

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**ALTERNATIVAS FARMACOLÓGICAS PARA A
RESISTÊNCIA PARASITÁRIA MÚLTIPLA EM
REBANHOS DE RUMINANTES: UMA NOVA
ABORDAGEM**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Alfredo Skrebsky Cezar

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**ALTERNATIVAS FARMACOLÓGICAS PARA A
RESISTÊNCIA PARASITÁRIA MÚLTIPLA EM REBANHOS
DE RUMINANTES: UMA NOVA ABORDAGEM**

por

Alfredo Skrebsky Cezar

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Orientadora: Fernanda Silveira Flôres Vogel, Dr.

Santa Maria, RS, Brasil

2010

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

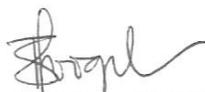
A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**ALTERNATIVAS FARMACOLÓGICAS PARA A RESISTÊNCIA
PARASITÁRIA MÚLTIPLA EM REBANHOS DE RUMINANTES: UMA
NOVA ABORDAGEM**

elaborada por
Alfredo Skrebsky Cezar

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

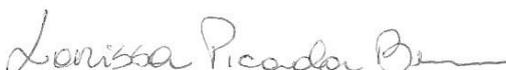
Comissão Examinadora:



Fernanda Silveira Flôres Vogel, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Marta Lizandra do Rego Leal, Dr. (UFSM)



Larissa Picada Brum, Dr. (UNIPAMPA)

Santa Maria, 10 de Março de 2010.

AGRADECIMENTOS

À orientadora, Dr^a. Fernanda Silveira Flôres Vogel, pelo constante incentivo, pelas cobranças sinceras e pelo reconhecimento do trabalho realizado no dia-a-dia, pela liberdade que me permitiu para a tomada de decisões e pela atenção e empenho que empreendeu na condução dos trabalhos e para a superação das dificuldades que se impuseram ao longo do caminho.

Ao professor Dr. Luís Antônio Sangioni pela excepcional convivência, conselhos e ensinamentos durante o curso deste trabalho no Laboratório de Doenças Parasitárias da UFSM (LADOPAR).

A toda a equipe do LADOPAR com a qual gratamente convivi em alguns dos mais decisivos (e desgastantes) anos da minha vida acadêmica, por todo o apoio, companheirismo nos erros e nos acertos no decorrer do nosso trabalho e pelos momentos de puro exercício da amizade, mesmo nas horas de trabalho mais árduo e pesado nos experimentos a campo ou nas incontáveis horas dentro dos laboratórios.

Ao apoio e solicitude dos profissionais e estudantes ligados ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFSM, especialmente aos mestres Dr. Rudi Weiblen, Dr. Eduardo Furtado Flores e Dr^a. Águeda Palmira Castagna de Vargas e à equipe do Setor de Virologia.

Aos meus familiares, meu pai Heraldo, minha mãe Maria Angela e meus irmãos Felipe e Heraldo, e aos amigos Nelson e Alice Cauzzo, pelo tanto que me apoiaram desde os primeiros passos na escolha da carreira de Médico Veterinário.

À minha namorada Fernanda, por todo o carinho e incentivo nos momentos difíceis, pelo compartilhamento das emoções ao longo dos dias, por desejar o meu sucesso e dedicar-se a ele ao meu lado, por me ajudar a superar qualquer desafio, por ser meu porto-seguro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da UFSM, pela oportunidade e estrutura oferecidas para a realização deste trabalho.

Às agências financiadoras (CAPES e CNPq) que apoiaram nossos projetos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

ALTERNATIVAS FARMACOLÓGICAS PARA A RESISTÊNCIA PARASITÁRIA MÚLTIPLA EM REBANHOS DE RUMINANTES: UMA NOVA ABORDAGEM

AUTOR: ALFREDO SKREBSKY CEZAR

ORIENTADORA: FERNANDA SILVEIRA FLÔRES VOGEL

Santa Maria, 10 de Março de 2010.

As infecções por nematódeos do trato gastrointestinal estão entre as principais enfermidades de ruminantes ao redor do mundo. Essas infecções, clínicas ou subclínicas, impactam negativamente a produtividade dos rebanhos, e a viabilidade econômica dos mesmos está diretamente relacionada a um controle adequado desses parasitas. Embora estejam comprovados os benefícios de utilizarem-se diversas práticas de controle alternativo de parasitas, as quais vêm sendo aprimoradas ao longo dos anos, em geral, a utilização de fármacos antiparasitários eficazes sobre os helmintos que infectam os ruminantes ainda é essencial para que se obtenham resultados satisfatórios. No entanto, o desenvolvimento de resistência parasitária a tais fármacos tem se tornado cada vez mais comum e, em alguns casos, as populações de parasitas já apresentam resistência múltipla a várias classes de anti-helmínticos e endectocidas, comprometendo o adequado controle das helmintoses. Neste estudo apresentam-se experimentos que foram conduzidos com o objetivo de encontrarem-se meios de restabelecer a eficácia dos tratamentos, recuperando-se a utilidade de princípios ativos para os quais os nematódeos gastrintestinais de rebanhos de ruminantes já tenham desenvolvido resistência. Foram utilizados testes de eficácia com base na redução da contagem de ovos nas fezes dos animais após os tratamentos (FECRT), e em culturas de larvas para a identificação dos gêneros de nematódeos presentes nessas amostras. Avaliaram-se os efeitos anti-helmínticos de fármacos de alta concentração (longa ação), de superdosagens, de combinações comerciais e de combinações de drogas elaboradas com base em estudos prévios de eficácia das mesmas (isoladamente), utilizando-se para isso, fármacos comercializados separadamente. Os melhores resultados foram obtidos, justamente, com estas últimas. Propõe-se, a partir destas constatações, uma nova abordagem em relação ao controle antiparasitário em populações de helmintos multi-resistentes, utilizando-se a combinação de diferentes fármacos (com princípios ativos e mecanismos de ação distintos), e valendo-se de testes de eficácia para a escolha dos fármacos e para a comprovação dos resultados obtidos com suas combinações especificamente em cada rebanho.

Palavras-chave: Combinações, superdoses, anti-helmínticos, multi-resistentes, helmintos.

ABSTRACT

Master's Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

PHARMACOLOGICAL ALTERNATIVES FOR MULTIPLE PARASITIC RESISTANCE IN RUMINANT LIVESTOCK: A NEW APPROACH

AUTHOR: ALFREDO SKREBSKY CEZAR

ADVISER: FERNANDA SILVEIRA FLÔRES VOGEL

Santa Maria, March, 10, 2010.

Infections by gastrointestinal nematodes are among the main diseases of the ruminants around the world. These infections cause - in their clinical or subclinical courses – a decrease of the productivity of the herds, thus, the economic viability of the ruminant farms is directly related to an adequate control of these parasites. Although the benefits of the use of several practices of alternative control of parasites are proven and, despite of that these practices have been improved through the years, in general, the use of efficacious antiparasitic drugs is imperative to control satisfactorily the helminths of the ruminants. However, the development of parasite resistance to these drugs has become common and, in some cases, parasitic populations are multiple resistant to several classes of anthelmintics and endectocides, and it makes very difficult to control the helminthosis adequately. In this study are shown some experiments conducted with the aim of to find ways to restore the efficacy of the treatments, for recovering the usefulness of active ingredients for which the gastrointestinal nematodes of ruminants became resistant. Efficacy tests of the drugs were made using Fecal Egg Count Reduction Tests (FECRT) and larvae cultures, for the identification of the genus of nematodes existing, before and after the treatments. We evaluated the anthelmintic action of high concentrated (long acting) drugs, overdoses (high dosages), commercial combinations of drugs and combinations of chemicals, formulated with basis in previous efficacy tests for each active ingredient alone. These combinations, done from drugs sold separately, gave us the best results. Based in these observations, we are proposing a new approach regarding helminth control in multi-resistant populations, by using combinations of drugs with different mechanisms of action on the parasites, and taking advantage of the efficacy tests, performed before the choose of drugs, and then, to prove the results obtained with the combinations done particularly for each herd.

Key words: Combinations, overdoses, anthelmintics, multi-resistant, helminths.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

- QUADRO 1. Percentuais de redução média de OPG, obtidos após a aplicação de diferentes antiparasitários em bovinos naturalmente infectados por nematódeos do trato gastrintestinal, nos dias 7 (D+7) e 14 (D+14) pós-tratamento..... 28
- QUADRO 2. Representatividade de larvas infectantes (L3) recuperadas dos cultivos de larvas - no dia anterior aos tratamentos (-1) e nos dias 7 (+7) e 14 (+14) pós-tratamentos – para os gêneros *Cooperia* spp. (*Coop.*), *Haemonchus* spp. (*Haem.*), *Ostertagia* spp. (*Ostert.*), *Trichostrongylus* spp. (*Trich.*) e *Oesophagostomum* spp. (*Oesoph.*)..... 29

CAPÍTULO 4

- QUADRO 1. Tratamentos avaliados nos ovinos do rebanho-alvo e eficácias calculadas das drogas com base em um Teste de Redução da Contagem de Ovos nas Fezes (FECRT) em um estudo prévio..... 52
- QUADRO 2. Percentual de cada um dos três gêneros de nematódeos gastrintestinais - *Haemonchus* spp. (*Haem.*), *Trichostrongylus* spp. (*Trich.*), *Ostertagia* spp. (*Ostert.*) – recuperados de culturas de larvas nas fezes dos ovinos, antes (D0) e 12 dias depois (D12) dos tratamentos antiparasitários, em um estudo prévio (para as drogas selecionadas para o presente estudo)..... 53
- QUADRO 3. Tratamentos avaliados no rebanho-alvo de ovinos no presente estudo..... 54
- QUADRO 4. Médias de OPG de cada grupo de ovinos antes (D0) e 12 dias depois (D12) dos tratamentos antiparasitários e eficácias calculadas de cada tratamento com base em um Teste de Redução da Contagem de Ovos nas Fezes (FECRT)..... 55
- QUADRO 5. Percentual de cada um dos cinco gêneros de nematódeos gastrintestinais - *Haemonchus* spp. (*Haem.*), *Trichostrongylus* spp. (*Trich.*), *Ostertagia* spp. (*Ostert.*), *Cooperia* spp. (*Coop.*), *Oesophagostomum* spp. (*Oesoph.*) – recuperados de culturas de larvas em fezes ovinas coletadas antes (D0) e 12 dias depois (D12) dos tratamentos antiparasitários..... 56

LISTA DE TABELAS

CHAPTER 3

TABLE 1. Groups (n=15) and treatments evaluated in the target sheep flock.....	37
TABLE 2. Mean EPG of each sheep group before (D0) and 12 days after (D12) antiparasitic treatments and calculated efficacies of the drugs based on Fecal Egg Count Reduction Tests (FECRT) by Coles et al. (1992) and RESO FECRT analysis:.....	38
TABLE 3. Percentage of each of three genera of gastrointestinal nematodes - <i>Haemonchus</i> spp. (<i>Haem.</i>), <i>Trichostrongylus</i> spp. (<i>Trich.</i>), <i>Ostertagia</i> spp. (<i>Ostert.</i>) – recovered from larvae cultures of sheep feces collected before (D0) and 12 days after (D12) antiparasitic treatments, and percentages of reduction (PR) post-treatments calculated in RESO FECRT software:.....	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 AÇÃO ANTI-HELMÍNTICA DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DE LACTONAS MACROCÍCLICAS EM CEPAS RESISTENTES DE NEMATÓDEOS DE BOVINOS.....	16
Abstract.....	16
Resumo.....	17
Introdução.....	17
Material e métodos.....	19
Resultados e discussão.....	21
Referências.....	25
3 MULTIPLE RESISTANCE OF GASTROINTESTINAL NEMATODES TO NINE DIFFERENT DRUGS IN A SHEEP FLOCK IN SOUTHERN BRAZIL.....	30
Abstract.....	30
1. Introduction.....	31
2. Materials and methods.....	31
3. Results.....	32
4. Discussion.....	33
References.....	34
4 COMBINAÇÃO DE DROGAS ANTIPARASITÁRIAS COMO ALTERNATIVA PARA O CONTROLE DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS MULTI-RESISTENTES EM OVINOS.....	40
Abstract.....	40
Resumo.....	41
Introdução.....	41
Material e métodos.....	43

Resultados e discussão.....	44
Conclusões.....	47
Referências.....	48
5 CONCLUSÕES.....	57
6 REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

As endoparasitoses dos ruminantes podem ser causadas por uma diversidade de helmintos, entre os quais se destacam os nematódeos do trato gastrointestinal (THAMSBORG; ROEPSTORFF; LARSEN, 1999; WALLER, 2002; MEJÍA et al., 2003; JACKSON et al., 2009). Com as alterações ambientais provocadas através do processo de domesticação dos animais (como o aumento da densidade populacional e a restrição de movimento dos rebanhos) e com a interferência humana na seleção genética das espécies domésticas visando apenas, ou principalmente, a propagação de características desejáveis a critérios de produção, o homem alterou o equilíbrio natural parasita/hospedeiro, favorecendo o aumento das populações de parasitas (REINECKE, 1994; WALLER, 2002). Por conseguinte, as endoparasitoses passaram a exercer um papel central dentre as causas de prejuízos econômicos nas criações pecuárias, podendo ser consideradas o principal fator restritivo à viabilidade dos sistemas de produção intensiva ou semi-intensiva de pequenos ruminantes em diversas regiões do mundo (van WYK; MALAN; RANGLES, 1997; SANGSTER, 1999; BIFFA; JOBRE; CHAKKA, 2006; LEATHWICK et al., 2009).

As mais notórias conseqüências das infecções por nematódeos do trato gastrointestinal nos rebanhos de ruminantes se devem ao seu impacto negativo ao bem-estar e à produtividade dos animais, causando desenvolvimento retardado, anorexia, queda do desempenho reprodutivo, má conversão alimentar, perda de peso, entre outros, chegando à mortalidade dos animais debilitados e, especialmente, de cordeiros (MacRAE, 1993; McLEOD, 1995; BAHIRATHAN et al., 1996; KAGIRA; KANYARIA, 2001; WEST et al., 2009). Porém, na maioria dos casos, as infecções têm um curso subclínico e, por isso, podem passar despercebidas, paradoxalmente aos grandes prejuízos que determinam (KYRIAZAKIS et al., 1994; FORBES; CUTLER; RICE, 2002; WEST et al., 2009). Por conta disso, é essencial ao bom desempenho geral dos rebanhos, que se apliquem medidas eficazes de controle e profilaxia, as quais minimizem os efeitos dessas parasitoses, mantendo-as dentro de níveis normais aceitáveis, os quais, em tese, dependerão da intensidade do sistema de produção (REINECKE, 1994; STROMBERG; AVERBECK, 1999; MOLENTO, 2009). A adoção dessas medidas determina um custo, o qual se deve, grandemente, a necessidade de aplicação de fármacos antiparasitários nos rebanhos (McLEOD, 1995).

Os melhores métodos e técnicas a serem aplicados, visando à sustentabilidade do controle parasitário, são variáveis em função das práticas de manejo utilizadas em cada rebanho, das espécies e das categorias animais criadas na área em questão, e de fatores

ambientais locais ou regionais (BARGER, 1999; WALLER, 1997; WALLER; THAMSBORG, 2004). Porém, há alguns conceitos básicos da epidemiologia dos endoparasitas dos ruminantes que precisam ser conhecidos para a realização de um manejo correto dos fármacos antiparasitários (STROMBERG; AVERBECK, 1999; WALLER, 1999). Levando-se em conta esses aspectos, têm-se como propostas para o alcance deste objetivo: a utilização da menor frequência de tratamentos alopáticos necessária (van WYK et al., 2006), o emprego de formulações as quais provoquem a menor pressão de seleção de genótipos resistentes possível, evitando-se as formulações de longa ação (YAZWINSKI et al., 2006; LEATHWICK et al., 2009), e a incorporação de subterfúgios, como a alternância de bases químicas (BARNES; DOBSON; BARGER, 1995), para frear o desenvolvimento da resistência parasitária. Com estas práticas - entre outras possíveis, revisadas por van Wyk et al. (2006) e por Cezar; Catto; Bianchin (2008) – tem-se como principal objetivo a manutenção e, idealmente, a ampliação da população parasitária em *refugia*.

