Forward)

961R: 5' -TGC AGA CAG TGG AGC AAAAC-3' (primer Reverse)

Seguindo do Mix para primeira reação como descrito por amostra:

Reagentes	1 amostra μ l
H ₂ O milli-Q	12,6
Tampão 5X	4,0
Primer 36F 10 μ M	0,5
Primer 961R 10 μ M	0,5
dNTPs 10 mM	0,2
Taq 5,0 U/ μ l	0,2
TOTAL	18,0

Em seguida distribui-se 18 μ l por tubo e acrescentou-se 2 μ l de DNA extraído levando para o termociclador, procedendo como seguinte: 1 ciclo 94°C por 2 minutos, 94°C 55s, 55°C 55s, 72°C 55s por 40 ciclos, extensão de 72°C por 10 minutos.

3.6.2 – Segunda reação Nested-PCR

Foram sintetizados os primers:

PN3S: 5' – GGA ACA ATG GAC TCT GTT CG- 3' (primer Foward)

PN4S: 5' – GAA TCG AAG GCA GGT CGT-3' (primer Reverse)

Seguindo do Mix para a segunda reação conforme descrito:

Reagentes	1 amostra μ l
H ₂ O milli-Q	15,6
Tampão 5X	4,0
PN3S 10 μ M	0,5
PN4S 10 μ M	0,5
dNTP 10 mM	0,2
Taq 5U/ μ l	0,2
Total	19,0

Em seguida distribui-se 19 μ l por tubo e acrescentou-se 1 μ l do produto da primeira Nested-PCR, levando em seguida para o termociclador procedendo como seguinte: 1

ciclo 94°C por 2 minutos, 94°C 55s, 55°C 55s, 72°C 55s por 40 ciclos, extensão de 72°C por 10 minutos.

3.6.3 – ARMS-PCR – reação específica para identificação da resistência

A identificação da resistência na posição 200 do isotipo 1 do gene da proteína β -tubulina para *Haemonchus* sp foi realizada por uma reação específica de a ARMS-PCR como descrita abaixo:

Foram sintetizados os primers-

79: 5' – AAA TAA GTC TCA CCA CCT GTA AAC – 3' (primer Foward controle)

RO: 5'- CCA GAC ATT GTG ACA GAC AGA ACA TTCA-3' (primer Reverse controle)

Ph3: 5'- CTG GTA GAG AAC ACC GAT GAA ACA TA-3' (primer Foward para Resistência)

RIT: 5' – CAG AGC TTC GTT GTC AAT ACG GA-3'(primer Reverse para susceptibilidade)

Seguindo o mix para a reação de ARMS-PCR:

Reagentes	1 amostra μ l
H ₂ O milli-Q	5,9
Tampão 5X	2,0
Primer 79 10 μ M	0,25
Primer RO 10 μ M	0,25
Primer Ph3 10 μ M	0,2
Primer Rit 10 μ M	0,2
dNTPs 10 mM	0,1
Taq DNA 5,0 U/ μ l	0,1
TOTAL	9,0

Em seguida distribui-se 9 μ l por tubo, acrescentando 1 μ l da reação de segunda Nested-PCR, levando em seguida ao termociclador procedendo como a seguir: 94°C 2 minutos, 94° 30s, 58°C 30s , 72°C 30s, 40 ciclos, 72°C 10minutos.

3.7 –Eletroforese em gel de Poliacrilamida para a identificação da resistência

A visualização dos produtos da ARMS-PCR para a identificação do polimorfismo associada ma resistência anti-helmíntica foi realizada em gel de poliacrilamida.

3.7.1 – Preparo do gel 8%

Foram medidos 5,5 ml de acrilamida 30%, onde foram acrescentados 4 ml de tampão TBE 5X, 200 µl de PSA, 10 µl de TEMED e H₂O milli-Q q.s.p 20ml.

A aplicação em placa dupla de vidro o gel após polimerização, retirou-se o pente formador das canaletas, onde as amostras padrão, controle e as amostras para teste foram aplicadas a um volume de 2 µl por canaleta. A corrida foi processada em fonte com 25 mA e 100 volts por 2 horas.

Após o tempo de corrida o gel foi retirado da placa sendo levado ao fixador (H₂O milli-Q 90 ml, Etanol absoluto 10 ml e Ácido Acético 0,5 ml) por 5 minutos. Findado o tempo de fixação foram acrescentados 50 ml de solução de Nitrato de Prata (50 ml H₂O milli-Q, 0,2 g de Nitrato de Prata) por 10 minutos.

Passado o tempo de coloração no Nitrato de Prata, dispensou-se em recipiente próprio a solução, e o gel foi lavado com 100 ml de H₂O milli-Q por 30 s para retirar o excesso de prata.

Desprezou-se a água, acrescentando ao gel 100 ml da solução reveladora (H₂O milli-Q 100 ml, NaOH 3,0g e formol 0,5 ml), incubando o gel por 10 minutos. Após o tempo de revelação observou-se a presença do polimorfismo, R= Resistente e S= Susceptível para o padrão de bandas, Controle = 296 pb; Resistente = 198 pb, Susceptível = 146 pb.

Os géis foram então fotografados e armazenados em plástico para identificação posterior das bandas.

3.8 - Análise dos Dados

Para a análise do Equilíbrio de Hardy-Weimberg nos rebanhos estudados foi utilizado o programa do software Genalex versão AIE6 Full Pack.sit, e para o teste de Qui-quadrado o programa Saeg 9.1 (2007).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos rebanhos de ruminantes aqui estudados pôde-se observar a presença de alelos resistentes nos isolados de *Haemonchus*, mesmo para aqueles rebanhos que não estavam sob seleção por benzimidazol, como no caso dos rebanhos de caprinos e bubalinos que estão sob seleção por ivermectina e nestas propriedades, não foi usado benzimidazol nos últimos cinco anos no processo de rotina de desverminação dos animais. O histórico das localidades e uso dos fármacos é mostrado na tabela 3.

Tabela -3 – Histórico de uso de anti-helmínticos usados nos rebanhos de ruminantes nas propriedades em estudo

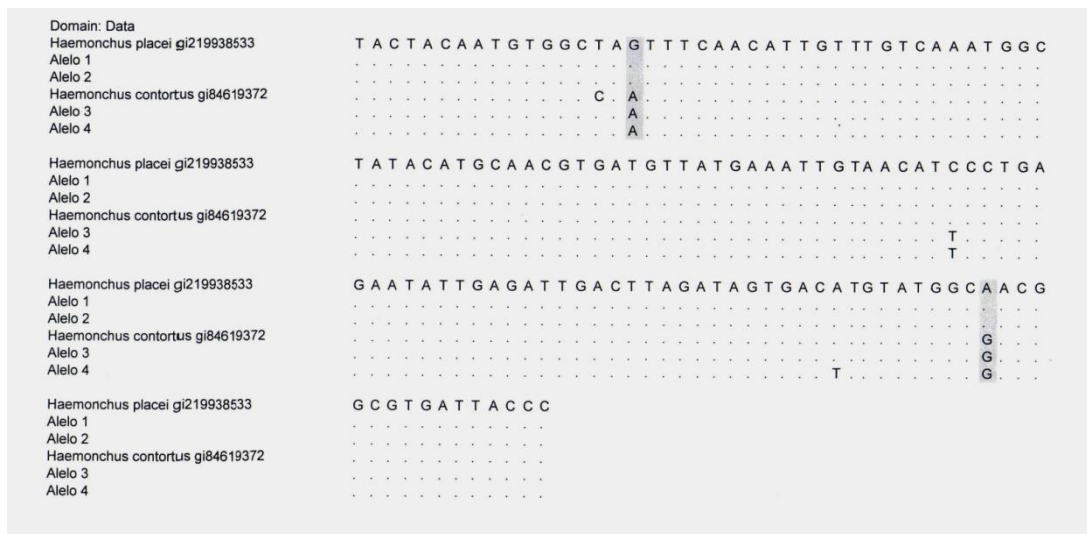
Propriedade	Coleta	Hospedeiro	Isolado	Espécie Isolada	Histórico de Bz no rebanho	Anti-helmíntico Em uso
T. Otoni - MG	22/11/2010	Bovino	Larva	<i>Haemonchus placei</i>	+ 10 anos	Albendazol
P. Leopoldo MG	07/02/2011	Caprino	Larva	<i>Haemonchus contortus</i>	5 anos	Ivermectina
S.J. Rio Preto SP	15/03/2011	Ovino	Ovo	<i>Haemonchus contortus</i>	+ 10 anos	Albendazol
C. Altos MG	28/04/2011	Bubalino	Ovo	<i>Haemonchus contortus</i>	*S/i 5 anos	Ivermectina

*Rebanho da propriedade formado por compra de animais para recria sem informações anteriores de uso de Benzimidazol.