A *refugia* consiste no estoque de ovos e larvas de parasitas presentes no ambiente, fora de contato com o princípio ativo utilizado ou, mesmo, de formas parasitárias, adultas ou imaturas, albergadas em animais não-tratados, e apresenta papel fundamental na sustentabilidade dos tratamentos antiparasitários (van WYK et al., 2006; KENYON et al., 2009; MOLENTO, 2009). Isso porque, quanto maior for a parcela da população parasitária que venha a entrar em contato com doses, terapêuticas ou não, dos antiparasitários utilizados no rebanho, maior será a pressão de seleção, ou seja, o estímulo para a sobrevivência e proliferação de genótipos parasitários com maior grau de resistência ao(s) princípio(s) ativo(s) utilizado(s) (WOLSTENHOLME et al., 2004; KENYON et al., 2009).

Nesse sentido, se observa que a rotação de bases químicas, realizada com critérios técnicos, dificulta o desenvolvimento da resistência, por haver uma interrupção na pressão de seleção para determinada base em detrimento de outra, eliminando-se, assim, muitos dos genótipos resistentes à primeira, pela utilização da segunda (BARNES; DOBSON; BARGER, 1995; JACKSON; COOP, 2000). Porém, como contrapartida, a alternância equivocada de bases químicas, especialmente naqueles casos em que são empregadas alta frequência de tratamentos e rápida rotação de drogas (CRAIG, 1993; JACKSON; COOP, 2000; CRUZ et al., 2010), somada à inerente resistência lateral¹ (RANJAN et al., 2002) e à possível

¹ Resistência lateral: diz-se daquela que se desenvolve quando, a partir de pressão de seleção exercida por fármaco de determinada classe química, ocorre, concomitantemente, o desenvolvimento de resistência parasitária para outro(s) fármaco(s) desta mesma classe química (van WYK; MALAN; RANDLES, 1997; SANGSTER, 1999).

resistência cruzada² (MOTTIER; PRICHARD, 2008; JAMES; DAVEY, 2009), além de, em alguns casos, à transferência de cepas resistentes de um rebanho para outro pela aquisição de animais (SILVESTRE et al., 2000; LEATHWICK; POMROY; HEATH, 2001; LEATHWICK et al., 2009), podem resultar no desenvolvimento de resistência múltipla.

Conceitua-se a resistência múltipla como aquela em que diferentes classes de fármacos antiparasitários, de comprovada eficácia sobre os parasitas-alvo em condições naturais, passam a ter sua eficácia reduzida sobre determinada população parasitária, a qual, na sua origem, consistia de ampla maioria (mais de 95%) de genótipos susceptíveis a estes fármacos (MEJÍA et al., 2003; TAYLOR et al., 2009). Em bovinos, são menos comuns os casos de resistência parasitária múltipla (COLES, 2002; MEJÍA et al., 2003), mas em pequenos ruminantes, além da grande ocorrência desses casos ao redor do mundo (WOLSTENHOLME et al., 2004), há relatos que dão conta de populações de helmintos multi-resistentes às principais classes de medicamentos antiparasitários (avermectinas/milbemicinas, benzimidazóis e imidazotiazóis) disseminadas por diversas regiões (FARIAS et al., 1997; ZAJAC; GIPSON, 2000; WAGHORN et al., 2006). Além disso, é comum a resistência lateral dentro de cada uma dessas classes de medicamentos (VÁRADY et al., 1997; van WYK; MALAN; RANGLES, 1997; SANGSTER, 1999; SANGSTER; GILL, 1999; JACKSON; COOP, 2000), especialmente, entre os endectocidas do grupo das lactonas macrocíclicas (avermectinas/milbemicinas) (KAPLAN, 2004).

Quanto mais intensivo for o sistema de criação, maiores tendem a ser os prejuízos ao produtor no caso de tratamentos anti-helmínticos ineficazes, seja pela sua incorreta aplicação, seja pela resistência parasitária (REINECKE, 1994; BARGER, 1999; KAGIRA; KANYARIA, 2001) e, há que se destacar, que os métodos alternativos de controle anti-helmíntico devem ser tratados como complementares no controle dos parasitas nos rebanhos e, com isso, devem ser associados ao tratamento alopático, e eficaz, dos animais (WALLER; THAMSBORG, 2004; CEZAR; CATTO; BIANCHIN, 2008; MOLENTO, 2009). Sabendo-se disso, fica clara a necessidade de recorrer-se a alternativas farmacológicas para restabelecer a eficácia dos tratamentos e garantir a sustentabilidade do controle anti-helmíntico e a viabilidade produtiva em rebanhos acometidos pela resistência parasitária múltipla.

² Resistência cruzada: diz-se daquela que se dá entre princípios ativos pertencentes a grupos químicos distintos entre si. Dessa forma, ocorre quando, ainda que indiretamente, a pressão de seleção exercida por determinado fármaco sobre a população parasitária provoca, concomitantemente, o desenvolvimento de genótipos resistentes a outro(s) fármaco(s) de grupo(s) químico(s) distinto(s) ao primeiro (van WYK; MALAN; RANGLES, 1997; SANGSTER, 1999).

A ampla gama de fármacos antiparasitários disponíveis no mercado, com diferentes princípios ativos, formulações, concentrações, vias de administração, nomes comerciais (McKELLAR; JACKSON, 2004), paradoxalmente à liberdade de escolha que proporciona, acaba por confundir os produtores, os quais, em geral, prescindem do aconselhamento de um médico veterinário, e utilizam critérios aleatórios na compra desses medicamentos para aplicação nos seus rebanhos. Essa realidade, que se observa no campo, é compatível com a amplitude dos problemas de resistência parasitária que se observam nas mais diferentes regiões do mundo (KAPLAN, 2004; WOLSTENHOLME et al., 2004).

Como alternativas de manejo de fármacos antiparasitários que podem ser propostas com vistas a recuperar a eficácia dos tratamentos sobre populações multi-resistentes de nematódeos gastrintestinais estão: (a) o uso de fármacos de alta concentração (longa ação); (b) a aplicação de superdoses; (c) as aplicações de um mesmo fármaco em dias consecutivos; e (d) as combinações comerciais de princípios ativos. Porém, todas essas práticas apresentam alguns pontos negativos importantes, os quais serão apresentados a seguir.

Em geral, as formulações com altas concentrações de princípio ativo são veiculadas de maneira a garantir um “estoque” deste princípio ativo no organismo do animal tratado, o qual vai sendo liberado gradativamente na corrente sanguínea (LIFSCHITZ et al., 1999; DUPUY; SUTRA; ALVINERIE, 2007; LIFSCHITZ et al., 2007), de onde se distribui aos tecidos-alvos nos quais se dá o contato com os parasitas (LIFSCHITZ et al., 1999). Por conta destes mecanismos, tais fármacos tendem a ter um efeito mais expressivo no aumento do período de ação do que propriamente na eficácia do tratamento (DOBSON; LeJAMBRE; GILL, 1996; LIFSCHITZ et al., 2007). Contando contra a utilização de fármacos com longo período de ação tem-se a sua característica de permanecerem sendo liberados na corrente sanguínea em subdoses por muito tempo depois de sua aplicação, o que ocorre posteriormente à sua queda para concentrações plasmáticas inferiores à dose terapêutica (DOBSON; LeJAMBRE; GILL, 1996; LAWRENCE et al., 2006). Durante esse período, ocorre a eliminação daqueles genótipos de parasitas mais susceptíveis ao princípio ativo, diminuindo a sua proporção na *refugia* (van WYK et al., 2006; KENYON et al., 2009), e acarretando, com isso, na aceleração do desenvolvimento de resistência parasitária.

Embora se possa imaginar que superdosagens promovam um aumento da eficácia dos tratamentos, isto pode não se confirmar na prática (WALLER, 1997). Adicionalmente, essas altas doses acabam por imprimir elevada pressão de seleção de genótipos (homozigotos) resistentes ao princípio ativo (BARNES; DOBSON; BARGER, 1995; GEERTS; GRYSEELS, 2000; SILVESTRE et al., 2002), o que, por sua vez, tende a inviabilizar a droga

utilizada a médio-longo prazo. Ainda, podem ocorrer intoxicações e se exacerbarem os efeitos adversos das drogas administradas em superdosagens (BARLOW; SHARPE; KINCAID, 2002; van der LUGT; VENTER, 2007). Além disso, com esta prática elevam-se os custos dos tratamentos, e pode haver interferência no tempo de carência para o abate ou para a utilização do leite dos animais, não sendo mais possível considerar as recomendações expressas nas bulas dos medicamentos, as quais são válidas apenas para as doses igualmente recomendadas.

Aplicações consecutivas de um mesmo princípio ativo em curtos intervalos de tempo (dias) podem aumentar sua eficácia sobre parasitas resistentes (SANGSTER et al., 1991; CHARTIER; PORS; BENOIT, 1995; HENNESSY, 1997), mas além de elevarem os custos dos tratamentos, aumentam o manejo e o estresse dos animais (van WYK et al., 2006), o que, por si só, poderá desencorajar o produtor a adotar esse sistema.

Por fim, as combinações comerciais de princípios ativos impedem que a escolha das bases químicas aplicadas seja feita conforme a realidade de cada rebanho. Isso reduz as opções do produtor às combinações mercadologicamente mais viáveis, não necessariamente as mais indicadas a determinado rebanho especificamente.

As combinações de drogas realizadas por meio de aplicação concomitante de fármacos têm sido comumente estudadas em humanos para o controle de parasitas resistentes ou para o aumento da eficácia dos tratamentos antiparasitários (ISMAIL et al., 1998; ALBONICO et al., 2003; PINK et al., 2005). As combinações comerciais, contendo diferentes classes de princípios ativos, têm seu uso freqüente para o controle de ectoparasitas resistentes em bovinos, principalmente na América Latina (GEORGE; POUND; DAVEY, 2004; FURLONG; PRATA; MARTINS, 2007). Essas estratégias têm sido pouco exploradas para endoparasitas de animais de produção, embora o aparecimento de resistência parasitária múltipla em rebanhos de pequenos ruminantes tenha instigado alguns estudos com essa proposta (ANDERSON; MARTIN; JARRET, 1988; MILLER; CRAIG, 1996; ENTROCASSO et al., 2008). Nesse sentido, deve-se destacar que, ao realizarem-se tratamentos com combinações de diferentes drogas, há pouco acréscimo no que diz respeito ao manejo, e têm-se, como vantagens importantes, a manutenção das dosagens recomendadas para cada fármaco e a possibilidade de combinação de bases pertencentes a grupos químicos distintos, os quais apresentam diferentes mecanismos de ação. Estas diferenças nos modos de ação dificultam as adaptações dos parasitas e, conseqüentemente, a disseminação de genótipos resistentes aos tratamentos (BARNES; DOBSON; BARGER, 1995; GEERTS; GRYSEELS, 2000; HU et al., 2010).

Os estudos *in vitro* (MOLENTO; PRICHARD, 1999; RANJAN, 2002; van ZEVEREN et al., 2007) têm grande importância para o esclarecimento dos mecanismos de desenvolvimento da resistência parasitária nos mais diversos contextos, e permitem um maior controle em relação aos fatores desencadeadores dos mecanismos de resistência nas populações de parasitas, já que nesses modelos experimentais podem-se evitar as variáveis ambientais, por exemplo. Porém, sabendo-se que, a campo, as cepas resistentes tendem a se desenvolver diferentemente daquelas produzidas em laboratório (GILL et al., 1998), torna-se imprescindível a condução de estudos em condições reais, ainda que, nesses casos, devam-se considerar particularidades inerentes a cada rebanho, as quais não devem ser generalizadas. Contudo, a conjunção de tais estudos é essencial para que se confirmem ou não as teorias advindas das mais diversas investigações conduzidas dentro do tema da resistência parasitária ao redor do mundo.

Nos capítulos seguintes são apresentados e discutidos experimentos que foram realizados com a finalidade de apresentar a problemática da resistência parasitária utilizando-se rebanhos de ruminantes do sul do Brasil, experimentos os quais se propuseram, mais especificamente, ao objetivo de testar alternativas farmacológicas para a recuperação da eficácia dos tratamentos antiparasitários sobre as populações de nematódeos gastrintestinais multi-resistentes presentes nesses rebanhos. A partir desses estudos, propõe-se uma nova abordagem em relação à resistência parasitária múltipla, na qual se almeja a recuperação da eficácia dos tratamentos alopáticos como objetivo primordial à elaboração de programas de controle anti-helmíntico sustentáveis, os quais deverão ser complementados com as ditas práticas alternativas, comprovadamente úteis, benéficas e indissociáveis de um adequado manejo antiparasitário.

2 AÇÃO ANTI-HELMÍNTICA DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DE LACTONAS MACROCÍCLICAS EM CEPAS RESISTENTES DE NEMATÓDEOS DE BOVINOS¹

Alfredo Skrebsky Cezar^{2*}, Fernanda S. F. Vogel³, Luís Antônio Sangioni³, Ana Maria Antonello⁴, Giovana Camillo², Gustavo Toscan² e Luciana O. de Araujo⁴

(Artigo aceito para publicação na revista científica Pesquisa Veterinária Brasileira, 2010)

ABSTRACT.- Cezar A.S., Vogel F.S.F., Sangioni L.A., Antonello A.M., Camillo G., Toscan G. & Araujo L.O. 2010. [**Anthelmintic action of different formulations of macrocyclic lactones on resistant strains of nematodes of cattle.**] Ação anti-helmíntica de diferentes formulações de lactonas macrocíclicas em cepas resistentes de nematódeos de bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* xx(xx):xx-xx. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil. E-mail: alfredosps@hotmail.com

The macrocyclic lactones (MLs) (avermectins and milbemicins) are endectocides broadly used in livestock and in some parasitic diseases of humans. In cattle, parasite resistance to MLs is emerging, and the appearance of formulations that differ in their pharmacological properties become complex the choice of the most appropriate drug to each case. In order to evaluate possible alternatives to restore the effectiveness of MLs on resistant strains of gastrointestinal nematodes, were tested, in this study, ten different treatments based on the MLs on a population of gastrointestinal nematodes of cattle which, known, was under pressure of selection by 1% avermectins. Additionally, was tested a benzimidazole. The efficacy of the drugs was calculated with basis on the reduction of eggs per gram of feces (EPG) of bovines. The resistance of each genus was evaluated by identification of the larvae, obtained from culture in the feces, pre- and post-treatments. The desired efficacy was not

¹ Recebido em:

² Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária Preventiva - Doenças Parasitárias. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, nº 1000, Prédio 44, Sala 5149, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP: 97105-900. Telefone: (55) 3220 8071. E-mail: alfredosps@hotmail.com. *Autor para correspondência.

³ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM. Av. Roraima, nº 1000, Prédio 44, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP: 97105-900. Telefone: (55) 3220 8071.

⁴ Curso de Medicina Veterinária, UFSM. Santa Maria, RS, Brasil.

obtained using long acting avermectins - with high concentration and in association - even with the application of high doses. The genera *Cooperia* spp., *Haemonchus* spp. and *Trichostrongylus* spp. were resistant to avermectins, and *Ostertagia* spp. to ivermectin. It was observed that, once established parasite resistance to the 1% MLs, the application of drugs, of this same chemical group, even in formulations of high concentration, association or in high doses, may not result in the expected efficacy.

INDEX TERMS: macrolactones, long action, parasite resistance, helminthes.

RESUMO.- As lactonas macrocíclicas (LMs) (avermectinas e milbemicinas) são endectocidas amplamente utilizados em animais e em algumas parasitoses humanas. Em bovinos, a resistência parasitária às LMs é emergente, e o surgimento de formulações que diferem nas suas propriedades farmacológicas tornou complexa a escolha da droga mais indicada a cada caso. Com o objetivo de avaliar possíveis alternativas para recuperar a eficácia de LMs sobre cepas resistentes de nematódeos gastrintestinais, testaram-se, neste estudo, dez diferentes tratamentos a base de LMs sobre uma população de nematódeos gastrintestinais de bovinos a qual, sabidamente, sofrera pressão de seleção por avermectinas a 1%. Adicionalmente, testou-se um benzimidazol. A eficácia das drogas foi calculada com base na redução de ovos por grama de fezes (OPG) dos bovinos. A resistência de cada gênero foi avaliada por meio de identificação de larvas, obtidas de cultivos nas fezes, pré- e pós-tratamentos. Não se obteve a eficácia desejada com o emprego de avermectinas de longa ação - com alta concentração e em associação - ou mesmo, com a aplicação de superdoses. Os gêneros *Cooperia* spp., *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp. foram resistentes às avermectinas, e *Ostertagia* spp. à ivermectina. Observou-se que, uma vez estabelecida a resistência parasitária a LMs a 1%, a aplicação de fármacos, deste mesmo grupo químico, ainda que em formulações mais concentradas, associações ou superdoses, pode não resultar na eficácia esperada.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: macrolactonas, longa ação, resistência parasitária, helmintos.