4.1 – Genotipagem dos isolados

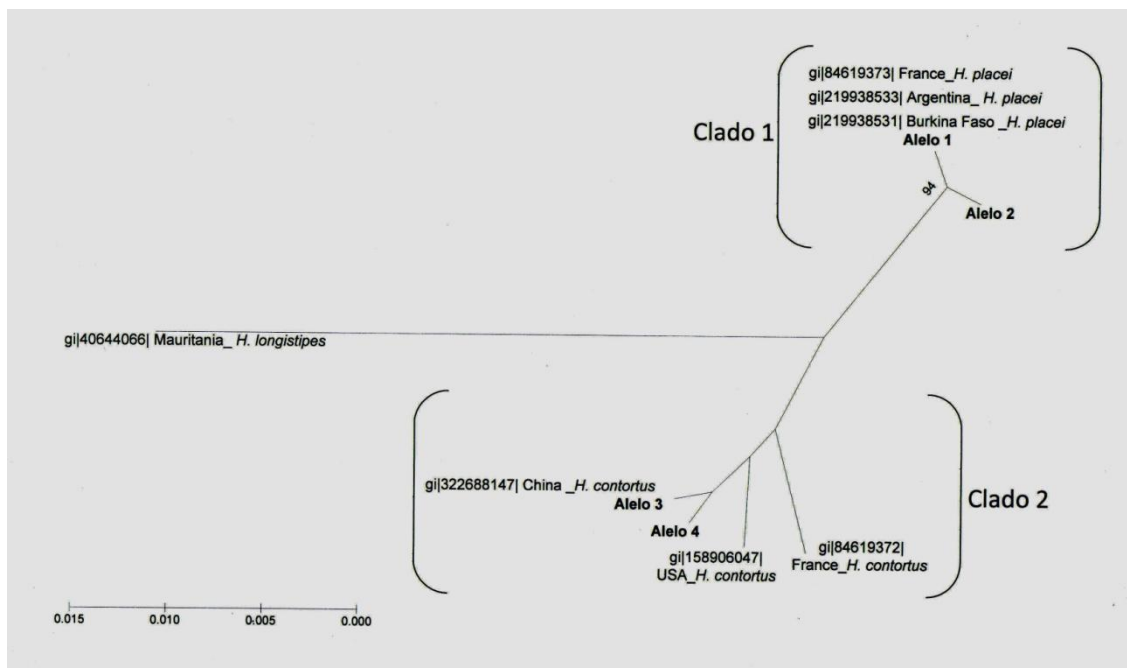
A partir dos vermes isolados, foi extraído o DNA e em seguida foi sequenciado a região ITS-2 (Internal Transcribed Spacer) (Stevenson, 1995). A região ITS é uma região presente no DNA nuclear bem conservada entre espécies estreitamente relacionadas, sendo empregada como ferramenta para estudar tanto a diversidade genética quanto a filogenia das espécies (Galdino *et al.* 2010). Os vermes isolados a partir de bovinos foram identificados como pertencentes à espécie *Haemonchus placei* e aqueles isolados a partir dos demais animais como *Haemonchus contortus*. Os resultados destes sequenciamentos serviram como referência na identificação de isolados nos rebanhos estudados.

Figura – 3 – Resultado do sequenciamento da região ITS-2 de isolados de *Haemonchus* sp



Resultado do sequenciamento, baseado na mutação das regiões no alelo 1 e 2 para *Haemonchus placei* Alelos 3 e 4 e para *Haemonchus contortus* pode-s diferenciar as espécies em estudo.

Figura – 4 – Identificação das espécies de *Haemonchus* Árvore Filogenética



Identificação das espécies de *Haemonchus* por meio do sequenciamento de alelos ITS-2. Árvore filogenética construída pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean) em escala. Sequência de regiões geográficas distintas resgatadas do GenBank por pesquisa no Blast usando sequência de alelos obtida foram incluídas nas análises, juntamente com a sequência de referência do *Haemonchus longistipes*.

As figuras 4 e 5 mostram claramente a presença de duas espécies diferentes, que foram sequenciadas a partir de amostras de DNA de isolados de *Haemonchus* de ovinos e bovinos, conferindo com as sequências de DNA de vermes de regiões geográficas distintas resgatadas no GenBank (Figura 4 - Clado1 e Clado2) .

A partir do material de fezes coletados nos animais dos rebanhos de bovinos, caprinos, ovinos e bubalinos foi realizada a contagem de OPG e separado os ovos e as larvas obtidas por coprocultura conforme descrita por Ueno e Gonçalves (1998) e posteriormente este material foi genotipado. A genotipagem destes isolados possibilitou caracterizar a resistência ao anti-helmíntico benzimidazol (BZ). O levantamento da frequência dos genótipos resistentes e susceptíveis nos isolados de *Haemonchus* sp foi realizado em 120 animais sendo testados 30 animais por rebanho e identificados 18 animais OPG positivos, o que representa 15% de animais infectados para todos os rebanhos estudados. O perfil dos genótipos possíveis no levantamento de isolados resistentes e sensíveis está ilustrado na figura 5. O alelo susceptível (S) apresenta o códon TTC na posição 200 enquanto o alelo resistente (R) possui o códon TAC na posição 200 do gene da proteína β -tubulina. As bandas no gel identificam o genótipo homocigoto resistente **RR** (198 pb), heterocigoto resistente **RS** (198/146 pb), e homocigoto susceptível **SS** (146 pb).

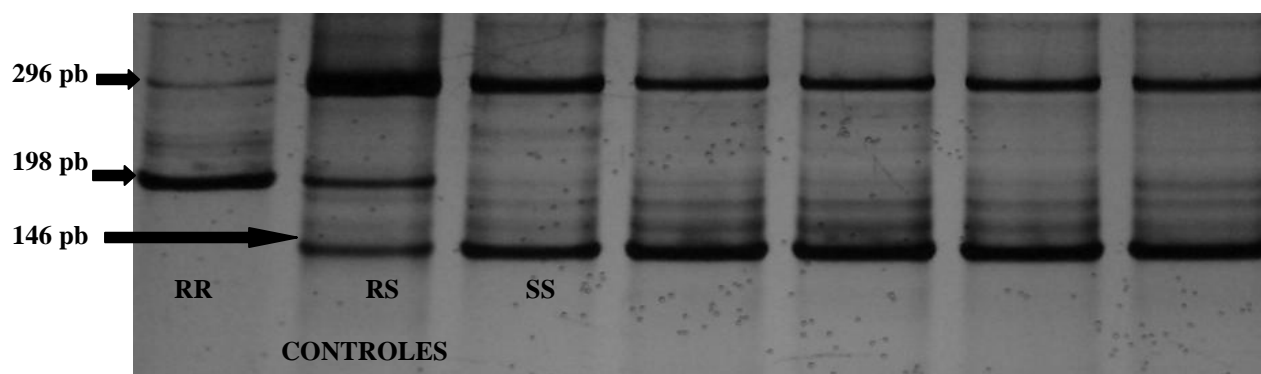


Figura 5 – Genotipagem do códon 200 do gene da β -tubulina isotipo presente em populações de *Haemonchus* sp, sensíveis ou resistentes ao BZ. Gel de poliacrilamida representativo das bandas correspondentes aos genótipos **RR** – indivíduo homocigoto resistente, **RS** – indivíduo resistente heterocigoto, **SS** - indivíduo homocigoto susceptível, de acordo com a presença dos nucleotídeos TTA ou TTC no códon 200 do gene da β -tubulina.

Estes perfis serviram como parâmetros para a realização dos estudos na identificação dos alelos resistentes e sensíveis como descritos por (Prichard, 2001; Humbert, *et al.*, 2001).

Sangster *et al.*, (2002), descreve o teste molecular para o monitoramento da resistência ao Benzimidazol como um avanço, porém limitado, necessitando de no mínimo 150 indivíduos e quando a prevalência da resistência é menor que 1%, elevando o custo de execução. Neste estudo foi possível aperfeiçoar a técnica de extração de DNA substituindo a técnica proposta por Silvestre e Humbert (2002), pela técnica proposta por (Coles *et al.*, 2006). A extração do DNA realizada por fenolclorofórmio foi substituída pelo tampão de extração (1mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, 5 mg/ml proteinase K). Tal modificação além de tornar o protocolo eficiente permitiu identificar perfis semelhantes de alelos e genótipos sensíveis e resistentes no material extraído de ovos, larvas e vermes adultos, mesmo com a prevalência da resistência baixa.

Como proposta de redução de custos, a extração direta dos ovos foi testada e se mostrou eficiente no diagnóstico da resistência ao Bz em *Haemonchus* sp. Com tal procedimento, não há necessidade da realização de coprocultura para obter as larvas ou o sacrifício de animais para obtenção de vermes adultos. A nova metodologia permite o diagnóstico seguro e rápido e os resultados são obtidos em três dias.

4.2 – Resistência ao Benzimidazol em nematódeos isolados em rebanhos de bovinos, caprinos, ovinos e bubalinos na Região Sudeste do Brasil

4.2.1 - Bovinos

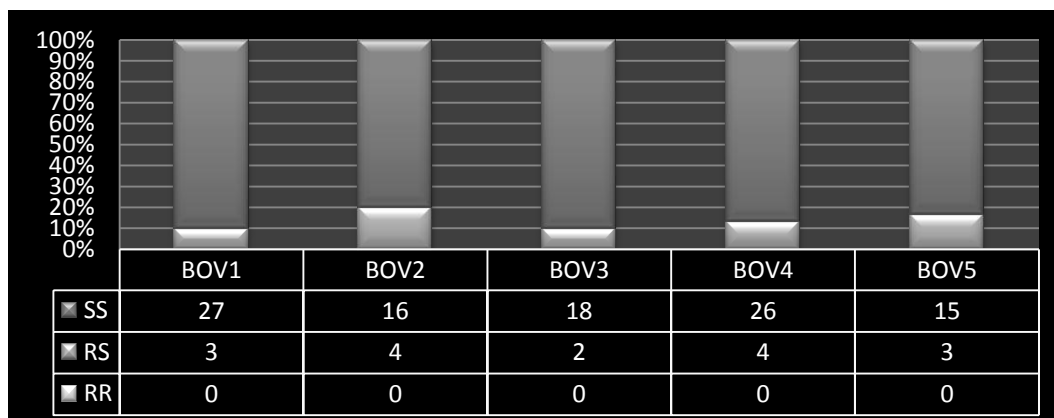
Do rebanho de bovinos da região de Teófilo Otoni-MG (17° 51'S/41°31'0 – Altitude 442m), foram testados 30 animais e desses, cinco apresentaram OPG positivo, o que representa a frequência 16,6% de animais infectados no rebanho. A contagem de ovos entre estes animais OPG positivos no rebanho variou entre 300-2000 ovos (Tabela -4).

Por meio do sequenciamento da região ITS-2 a partir de DNA extraído de 10 indivíduos dos isolados de helmintos, a espécie infectante do rebanho de bovinos de Teófilo Otoni-MG foi identificada como *Haemonchus placei*, pois todos os indivíduos testados deste isolado carregavam os alelos 1 ou 2 do locus ITS-2 (Figura 4 – Clado 1).

O gráfico 1 mostra a frequência de genótipos resistentes e susceptíveis na subpopulação de helmintos. O genótipo RR não foi encontrado em vermes isolados a partir do rebanho de bovinos. No gráfico 2 é mostrada a frequência dos alelos resistentes e susceptíveis na mesma subpopulação, dentro do mesmo rebanho. O teste estatístico $\chi^2 = 1,292$ indicou que não há diferença significativa ($p=0,8620$) entre as frequências alélicas dos isolados

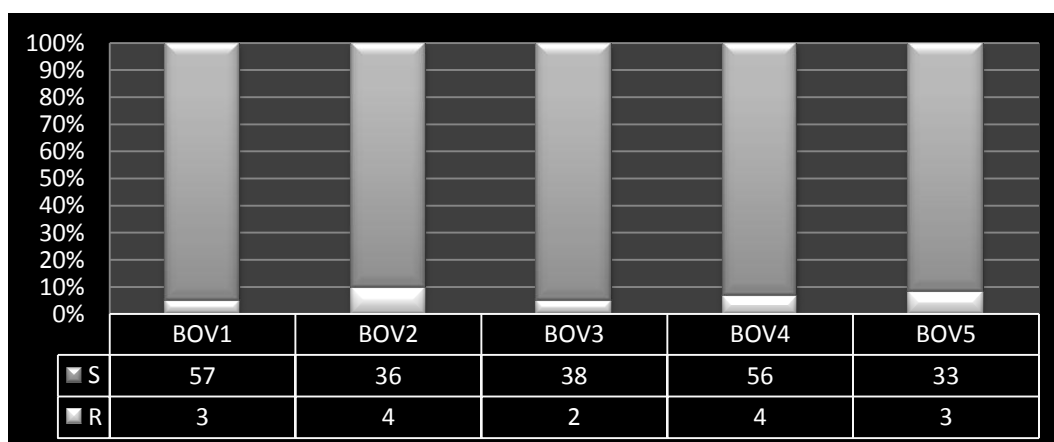
de *Haemonchus placei* isoladas a partir de diferentes animais bovinos do mesmo rebanho.

Gráfico - 1 Frequência de genótipos por animal com OPG positivo infectados por *Haemonchus placei* no rebanho de bovino de Teófilo Otoni –MG, 2010.



RR– indivíduos homozigotos resistentes, **RS** – indivíduos heterozigotos resistentes, **SS** – indivíduos homozigotos susceptíveis para os animais BOV1 a BOV5 no rebanho de bovinos.

Gráfico – 2 Frequência de alelos resistentes e susceptíveis por animal OPG positivo infectado por *Haemonchus placei* no rebanho de bovino de Teófilo Otoni – MG, 2010.



R – alelo resistente, **S** – alelo susceptível, nos animais BOV1 a BOV5 no rebanho de bovinos.

Este tipo de helminto passa a maior parte do ano no ambiente durante seu ciclo de vida, liberando uma quantidade elevada de ovos que eclodem quando as condições ambientais de temperatura e umidade estão favorecidas. Os ruminantes no rebanho estudado compartilham do mesmo ambiente de pasto. Alimentando-se de pastagens, onde existe a presença elevada de ovos e larvas de tricostrongilídeos. Estes helmintos, identificados por sequenciamento como *Haemonchus placei*, têm o ciclo de vida direto sem hospedeiro intermediário. Os hospedeiros pastam em áreas restritas aumentando a

proximidade entre eles. A convivência entre os animais provoca infecção cruzada e assim impede a estruturação genética dos helmintos em subpopulações (Silvestre *et al.*, 2009). O resultado deste estudo corrobora com estudos realizados por Blouin (1995), quando observou em rebanhos nos Estados Unidos que 98% da diversidade genética na subpopulação de helmintos e o fluxo gênico aumentavam quando os hospedeiros transitavam pelo país.

Avaliando os isolados de helmintos presentes em cada animal do rebanho quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), nenhuma deles apresentou desvios significativos do esperado assumindo que a população esteja em equilíbrio ($p > 0,05$ - Tabela 4). A tabela 4 mostra análises visando a determinação dos índices de endogamia e teste de HWE. Pode-se observar que em todos os animais do rebanho os isolados de *Haemonchus placei* apresentam número de heterozigotos similares ao esperado ($H_o=H_e$), o que resulta em índices de fixação F e coeficientes de endogamia próximos de zero (Tabela 4).

Tabela 4 – Teste Equilíbrio Hardy-Weinberg nos parâmetros de estatística F da nos isolados do helminto *Haemonchus placei* no rebanho de bovinos de Teófilo Otoni – MG-2010

Animais	N	OPG	H_o	H_e	P	F	Fis
BOV1	30	2200	0,100	0,095	0,77	-0,053	-0,086
BOV2	20	300	0,200	0,180	0,62	-0,111	
BOV3	20	500	0,100	0,095	0,81	-0,053	
BOV4	30	1200	0,167	0,153	0,62	-0,091	
BOV5	18	600	0,167	0,153	0,70	-0,091	

N, número de *Haemonchus* sp, H_o heterozigosidade observada, H_e heterozigosidade esperada, P.valor de p em teste de χ^2 para equilíbrio de Hardy-Weinberg, F índice de fixação e Fis, coeficiente de endogamia, P<0.05 estatisticamente significante.

Biologicamente, F mede a redução na heterozigosidade, medida como a relação entre as frequências observadas e esperadas para uma população, assumindo cruzamento aleatório com as mesmas frequências alélicas. Quando F= 0 (sem endogamia), as frequências genotípicas são as do HWE. Quando F= 1 (endogamia completa), a população consiste inteiramente de genótipos homozigotos (Hartl, 2008).

A tendência dos isolados de helmintos é equilibrar-se na primeira geração após os mesmos estarem sob seleção pelo benzimidazol. Após o término processo da pressão de seleção pela droga a população na primeira geração de helmintos voltará ao equilíbrio.

Assim a observação de que o isolado de nematódeos encontra-se em equilíbrio mesmo sob seleção do benzimidazol, pode ser explicada pelo período de coleta dos espécimes,

mais de 40 dias após a vermifugação. Dado que o ciclo destes nematódeos é de cerca de 30 dias, o princípio do equilíbrio de Hardy-Weinberg explica que a tendência do isolado de helmintos é equilibrar-se logo na primeira geração após a seleção por benzimidazol.

O rebanho bovino deste estudo tem histórico de uso contínuo de Benzimidazol, com aplicações anuais (duas no período seco e duas no período chuvoso). Mesmo estando o rebanho estudado sob seleção pelo benzimidazol, foi identificado um número maior de alelos susceptíveis entre os isolados de helmintos sugerindo que os isolados o identificados pelo sequenciamento do DNA da região nuclear ITS-2 como *Haemonchus placei*, seja mais susceptível à ação do anti-helmíntico.

A resistência aos anti-helmínticos não é comum em rebanhos de bovinos, como acontece entre os rebanhos de ovinos onde a infecção mais comum é por *Haemonchus contortus*. Há diferenças quanto a prática e controle das verminoses entre estes rebanhos. Os tratamentos nos rebanhos de bovinos são mais efetivos quando os animais são jovens, não havendo tratamento para verminoses quando os mesmos atingem a idade adulta por desenvolverem resistência à verminose nesta faixa etária (Coles, 2002).

4.2.2 - Caprinos

No rebanho de caprinos da região de Pedro Leopoldo-MG (19°37'S/44°26'0 – Altitude= 800m), 30 animais foram testados e cinco animais apresentaram OPG positivo, representando a frequência de 16% de animais infectados no rebanho para a resistência ao benzimidazol. A contagem de ovos nas fezes variou de 1000-6700 ovos (Tabela-5).

Tabela 5 – Teste Equilíbrio Hardy-Weinberg nos parâmetros de estatística F da nos isolados do helminto *Haemonchus contortus* no rebanho de caprinos de Pedro Leopoldo – MG-2011

Animais	N	OPG	Ho	He	P.valor	F	Fis
CV1	20	6700	0,100	0,18	0,05	0,444	0,092
CV2	12	1000	0,083	0,080	0,88	-0,043	
CV3	13	1500	0,154	0,142	0,76	-0,083	
CV4	10	4100	0,200	0,180	0,72	-0,111	
CV5	10	1000	0,200	0,180	0,72	-0,111	

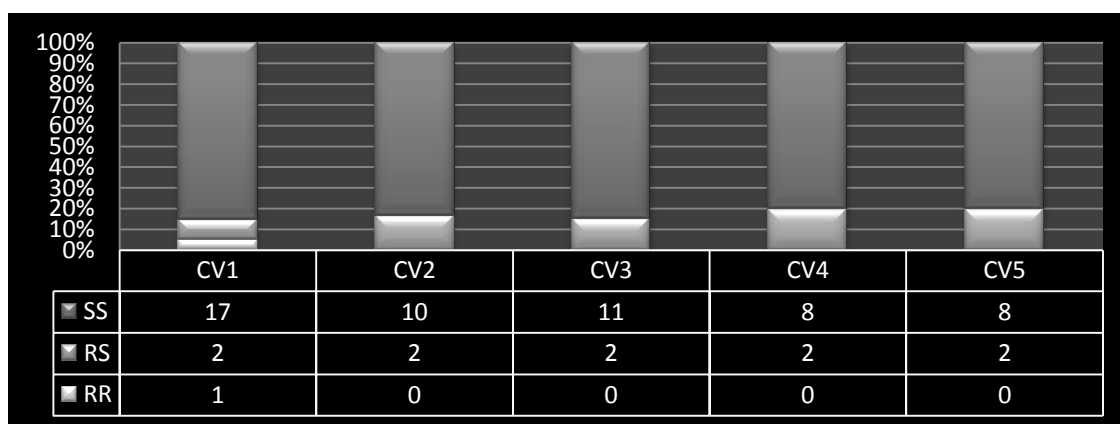
N, número de *Haemonchus* sp, Ho heterozigidade observada, He heterozigidade esperada, P.valor de p em teste de χ^2 para equilíbrio de Hardy-Weinberg, F índice de fixação e Fis, coeficiente de endogamia, P<0.05 estatisticamente significante.