INTRODUÇÃO

As infecções por nematódeos do trato gastrintestinal influenciam negativamente na produtividade e no bem-estar dos bovinos, sendo necessário que se promovam medidas de

controle e profilaxia que as minimizem. Até o momento, quase todos os métodos de controle dessas parasitoses dependem, em algum grau, do emprego de quimioterápicos. As lactonas macrocíclicas (LMs) são endectocidas de amplo espectro (avermectinas e milbemicinas), largamente utilizados em animais domésticos e em algumas parasitoses de humanos (Shoop et al. 1995, Geary 2005). A resistência parasitária a essas drogas encontra-se disseminada ao redor do mundo nos rebanhos bovinos (Kaplan 2004), reduzindo a eficácia e, por consequência, o retorno econômico dos tratamentos antiparasitários.

As LMs disponíveis para aplicação em bovinos apresentam-se em diversas formulações - com diferentes princípios ativos, concentrações e associações - dando alternativas ao produtor para a escolha de drogas eficazes no seu rebanho e adequadas ao seu manejo. Porém, é necessário que se encontrem meios para estender a vida-útil destes e dos demais fármacos antiparasitários, caso contrário, o desenvolvimento de resistência múltipla aos anti-helmínticos pode dificultar, ou mesmo, inviabilizar o controle das nematódioses no rebanho (Coles 2002, Kaplan 2004). Além disso, deve-se destacar a importância de manter-se a viabilidade dos endectocidas para programas de controle integrado das parasitoses.

Há correlação positiva entre a dose administrada e a concentração plasmática de LMs em bovinos (Lanusse & Prichard 1993, van Zeveren et al. 2007) e alguns estudos indicam que a aplicação de LMs de alta concentração com longa ação (LA) e em associação pode aumentar a eficiência dos tratamentos (Dobson et al. 1996, Catto et al. 2005, Yazwinski et al. 2006, Borges et al. 2008). Além disso, na seleção experimental de nematódeos resistentes a LMs, a partir de cepas originalmente susceptíveis, em geral, é necessária a aplicação de uma subdose para desencadear o processo de seleção, a qual é aumentada gradativamente, sobre subseqüentes gerações do parasita, até obterem-se cepas resistentes à dose terapêutica do princípio ativo (Ranjan et al. 2002, van Zeveren et al. 2007). Essas observações apontam para uma adaptação dose-dependente da população parasitária ao princípio ativo, o que indica que cepas resistentes à dose terapêutica mínima de determinada droga poderiam ser susceptíveis ao contato com maiores concentrações da mesma. Levando-se em conta esses fatos, e as evidências de que as cepas resistentes presentes nos rebanhos podem diferir daquelas produzidas em laboratório (Gill et al. 1998), torna-se importante a investigação criteriosa da aplicabilidade desses conceitos em condições de campo.

Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação de LMs - com diferentes princípios ativos e concentrações, em associação, com diferentes doses e períodos de persistência - e, adicionalmente, de um fármaco do grupo dos benzimidazóis, sobre uma população de helmintos que, sabidamente, sofrera pressão de seleção por avermectinas a 1%,

e a qual não sofrera pressão de seleção por outros anti-helmínticos nos oito anos anteriores ao estudo. Com isso, buscou-se avaliar a viabilidade dessas alternativas para o controle de helmintos em uma população resistente às avermectinas de baixa concentração (a 1%).

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se um rebanho bovino situado no município de São Pedro do Sul, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, cuja escolha deveu-se ao manejo antiparasitário previamente realizado, que consistia na aplicação de doramectina a 1% (DRM 1%) (apenas em neonatos ou pré-castração - nos machos) e de ivermectina a 1% (IVM 1%), com média de 4 tratamentos/ano, em todas as categorias animais. Não havia critério definido para os tratamentos, sendo, os mesmos, realizados de maneira profilática e, por conveniência, quando os animais viessem a ser manejados para outros fins. Assim, por conta da pressão de seleção exercida sobre os nematódeos gastrintestinais presentes nos bovinos e, por conseqüência, nas pastagens, partiu-se de boa probabilidade de se encontrarem cepas de nematódeos resistentes à LMs. Deste rebanho, utilizou-se um lote de 149 bovinos da raça Brangus, com cerca de 12 meses de idade, mantidos em campo nativo, com densidade de 1,1 UA ha⁻¹ e isentos de tratamento anti-helmíntico nos três meses precedentes ao início dos testes.

O estudo constituiu-se de três experimentos subseqüentes e interdependentes, onde os resultados de cada experimento indicavam o que seria testado a seguir. Durante o curso deste estudo avaliou-se, pelos mesmos métodos, um grupo de animais não-tratados junto a cada um dos experimentos. Com isso, monitoraram-se possíveis variações naturais da população parasitária que pudessem interferir nos resultados dos testes de eficácia.

Experimento 1: testou-se a eficácia anti-helmíntica de avermectinas e de uma milbemicina, nas suas formulações a 1%, em veículo oleoso (de liberação lenta) ou não-aquoso. Adicionalmente, testou-se a eficácia de um anti-helmíntico do grupo dos benzimidazóis. Para isso, foram constituídos 6 grupos (n=8), que receberam os seguintes tratamentos: G1. ivermectina a 1%⁵ (IVM 1%) (0,2 mg Kg⁻¹); G2. doramectina a 1%⁶ (DRM 1%) (0,2 mg Kg⁻¹); G3. ivermectina a 1% LA⁷ (IVM 1% LA) (0,2 mg Kg⁻¹); G4. abamectina a 1% LA⁸ (ABM 1% LA) (0,2 mg Kg⁻¹); G5. moxidectina a 1%⁹ (MOX 1%) (0,2 mg Kg⁻¹); G6.

⁵Ivermectina 1% Ouro Fino, Ouro Fino Saúde Animal, Rodovia Anhanguera SP 330, Km 298, Cravinhos, SP.

⁶Dectomax®, Pfizer Saúde Animal, Avenida Monteiro Lobato 2270, Guarulhos, SP.

⁷Ivotan® L.A., Intervet do Brasil Veterinária LTDA, Avenida Sir Henry Wellcome 335, Cotia, SP.

⁸Abamectina 1% Ouro Fino LA, Ouro Fino Saúde Animal, Rod. Anhanguera SP 330, Km 298, Cravinhos, SP.

⁹Cydectin Injetável®, Fort Dodge Saúde Animal, Rua Luiz Fernando Rodriguez, 1701, Campinas, SP.

sulfóxido de albendazol a 10%¹⁰ (SULF-ALB 10%) (2,5 mg Kg⁻¹) - do grupo dos benzimidazóis.

Experimento 2: testou-se a ação anti-helmíntica de avermectinas de alta concentração com longa ação (LA), incluindo-se uma droga composta por uma associação de princípios ativos, sobre a população de nematódeos gastrintestinais resistente às avermectinas a 1%. Os grupos tratados (n=8) foram: G7. ivermectina a 3,15% LA¹¹ (IVM 3,15% LA) (0,63 mg Kg⁻¹); G8. ivermectina a 4% LA¹² (IVM 4% LA) (0,8 mg Kg⁻¹); G9. ivermectina a 2,25% (0,45 mg Kg⁻¹) + abamectina a 1,25% LA (0,25 mg Kg⁻¹)¹³ (IVM+ABM 3,5% LA).

Experimento 3: testou-se a ivermectina - a 1% e a 3,15% LA - em superdoses (triplo da dose terapêutica) sobre a população de nematódeos gastrintestinais resistente às avermectinas a 1%. Os grupos tratados (n=8) foram: G10. IVM 1%⁵ em dose tripla (0,6 mg Kg⁻¹); G11. IVM 3,15% LA¹¹ em dose tripla (1,9 mg Kg⁻¹).

Procederam-se coletas de fezes no dia anterior ao tratamento (D-1) e aos 7 (D+7), 14 (D+14) e 21 (D+21) dias pós-tratamento. Realizaram-se contagens de ovos de nematódeos por grama de fezes (OPG) (individualmente para cada amostra fecal), pelo método de Gordon & Withlock, modificado, com sensibilidade de detecção de 50 OPG; e cultivos de larvas (uma por grupo experimental, em cada uma das coletas), pelo método de Roberts & O'Sullivan, identificando-se até 100 larvas infectantes por coprocultura (Ueno & Gonçalves 1998). Foram selecionados animais com OPG inicial ≥ 200 (D-1), os quais foram divididos em grupos com médias de OPG pré-tratamento equivalentes, a cada experimento, por randomização estratificada, com o ranqueamento dos animais por contagem de OPG. Todas as drogas testadas foram administradas pela via subcutânea, em dose única. Os dias dos tratamentos foram tomados como dias zero (D0) dos experimentos.

Seguindo as recomendações da World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (Coles et al. 1992), considerou-se eficaz aquela droga que atingiu ou superou os 95% de redução de OPG aos 7 (D+7) e aos 14 (D+14) dias pós-tratamento, calculado pela fórmula: $PR = 100 (1 - OPG_{pós} / OPG_{pré})$, onde, "PR" representa o percentual de redução de OPG calculado; "OPG_{pós}" equivale à média aritmética de OPG para cada grupo pós-tratamento (D+7, D+14 e D+21); e "OPG_{pré}" equivale à média aritmética de OPG para cada grupo pré-tratamento (D-1). Os valores de OPG foram comparados pelo teste ANOVA com DMS Duncan, com nível de significância de 5%. O grau de resistência, de cada

¹⁰Ricobendazole 10 Injetável, Ouro Fino Saúde Animal, Rodovia Anhanguera SP 330, Km 298, Cravinhos, SP.

¹¹Ivomec® Gold, Merial Saúde Animal, Fazenda São Francisco, s/nº, Paulínia, SP.

¹²Master LP, Ouro Fino Saúde Animal, Rodovia Anhanguera SP 330, Km 298, Cravinhos, SP.

¹³Solution® 3,5% L.A., Intervet do Brasil Veterinária LTDA, Avenida Sir Henry Wellcome 335, Cotia, SP.

gênero de nematódeo presente no rebanho para cada droga testada, foi avaliado pela comparação entre o seu percentual representativo, nos cultivos de larvas, pré- e pós-tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1 são demonstradas as médias de OPG e as eficácias calculadas das formulações testadas. Devido a nenhum dos tratamentos testados durante este estudo ter sido capaz de manter uma média de redução de OPG $\geq 95\%$ (em relação à D-1) até o D+21 (dados não demonstrados), não foram realizadas novas coletas depois de decorrido este período.

Conforme se observa no Quadro 1, detectou-se resistência parasitária aos fármacos que já vinham sendo utilizados nos bovinos – IVM 1% (G1) e DRM 1% (G2) - e resistência lateral à ABM (G4) (princípio ativo que não houvera sido utilizado anteriormente neste rebanho). No que diz respeito às médias de OPG pós-tratamentos, tanto a DRM quanto a ABM apresentaram melhor desempenho no D+7 ($p < 0,05$), se comparado às IVMs a 1% (G1 e G3). A resistência parasitária à IVM 1% já era esperada neste caso, uma vez que esta era a formulação mais frequentemente utilizada nos bovinos. O desenvolvimento de resistência às avermectinas, em rebanhos tratados profilaticamente com esses fármacos (Soutello et al. 2007, Souza et al. 2008), e a ocorrência de resistência lateral entre princípios ativos desse grupo químico (Mello et al. 2006) têm sido comumente descritos. Por outro lado, não se observou, neste estudo, resistência lateral à MOX 1% (G5), diferentemente do que fora relatado por Vermunt et al. (1996). Embora avermectinas e milbemicinas apresentem mecanismos de ação quase idênticos (Shoop et al. 1995), o que, aparentemente, implica em que o desenvolvimento de resistência às avermectinas provoque, paralelamente, resistência às milbemicinas e vice-versa (Kaplan et al. 2007), pouco se sabe a respeito de quais fatores poderiam ser determinantes para que ocorra ou não resistência lateral para avermectinas/milbemicinas em uma população parasitária. Segundo Ranjan et al. (2002) a resistência parasitária à MOX pode se desenvolver mais lentamente, em comparação com a IVM, na população parasitária, fazendo com que parasitas resistentes à IVM permaneçam susceptíveis à dose terapêutica da MOX. Essas observações vão ao encontro dos resultados deste estudo, cuja população parasitária fora selecionada pela dose terapêutica de avermectinas. Todavia, Condi et al. (2009) demonstraram que a resistência parasitária à MOX, avaliada pela redução da contagem de OPG, pode acabar sendo subestimada devido à supressão, provocada pela droga, na excreção de ovos pelos nematódeos gastrintestinais, sem

que haja, porém, a equivalente redução da carga parasitária. Por conta disso, deve-se ter cautela ao utilizar-se a MOX em caso de ineficácia de outras LMs em um rebanho, uma vez que a diferença observada na eficácia da MOX em relação às avermectinas será, possivelmente, temporária, sendo que o modelo experimental utilizado não permitiu a comprovação desta tendência pelo curto período de observação.

Conforme se demonstra no Quadro 1, embora tenham sido observados maiores percentuais de redução de OPG com a aplicação de IVM 3,15% LA (G7) e de IVM 4% LA (G8), se comparado às IVMs a 1% (G1 e G3), não houve diferença estatística para as médias de OPG pós-tratamentos entre estes grupos, exceto no caso do G3, no qual o desempenho do tratamento foi inferior ao do G7 e ao do G8 ($p < 0,05$) no D+14. Por outro lado, a associação IVM+ABM 3,5% LA (G9) determinou menores médias de OPG ($p < 0,05$) tanto em relação à IVM a 1% (D+7) como à IVM 1% LA (D+7 e D+14). Além disso, o desempenho dessa associação (G9) foi superior ($p < 0,05$) ao da IVM 3,15% LA (G7) no D+7. Contudo, estes tratamentos com formulações de alta concentração não atingiram a eficácia desejada (redução média de OPG $\geq 95\%$) (Coles et al. 1992), o que não foi obtido mesmo com a aplicação de superdosagens de IVM (G10 e G11), apesar da obtenção de menores médias de OPG ($p < 0,05$) no D+7 para o G10 em relação ao G1 e ao G3, e no D+14 para o G11 se comparado ao G3. De forma geral, pode-se afirmar que os nematódeos gastrintestinais dos bovinos, os quais já se mostravam resistentes aos tratamentos realizados na propriedade, apresentaram resistência a uma concentração equivalente ao triplo da dose terapêutica recomendada para a IVM.

O SULF-ALB10% foi eficaz, considerando-se a redução média de OPG (D+7 e D+14). Em uma primeira análise, estes resultados não confirmariam as evidências de que a pressão de seleção, exercida pelas LMs, seria capaz de aumentar a frequência de alelos envolvidos na resistência aos benzimidazóis na população parasitária, como comprovado, *in vitro*, na espécie *Haemonchus contortus* (Mottier & Prichard 2008). Porém, recuperaram-se larvas resistentes a este tratamento (Quadro 2), com alta predominância de *Haemonchus* spp. no D+7, seguida por grande representatividade de *Cooperia* spp. no D+14.

Não houve variações representativas das médias de OPG dos grupos não-tratados no curso dos experimentos. Nestes grupos os gêneros *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp. predominaram, as frequências de *Trichostrongylus* spp. e *Ostertagia* spp. foram consideráveis e de *Oesophagostomum* spp. foram mínimas (dados não-demonstrados).