Por meio do sequenciamento da região ITS-2 a partir de DNA extraído de 10 helmintos isolados, a espécie infectante do rebanho de caprinos de Pedro Leopoldo-MG foi

identificada como *Haemonchus contortus*, pois todos os indivíduos testados carregavam os alelos 3 ou 4 do locus ITS-2 (Figura 4 – Clado 2).

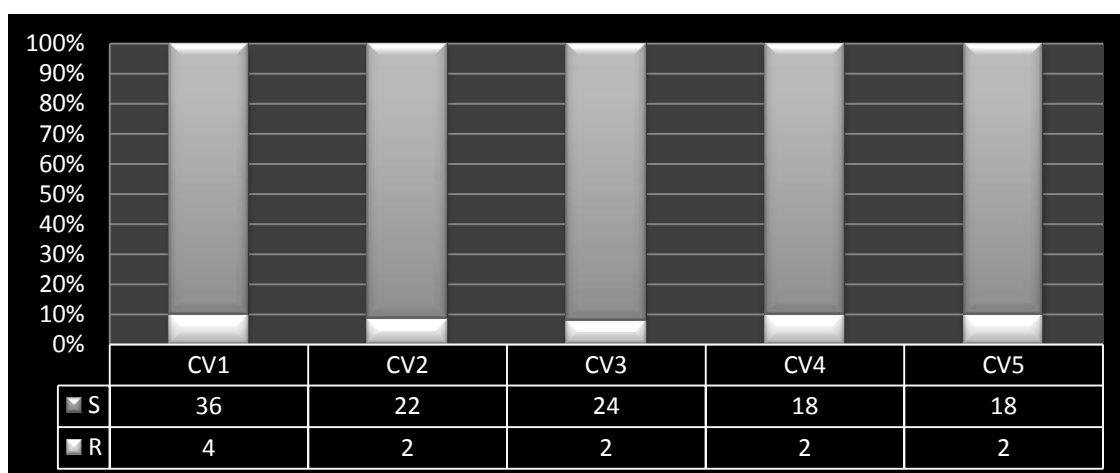
O gráfico 3 mostra a frequência de genótipos na subpopulação no rebanho de caprinos. O gráfico 4 representa a frequência dos alelos resistentes e susceptíveis ao benzimidazol no rebanho. O teste estatístico $\chi^2 = 0,153$ realizado utilizando o programa Saeg 9.1 indicou que não há diferença significativa ($p=0,997$) entre as frequências alélicas das subpopulações de *Haemonchus contortus* isolados a partir de diferentes animais.

Gráfico – 3 - Frequência de genótipos por animal OPG positivo infectado por *Haemonchus contortus* no rebanho de caprino de Pedro Leopoldo – MG- 2011.



RR – indivíduos homozigotos resistentes, **RS** – indivíduos heterozigotos resistentes, **SS** – indivíduos homozigotos susceptíveis nos animais CV1 a CV5.

Gráfico – 4 -Frequência de alelos resistentes e susceptíveis por animal OPG positivo infectado por *Haemonchus contortus* no rebanho de caprinos de Pedro Leopoldo – MG, 2011.



R – alelo resistente, **S** – alelo susceptível, nos animais CV1 a CV5.

A tabela 5 mostra análises visando a determinação dos índices de endogamia e teste de HWE. Pode-se observar que nos animais do rebanho os isolados de *Haemonchus*

contortus apresentam número de heterozigotos similares ao esperado ($H_o=H_e$), o que resulta em índices de fixação F e um coeficiente de endogamia próximo de zero (Tabela 5), exceto no caso do animal CV1, onde o índice F apresentou-se ligeiramente maior, o que pode indicar erro amostral.

O rebanho não está sob seleção por benzimidazol, mas os isolados de *Haemonchus contortus* apresentam homozigotos resistentes e estão em equilíbrio. Isto pode indicar que animais oriundos de propriedades onde o benzimidazol é utilizado rotineiramente tenham sido introduzidos neste rebanho, carregando consigo parasitas resistentes. De fato, o trânsito animal é considerado o principal fator promotor de fluxo gênico entre populações de nematódeos e um fator preponderante na disseminação de resistência aos anti-helmínticos (Blouin *et al.*, 1995; Prichard, 2001).

4.2.3 - Ovinos

No rebanho de ovinos de São José do Rio Preto – SP (20°49’S/49°22’0) - Altitude 5528m, foram testados 30 animais sendo que seis apresentaram OPG positivo, o que representa a frequência de 20% de animais infectados no rebanho. A contagem de ovos nas fezes variou de 400-33000 (Tabela 6).

Tabela 6 – Teste Equilíbrio Hardy-Weinberg nos parâmetros de estatística F da nos isolados do helminto *Haemonchus contortus* no rebanho de ovino de São José do Rio Preto – SP-2011

Animais	N	OPG	H _o	H _e	P.valor	F	Fis
OV1	10	33000	1,00	0,5	0,02*	-1,0	-0,851
OV2	10	400	0,8	0,5	0,05	-0,6	
OV3	10	800	0,9	0,495	0,01*	-0,818	
OV4	15	1300	1,00	0,5	0,00*	-1,0	
OV5	25	10500	0,960	0,499	0,00*	-0,923	
OV6	15	500	0,867	0,491	0,00*	-0,765	

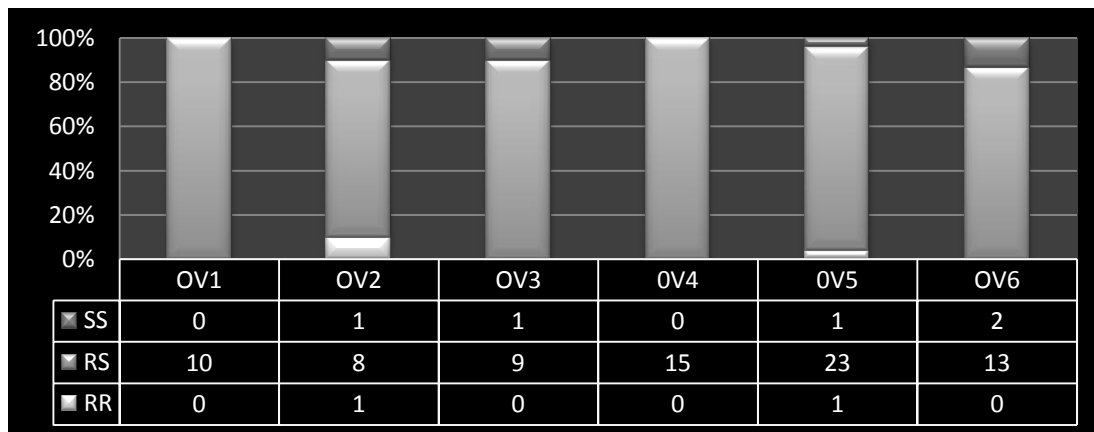
N, número de *Haemonchus* sp, H_o heterozigosidade observada, H_e heterozigosidade esperada, P.valor de p em teste de χ^2 para equilíbrio de Hardy-Weinberg, F índice de fixação e Fis, coeficiente de endogamia, P<0.05 estatisticamente significante.

Por meio do sequenciamento da região ITS-2 a partir de DNA extraído de 10 isolados de helmintos, a espécie infectante do rebanho de ovinos de São José do Rio Preto-SP foi identificada como *Haemonchus contortus*, pois todos os indivíduos testados deste isolado carregavam os alelos 3 ou 4 no locus ITS-2 (Figura 4 – Clado 2).

O gráfico 5 mostra a frequência genotípica nos isolados de helmintos no rebanho de ovinos. O gráfico 6 representa a frequência dos alelos resistentes e susceptíveis ao BZ no mesmo rebanho. O teste estatístico $\chi^2=0,522$ indicou que não há diferença

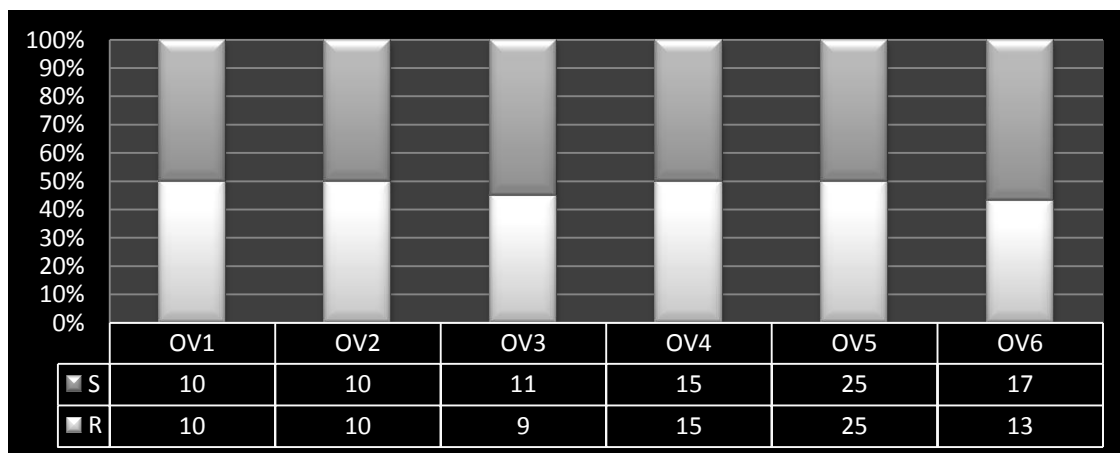
significativa ($p=0,991$) entre as frequências alélicas das subpopulações de *Haemonchus contortus* de diferentes animais hospedeiros.

Gráfico – 5 Frequência de genótipos por animal OPG positivo infectado por *Haemonchus contortus* no rebanho de ovinos de São José do Rio Preto – SP, 2011.



RR – indivíduos homocigotos resistentes, **RS** – indivíduos heterocigotos resistentes, **SS** – indivíduos homocigotos susceptíveis nos animais OV1 a OV6.

Gráfico – 6 Frequência de alelos resistentes e susceptíveis por animal OPG positivo infectado por *Haemonchus contortus* no rebanho de ovinos de São José do Rio Preto – SP, 2011.



R – alelo resistente, **S** – alelo susceptível, nos animais OV1 a OV6.

A tabela 6 mostra análises visando a determinação dos índices de endogamia e teste de equilíbrio de HWE. Pode-se observar que em todos os animais do rebanho, os isolados de *Haemonchus contortus* apresentaram excesso de heterocigotos ($H_o > H_e$), o que resulta em índices de fixação de alelos (F) significativamente negativos, assim como um coeficiente de endogamia baixo ($F_{is} = -0,85$).

O rebanho de ovinos é o mais susceptível à contaminação por parasitas pertencentes à espécie *Haemonchus contortus*. Há numerosos relatos na literatura da contaminação de

rebanhos de ovinos pelo *Haemonchus contortus*, trazendo sérios prejuízos, provocando mortes dos animais e perdas na para os produtores (Vieira, 2008; Krawczyk e Slota, 2009; Rufener *et al.*,2009).

O rebanho está sob seleção pelo benzimidazol e as amostras de fezes foram coletadas 10 dias após a aplicação do anti-helmíntico, o que justifica o número elevado de heterozigotos nos isolados. Não houve tempo para uma nova geração surgir após a seleção e indivíduos heterozigotos apresentam níveis moderados de resistência.

4.2.4 – Bubalinos

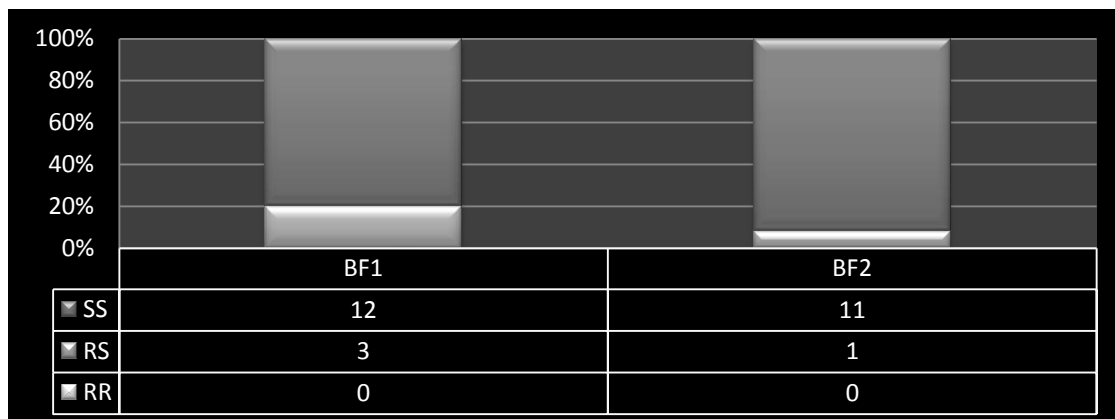
No rebanho bubalino de Campos Altos-MG (19°41'S/46°10'0 - Altitude 1072m) foram testados 30 animais. Dois animais apresentaram OPG positivo, representando a frequência de 6,6% de animais infectados no rebanho. A contagem de ovos nas fezes variou de 200-1400 ovos (Tabela-7)

Por meio do sequenciamento da região ITS-2 a partir de DNA extraído de 10 indivíduos da subpopulação de helmintos, a espécie infectante no rebanho de bubalinos de Campos Altos-MG foi identificada como *Haemonchus contortus*, pois todos os indivíduos testados carregavam os alelos 3 ou 4 no locus ITS-2 (Figura 4 – Clado 2).

No histórico de formação do rebanho, a aquisição dos animais da propriedade se dá para recria e engorda, portanto os animais não eram nascidos na propriedade. Com isto não há informações sobre o uso de drogas do grupo dos benzimidazóis anteriormente a chegada dos animais à propriedade. Todavia, são usados no rebanho, a partir da entrada dos animais na propriedade, drogas do grupo das lactonas macrocíclicas no processo de desverminação.

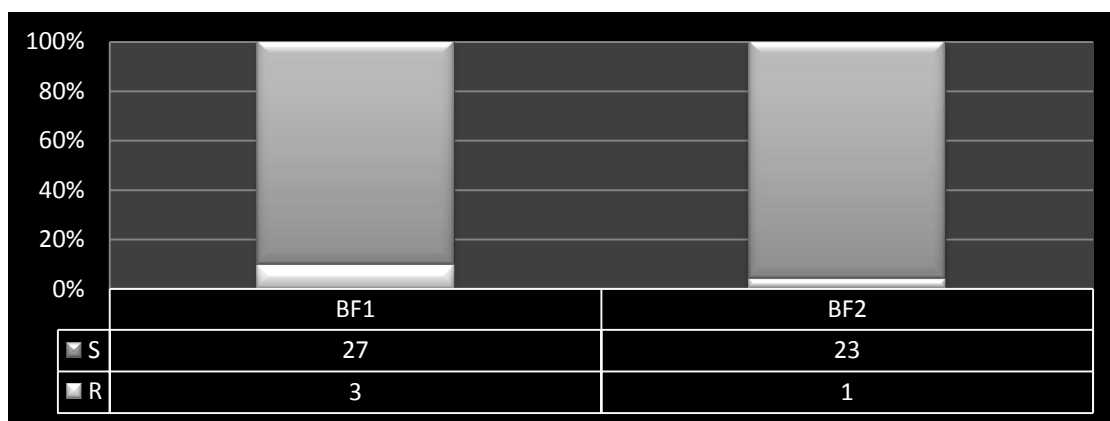
O gráfico 7 mostra a frequência dos genótipos resistentes e sensíveis nos isolados de helmintos no rebanho de bubalinos e o gráfico 8 mostra a frequência dos alelos resistentes e susceptíveis ao BZ no mesmo rebanho. O teste estatístico $\chi^2 = 0,661$ indica que não há diferença significativa ($p=0,416$) entre a frequência alélica dos isolados de *Haemonchus contortus* isolados destes diferentes animais hospedeiros.

Gráfico – 7 Frequência de genótipos por animal OPG positivo contaminado por *Haemonchus contortus* no rebanho de bubalinos de Campos Altos – MG, 2011.



RR – indivíduos homozigotos resistentes, **RS** – indivíduos heterozigotos resistentes, **SS** – indivíduos homozigotos susceptíveis para os animais BF1 e BF2.

Gráfico – 8 Frequência de alelos resistentes e susceptíveis por animal contaminado por *Haemonchus contortus* no rebanho de bubalinos de Campos Altos – MG, 2011.



R – alelo resistente, **S** – alelo susceptível, para os animais BF1 e BF2.

A tabela 7 mostra a análise visando a determinação do índice de endogamia e teste HWE. Pode-se observar que em todos os animais do rebanho os isolados de *Haemonchus contortus* apresentam número de heterozigotos similares ao esperado ($H_o=H_e$), o que resulta em índices de fixação F e coeficientes de endogamia baixos ou próximos de zero. Isto indica que sendo $F=0$ as frequências genotípicas são as esperadas para o equilíbrio.