Conforme observa-se no Quadro 2, o gênero *Oesophagostomum* spp. não se demonstrou resistente a nenhum dos tratamentos. Após o tratamento (D+14) com MOX 1% (G5), sobressaíram-se larvas de *Haemonchus* spp. e *Cooperia* spp. (Quadro 2), porém, a

elevada redução de OPG obtida com esta droga (Quadro 1) não permitiu a comprovação de resistência da população parasitária neste caso. Por outro lado, conforme se observa no Quadro 2, os gêneros *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp. demonstraram resistência a todos os tratamentos com avermectinas, larvas do gênero *Trichostrongylus* spp. resistentes às avermectinas também foram recuperadas ao longo deste estudo, e o gênero *Ostertagia* spp., que apareceu em níveis consideráveis apenas no experimento 3, demonstrou resistência à IVM (G10 e G11). Nota-se que, tal como relatado neste, cepas de *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp. resistentes às avermectinas têm sido comumente descritas em bovinos (Rangel et al. 2005, Soutello et al. 2007, Suarez & Cristel 2007, Borges et al. 2008). Em relação ao gênero *Cooperia* spp., isto pode estar relacionado à sua característica de ser dose-limitante para as LMs (Shoop et al. 1995), ou seja, de ser naturalmente mais tolerante a esses fármacos se comparado a maioria dos demais gêneros de nematódeos. Para o gênero *Haemonchus* spp., tal fato parece estar relacionado à dominância genética que torna mais eficiente a transmissão da resistência às LMs (Dobson et al. 1996). Já no que confere aos gêneros *Trichostrongylus* spp. e *Ostertagia* spp., os relatos de resistência às LMs em rebanhos bovinos são mais raros, e os mecanismos envolvidos neste processo são pouco conhecidos.

A concentração necessária nos tecidos-alvos, para que a droga seja eficaz, é variável entre os gêneros de helmintos (Lifschitz et al. 1999), o que sugere que possa variar também entre cepas resistentes e susceptíveis de um mesmo gênero de nematódeo (Shoop et al. 1995). As farmacocinéticas da IVM 1% e da IVM 3,15% LA foram demonstradas por Lifschitz et al. (2007), os quais observaram influências da concentração do fármaco, da dose aplicada e do veículo (não-aquoso ou oleoso) na curva de concentração plasmática da IVM em bovinos. Com base nessas informações, pode-se afirmar que ambas as formulações, nas doses usuais ($0,2 \text{ mg Kg}^{-1}$ e $0,63 \text{ mg Kg}^{-1}$, respectivamente), apresentam picos plasmáticos equivalentes, devido à liberação lenta da IVM em veículo oleoso (caso da IVM 3,15% LA). No presente estudo, as formulações de IVM de alta concentração com liberação lenta (G7 e G8), em geral, determinaram maior redução média de OPG sobre as cepas resistentes em relação às IVMs a 1% (G1 e G3). Isto poderia indicar que o tempo de exposição dos parasitas a uma mesma concentração plasmática do princípio ativo tem influência positiva na eficácia do tratamento.

Neste contexto, as formulações LA têm como principal vantagem sua maior persistência em concentração suficiente à manutenção da sua ação antiparasitária (Dobson et al. 1996). A exemplo disso, Catto et al. (2005) detectaram menor prevalência das infecções, menor média de OPG e maior ganho de peso em bezerros tratados com IVM 3,15% LA em comparação a bezerros tratados com IVM 1%, devendo-se ressaltar que essas diferenças

puderam ser constatadas em um período observacional mais longo (dos 3 a 5 meses ao desmame). Porém, no presente estudo, a ação dessa maior persistência das formulações LA no controle da re-infecção parasitária não pôde ser quantificada, o que se deveu à baixa eficácia destes fármacos no rebanho utilizado. Adicionalmente, ao utilizar-se uma associação de avermectinas, como no caso da IVM+ABM 3,5% LA (G9), soma-se à maior persistência, um possível efeito combinado dos princípios ativos, levando-se em conta que há diferenças na susceptibilidade dos diferentes gêneros ou espécies de helmintos a cada uma dessas bases químicas (Borges et al. 2008). De outra forma, ao aumentar-se a dose administrada de IVM, tal qual realizado nos grupos G10 e G11, obtém-se um aumento equivalente do seu pico de concentração plasmática (Lifschitz et al. 2007), o que poderia ser determinante para a eficácia do princípio ativo sobre helmintos menos sensíveis (ou mais resistentes) ao mesmo.

Juntamente a essas observações, deve-se considerar o fato de que na seleção experimental, em condições laboratoriais, de genótipos de parasitas resistentes a LMs como, por exemplo, de *H. contortus* (Ranjan et al. 2002) e de *Ostertagia ostertagi* (van Zeveren et al. 2007), o processo de seleção é desencadeado pela aplicação de subdoses nos animais inoculados com a cepa parental (susceptível), seguido de aumento gradativo da dose sobre subseqüentes gerações dos parasitas, até a obtenção de uma cepa resistente à dose terapêutica do princípio ativo, devendo-se ressaltar que, nestes casos, não há o efeito da *refugia* e de outros fatores epidemiológicos que poderiam interferir na proporção de genótipos resistentes.

A conjunção destas observações permitia supor que, em condições de campo, ao sofrer pressão de seleção pela dose terapêutica (i.e. 0,2 mg Kg⁻¹ de IVM), durante um longo período, a população parasitária que se tornasse resistente, pudesse apresentar susceptibilidade a maiores doses e concentrações de princípio ativo, o que não se confirmou em termos de eficácia baseada na redução média de OPG, no presente estudo.

A baixa eficácia dos tratamentos anti-helmínticos, detectada neste rebanho, indica a ocorrência de perdas econômicas, as quais não estavam sendo identificadas pelos proprietários por decorrerem de infecções subclínicas. Esta situação, provavelmente, é similar à de outras propriedades que utilizam as LMs de maneira profilática, ou ainda, supressiva.

Buscar meios de restabelecer a eficácia das LMs em parasitas resistentes de animais pode ser uma alternativa para estender a vida útil deste importante grupo de endectocidas nos rebanhos e poderia, inclusive, servir de base para casos de resistência em parasitas de humanos, onde a recuperação clínica do paciente suplantaria maiores custos com os tratamentos. Porém, observou-se que, uma vez estabelecida a resistência parasitária às avermectinas a 1%, a utilização destes fármacos, ainda que em formulações mais

concentradas, associações ou superdoses, pode não resultar no retorno esperado, devendo-se testar a viabilidade destas opções no rebanho-alvo antes de instituírem-se tais tratamentos.

Restam, ainda, diversos pontos a serem esclarecidos em relação aos mecanismos de resistência parasitária, especialmente em condições de campo. É necessário que se aprofundem pesquisas nesta área visando um melhor aproveitamento das drogas antiparasitárias existentes no mercado.

REFERÊNCIAS

- Borges F.A., Silva H.C., Buzzulini C., Soares V.E., Santos E., Oliveira G.P. & Costa A.J. 2008. Endectocide activity of a new long-action formulation containing 2.25% ivermectin + 1.25% abamectin in cattle. *Vet. Parasitol.* 155(3/4):299-307.
- Catto J.B, Bianchin I. & Torres Junior R.A.A. 2005. Efeitos da everminação de matrizes e de bezerros lactentes em sistema de produção de bovinos de corte na região de Cerrado. *Pesq. Vet. Bras.* 25(3):188-194.
- Coles G.C. 2002. Cattle nematodes resistant to anthelmintics: why so few cases? *Vet. Res.* 33(5):481-489.
- Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F.H.M., Geerts S., Klei, T.R., Taylor M.A. & Waller P.J. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44(1/2):35-44.
- Condi G.K., Soutello R.G.V. & Amarante A.F.T. 2009. Moxidectin-resistant nematodes in cattle in Brazil. *Vet. Parasitol.* 161(3/4):213-217.
- Dobson R.J., LeJambre L. & Gill J. 1996. Management of anthelmintic resistance: inheritance of resistance and selection with persistent drugs. *Int. J. Parasitol.* 26(8/9):993-1000.
- Geary T.G. 2005. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends Parasitol.* 21(11): 530-532.
- Gill J.H., Kerr C.A., Shoop W.L. & Lacey E. 1998. Evidence of multiple mechanisms of avermectin resistance in *Haemonchus contortus* - comparison of selection protocols. *Int. J. Parasitol.* 28(5):783-789.
- Kaplan R.M. 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol.* 20(10):477-481.
- Kaplan R.M., Vidyashankar A.N., Howell S.B., Neiss J.M., Williamson L.H. & Terrill T.H. 2007. A novel approach for combining the use of in vitro and in vivo data to measure and

- detect emerging moxidectin resistance in gastrointestinal nematodes of goats. *Int. J. Parasitol.* 37(7):795-804.
- Lanusse C.E. & Prichard R.K. 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 49(2/4):123-158.
- Lifschitz A., Virkel G., Pis A., Imperiale F., Sanchez S., Alvarez L., Kujanek R. & Lanusse C. 1999. Ivermectin disposition kinetics after subcutaneous and intramuscular administration of an oil-based formulation to cattle. *Vet. Parasitol.* 86(3):203-215.
- Lifschitz A., Virkel G., Ballent M., Sallovitz J., Imperiale F., Pis A. & Lanusse C. 2007. Ivermectin (3.15%) long-action formulations in cattle: absorption pattern and pharmacokinetic considerations. *Vet. Parasitol.* 147(3/4):303-310.
- Mello M.H.A., Depner R., Molento M.B. & Ferreira J.J. 2006. Resistência lateral às macrolactonas em nematodas de bovinos. *Arch. Vet. Sci.* 11(1):8-12.
- Mottier M.L. & Prichard R.K. 2008. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. *Pharmacogenet. Genomics* 18(2):129-140.
- Rangel V.B., Leite R.C., Oliveira P.R. & Santos Junior E.J. 2005. Resistência de *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp. às avermectinas em bovinos de corte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 57(2):186-190.
- Ranjan S., Wang G.T., Hirschlein, C. & Simkins K.L. 2002. Selection for resistance to macrocyclic lactones by *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. Parasitol.* 103(1/2):109-117.
- Shoop W.L., Mrozik H. & Fisher M.H. 1995. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Vet. Parasitol.* 59(2):139-156.
- Soutello R.G., Seno M.C.Z. & Amarante A.F.T. 2007. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 148(3/4):360-364.
- Souza A.P., Ramos C.I., Bellato V., Sartor A.A. & Schelbauer C.A. 2008. Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. *Ciên. Rur.* 38(5):1363-1367.
- Suarez V.H. & Cristel S.L. 2007. Anthelmintic resistance in cattle nematode in the western Pampeana Region of Argentina. *Vet. Parasitol.* 144(1/2):111-117.
- Ueno H. & Gonçalves V.C. 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. Tóquio : Japan International Cooperation Agency. 143p.
- van Zeveren A.M., Casaert S., Alvinerie M., Geldhof P., Claerebout E. & Vercruysse J. 2007. Experimental selection for ivermectin resistance in *Ostertagia ostertagi* in cattle. *Vet. Parasitol.* 150(1/2):104-110.

- Vermunt J., West D. & Pomroy W. 1996. Inefficacy of moxidectin and doramectin against ivermectin-resistant *Cooperia* spp. of cattle in New Zealand. N. Z. Vet. J. 44(5):188-193.
- Yazwinski T.A., Williams J.C., Smith L.L., Tucker C., Loyacano A.F., DeRosa A., Peterson P., Bruer D.J. & Delay R.L. 2006. Dose determination of the persistent activity of moxidectin long-acting injectable formulations against various nematode species in cattle. Vet. Parasitol. 137(3/4):273-285.

Quadro 1 - Percentuais de redução média de OPG, obtidos após a aplicação de diferentes antiparasitários em bovinos naturalmente infectados por nematódeos do trato gastrointestinal, nos dias 7 (D+7) e 14 (D+14) pós-tratamento:

Grupos e tratamentos (doses)	Médias de OPG (PR)		
	D-1	D+7	D+14
G1. IVM 1% (0,2 mg Kg ⁻¹)	494 ^{A a}	437 ^{A a b} (12%)	356 ^{A a b} (28%)
G2. DRM 1% (0,2 mg Kg ⁻¹)	506 ^{A a}	125 ^{B d} (75%)	181 ^{B b c} (64%)
G3. IVM 1% LA (0,2 mg Kg ⁻¹)	531 ^{A a}	456 ^{A a b} (14%)	544 ^{A a} (-2%)
G4. ABM 1% LA (0,2 mg Kg ⁻¹)	506 ^{A a}	206 ^{A c d} (59%)	175 ^{A b c} (65%)
G5. MOX 1% (0,2 mg Kg ⁻¹)	494 ^{A a}	0 ^{B d} (100%)*	025 ^{B c} (95%)*
G6. SULF-ALB 10% (2,5 mg Kg ⁻¹)	544 ^{A a}	019 ^{B d} (97%)*	019 ^{B c} (97%)*
G7. IVM 3,15% LA (0,63 mg Kg ⁻¹)	512 ^{A a}	412 ^{A a b c} (20%)	175 ^{B b c} (66%)
G8. IVM 4% LA (0,8 mg Kg ⁻¹)	475 ^{A a}	219 ^{B b c d} (54%)	175 ^{B b c} (63%)
G9. IVM+ABM 3,5% LA (0,7 mg Kg ⁻¹)	506 ^{A a}	144 ^{A d} (71%)	156 ^{A b c} (69%)
G10. IVM 1% (0,6 mg Kg ⁻¹)	487 ^{A a}	161 ^{B d} (67%)	487 ^{A a} (0%)
G11. IVM 3,15% LA (1,9 mg Kg ⁻¹)	506 ^{A a}	219 ^{A b c d} (57%)	225 ^{A b c} (56%)

PR= percentual de redução de OPG por grupo em D+7 e D+14 em relação à D-1.

* Tratamentos eficazes: PR ≥ 95% (Coles et al. 1992).

Letras diferentes, na mesma linha (maiúsculas) ou na mesma coluna (minúsculas), indicam diferença estatística, pelo teste ANOVA com DMS Duncan, com p < 0,05.

Quadro 2 - Representatividade de larvas infectantes (L3) recuperadas dos cultivos de larvas - no dia anterior aos tratamentos (-1) e nos dias 7 (+7) e 14 (+14) pós-tratamentos – para os gêneros *Cooperia* spp. (*Coop.*), *Haemonchus* spp. (*Haem.*), *Ostertagia* spp. (*Ostert.*), *Trichostrongylus* spp. (*Trich.*) e *Oesophagostomum* spp. (*Oesoph.*):

Grupos e tratamentos (doses)	<i>Coop.</i> (%)			<i>Haem.</i> (%)			<i>Ostert.</i> (%)			<i>Trich.</i> (%)			<i>Oesoph.</i> (%)		
	-1	+7	+14	-1	+7	+14	-1	+7	+14	-1	+7	+14	-1	+7	+14
G1. IVM 1% (0,2 mg Kg ⁻¹)	37	63	61	40	35	38	3	0	0	19	2	1	1	0	0
G2. DOR 1% (0,2 mg Kg ⁻¹)	28	65	79	58	34	20	3	1	0	9	0	1	2	0	0
G3. IVM 1% LA (0,2 mg Kg ⁻¹)	68	91	90	14	6	7	4	0	0	14	3	3	0	0	0
G4. ABM 1% LA (0,2 mg Kg ⁻¹)	52	48	74	27	52	23	0	0	0	20	0	3	1	0	0
G5. MOX 1% (0,2 mg Kg ⁻¹)	78	0	56	16	0	40	0	0	0	6	0	4	0	0	0
G6. SULF-ALB 10% (2,5 mg Kg ⁻¹)	81	10	69	8	90	31	1	0	0	9	0	0	1	0	0
G7. IVM 3,15% LA (0,63 mg Kg ⁻¹)	72	70	57	23	28	43	0	0	0	5	2	0	0	0	0
G8. IVM 4% LA (0,8 mg Kg ⁻¹)	67	14	28	28	86	72	0	0	0	5	0	0	0	0	0
G9. IVM+ABM 3,5% LA (0,7 mg Kg ⁻¹)	42	14	28	51	86	72	0	0	0	7	0	0	0	0	0
G10. IVM 1% (0,6 mg Kg ⁻¹)	8	16	18	71	76	68	10	6	8	2	2	6	9	0	0
G11. IVM 3,15% LA (1,9 mg Kg ⁻¹)	4	4	48	78	90	38	7	4	0	4	2	14	7	0	0

3 MULTIPLE RESISTANCE OF GASTROINTESTINAL NEMATODES TO NINE DIFFERENT DRUGS IN A SHEEP FLOCK IN SOUTHERN BRAZIL

Alfredo Skrebsky Cezar ^{a,*}, Gustavo Toscan ^a, Giovana Camillo ^a, Luís Antônio Sangioni ^a, Henrique Olmedo Ribas ^b, Fernanda Silveira Flôres Vogel ^a

(Short Communication submitted to Veterinary Parasitology Journal)

^a Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

^b Merial Animal Health Ltda., Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8071; fax: +55 55 3220 8257.