Tabela 7 – Teste Equilíbrio Hardy-Weinberg nos parâmetros de estatística F da nos isolados do helminto *Haemonchus contortus* no rebanho de bubalino Campos Altos - MG

Animais	N	OPG	Ho	He	P.valor	F	Fis
BF1	20	200	0,100	0,18	0,05	0,444	0,092
BF2	12	1400	0,083	0,080	0,88	-0,043	

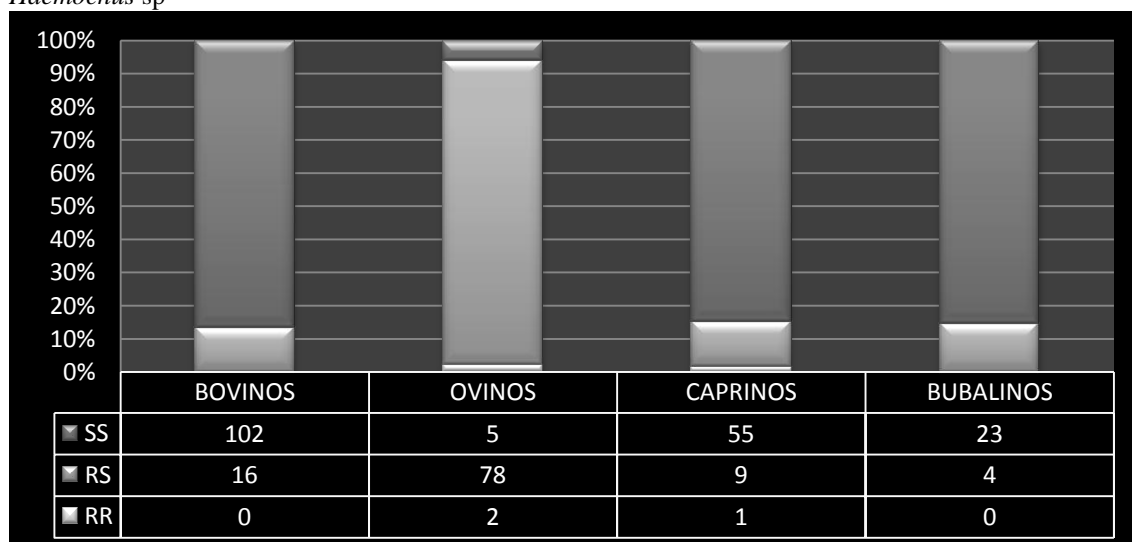
N, número de *Haemonchus* sp, Ho heterozigosidade observada, He heterozigosidade esperada, P.valor de p em teste de χ^2 para equilíbrio de Hardy-Weinberg, F índice de fixação e Fis, coeficiente de endogamia, P<0.05 estatisticamente significante.

O rebanho bubalino, segundo dados do IBGE (2010), está em torno de três milhões de cabeças e a aceitação de leite, carne e derivados, vem abastecendo o mercado estimulando a produção. No entanto há escassez de relatos de estudos sobre a resistência às parasitoses, muito em função de recente introdução destes animais no mercado consumidor, principalmente quando comparados com pequenos ruminantes e bovinos. Sendo assim, é necessária maior atenção, quanto à sanidade parasitária destes animais visando o controle mais eficiente e evitando a expansão das verminoses.

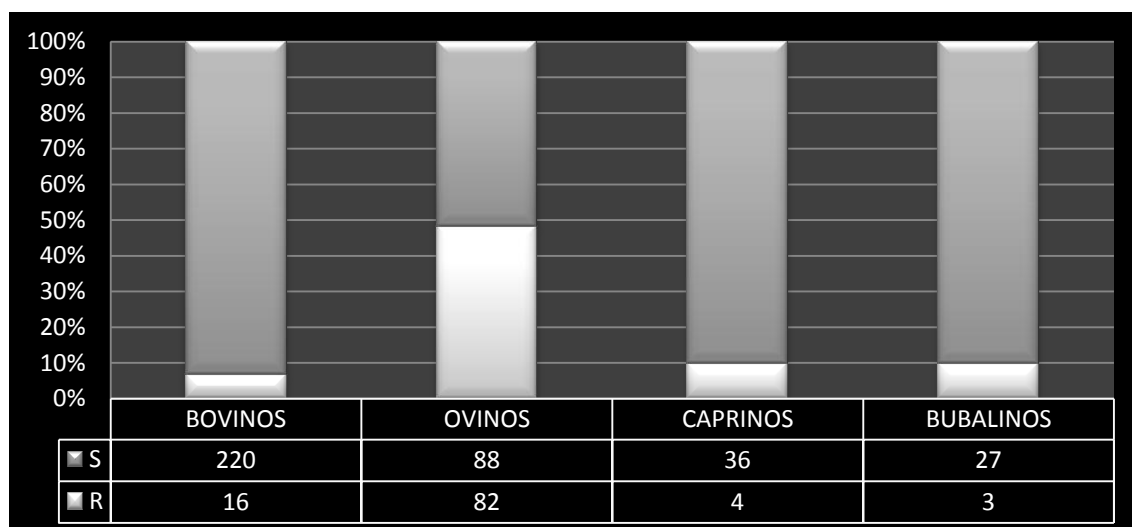
4.3 - Comparação da resistência ao Benzimidazol em nematódeos isolados dos rebanhos de ruminantes infectados por *Haemonchus* sp

As frequências dos genótipos entre os rebanhos de ruminantes e o número de animais OPG positivos por rebanho estão representados no gráfico 9. As frequências dos alelos resistentes e susceptíveis estão representadas no gráfico10.

Gráfico – 9 Frequência genotípica em animais OPG positivos por rebanho de ruminantes infectados por *Haemochus* sp



RR – indivíduos homozigotos resistentes, **RS** – indivíduos heterozigotos resistentes, **SS** – indivíduos homozigotos susceptíveis nos rebanhos bovinos, ovinos, caprinos e bubalino.

Gráfico – 10 Frequência alélica em animais OPG positivos por rebanho de ruminantes

R – alelo resistente, **S** – alelo susceptível, nos rebanhos bovinos, ovinos, caprinos e bubalinos

Os resultados da genotipagem mostraram que a frequência da mutação F200Y, capaz de conferir resistência ao benzimidazol, foi baixa nos rebanhos de bovino, de caprino e de bubalino analisados. Estes rebanhos apresentaram frequências para os alelos R e S respectivamente, de 0,08 e 0,92 (bovinos); 0,08 e 0,92 (caprinos) e 0,07 e 0,93 (bubalinos). Já no rebanho de ovinos, infectado por *Haemonchus contortus*, as frequências de alelos R e S foram de respectivamente 0,48 e 0,52.

O teste estatístico $\chi^2 = 105,71$ indicou que há diferença significativa ($p=0,00$) entre as frequências alélicas dos isolados de *Haemonchu* sp nos diferentes rebanhos de ruminantes das propriedades testadas. A frequência de alelos R foi maior para *Haemonchus contortus* que para *Haemonchus placei*. De fato ocorrem mais relatos na literatura de ocorrência de resistência em *Haemonchus contortus* e poucos relatos de resistência em *Haemonchus placei* (Coles, 2002; Suherland and Leathwick, 2011).

Os testes do χ^2 , no entanto, apresentaram-se não significativos quando somente isolados de diferentes animais de um mesmo rebanho eram testados (gráficos – 2, 4, 6 e 8). Isto indica que a maior parte da diversidade genética da população dos nematódeos pode ser encontrada em vermes que estão dentro de cada hospedeiro. Este resultado sugere que é possível estimar a frequência da resistência ao benzimidazol em todo o rebanho, testando-se apenas um indivíduo ou poucos indivíduos.

Para o controle da resistência e melhor aplicação dos fármacos, os métodos tradicionais como a contagem de OPG, redução no número de ovos para controle do fármaco, além

do método FAMACHA[®], indicado principalmente quando há alta prevalência de *Haemonchus contortus* (Abrão *et al.*, 2010), devem estar associados à técnica molecular na avaliação da resistência quando da implantação de programa de controle em uma propriedade.

O emprego da técnica molecular no diagnóstico da resistência mostra vantagens sobre a metodologia tradicional, uma vez que é possível identificar a resistência ainda em baixos níveis (Von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2009), além de ser economicamente viável, pois é possível testar um menor número de animais (um ou dois) e estimar o grau de resistência para todo o rebanho.

CONCLUSÕES

- A resistência ao Benzimidazol está presente no rebanho de ovinos e apresenta menor frequência nos rebanhos de bovinos, caprinos e bubalinos.
- A maior parte da diversidade genética do *Haemonchus* sp pode ser encontrada nos isolados destes parasitos dentro do hospedeiro e não entre as propriedades, o que torna possível diagnosticar a infecção no rebanho testando um número reduzido de animais.
- Com as modificações realizadas na técnica molecular para a identificação da resistência foi possível reduzir consideravelmente o tempo e custos do teste, tornando-o economicamente viável para uso na rotina laboratorial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOTT, E. M.; PARKINS, J. J.; HOLMES, P. H. The effect of dietary protein on the pathogenesis of acute ovine haemonchosis. *Veterinary Parasitology*, v.20, n.4, p.275-289, 1986.

AHID, S. M. M.; SUASSUNA, A. C. D.; MAIA, M. B.; COSTA, V. M. M.; SOARES, H. S. Parasitos gastrointestinais em caprinos e ovinos da Região Oeste do Rio Grande do Norte, *Ciência Animal Brasileira*, v.9, n.1, p.212-218, 2008.

AMARANTE, A.F.T.; PADOVANI, C.R.; BARBOSA, M.A. Contaminação das pastagens por larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais parasitas de bovinos e ovinos de Botucatu- SP. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, V.5, p.65-73, 1996.

ABRÃO, C.A.; ABRÃO, S.; VIANA, C.H.C.; VALLE, R.C. Utilização do método Famacha no diagnóstico clínico individual de hemoncose em ovinos no Sudeste do Estado de Minas Gerais, *Revista Brasileira de Parasitologia veterinária*, v.19, n.1, p.6870, 2010.

BEECH, R.N.; PRICHARD, R.K.; SCOTT, M.E. Genetic variability of the beta-tubulin genes in benzimidazole-susceptible and resistant strains of *Haemonchus contortus*. *Genetics*, v.138, p.138-10, 1994.

BIANCHIN, I., HONNER, M.R.; NUNES, S.G. *et al.*, Epidemiologia dos nematódeos gastrointestinais em bovinos de corte nos cerrados e o controle estratégico no Brasil. Campo Grande: EMBRAPA CNPG, 1993, (Circular Técnica 24), 120 p.

BIACHIN, I.; HONER, M.R. Verminose bovina: ocorrência e controle estratégico. Circular Técnica, v.27, 1995

BLOUIN, M.S., YOWELL C. A.; COURTNEY, C.H.; DAME, J.B. Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes, *Genetics*, v.141, p. 1007-1014, 1995.

BLOUIN, M.S., YOWELL, C.A., COURTNEY, C.H., DAME, J.B., *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* are distinct species based on mtDNA evidence. *International Journal for Parasitology*, v.27, n.11, p.1383-1387. 1997.

BOGAN, J.; ARMOUR, J. Anthelmintic for ruminants. *International Journal for Parasitology*. V.17, p.483-491.1987.

BRUCE, J.I., New anthelmintics. *International Journal for Parasitology*, v.17, p.483-491. 1987.

CALCAGNOTTO, D. Taxas de evolução e o relógio molecular. S.R. (Ed.) *Biologia Molecular e Evolução*, n.5, Ribeirão Preto editora Holos, 2001, p.51-61.

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

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.7175. 1989.

CHARLIER, J.; HOGLUND, J; VON SANSON-HMMELSTJEMA, *et al* Gastrointestinal nematode infections in adult dairy: cattle impact on production, diagnosis and control, *Veterinary Parasitology*, v. 164, p. 70-9.2009.

CHRISTENSEN, C. M.; ZARLENGA, D. S.; GASBARE, Identification of a *Haemonchus placei* specific DNAm, probe. *Journal Helminthological society of Washington*. V. 61, p.249-252. 1994.

COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEED, F. H. M.; GERTS, S. *et al* Methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, v.44, p. 35-44, 1992.

COLES, G. C. Cattle nematodes resistant to anthelmintics: Why so few cases? *Veterinary Research*, v.33,n.5, p.481-489, 2002.

COLES, G.C. Anthelmintic resistance –looking to the future: a UK perspective. *Research Veterinary Science*, v.78, n.2, p.99-108, 2005

COLES, G. C., JACKSON, F., POMOROY, W. E. *et al* The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, v. 136, p.167–185. 2006.

COSTA, J.A; BORGES, F. A.; Controle de endoparasitos em bovinos de corte. in: PIRES, A. V.(Ed.). *Bovinocultura de corte*. Piracicaba: Prol Editora Gráfica: 2010. p.1149-1168.

CRAIG, T. M. Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, v.46, p.121-31. 1993.

CRAVEN, J.; BJORN, H.; BARNES, E.H.*et al*; Comparison of in vitro tests and faecal egg count reduction test in detecting anthelmintic resistance in horse strongyles. *Veterinary Parasitology*, v.85, n.1, p.49-59, 1999.

DOBSON, R. J.; LE JAMBRE, L.F.; GILL, J.H. Management of anthelmintic resistance: inheritance of resistance and selection with persistent drugs. *International Journal Parasitology*, v.26, p.993-1000.1996.

DOS SANTOS, V. T.; GONÇALVES, P. G., Verificação de estirpe resistente de *Haemonchus* resistentes ao thiabendazole no Rio Grande do Sul (Brasil). *Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária*, v.9, p. 201-209, 1967.

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

ECHEVARRIA, F. A. M.; BORBA, M. F. S.; PINHEIRO, A. C. *et al* The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.62, p.199-206. 1996.

ECHEVARRIA, F.A.M.; TRINDADE, G.N.P. Anthelmintic resistance by *Haemonchus contortus* to ivermectin in Brazil. *Veterinary Record*, v.124, p.147-148.1989.

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.

ELARD, L.; COMES, A.M.; HUMBERT, J.H. Sequences of β -tubulin cDNA from benzimidazole-susceptible and –resistant strains of *Teladorsagia circumcincta*, a

nematode parasite of small ruminants. *Molecular Biochemical Parasitology*, v.79, p.249-251.1996.

ELARD, L.; SAUVE, C.; HUMBERT, J. H. Fitness of benzimidazole-resistant and susceptible worms of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. *Parasitology*, v.117, p.571-578, 1998.

EYSKER, M.; PLOEGER, H. W., Value of present diagnostic methods for gastrointestinal nematodes infections in ruminants. *Parasitology*, v.120, p. 5109-5119, 2000.

FARIAS, M. T.; BORDIN, E. L.; FORBES, A. B.; NEWCOMB, K. A survey on resistance to anthelmintic in sheep study farms of southern Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.72, p. 209-214.1997.

FIEL, C. A., *et al.*, Resistência antihelmíntica em bovinos: causas, diagnóstico y profilaxis. *Veterinária Argentina*, v.18, n.171, p.21-33, 2003.

GALDINO, A. S.; LIMA, J. P. M. S.; ANTUNES, R. S. P. *et al* Caracterização molecular de acessos de *Cratylia argentea* e sua relação filogenética com outras leguminosas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.45, n.8, p.846-854, 2010.

GEARY, T. G.; THOMPSON, D. P. *Ceanohabdtis elegans*: how good a model for veterinary parasites? *Veterinary Parasitology*, v.101, p.371-386.2001.

GHISE, M., KAMINSKY, R., MASER, P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for BZ resistance in nematodes. *Veterinary Parasitology*, v.144, p. 313–320.2007.

GIBBS E HERD, Nematodiasis in cattle, importance, species involved, immunity and resistance *Veterinary Clinical North am food Animal Pract* 2, p.211-224.

GILHAM, R. J.; OBENDORF, D. I., Therapeutic failure of levamisole in dairy goats, *Australian Veterinary Journal*, v.62, n.12, p.426-427, 1985.

GILLEARD, J. S. Understanding anthelmintic resistance: the need for genomics and genetics, *International Journal for Parasitology*, v.36, p.1227-1239, 2006.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J.H., SUZUKI, D.T. *et al* *Introdução a genética*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

GUTTERIDGE, W. E.: Chemotherapy. In: COX, F.E.G. (Ed) *Modern Parasitology: a testbook of parasitology*. Oxiford: Editora, 1993 p. 219-242.

HALL, C.A. ; KELLY, J. D.; WHITLOCK, H.V. *et al.*, Prolonged effect of closantel and disophenol against thiabendazole select resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. *Resarch in veterinary science*, v.31, p.104-306 1981.

HANKINS, J. A. Economic benefits of parasite control in cattle. *Veterinary Parasitology*, v.46, p.159-173, 1993.

HARTL, D.L. *Princípios de genética de população*. 3 ed. São Paulo: Editora Funpec, 2008. Endogamia. p.41.

HASHMI, S.; TAWA, W.; LUSTGMAN, S. *Caenorhabditis elegans* and study of gene function in parasites. *Trends in Parasitology*, v.17, p.387-393. 2001.

HOLLOMON, D.W.; BUTTERS, J.A.; BARKER, H. AND HALL, L. Fungal beta-tubulin, expressed as a fusion protein, binds benzimidazole and phenylcarbamate fungicides. *Antimicrobiology. Agents chemother.*, v.42, p.2171-2173, 1998.

HUMBERT, J.F.; CABARET, J.; ELARD, L *et al.* Molecular approaches to studying benzimidazole resistance in trichostrongylid nematode parasites of small ruminants. *Veterinary Parasitology*, v.101, p.405-414.2001.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. Ministério Brasileiro do Planejamento, Orçamento e Gestão. Disponível em: (http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia_ppm/2010/default.shtm.) Acessado em Maio /2010.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011. Ministério Brasileiro do Planejamento, Orçamento e Gestão. Disponível em: (<http://www.ibge.gov.br/home/>.) Acessado em June/2011.

JABBAR, A.; IQBAL, Z.; KERBOEUF, D.; MUHAMMAD, G.; KHAN, M.N.; AFAQ, M. Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life Sci*, v.79, p.2413-2431, 2006.

JASMER, D.P.; YAO, C.; REHMAN, A.; JOHNSON, S. Multiple lethal effects induced by a benzimidazole anthelmintic in the anterior intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. *Molecular Biochemical Parasitology*, v.105, n.1, p.81-90. 2000.

KAPLAN, R.M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report, *Trend Parasite*, v.20, p.477-481, 2004.

KÖHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*, v. 31, p.336-345, 2001.

KRAWCZYK, A.; SLOTA, E. Genetic markers to gastrointestinal nematode resistance in sheep: a review. *Helminthologia*, v.46, 1 p.3-8, 2009.

KREVECK, R. C.; GROENEVELD, H. T.; VAN WIK, J. A., Effects of time of day, season and stratum on *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* third-stage larvae on irrigated pasture. *Veterinary Parasitology*, v.40, n.(1-2), p.87-98, 1991.

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 Biochemistry Parasitology*, v.63, p. 299–303. 1994.

LACEY, E. The role of the cytoskeletal, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal for Parasitology*, v. 20, n.7, p.105-111.1988.

LANUSSE, C. E. Farmacologia dos compostos anti-helmínticos. In: Charles T.P. (Ed) Controle dos nematódeos gastrointestinais. Juiz de Fora, Minas Gerais, p.1- 44.1996

LEATHWICK, D.M. Modelling the benefits of a new class of anthelmintic in combination *Veterinary Parasitology*. 2011, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401711007825>. Acesso em Janeiro 2012

LEIGNEL, V.; CABARET, J. Massive use of chemotherapy influences life traits of parasitic nematodes in domestic ruminants. *Functional ecology*, v.15, p.569-574.2001.

MARTIN, P. J., Development and control of resistance to anthelmintics. *International Journal of Parasitology*, v.17, p. 493-501, 1987.

MARTIN, R. J.; ROBERTSON, A. P.; BJORN, H., Target sites of anthelmintics. *Parasitology*, v.114, p.111-124, 1997.

MEIJA, M.E. *et al.*, Multispecies and multiple anthelmintic resistance on cattle nematodes in a farm in Argentina: the beginning of high resistance? *Veterinary Research*, n. 4, v.34, p.461-467, 2003.