E-mail address: alfredosps@hotmail.com (A.S. Cezar).

ABSTRACT

Based on clinical observation of a flock of approximately 5,000 sheep (breed Merino) from southern Brazil, the failure of anthelmintic treatments was suspected. The sensitivity of the gastrointestinal nematodes that infected these sheep to nine drugs (Levamisole, Moxidectin, Albendazole, Ivermectin, Nitroxynil, Disophenol, Trichlorphon, Closantel, and a combination of Ivermectin, Levamisole and Albendazole) was evaluated. None of the drugs reduced the count of nematode eggs per gram of feces (EPG) in the sheep to an adequate extent (defined as a 95% reduction in EPG). Therefore, we found multiple parasite resistance to all classes of anthelmintic drugs available for small ruminants in the Brazilian market. The genera *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp. and *Ostertagia* spp. had various degrees of resistance (or natural tolerance) to each of the drug treatments.

Keywords: FECRT, ovine, anthelmintic, multi-drug resistance, helminth, EPG.

1. Introduction

In Rio Grande do Sul state, Brazil, sheep farming is a deeply rooted tradition (Echevarria et al., 1996). The economic viability of this production system depends entirely on adequate control of endoparasites. Information is scarce regarding parasite resistance in sheep in southern Brazil but there is evidence of widespread resistance to the most common drugs, such as avermectins and benzimidazoles (Waller et al., 1996). Resistance of parasites to anthelmintics tends to increase the mean parasite burden in a sheep flock, which implies several problems such as an increase in the number of treatments needed for parasite control, a decrease in reproductive indexes, a retardation in body development, and an increase in the mortality rate in the flock (Hovi et al., 2003; Wolstenholme et al., 2004).

Resistance of parasites to anthelmintics develops gradually and its early recognition depends on monitoring the effectiveness of treatments (McKellar and Jackson, 2004). The Fecal Egg Count Reduction Test (FECRT) can be used to measure parasite resistance (Coles et al., 1992; McKenna, 2006). However, sheep ranchers rarely suspect any failure of the drug treatments until the appearance of clinical signs. By this point, the flock may already be in a very serious situation.

In this study, we evaluated the efficacies of each of nine drugs with anthelmintic (or endectocide) action - covering most classes of nematicidal drugs available worldwide - on a suspected multi-drug resistant population of gastrointestinal nematodes. We report here an extremely severe case of multiple anthelmintic resistance in a sheep flock from southern Brazil.

2. Materials and methods

This study was conducted in a flock of, approximately, 5,000 Merino breed sheep, on a farm in the state of Rio Grande do Sul in the southern, sub-tropical region of Brazil, near the border with Uruguay. According to the owners, a previous owner also had raised sheep on the same land. However, farming had ceased on this area and all livestock had been removed because drug treatments had failed to control sheep endoparasites. Then, sheep from a neighboring farm were introduced to the land to establish a new flock. These sheep had no evident signs of parasite resistance, although they were being submitted to monthly treatments, with alternation of drugs (macrocyclic lactones, imidazothiazoles, benzimidazoles and nitrophenols). This treatment regimen was maintained, and some months after the establishment of the new flock, the farmers suspected that the several anthelmintic and endectocide drugs used in the sheep were failing in controlling endoparasites. At that moment,

sheep were already suffering of loss of weight, submandibular swelling, diarrhea, and was occurring death of lambs.

Based on the clinical and epidemiological history of the farm, a large study was needed to evaluate the efficacies of drugs belonging to different chemical groups. Thus, aiming to find one or more drugs that effectively controlled the target parasite population, 135 sheep aged approximately nine months were distributed randomly to each of nine groups (n=15). Each group received one of the treatments described in Table 1. The doses were determined by individual sheep weight. All the sheep were kept in the same pasture area, in a constant stocking rate, with a good forage condition, in a continuous grazing system.

Fecal samples were collected immediately before the treatments (D0) and 12 days after (D12). Values of EPG were counted, in each fecal sample, using the modified McMaster technique, with a detection margin of 100 EPG. Larvae cultures were performed as given in the Roberts & O'Sullivan modified technique (Ueno and Gonçalves, 1998) and the genera of the gastrointestinal nematodes were identified following the recommendations of van Wyk et al. (2004), counting 100 infective larvae for each collection of each group.

The efficacy of each treatment was assessed using a FECRT, and was calculated by the formula: $PR = 100 (1 - \text{Final EPG} / \text{Initial EPG})$, where, "PR" is the reduction in EPG expressed as a percentage; "Initial EPG" (D0) and "Final EPG" (D12), respectively, are the arithmetic mean values of EPG for each group, counted before (used as untreated control) and after drug treatment (Coles et al., 1992; Coles et al., 2006; McKenna, 2006). In addition, RESO FECRT analysis software, version 4.0 (available in <http://www.vetsci.usyd.edu.au/sheepwormcontrol>, within the 'SiteMap') was used to assess resistance levels of the nematode genera that were found affecting the flock for each drug tested. For this purpose we compared the percentage of each genus recovered from the larvae cultures before (D0) and after (D12) treatments. Thus, to be considered efficacious, the drug should to reduce the EPG by at least 95%, with 95% confidence limits less than 90%, considering all genera together and each genus alone (Coles et al., 1992; McKenna, 2006).

3. Results

None of the treatments evaluated in this study was effective considering the FECRT (Table 2).

In Table 3 are shown the genera of gastrointestinal nematodes recovered from larvae cultures, their proportions and their reduction percentages before and after each treatment.

Only three genera of gastrointestinal nematodes (*Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp. and *Ostertagia* spp.) were detected. Each of them was resistant (or tolerant) to each drug tested.

4. Discussion

An extremely difficult situation regarding the control of gastrointestinal nematodes was observed in the target flock in our study, since the parasite population was resistant to each class of anthelmintic drugs available for ruminants in the Brazilian market. Thus, given that side resistance between drugs that have similar mechanisms of action is common (McKellar and Jackson, 2004), it is possible that the conventional chemical resources for the control of nematodes in this sheep flock may be exhausted.

In the nematode genera *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp. and *Ostertagia* spp., we detected parasite resistance to: Levamisole phosphate 22.3%, Moxidectin 1%, Albendazole sulphoxide 10%, Ivermectin 1% and a combination of Levamisole, Albendazole and Ivermectin (Table 3). These drugs cover the three major classes of broad-spectrum drugs used to control gastrointestinal nematodes worldwide (McKellar and Jackson, 2004; Wolstenholme et al., 2004).

The compounds Nitroxynil 34%, Disophenol 20% and Closantel 10% are not recommended for control of *Trichostrongylus* spp. or *Ostertagia* spp. infections but they are indicated for the control of Haemonchosis (van Wyk et al., 1997; McKellar and Jackson, 2004). However, the population of *Haemonchus* spp. in the flock in our study showed resistance to these drugs (Table 3). Similarly, Trichlorphon 10% is not recommended for control of *Trichostrongylus* spp. infections. Thus, in our study, the genera *Haemonchus* spp. and *Ostertagia* spp. showed resistance to this drug (Table 3). In summary, each of the treatments was ineffective on the totality of the genera of gastrointestinal nematodes found in the flock because the nematodes were resistant to or tolerant of the active ingredient(s).

Other studies have revealed the existence of gastrointestinal nematodes that are resistant to antiparasitic drugs in sheep in southern Brazil (Echevarria et al., 1996; Farias et al., 1997). Multiple resistance to the three main classes of drugs with anthelmintic action (avermectins/milbemycins, benzimidazoles and imidazothiazoles), apparently, is not rare in this region (Waller et al., 1996) but the situation observed here is particularly worrying. Drug combinations could possibly restore the effectiveness of the treatments. However, these resources are likely to become ineffective with long-term use when parasites are resistant to all classes of available drugs. Furthermore, alternative methods of control of parasites have been proven to be more efficient when used as a complement to chemotherapy because they

can delay the development of parasite resistance and preserve the usefulness of the antiparasitic drugs (Waller, 2006; Torres-Acosta and Hoste, 2008).

Knowing that preventative actions, to slow the development of parasite resistance, were not being performed, we can claim that several of the features found in the flock targeted in our study can have contributed to the severe case of multiple resistance reported here. In this sense, we should emphasize the mistaken anthelmintic management that was being promoted, with rapid alternation of drugs without monitoring their effectiveness, combined with epidemiological conditions that are favorable to the presence of helminths during all the months of the year in southern Brazil (Echevarria et al., 1996; Waller, 1997; Wolstenholme et al., 2004). In addition, we have, in this case, the likely previous environmental contamination with resistant nematodes, once the quarantine period was not sufficient for the elimination of the nematodes' larvae from the pasture (Stromberg, 1997; Souza et al., 2000). Furthermore, on the contrary of the appearances (lack of clinical signs), the presence of resistant nematodes infecting the sheep introduced in the farm was very probable, due to the anthelmintic regimen which was performed in the farm from where the sheep were brought (van Wyk et al., 2006; Molento, 2009). Because of this, these sheep may have carried resistant strains to the new farm (Silvestre et al., 2000; Wolstenholme et al., 2004).

These results confirm the importance of establishing programs of parasite control based on clinical and epidemiological criteria to increase the sustainability of controlling livestock parasites. In this context, treatments should be applied at the minimum frequency that is feasible and management measures that decelerate the development of the parasite resistance should be employed (Barger, 1999; Jackson and Miller, 2006; Waller, 2006). These same concepts can be applied in the flock in our study to reduce dependency on chemical treatments by adding alternative methods to control endoparasites, such as the selection of less susceptible animals, biological control, and the introduction of other herbivorous species in the sheep pasture, among others (Jackson and Miller, 2006; Torres-Acosta and Hoste, 2008). Nevertheless, based on the scenario observed in our study, efficacious chemical treatments, with combination of drugs for example, must be found to make viable the control of the gastrointestinal nematode infections in the studied flock.

References

- Barger, I.A., 1999. The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. *Int. J. Parasitol.* 29, 41-47.

- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J., 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44, 35-44.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruyse, J., 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 136, 167-185.
- Echevarria, F., Borba, M.F.S., Pinheiro, A.C., Waller, P.J., Hansen, J.W., 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. *Vet. Parasitol.* 62, 199-206.
- Farias, M.T., Bordin, E.L., Forbes, A.B., Newcomb, K., 1997. A survey on resistance to anthelmintics in sheep stud farms of southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 72, 209-214.
- Hovi, M., Sundrum, A., Thamsborg, S.M., 2003. Animal health and welfare in organic livestock production in Europe: current state and future challenges. *Livest. Prod. Sci.* 80, 41-53.
- Jackson, F., Miller, J., 2006. Alternative approaches to control - Quo vadit? *Vet. Parasitol.* 139, 371-384.
- McKellar, Q.A., Jackson, F., 2004. Veterinary anthelmintics: old and new. *Trends Parasitol.* 20, 456-461.
- McKenna, P.B., 2006. Further comparison of faecal egg count reduction test procedures: sensitivity and specificity. *N. Z. Vet. J.* 54, 365-366.
- Molento, M.B., 2009. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. *Vet. Parasitol.* 163, 229-234.
- Silvestre, A., Chartier, C., Sauvé, C., Cabaret, J., 2000. Relationship between helminth species diversity, intensity of infection and breeding management in dairy goats. *Vet. Parasitol.* 94, 91-105.
- Souza, P., Bellato, V., Sartor, A.A., Ramos, C.I., 2000. Período para desinfestação das pastagens por larvas de nematóides gastrintestinais de ovinos, em condições naturais nos campos de Lages, SC. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 9, 159-164.
- Stromberg, B.E., 1997. Environmental factors influencing transmission. *Vet. Parasitol.* 72, 247-264.
- Torres-Acosta, J.F.J., Hoste, H., 2008. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Rumin. Res.* 77, 159-173.

- Ueno, H., Gonçalves, V.C., 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. Tóquio : Japan International Cooperation Agency. 143p.
- van Wyk, J.A., Cabaret, J., Michael, L.M., 2004. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. *Vet. Parasitol.* 119, 277-306.
- van Wyk, J.A., Hoste, H., Kaplan, R.M., Besier, R.B., 2006. Targeted selective treatment for worm management - How do we sell rational programs to farmers? *Vet. Parasitol.* 139, 336-346.
- van Wyk, J.A., Malan, F.S., Randles, J.L., 1997. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? *Vet. Parasitol.* 70, 111-122.
- Waller, P.J., 1997. Nematode parasite control of livestock in the tropics/subtropics: the need for novel approaches. *Int. J. Parasitol.* 27, 1193-1201.
- Waller, P.J., 2006. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126, 277-289.
- Waller, P.J., Echevarria, F., Eddi, C., Maciel, S., Nari, A., Hansen, J.W., 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: General overview. *Vet. Parasitol.* 62, 181-187.
- Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., von Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N.C., 2004. Drug resistance in veterinary helminthes. *Trends Parasitol.* 20, 469-476.

Table 1 – Groups (n=15) and treatments evaluated in the target sheep flock:

Groups (n=15) and drugs tested	Dose (mg Kg ⁻¹)	Class	Trade name, Company
G1. Levamisole phosphate 22.3% ^a	4.5	Imidazothiazole	Levamisole F, Vetbrands
G2. Moxidectin 1% ^a	0.2	Milbemycin ^c	Cydectin ovinos, Fort Dodge
G3. Albendazole sulphoxide 10% ^a	2.5	Benzimidazole	Ricobendazole 10, Ouro Fino
G4. Ivermectin 1% ^a	0.2	Avermectin ^c	Ivomec Injetável, Merial
G5. Nitroxynil 34% ^a	9.7	Nitrophenol	Dovenix Supra, Merial
G6. Disophenol 20% ^a	10.0	Nitrophenol	Disofenol 20%, IBASA
G7. Trichlorphon 10% ^a	100.0	Organophosphate	Bevermex, IRFA
G8. Ivermectin	0.2		
Levamisole	7.5	Combination ^d	Trimix, Merial
Albendazole ^b	5.0		
G9. Closantel 10% ^b	10.0	Salicylanilide	Diantel, IRFA

^aSubcutaneously.

^bOrally.

^cMacrocyclic lactone.

^dMixture of Avermectin, Imidazothiazole and Benzimidazole classes.

Table 2 – Mean EPG of each sheep group before (D0) and 12 days after (D12) antiparasitic treatments and calculated efficacies of the drugs based on Fecal Egg Count Reduction Tests (FECRT) by Coles et al. (1992) and RESO FECRT analysis:

Groups (n=15) and treatments	EPG (mean)		Efficacy (PR)	FECRT Analysis
	D0	D12		
G1. Levamisole phosphate 22.3%	440	340	23%	Resistance
G2. Moxidectin 1%	160	73	54%	Resistance
G3. Albendazole sulphoxide 10%	393	400	-2%	Resistance
G4. Ivermectin 1%	367	520	-42%	Resistance
G5. Nitroxynil 34%	487	333	32%	Resistance
G6. Disophenol 20%	380	280	26%	Resistance
G7. Trichlorphon 10%	340	460	-35%	Resistance
G8. Ivermectin, Levamisole, Albendazole	480	153	68%	Resistance
G9. Closantel 10%	347	427	-23%	Resistance

Table 3 - Percentage of each of three genera of gastrointestinal nematodes - *Haemonchus* spp. (*Haem.*), *Trichostrongylus* spp. (*Trich.*), *Ostertagia* spp. (*Ostert.*) - recovered from larvae cultures of sheep feces collected before (D0) and 12 days after (D12) antiparasitic treatments, and percentages of reduction (PR) post-treatments calculated in RESO FECRT software:

Groups (n=15) and treatments	<i>Haem.</i> (%)		<i>Trich.</i> (%)		<i>Ostert.</i> (%)	
	D0	D12 (PR)	D0	D12 (PR)	D0	D12 (PR)
G1. Levamisole phosphate 22.3%	48	38 (39%)	52	56 (17%)	0	6 (0%)
G2. Moxidectin 1%	50	31 (72%)	44	59 (38%)	6	10 (31%)
G3. Albendazole sulphoxide 10%	60	66 (0%)	26	26 (0%)	14	8 (42%)
G4. Ivermectin 1%	30	46 (0%)	60	22 (48%)	10	32 (0%)
G5. Nitroxynil 34%	32	40 (14%)	66	34 (65%)	2	26 (0%)
G6. Disophenol 20%	48	22 (66%)	36	46 (6%)	16	32 (0%)
G7. Trichlorphon 10 %	42	36 (0%)	52	41 (0%)	6	23 (0%)
G8. Iverm., Levam., Albendaz.	30	46 (51%)	56	16 (91%)	14	38 (13%)
G9. Closantel 10%	44	38 (0%)	50	20 (51%)	6	42 (0%)

4 COMBINAÇÃO DE DROGAS ANTIPARASITÁRIAS COMO ALTERNATIVA PARA O CONTROLE DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS MULTI-RESISTENTES EM OVINOS¹

Alfredo Skrebsky Cezar ² *, Felipe Lamberti Pivoto ³, Luís Antônio Sangioni⁴,
Fernanda Silveira Flôres Vogel ⁴

(Manuscrito sob as normas de submissão à revista científica Pesquisa Veterinária Brasileira)

ABSTRACT.- Cezar, A.S., Pivoto, F.L., Sangioni, L.A. & Vogel, F.S.F. 2010. [Combination of drugs as an alternative to control multi-resistant gastrointestinal nematodes in sheep]. Combinação de drogas antiparasitárias como alternativa para o controle de nematódeos gastrintestinais multi-resistentes em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* xx(xx):xx-xx. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil. E-mail: alfredosps@hotmail.com.