MELO, A. C. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; Abordagem genética da resistência anti-helmíntica em *Haemonchus contortus*, *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.100,n. 555-556, p.141-146, 2005.

MELO, A. C. F. L., BEVILAQUA, C. M. L., Resistência anti-helmíntica em nematódeos de pequenos ruminantes: Uma revisão, *Ciência animal*, v.12, n.1, p.35-45, 2002.

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, 1998.

MOLENTO, M. B., Resistência em ovinos e caprinos. *Archives of Veterinary Science*, v.11, n.1, p.82-87, 2004.

MOTTA, M. A. *et al.*, Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. *Pesquisa Veterinária*, v.23, n.3, p.93-100, 2003.

O'CONNOR, L. J.; WALDEN-BROWN, S.W., KAHN, L.P. Ecology of the free-living stages major Trichostrongylid parasite of sheep. *Veterinary Parasitology*, v 142,n.(1-2), p.1-15, 2006.

O'GRADY, J.; KOTZE, A.C. *Haemonchus contortus*: *in vitro* drug screening assays with the adult life stage. *Experimental Parasitology*, v. 106, n. 3-4, p.164-172.2004.

PAIVA, L. J. M.; NEVES, M. F., Controle orgânico de parasitoses, *Revista Científica de Eletrônica de Medicina Veterinária* – ISSN 1679-7353, Ano XII, n.12, 2009.

PAIVA, F. *et al.*, Resistência a ivermectina constatada em *Haemonchus placei* e *Cooperia punctata* em bovinos. *A Hora Veterinária*, v.20, n. 120, p. 29-32, 2001.

PINHEIRO, A.C. Verminose ovina. *A Hora Veterinária*. n.12, p.5-9, 1983.

PINHEIRO, A.C.; ECHEVARRIA, E.A.M. Susceptibilidade de *Haemonchus* spp em bovinos ao tratamento anti-helmíntico com albendazole e Oxifendazole. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.10, n.1/2, p.19-21, 1990.

PRADHAN, S. L.; JOHNSTONE, J. L. *Haemonchus contortus* the effect on lambs of prolonged exposure to daily and weekly closes of infective larvae. *Parasitology*, v.64, n.1, p. 143-52, 1972.

PRICHARD, R., Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* whit anthelmintics. *Trends Parasitology.*, v.17, n.9, p. 445-453, 2001.

RANGEL, V.B.; LEITE, R.C.; OLIVEIRA P.R.; SANTOS, E.J. Resistência de *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp. Às avermectinas em bovinos de corte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária*, v.57, n.2, p.186-190. 2005.

RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; SOUZA, A.P.; ÁVILA, V.S. *et al* Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. *Ciência Rural*, v.34, n.6, p.1889-1895. 2004

RECOMENDAÇÕES tecnológicas para a produção de caprinos e ovinos no estado do Ceará. Sobral: EMBRAPA/CNPC, 1994. (Circular técnica, 9). 58p.

RUFENER, L.; MÄSER, P. ; RODITI, I.; KAMINSKY, R.; *Haemonchus contortus* Acetylcholine Receptors of the DEG-3 Subfamily and Their Role in Sensitivity to Monepantel *PloS Pathogens* . v. 5, n. 4, p.1-11. 2009.

ROTHWELL, J. T.; SANGSTER, N. C., The effects of closantel treatment on the ultrastructure of *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, v.49, n.1, p.49-57, 1986.

ROOS, M.H.; BOERSEMA, J.H.; BORGESTEED, 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, n.1, p.77-88. 1990.

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. V.; BLACKHALL W., Will techonology provide solutions for drug resistance in veterinary helminthes? *Veterinary Parasitology*, v.132, n.3-4, p.223-39. 2005.

SANGASTER, N.C.; GILL, J., Pharmacology of anthelmintics resistance. *Parasitology. Today*, v.15, p.141-146, 1999.

SANGSTER, N.C. Managing parasiticide resistance. *Veterinary Parasitology*, v. 98, n.1, p. 89-109. 2001.

SANGSTER, N.; BATHERHAM, P.; CHAPMAN, H.D. *et al.*, Resistance to antiparasitic drugs: The role of molecular diagnosis, *International Journal for Parasitology*, v.32, n.5, p.637-653. 2002.

SANTIAGO, A. A., Introdução dos búfalos no Brasil: histórico, fundação, pioneiros, importadores. São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB), 2010.

SILVA, M. R. L.; SOUZA, E. A.; BONELLI, E. A.; MEDEIROS, M. O.; SILVA, G. F.; QUEIROZ, E. O.; Parasitas gastrointestinais de ovinos criados na região de Rondonópolis-MT; *Revista Biodiversidade*, v.9, n.1, p.67-73, 2010

SILVESTRE, A., SAUVE, C., CORTET, J., CABARET, J., Contrasting genetic structures of two parasitic nematodes, determined on the basis of neutral microsatellite markers and selected anthelmintic resistance markers. *Molecular Ecology* v.18, n.24, p. 5086-5100. 2009.

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, n. 2, p.297-300, 2002.

SILVESTRE, A.; HUMBERT, J. F. A tool molecular identification and Benzimidazole Resistance Diagnosis in larval communities of small Ruminant Parasites, *Experimental Parasitology*, n.4, p.271-276, 2000.

SILVESTRE, A.; HUMBERT, J. F.; Diversity of benzimidazole resistance alleles in populations of small ruminant parasites. *International Journal for Parasitology*, v.32, p.321-328, 2002.

SILVESTRE, A.; HUMBERT, J. F. Diversity of benzimidazole-resistance alleles in populations of small ruminant parasites. *International Journal for Parasitology*, v.32, n.7, p.321-328. 2008.

SILVESTRE, A., SAUVE, C., CORTET, J., CABARET, J., Contrasting genetic structures of two parasitic nematodes, determined on the basis of neutral microsatellite markers and selected anthelmintic resistance markers. *Molecular Ecology* , v.18, n.24, p. 5086-5100. 2009.

SOULSBY, E. J. L., *Helminths, Arthropods and Protozoa of domesticated animals* 7^a ed Cidade: Bailliere Tindall 1982, p. 212-259.

SOULSBY, E. J. L., Parasitology y enfermedades parasitarias em los animales domésticos, p.782, 1987.

STEVENSON, L.A., CHILTON, N.B., GASSER, R.B. Differentiation of *Haemonchus placei* from *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) by the ribosomal DNA second internal transcribed spacer. *International Journal Parasitology*, v. 25, n.4, p. 483-488. 1995.

SUTHERLAND, I.A., and LEATHWICK, D.M., 2011. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? *Trends in Parasitology*, Vol. 27, No. 4 – April 2011.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M., KUMAR, MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum Likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted) (Publication Disponível em: (<http://kumarlab.net/publications>)). 2011

THOMAZ –SOCCOL, V.; SOUZA, F. R.; SOTOMAIOR, C.*et al.* - Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.47, n.1, 2004.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. *Manual para diagnóstico da helmintoses de ruminantes*. 4 ed, 1998, p. 72.

Van WYK, J.A.; STENSON, M.O.; Van DER MERWE, *et al*; VILJOEN, P.G.

Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. *Oderstepoort Journal Veterinary Research*, v.66, p.273-284, 1999.

Van WYR, J. A.; HOSTE, H.; KAPLAN, R. M.; BESIER, R. B., Target selective treatment for worm management-How do we sell rational program to farmers? *Veterinary Parasitology*, v.139, p.336-346, 2006.

VATTA, A.F.; LETTY, B. A. van der LINDEN, M. Testing for clinical anaemia caused by *Haemonchus* spp. In goats farmed under resourcepoor conditions in South África using na eye colour chart developed for sheep. *Veterinary Parasitology*, v.80, p.239-249. 1999.

VARADY, 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.

VIEIRA, L.S., BERNE, M.E.A.; CAVALCANTE, A.C.R. *Redução do número de ovos por grama de fezes (OPG) em caprinos medicados com anti-helmínticos*. EMBRAPA, 1989 (Boletim de Pesquisa, 11).24p.

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

VIEIRA, L.S.; BERNE, M.E.; CAVALCANTE, A.C.; COSTA, C.A. *Haemonchus contortus* resistance to ivermectin and neobimin in Brazilian sheep. *Veterinary Parasitology*, v. 45, n.1-2, p.111-116. 1992.

Von SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., WALSH, T.K., DONNAN, A.A. *et al*. Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing. *Parasitology* v. 136, p. 349–358. 2009.

WALLER, P.J. World Association for the Advancement of veterinary Parasitology (WAAVP) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, v.44, p.35-44. 1992.

WALLER, P. J., International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. *International Journal of Parasitology*, v.29, p.155-164, 1999.

WALLER, P. J.; DASH, K. M.; BARGER, I.A.; *et al* Anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep: learning from the Australian experience. *Veterinary Record*, v.136, p. 441, 1995.

WALLER, P. J.; ECHEVARRIA, F.; EDDI, C. *et al* The prevalence of anthelmintic resistance *et al* The prevalence in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: General overview. *Veterinary Parasitology*, v.62, p.181-187, 1996.

WILANS, J. C., Anthelmintic treatment strategies: current status and future. *Veterinary Parasitology*. v.72, p.461-477, 1997.

WOOD, I. B.; AMARAL, N. K.; BAIRDEN, K. *et al* World Association for Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) second edition of guidelines for

evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine).
Veterinary Parasitology, v.58, p.181-213. 1995.

ZARLENGA, D.S.; STRINGFELLOW, F.; NOBARY, M.; LICHTENFELS J. R.
Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from three species of
Haemonchus (Nematoda: Trichostrongyloidea) and identification for PCR primers for
rapid differentiation *Experimental Parasitology* .v.78, n.1 p.28-36. 1994.