This study was conducted aiming to find efficacious anthelmintic treatments on a multi-resistant population of gastrointestinal nematodes of sheep, which was found resistant to all the classes of nematocidal drugs available in the Brazilian market. We used data from a previous study performed in the target flock testing conventional treatments. Thus, using the calculated efficacy of the drugs for each nematode genus present in the flock, we selected drugs which, combined or used in higher doses, could improve the efficacy of the treatments. We evaluated anthelmintic action of each treatment using the percentage of reduction of eggs in the feces, along with larvae cultures. A combination of Moxidectin 1% + Disophenol 20% showed 99% of efficacy, and combinations of Moxidectin 1% + Trichlorphon 10% and Moxidectin 1% + Levamisole Phosphate 22,3% showed more than 90% of efficacy.

¹Recebido em

²Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. *Autor para correspondência. Tel.: +55 55 3220 8071; fax: +55 55 3220 8257. E-mail: alfredosps@hotmail.com

³Curso de Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

⁴Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

Combinations of drugs, with different mechanisms of action, provide efficacious anthelmintic treatments in the target flock.

INDEX TERMS: Multidrug resistance, anthelmintics, efficacy, association, ruminants.

RESUMO.- Este estudo foi realizado com o objetivo de encontrarem-se tratamentos anti-helmínticos eficazes sobre uma população de nematódeos gastrintestinais de ovinos, a qual desenvolveu resistência a todas as classes de drogas com ação nematocida disponíveis para ruminantes no mercado brasileiro. Valendo-se da eficácia calculada destas drogas e conhecendo-se sua ação sobre cada gênero de nematódeo presente no rebanho a partir de um estudo prévio, selecionaram-se drogas as quais, utilizadas em combinações ou em superdoses, pudessem aumentar significativamente a eficácia dos tratamentos. Utilizou-se o percentual de redução da contagem de ovos nas fezes e as culturas de larvas para avaliar a ação anti-helmíntica dos tratamentos. A combinação de Moxidectina 1% + Disofenol 20% apresentou 99% de eficácia, e as combinações de Moxidectina 1% + Triclorfon 10% e de Moxidectina 1% + Fosfato de Levamisol 22,3% superaram os 90% de eficácia. A utilização de combinações de princípios ativos com diferentes mecanismos de ação possibilitou a recuperação da eficácia dos tratamentos anti-helmínticos no rebanho-alvo.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Resistência múltipla, anti-helmínticos, eficácia, associação, ruminantes.

INTRODUÇÃO

A resistência múltipla de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes às três principais classes de drogas com ação em endoparasitas (avermectinas/milbemicinas, benzimidazóis e imidazotiazóis) tem se tornado um problema comum ao redor do mundo (Mwamachi et al. 1995, Sargison et al. 2007, Traversa et al. 2007). O desenvolvimento de novas drogas antiparasitárias é dificultado por uma série de fatores de ordem técnica e econômica (McKellar & Jackson 2004, Hopkins et al. 2007, Woods & Williams 2007) e, com isso, tem-se a opção de recorrer a outras classes menos consagradas de anti-helmínticos (McKellar & Jackson 2004) para que se obtenham tratamentos eficazes nesses rebanhos. Mas o que fazer quando, assim como no rebanho-alvo do presente estudo, o manejo antiparasitário

equivocado resulta em resistência múltipla a todas as classes de drogas com ação nematicida disponíveis no mercado?

Os métodos de controle alternativo com base no manejo dos animais e das pastagens, no estímulo à resposta imune do hospedeiro, no controle biológico e na fitoterapia têm se mostrado promissores e são importantes para a sustentabilidade do controle de parasitas nos rebanhos, porém, ainda devem ser vistos como complementares ao controle baseado em tratamentos alopáticos eficazes (Waller & Thamsborg 2004, van Wyk et al. 2006). Por conta disso, é necessário que se encontrem alternativas para a recuperação da eficácia dos antiparasitários sobre populações de helmintos multi-resistentes. Nesse sentido, podem-se citar a utilização de fármacos de alta concentração (longa ação), a aplicação de superdoses, aplicações de um mesmo fármaco em dias consecutivos e as combinações comerciais de princípios ativos como algumas das possíveis alternativas para a obtenção de um controle anti-helmíntico eficaz sobre parasitas resistentes. Porém, alguns pontos negativos em relação a essas práticas precisam ser considerados.

As formulações com altas concentrações de princípio ativo tendem a ter um efeito mais expressivo no aumento do período de ação do que propriamente na eficácia do tratamento, e aceleram o desenvolvimento de resistência parasitária (Dobson et al. 1996, Yazwinski et al. 2006). A pressão de seleção de genótipos (homozigotos) resistentes ao princípio ativo pode ser elevada com a utilização de superdoses (Barnes et al. 1995), agravando o problema de resistência parasitária. Aplicações consecutivas de uma mesma droga, além de elevarem os custos dos tratamentos, aumentam o manejo e o estresse dos animais (van Wyk et al. 2006). Por fim, as combinações comerciais de princípios ativos não permitem que a escolha das bases químicas a serem aplicadas seja feita conforme a realidade de cada rebanho.

As combinações de drogas têm sido comumente estudadas para o controle de parasitas resistentes ou para o aumento da eficácia dos tratamentos antiparasitários em humanos (Albonico et al. 2003, Pink et al. 2005) e, particularmente, para o controle de ectoparasitas resistentes em bovinos (George et al. 2004, Furlong et al. 2007, Martins et al. 2008). Embora essa estratégia tenha sido pouco explorada para endoparasitas, o aparecimento de resistência parasitária múltipla em rebanhos de pequenos ruminantes instigou alguns estudos com esta proposta (Anderson et al. 1988, Miller & Craig 1996, Entrocasso et al. 2008). Em tratamentos com combinações de drogas podem-se manter as dosagens recomendadas para cada fármaco e combinar-se as bases pertencentes a grupos químicos distintos, os quais apresentam diferentes

mecanismos de ação, dificultando as adaptações dos parasitas, as quais os tornam resistentes aos tratamentos (Barnes et al. 1995, Geerts & Gryseels 2000, Hu et al. 2010).

Para o delineamento deste estudo foram utilizados os índices de eficácia de anti-helmínticos e endectocidas testados previamente no rebanho-alvo. Esses resultados foram empregados como ferramentas para a identificação das drogas candidatas às combinações de princípios ativos que foram testadas em comparação a superdoses e a um fármaco de alta concentração (longa ação). O objetivo deste estudo foi o de encontrar alternativas de tratamentos alopáticos eficazes, sobre uma população de nematódeos gastrintestinais multi-resistente a todas as classes de medicamentos com ação nematicida disponíveis no mercado brasileiro, e que foi encontrada infectando naturalmente os ovinos no rebanho-alvo.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido em um rebanho de, aproximadamente, 5000 ovinos da raça Merino Australiano no estado do Rio Grande do Sul, na porção subtropical do Brasil, na região da Fronteira-Oeste, na divisa com o Uruguai. Conforme um estudo prévio realizado no mesmo rebanho detectou-se resistência dos nematódeos gastrintestinais dos ovinos a todas as classes de fármacos com ação nematicida disponíveis para ruminantes no mercado brasileiro (Quadro 1 e Quadro 2).

Assim, com base nesses resultados prévios, foram selecionados aqueles fármacos com maior eficácia em relação à redução de OPG (Quadro 1) e/ou sobre um ou mais dos gêneros de nematódeos encontrados no rebanho (Quadro 2). Primou-se, além disso, por fármacos com amplo espectro de ação sobre nematódeos gastrintestinais. Dessa forma, elaboraram-se combinações de dois a dois princípios ativos e, adicionalmente, tratamentos com Moxidectina em superdose ou em alta concentração (longa ação) e com Fosfato de Levamisole em superdose.

Foram utilizados oito grupos de ovinos (n=15), formados aleatoriamente a partir de um lote de animais com cerca de 10 meses de idade, naturalmente infectados por nematódeos do trato gastrintestinal. Cada um dos tratamentos descritos no Quadro 3 foi testado sobre um desses oito grupos. Como regra, combinaram-se fármacos com mecanismos de ação diferentes entre si. Não houve mistura física dos fármacos anteriormente às aplicações, que se deram por vias ou em pontos anatômicos distintos nos animais, seguindo-se as dosagens recomendadas nas bulas dos medicamentos (exceto, nos grupos G1 e G2 nos quais se utilizaram superdoses).

Coletaram-se amostras de fezes imediatamente antes dos tratamentos (D0) e doze dias após os mesmos (D12). A cada coleta, as amostras foram examinadas, conforme recomendações de Ueno & Gonçalves (1998), por contagens individuais de OPG pela técnica de Gordon & Withlock modificada, com margem de detecção de 100 OPG, e por culturas de larvas, uma para cada grupo a cada coleta, pela técnica de Roberts & O'Sullivan, com identificação de gênero de 100 larvas infectantes recuperadas de cada cultura.

A eficácia dos tratamentos testados foi calculada através de um Teste de Redução da Contagem de Ovos nas Fezes (FECRT), sendo calculada pela fórmula: $PR = 100 (1 - OPG_{final} / OPG_{inicial})$, onde, "PR" é o percentual de redução de OPG; "OPG inicial" e "OPG final" são, respectivamente, a média aritmética dos valores de OPG para cada grupo imediatamente antes (D0) e doze dias depois (D12) dos tratamentos (Coles et al. 1992, Coles et al. 2006, McKenna 2006). Para ser considerado eficaz, um tratamento deveria reduzir a contagem de OPG e os percentuais de cada gênero de nematódeo nas culturas de larvas em pelo menos 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As eficácias calculadas de cada um dos tratamentos testados encontram-se descritas no Quadro 4. Observa-se que apenas o tratamento composto por uma combinação de Moxidectina 1% (MOX 1%) + Disofenol 20% (DISOF) apresentou eficácia dentro do nível desejado ($PR \geq 95\%$). Os tratamentos com MOX 1% (dobro da dose terapêutica recomendada), MOX 1% + Triclorfon 10% (TRICLOR) e MOX 1% + Fosfato de Levamisol 22,3% (LEVAM) apresentaram eficácia próxima aos 90%. Todos os demais tratamentos foram insuficientes.

No Quadro 5 apresentam-se os gêneros de nematódeos gastrintestinais recuperados das culturas de larvas e suas proporções antes e depois dos tratamentos. Detectaram-se maiores frequências dos gêneros *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Ostertagia* spp. e *Cooperia* spp., os quais apresentaram mais relevância em relação à resistência parasitária aos tratamentos em geral. O gênero *Oesophagostomum* spp. ocorreu com baixa prevalência, porém, detectou-se resistência deste gênero aos tratamentos a base de MOX 1% + Closantel 10% (CLOS) e de LEVAM + TRICLOR.

A combinação MOX 1% + DISOF apresentou redução de OPG de 99%, podendo, com isso, ser considerada altamente eficaz (Coles et al. 1992, Wood et al. 1995). Conforme se observa no Quadro 5, este tratamento atuou principalmente sobre *Haemonchus* spp., o que já

era esperado, uma vez que ambas as drogas utilizadas haviam demonstrado, previamente, boa ação sobre este gênero (Quadro 2). Este é um resultado de grande relevância sabendo-se que a haemoncose é extremamente prejudicial à criação de ovinos, podendo ser considerada um dos principais problemas na ovinocultura ao redor do mundo, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais (Echevarria et al. 1996, Cheah & Rajamanickam 1997, Miller et al. 1998, Waller et al. 2004).

Além disso, levando-se em conta o baixo desempenho dos tratamentos convencionais testados anteriormente neste mesmo rebanho (Quadro 1), pode-se considerar positiva a obtenção de resultados superiores aos 90% de eficácia (Wood et al. 1995, Sangster 1999), observados nos tratamentos: Moxidectina 1% + Triclorfon 10% (MOX 1% + TRICLOR) com PR = 91%, e Moxidectina 1% + Fosfato de Levamisol 22,3% (MOX 1% + LEVAM) com PR = 92%, com a ressalva de que no primeiro caso observou-se alto grau de resistência dos gêneros *Trichostrongylus* spp. e *Ostertagia* spp. e, no segundo, do gênero *Trichostrongylus* spp. (Quadro 5). Dessa forma, tais combinações apenas seriam recomendáveis no caso de baixa incidência dos gêneros resistentes nos animais ou com a utilização de um terceiro fármaco para o controle destes nematódeos.

Por outro lado, as combinações de MOX 1% + CLOS e de LEVAM + TRICLOR apresentaram eficácias insuficientes (Quadro 4). Deve-se notar que o CLOS foi incluído neste estudo devido à sua ação sobre *Trichostrongylus* spp. demonstrada anteriormente no rebanho-alvo (Quadro 2), porém, este fármaco, além de não ser sequer indicado para o controle do referido gênero, havia apresentado, naquele estudo, PR= -23%, o que pode ter determinado o baixo desempenho de sua combinação com a MOX 1%. De maneira semelhante, a combinação de dois fármacos com alto grau de resistência parasitária no rebanho-alvo (Quadro 1) (LEVAM + TRICLOR) teve baixíssima eficácia (Quadro 4). Este fato pode estar, ainda, associado à ocorrência de mecanismos semelhantes de resistência parasitária (resistência cruzada) entre imidazotiazóis e organofosfatos (Sangster 1999). Isso demonstra que combinações aleatórias de drogas não são aconselháveis em hipótese alguma, sob pena de aumentarem os custos dos tratamentos sem acréscimos à eficácia dos mesmos e podendo acentuar o problema de resistência parasitária.

As superdosagens de MOX 1% ou de LEVAM (ambas compatíveis ao dobro da dose terapêutica recomendada) não apresentaram eficácia satisfatória (Quadro 4). Tais tratamentos foram executados visando a obtenção de um aumento proporcional no pico plasmático dos princípios ativos e, por conseguinte, nos tecidos-alvos nos quais há contato com os parasitas (Lanusse & Prichard 1993, van Zeveren et al. 2007). Porém, tais

subterfúgios não foram efetivos, assim como havia sido observado por Cezar et al. (2010) em bovinos.

As lactonas macrocíclicas de longa ação, veiculadas em base oleosa, têm como característica um período estendido de absorção após a aplicação (Ranjan et al. 2010), caso da Moxidectina 10% Longa Ação (MOX 10% LA). Ressaltando-se que a resistência parasitária à MOX 1% já havia sido demonstrada no rebanho-alvo em estudo prévio (Quadro 1), observou-se que a utilização da formulação de MOX 10% LA não foi suficiente para o alcance da eficácia desejada ($PR \geq 95\%$). Isso vai ao encontro de resultados anteriores que dão conta de que o aumento da concentração de lactonas macrocíclicas para as quais se tenha comprovado resistência parasitária pode não resultar na recuperação da eficácia do tratamento (Cezar et al. 2010). Essas observações indicam que a utilização de antiparasitários de longa ação (e com maior concentração de princípio ativo) deve ser recomendada apenas em casos em que se deseje ampliar o período de proteção para o rebanho. Em tempo, deve-se fazer a ressalva de que a formulação comercial de MOX 10% LA disponível no mercado apenas possui indicação do fabricante para o uso em bovinos, tendo sido testada aqui, experimentalmente. No entanto, a moxidectina é um endectocida indicado e amplamente utilizado em ovinos (McKellar & Jackson 2004).

A combinação de MOX 1% + DISOF além de ter resultado em maior redução de OPG em comparação aos demais tratamentos testados, superou a redução mínima de OPG esperada, ao alcançar um $PR=99\%$. Nesse caso, o fato de não se ter que recorrer a superdoses proporcionará uma menor pressão de seleção de genótipos resistentes na população parasitária e permitirá maior segurança no que diz respeito ao risco de efeitos adversos – exceto possíveis efeitos devidos à interação medicamentosa, os quais precisam ser avaliados. Além disso, ao se evitarem os fármacos de alta concentração (com longa ação) também se evita acelerar o processo de resistência parasitária, uma vez que, quando utilizados, estes proporcionam longo período de sub-dose residual, prejudicando a *refugia*, a qual, provavelmente, já se encontra bastante comprometida no caso em questão (Coles 2002, van Wyk et al. 2006). Por sua vez, quando utilizadas nas suas doses terapêuticas recomendadas, e nas suas formulações de menor concentração, os anti-helmínticos facilitam um manejo adequado à manutenção da *refugia* nas pastagens (Molento 2009), o que é essencial para a sustentabilidade dos tratamentos.

Outra questão a ser considerada é que a combinação de fármacos tenderá a ser mais efetiva quando forem utilizados princípios ativos com mecanismos de ação diferentes, o que possibilita uma maior probabilidade de que se somem os efeitos de ambos, uma vez que serão necessários diferentes mecanismos adaptativos dos parasitas para que estes resistam à

combinação de princípios ativos, e isto tenderá a dificultar o desenvolvimento da resistência parasitária (Hall et al. 1981, Barnes et al. 1995).

O gênero *Trichostrongylus* spp. foi resistente e aumentou sua proporção após todos os tratamentos (Quadro 5). Este gênero foi o principal limitante para a eficácia das combinações de drogas utilizadas. Por conta disso, devem-se buscar alternativas para um controle adequado de *Trichostrongylus* spp. no rebanho-alvo deste estudo. Contudo, considerando-se a situação extrema da resistência parasitária encontrada acometendo o mesmo, pode-se classificar a resistência do gênero *Trichostrongylus* spp. como aceitável, desde que a eficácia do tratamento supere os 95%. Ainda, conforme se observa no Quadro 5, recuperaram-se larvas resistentes dos gêneros *Haemonchus* spp. e *Ostertagia* spp. após todos os tratamentos, o gênero *Cooperia* spp. foi susceptível aos tratamentos com MOX 1% + LEVAM, MOX 1% + CLOS e MOX 10% LA.

Sendo assim, a ação da combinação de fármacos poderá apresentar resultados mais ou menos satisfatórios dependendo do(s) gênero(s) de nematódeo(s) predominante(s) no rebanho, sendo que a própria eficácia dos tratamentos, juntamente à variação dos fatores epidemiológicos locais, terão influência na carga parasitária e na proporção de cada gênero na população de parasitas do rebanho (Barger 1999, Molento 2009). Embora haja relatos de resistência lateral de endoparasitas à moxidectina em rebanhos tratados com outras lactonas macrocíclicas (Vermunt et al. 1996), aparentemente, a resistência à moxidectina se desenvolve mais lentamente do que a resistência às avermectinas (Ranjan et al. 2002, Cezar et al. 2010). Isto torna a moxidectina uma boa candidata para associação com outras drogas em casos de resistência múltipla. De qualquer forma, as combinações de fármacos a serem utilizadas sobre populações parasitárias multi-resistentes devem ser baseadas em testes de eficácia destas drogas, incluindo culturas de larvas, no rebanho-alvo.

CONCLUSÕES

Demonstrou-se a viabilidade da recuperação da eficácia dos tratamentos anti-helmínticos no rebanho acometido por nematódeos resistentes a todas as classes de drogas com ação nematicida disponíveis no mercado.

A combinação de drogas antiparasitárias, com diferentes mecanismos de ação, possibilitou alta eficácia do tratamento anti-helmíntico sobre uma população de nematódeos gastrintestinais de ovinos, altamente resistente, inclusive às drogas utilizadas nas combinações, e sem necessidade de maiores doses ou concentrações dos princípios ativos.

Em princípio, a utilização de combinações de antiparasitários só é aconselhável em casos extremos, nos quais todas as opções de tratamentos convencionais, a base de um único fármaco em cada tratamento, estejam esgotadas em relação a sua eficácia anti-helmíntica.

REFERÊNCIAS

- Albonico M., Bickle Q., Ramsan M., Montresor A., Savioli L. & Taylor M. 2003. Efficacy of mebendazole and levamisole alone or in combination against intestinal nematode infections after repeated targeted mebendazole treatment in Zanzibar. *Bull. World Health Organ.* 81:343-352.
- Anderson N., Martin P.J. & Jarret R.G. 1988. Mixtures of anthelmintics: a strategy against resistance. *Aust. Vet. J.* 65:62-64.
- Barger I.A. 1999. The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. *Int. J. Parasitol.* 29:41-47.
- Barnes E.H., Dobson R.J. & Barger I.A. 1995. Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. *Parasitol. Today* 11:56-63.
- Cezar A.S., Vogel F.S.F., Sangioni L.A., Antonello A.M., Camillo G., Toscan G. & Araujo L.O. 2010. Ação anti-helmíntica de diferentes formulações de lactonas macrocíclicas em cepas resistentes de nematódeos de bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* xx:xxx-xxx.
- Cheah T.S. & Rajamanickam C. 1997. Epidemiology of gastro-intestinal nematodes of sheep in wet tropical conditions in Malaysia. *Trop. Anim. Health Prod.* 29:165-173.
- Coles G.C. 2002. Sustainable use of anthelmintics in grazing animals. *Vet. Rec.* 151:165-169.
- Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F.H.M., Geerts S., Klei T.R., Taylor M.A. & Waller P.J. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44:35-44.
- Coles G.C., Jackson F., Pomroy W.E., Prichard R.K., von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor M.A. & Vercruysse J., 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 136:167-185.
- Dobson R.J., LeJambre L. & Gill J. 1996. Management of anthelmintic resistance: inheritance of resistance and selection with persistent drugs. *Int. J. Parasitol.* 26:993-1000.
- Echevarria F., Borba M.F.S., Pinheiro A.C., Waller P.J. & Hansen J.W. 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. *Vet. Parasitol.* 62:199-206.

- Entrocasso C., Alvarez L., Manazza J., Lifschitz A., Borda B., Virkel G., Mottier L. & Lanusse C. 2008. Clinical efficacy assessment of the albendazole–ivermectin combination in lambs parasitized with resistant nematodes. *Vet. Parasitol.* 155:249–256.
- Furlong J., Prata M.C.A. & Martins J.R. 2007. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? *A Hora Vet.* 159:26-32.
- Geerts S. & Gryseels, B. 2000. Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:207-222.
- George J.E., Pound J.M. & Davey R.B. 2004. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitol.* 129:353–366.
- Hall C.A., Kelly J.D., Whitlock H.V. & Ritchie L. 1981. Prolonged anthelmintic effect of closantel and disophenol against a thiabendazole selected resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. *Res. Vet. Sci.* 31:104-106.
- Hopkins A.L., Witty M.J. & Nwaka S. 2007. Mission possible. *Nature* 449:166-169.
- Hu Y., Platzer E.G., Bellier A. & Aroian R.V. 2010. Discovery of a highly synergistic anthelmintic combination that shows mutual hypersusceptibility. *PNAS* 107:5955-5960. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0912327107>>. Acesso em: 5 mar. 2010.
- Lanusse C.E. & Prichard R.K. 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 49:123-158.
- Martins J.R., Furlong J., Prata M.C.A. & Doyle R.L. 2008. Acaricide resistance in Brazil and the use of mixtures as chemical alternative for tick control. In: VI Seminario Internacional de Parasitología Animal, 2008, Boca del Río Veracruz, Mexico.
- McKellar Q.A. & Jackson F. 2004. Veterinary anthelmintics: old and new. *Trends Parasitol.* 20:456-461.
- McKenna P.B., 2006. Further comparison of faecal egg count reduction test procedures: sensitivity and specificity. *N. Z. Vet. J.* 54:365-366.
- Miller D.K. & Craig T.M. 1996. Use of anthelmintic combinations against multiple resistant *Haemonchus contortus* in Angora goats. *Small Rumin. Res.* 19:281-283.
- Miller J.E., Bahirathan M., Lemarie S.L., Hembry F.G., Kearney M.T. & Barras S.R. 1998. Epidemiology of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk and Gulf Coast Native sheep with special emphasis on relative susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. *Vet. Parasitol.* 74:55-74.
- Molento M.B. 2009. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. *Vet. Parasitol.* 163:229-234.

- Mwamachi D.M., Audho J.O., Thorpe W. & Baker R.L. 1995. Evidence for multiple anthelmintic resistance in sheep and goats reared under the same management in coastal Kenya. *Vet. Parasitol.* 60:303-313.
- Pink R., Hudson A., Mouriès M.-A. & Bendig M. 2005. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature Rev. Drug Discov.* 4:727–739.
- Ranjan S., Search R., Szewczyk E., Amodie D., Pollet R. & Rugg D. 2010. Evaluation of the persistent activity of moxidectin (10%) long-acting (LA) injectable formulation against *Dictyocaulus viviparus*, *Haemonchus placei*, *Trichostrongylus axei* and *Oesophagostomum radiatum* infections in cattle. *Vet. Parasitol.* 167:50–54.
- Ranjan S., Wang G.T., Hirschlein C. & Simkins K.L. 2002. Selection for resistance to macrocyclic lactones by *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. Parasitol.* 103:109-117.
- Sangster N.C. 1999. Anthelmintic resistance: past, present and future. *Int. J. Parasitol.* 29:115-124.
- Sargison N.D., Jackson F., Bartley D.J., Wilson D.J., Stenhouse L.J. & Penny C.D. 2007. Observations on the emergence of multiple anthelmintic resistance in sheep flocks in the south-east of Scotland. *Vet. Parasitol.* 145:65-76.
- Traversa D., Paoletti B., Otranto D. & Miller J. 2007. First report of multiple drug resistance in trichostrongyles affecting sheep under field conditions in Italy. *Parasitol. Res.* 101:1713-1716.
- Ueno H. & Gonçalves V.C. 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. Tóquio : Japan International Cooperation Agency. 143p.
- van Wyk J.A., Hoste H., Kaplan R.M. & Besier R.B. 2006. Targeted selective treatment for worm management—How do we sell rational programs to farmers? *Vet. Parasitol.* 139:336-346.
- van Zeveren A.M., Casaert S., Alvinerie M., Geldhof P., Claerebout E. & Vercruyse J. 2007. Experimental selection for ivermectin resistance in *Ostertagia ostertagi* in cattle. *Vet. Parasitol.* 150:104-110.
- Vermunt J., West D. & Pomroy W. 1996. Inefficacy of moxidectin and doramectin against ivermectin-resistant *Cooperia* spp. of cattle in New Zealand. [N. Z. Vet. J.](#) 44:188-193.
- Waller P.J. & Thamsborg S.M. 2004. Nematode control in ‘green’ ruminant production systems. *Trends Parasitol.* 20:493-497.
- Waller P.J., Rudby-Martin L., Ljungström B.L. & Rydzik A. 2004. The epidemiology of abomasal nematodes of sheep in Sweden, with particular reference to over-winter survival strategies. *Vet. Parasitol.* 122:207-220.

- Wood I.B., Amaral N.K., Bairden K., Duncan J.L., Kassai T., Malone Jr. J.B., Pankavich J.A., Reinecke R.K., Slocombe O., Taylor S.M. & Vercruysse J. 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Vet. Parasitol.* 58:181-213.
- Woods D.J. & Williams T.M. 2007. The challenges of developing novel antiparasitic drugs. *Invert. Neurosci.* 7:245-250.
- Yazwinski T.A., Williams J.C., Smith L.L., Tucker C., Loyacano A.F., DeRosa A., Peterson P., Bruer D.J. & Delay R.L. 2006. Dose determination of the persistent activity of moxidectin long-acting injectable formulations against various nematode species in cattle. *Vet. Parasitol.* 137:273-285.

Quadro 1 – Tratamentos avaliados nos ovinos do rebanho-alvo e eficácias calculadas das drogas com base em um Teste de Redução da Contagem de Ovos nas Fezes (FECRT) em um estudo prévio:

Drogas testadas em cada grupo de ovinos (n=15)	Dose (mg Kg ⁻¹)	Eficácia (FECRT)	Nome comercial, Fabricante
Fosfato de Levamisol 22,3%	4,5	23%	Levamisol F, Vetbrands
Moxidectina 1%	0,2	54%	Cydectin ovinos, Fort Dodge
Sulfóxido de Albendazol 10%	2,5	-2%	Ricobendazole 10, Ouro Fino
Ivermectina 1%	0,2	-42%	Ivomec Injetável, Merial
Nitroxinil 34%	9,7	32%	Dovenix Supra, Merial
Disofenol 20%	10,0	26%	Disofenol 20%, IBASA
Triclorfon 10%	100,0	-35%	Bevermex, IRFA
Ivermectina	0,2		
Levamisole	7,5	68%	Trimix, Merial
Albendazole	5,0		
Closantel 10%	10,0	-23%	Diantel, IRFA

Quadro 2 – Percentual de cada um dos três gêneros de nematódeos gastrintestinais - *Haemonchus* spp. (*Haem.*), *Trichostrongylus* spp. (*Trich.*), *Ostertagia* spp. (*Ostert.*) - recuperados de culturas de larvas nas fezes dos ovinos, antes (D0) e 12 dias depois (D12) dos tratamentos antiparasitários, em um estudo prévio (para as drogas selecionadas para o presente estudo):

Drogas testadas em grupos de 15 ovinos	<i>Haem.</i> (%)		<i>Trich.</i> (%)		<i>Ostert.</i> (%)	
	D0	D12	D0	D12	D0	D12
Fosfato de Levamisol 22,3%	48	38 ↓ ^a	52	56 ↑	0	6 ↑
Moxidectina 1%	50	31 ↓	44	59 ↑	6	10 ↑
Disofenol 20%	48	22 ↓	36	46 ↑	16	32 ↑
Triclorfon 10 %	42	36 ↓	52	41 ↓	6	23 ↑
Closantel 10%	44	38 ↓	50	20 ↓	6	42 ↑

^a As setas representam redução (↓) ou aumento (↑) no percentual de cada gênero após o tratamento.

Quadro 3 – Tratamentos avaliados no rebanho-alvo de ovinos no presente estudo:

Grupos (n=15) e tratamentos	Dose (mg Kg ⁻¹) ^a	Classes	Nome comercial, Fabricante
G1. Moxidectina 1% (Dobro da dose)	0,4	Milbemicina ^b	Cysectin ovinos, Fort Dodge
G2. Fosfato de Levamisol 22,3% (Dobro da dose)	9,0	Imidazotiazol	Levamisol F, Vetbrands
G3. Moxidectina 1%	0,2	Milbemicina ^b	Cysectin ovinos, Fort Dodge
Fosfato de Levamisol 22,3%	4,5	Imidazotiazol	Levamisol F, Vetbrands
G4. Moxidectina 1%	0,2	Milbemicina ^b	Cysectin ovinos, Fort Dodge
Disofenol 20%	10,0	Nitrofenol	Disofenol 20%, IBASA
G5. Moxidectina 1%	0,2	Milbemicina ^b	Cysectin ovinos, Fort Dodge
Triclorfon 10%	100,0	Organofosfato	Bevermex, IRFA
G6. Moxidectina 1%	0,2	Milbemicina ^b	Cysectin ovinos, Fort Dodge
Closantel 10%	10,0	Salicilanilida	Diantel, IRFA
G7. Fosfato de Levamisol 22,3%	4,5	Imidazotiazol	Levamisol F, Vetbrands
Triclorfon 10%	100,0	Organofosfato	Bevermex, IRFA
G8. Moxidectina 10%	1,0	Milbemicina ^b	Onyx, Fort Dodge

^a Todos por via parenteral, subcutânea, exceto o Closantel 10% (via oral).

^b Lactona Macroclíclica.

Quadro 4 – Médias de OPG de cada grupo de ovinos antes (D0) e 12 dias depois (D12) dos tratamentos antiparasitários e eficácias calculadas de cada tratamento com base em um Teste de Redução da Contagem de Ovos nas Fezes (FECRT):

Grupos (n=15) e tratamentos	OPG (médio)		Eficácia (FECRT)
	D0	D12	
G1. Moxidectina 1% (Dobro da dose)	2900	313	89%
G2. Fosfato de Levamisol 22,3% (Dobro da dose)	3971	682	83%
G3. Moxidectina 1% + Fosfato de Levamisol 22,3%	4887	395	92%
G4. Moxidectina 1% + Disofenol 20%	3067	40	99%
G5. Moxidectina 1% + Triclorfon 10%	2538	238	91%
G6. Moxidectina 1% + Closantel 10%	5140	892	83%
G7. Fosfato de Levamisol 22,3% + Triclorfon 10%	4227	1536	36%
G8. Moxidectina 10%	2773	598	78%

Quadro 5 - Percentual de cada um dos cinco gêneros de nematódeos gastrintestinais - *Haemonchus* spp. (*Haem.*), *Trichostrongylus* spp. (*Trich.*), *Ostertagia* spp. (*Ostert.*), *Cooperia* spp. (*Coop.*), *Oesophagostomum* spp. (*Oesoph.*) - recuperados de culturas de larvas em fezes ovinas coletadas antes (D0) e 12 dias depois (D12) dos tratamentos antiparasitários:

Grupos (n=15) e tratamentos	<i>Haem.</i> (%)		<i>Trich.</i> (%)		<i>Ostert.</i> (%)		<i>Coop.</i> (%)		<i>Oesoph.</i> (%)	
	D0	D12	D0	D12	D0	D12	D0	D12	D0	D12
G1. Moxidectina 1% (Dobro da dose)	78	72↓ ^a	4	40↑	0	2↑	18	6↓	0	0
G2. Fosf. Levam. ^b 22,3% (Dobro da dose)	46	14↓	16	80↑	16	4↓	20	2↓	2	0↓
G3. Moxidectina 1% + Fosf. Levam. 22,3%	68	6↓	4	91↑	20	3↓	8	0↓	0	0
G4. Moxidectina 1% + Disofenol 20%	54	6↓	10	86↑	20	4↓	16	4↓	0	0
G5. Moxidectina 1% + Triclorfon 10%	80	26↓	2	48↑	2	20↑	16	6↓	0	0
G6. Moxidectina 1% + Closantel 10%	60	4↓	24	86↑	0	6↑	12	0↓	6	2↓
G7. Fosf. Levam. 22,3% + Triclorfon 10%	62	8↓	8	62↑	4	18↑	26	8↓	0	4↑
G8. Moxidectina 10%	58	47↓	0	47↑	2	6↑	40	0↓	0	0

^a As setas representam redução (↓) ou aumento (↑) no percentual de cada gênero após o tratamento.

^b Fosf. Levam. = Fosfato de Levamisole.

5 CONCLUSÕES

A resistência parasitária múltipla aos fármacos com ação nematicida, provavelmente disseminada em rebanhos de ruminantes no sul do Brasil, precisa ser controlada de maneira a se restabelecer a eficácia dos tratamentos anti-helmínticos, caso contrário, este problema poderá inviabilizar economicamente alguns desses rebanhos.

A utilização de superdoses e/ou de formulações com alta concentração de princípio ativo (longa ação), não garante a eficácia dos tratamentos sobre populações de nematódeos gastrintestinais resistentes aos mesmos princípios ativos nas formulações e dosagens convencionais.

A combinação de princípios ativos quimicamente semelhantes, com mecanismos de ação similares, tende a resultar em baixo incremento da eficácia dos tratamentos em populações de nematódeos gastrintestinais resistentes ao grupo químico em questão.

A combinação de drogas, com mecanismos de ação distintos, disponíveis separadamente no mercado, é uma alternativa viável para o controle de nematódeos gastrintestinais multi-resistentes. Contudo, a sua utilização deve ser baseada em testes de eficácia e em culturas de larvas que possibilitem o direcionamento da escolha daqueles fármacos que sejam os melhores candidatos em cada caso.

A utilização de combinações de drogas só é recomendável em casos de resistência múltipla a todos os fármacos com ação nematicida disponíveis no mercado, e seu efeito deve ser comprovado por meio de testes de eficácia.

A utilização de combinações aleatórias de fármacos antiparasitários não deve ser utilizada, sob pena de incorrer-se no risco de agravar o problema de resistência parasitária no rebanho com a aplicação de combinações ineficazes.

6 REFERÊNCIAS

ALBONICO, M. et al. Efficacy of mebendazole and levamisole alone or in combination against intestinal nematode infections after repeated targeted mebendazole treatment in Zanzibar. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 81, n. 5, p. 343-352, 2003.

ANDERSON, N.; MARTIN, P. J.; JARRET, R. G. Mixtures of anthelmintics: a strategy against resistance. **Australian Veterinary Journal**, v. 65, n. 2, p. 62-64, 1988.

BAHIRATHAN, M. et al. Susceptibility of Suffolk and Gulf Coast Native suckling lambs to naturally acquired strongylate nematode infection. **Veterinary Parasitology**, v. 65, n. 3-4, p. 259-268, 1996.

BARGER, I. A. The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 41-47, 1999.

BARLOW, A. M.; SHARPE, J. A. E.; KINCAID, E. A. Blindness in lambs due to inadvertent closantel overdose. **Veterinary Record**, v. 151, n. 1, p. 25-26, 2002.

BARNES, E. H.; DOBSON, R. J.; BARGER, I. A. Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. **Parasitology Today**, v. 11, n. 2, p. 56-63, 1995.

BIFFA, D.; JOBRE, Y.; CHAKKA, H. Ovine helminthosis, a major health constraint to productivity of sheep in Ethiopia. **Animal Health Research Reviews**, v. 7, n. 1-2, p. 107-118, 2006.

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

CHARTIER, C.; PORS, I.; BENOIT, C. Efficacy of pyrantel tartrate against experimental infections with *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in goats. **Veterinary Parasitology**, v. 59, n. 1, p. 69-73, 1995.

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

CRAIG, T. M. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 46, n. 1-4, p. 121-131, 1993.

CRUZ, D. G. et al. Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD7-4YGHGX6-3&_user=687358&_coverDate=02%2F26%2F2010&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1282273442&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000037899&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687358&md5=56e1d18360f113947e5ad50c110021d3>. Acesso em: 5 mar. 2010.

DOBSON, R. J.; LeJAMBRE, L.; GILL, J. Management of anthelmintic resistance: inheritance of resistance and selection with persistent drugs. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 8-9, p. 993-1000, 1996.

DUPUY, J.; SUTRA, J. F.; ALVINERIE, M. Pharmacokinetics assessment of moxidectin long-acting formulation in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 3-4, p. 252-257, 2007.

ENTROCASSO, C. et al. Clinical efficacy assessment of the albendazole-ivermectin combination in lambs parasitized with resistant nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 3-4, p. 249-256, 2008.

FARIAS, M. T. et al. A survey on resistance to anthelmintics in sheep stud farms of southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 72, n. 2, p. 209-214, 1997.

FORBES, A. B.; CUTLER, K. L.; RICE, B. J. Sub-clinical parasitism in spring-born, beef suckler calves: epidemiology and impact on growth performance during the first grazing season. **Veterinary Parasitology**, v. 104, n. 4, p. 339-344, 2002.

FURLONG, J.; PRATA, M. C. A.; MARTINS, J. R. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v. 27, n. 159, p. 26-32, 2007.

GEERTS, S.; GRYSEELS, B. Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2, p. 207-222, 2000.

GEORGE, J. E.; POUND, J. M.; DAVEY, R. B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. **Parasitology**, v. 129, p. 353-366, 2004. Suppl. 1.

GILL, J. H. et al. Evidence of multiple mechanisms of avermectin resistance in *Haemonchus contortus* - comparison of selection protocols. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 5, p. 783-789, 1998.

HENNESSY, D. R. Modifying the formulation or delivery mechanism to increase the activity of anthelmintic compounds. **Veterinary Parasitology**, v. 72, n. 3-4, p. 367-390, 1997.

HU, Y. et al. Discovery of a highly synergistic anthelmintic combination that shows mutual hypersusceptibility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 13, p. 5955-5960, 2010. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0912327107>>. Acesso em: 5 mar. 2010.

ISMAIL, M. M. et al. Efficacy of single dose combinations of albendazole, ivermectin and diethylcarbamazine for the treatment of Bancroftian filariasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 1, p. 94-97, 1998.

JACKSON, F.; COOP, R. L. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Parasitology**, v. 120, n. 7, p. 95-107, 2000.

JACKSON, F. et al. Worm control in sheep in the future. **Small Ruminant Research**, v. 86, n. 1-3, p. 40-45, 2009.

JAMES, C. E.; DAVEY, M. W. Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 2, p. 213-220, 2009.

KAGIRA, J.; KANYARIA, P. W. The role of parasitic diseases as causes of mortality in small ruminants in a high-potential farming area in central Kenya. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 72, n. 3, p. 147-149, 2001.

KAPLAN, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 10, p. 477-481, 2004.

KENYON, F. et al. The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 1, p. 3-11, 2009.

KYRIAZAKIS, I. et al. The effect of subclinical intestinal nematode infection on the diet selection of growing sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 72, n. 5, p. 665-677, 1994.

LAWRENCE, K. E. et al. Farm management practices associated with macrocyclic lactone resistance on sheep farms in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 54, n. 6, p. 283-288, 2006.

LEATHWICK, D. M.; POMROY, W. E.; HEATH, A. C. G. Anthelmintic resistance in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 49, n. 6, p. 227-235, 2001.

LEATHWICK, D. M. et al. Managing anthelmintic resistance: Is it feasible in New Zealand to delay the emergence of resistance to a new anthelmintic class? **New Zealand Veterinary Journal**, v. 57, n. 4, p. 181-192, 2009.

LIFSCHITZ, A. et al. Ivermectin disposition kinetics after subcutaneous and intramuscular administration of an oil-based formulation to cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 86, n. 3, p. 203-215, 1999.

LIFSCHITZ, A. et al. Ivermectin (3.15%) long-action formulations in cattle: absorption pattern and pharmacokinetic considerations. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 3-4, p. 303-310, 2007.

MacRAE, J. C. Metabolic consequences of intestinal parasitism. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 52, n. 1, p. 121-130, 1993.

McKELLAR, Q. A; JACKSON, F. Veterinary anthelmintics: old and new. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 10, p. 456-461, 2004.

McLEOD, R. S. Costs of major parasites to the Australian livestock industries. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 11, p. 1363-1367, 1995.

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

MILLER, D. K.; CRAIG, T. M. Use of anthelmintic combinations against multiple resistant *Haemonchus contortus* in Angora goats. **Small Ruminant Research**, v. 19, n. 3, p. 281-283, 1996.

MOLENTO, M. B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 3, p. 229-234, 2009.

MOLENTO, M. B.; PRICHARD, R. K. Effects of the multidrug-resistance-reversing agents verapamil and CL 347,099 on the efficacy of ivermectin or moxidectin against unselected and drug-selected strains of *Haemonchus contortus* in jirds (*Meriones unguiculatus*). **Parasitology Research**, v. 85, n. 12, p. 1007-1011, 1999.

MOTTIER M. L.; PRICHARD R. K. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 18, n. 2, p. 129-140, 2008.

PINK, R. et al. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 9, p. 727-739, 2005.

RANJAN, S. et al. Selection for resistance to macrocyclic lactones by *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n. 1-2, p. 109-117, 2002.

REINECKE, R. K. Parasitic control in intensive vs. non-intensive systems - ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 54, n. 1-3, p. 49-67, 1994.

SANGSTER, N. C. Anthelmintic resistance: past, present and future. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 115-124, 1999.

SANGSTER, N. C.; GILL, J. Pharmacology of anthelmintic resistance. **Parasitology Today**, v. 15, n. 4, p. 141-146, 1999.

SANGSTER, N. C. et al. Disposition of oxfendazole in goats and efficacy compared to sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 51, n. 3, p. 258-263, 1991.

SILVESTRE, A. et al. Relationship between helminth species diversity, intensity of infection and breeding management in dairy goats. **Veterinary Parasitology**, v. 94, n. 1-2, p. 91-105, 2000.

SILVESTRE, A. et al. Sheep and goat nematode resistance to anthelmintics: pro and cons among breeding management factors. **Veterinary Research**, v. 33, n. 5, p. 465-480, 2002.

STROMBERG, B. E.; AVERBECK, G. A. The role of parasite epidemiology in the management of grazing cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 33-39, 1999.

- TAYLOR, M. A. et al. Multiple resistance to anthelmintics in sheep nematodes and comparison of methods used for their detection. **Small Ruminant Research**, v. 86, n. 1-3, p. 67-70, 2009.
- THAMSBORG, S. M.; ROEPSTORFF, A.; LARSEN, M. Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems. **Veterinary Parasitology**, v. 84, n. 3-4, p. 169-186, 1999.
- van der LUGT, J. J.; VENTER, I. Myelin vacuolation, optic neuropathy and retinal degeneration after closantel overdosage in sheep and in a goat. **Journal of Comparative Pathology**, v. 136, n. 2-3, p. 87-95, 2007.
- van WYK, J. A.; MALAN, F. S.; RANGLES, J. L. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? **Veterinary Parasitology**, v. 70, n. 1-3, p. 111-122, 1997.
- van WYK, J. A. et al. Targeted selective treatment for worm management - How do we sell rational programs to farmers? **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 336-346, 2006.
- van ZEVEREN, A. M. et al. Experimental selection for ivermectin resistance in *Ostertagia ostertagi* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 1-2, p. 104-110, 2007.
- VÁRADY, M. et al. In vitro characterization of lines of *Oesophagostomum dentatum* selected or not selected for resistance to pyrantel, levamisole and ivermectin. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 1, p. 77-81, 1997.
- WAGHORN, T. S. et al. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep farms in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 54, n. 6, p. 271-277, 2006.
- WALLER, P. J. Nematode parasite control of livestock in the tropics/subtropics: the need for novel approaches. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 10, p. 1193-1201, 1997.
- _____. International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 155-164, 1999.
- _____. Global perspectives on nematode parasite control in ruminant livestock: the need to adopt alternatives to chemotherapy, with emphasis on biological control. In: FAO. Animal Production and Health Division. Biological control of nematode parasites of small ruminants in Asia. **Final proceedings...** Rome, Italy: FAO, 2002. 104p. (FAO Animal Production and Health Paper).

WALLER, P. J.; THAMSBORG, S. M. Nematode control in 'green' ruminant production systems. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 10, p. 493-497, 2004.

WEST, D. et al. Estimating the cost of subclinical parasitism in grazing ewes. **Small Ruminant Research**, v. 86, n. 1, p. 84-86, 2009.

WOLSTENHOLME, J. et al. Drug resistance in veterinary helminthes. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 10, p. 469-476, 2004.

YAZWINSKI, T. A. et al. Dose determination of the persistent activity of moxidectin long-acting injectable formulations against various nematode species in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3-4, p. 273-285, 2006.

ZAJAC, A.M.; GIPSON, T. A. Multiple anthelmintic resistance in a goat herd. **Veterinary Parasitology**, v. 87, n. 2-3, p. 163-172, 2000.

C425a Cezar, Alfredo Skrebsky, 1985-

Alternativas farmacológicas para a resistência parasitária múltipla em rebanhos de ruminantes: uma nova abordagem / Alfredo Skrebsky Cezar. - 2010.
64 f. ; il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, 2010.

“Orientadora: Prof^a. Fernanda Silveira Flôres Vogel”

1. Medicina veterinária 2. Ruminantes 3. Superdoses 4. Anti-helmínticos 5. Multi-resistentes 6. Helmintos I. Vogel, Fernanda Silveira Flôres Vogel II. Título III. Título: Uma nova abordagem

CDU: 619:636.2/.3

Ficha catalográfica elaborada por
Patrícia da Rosa Corrêa – CRB 10/1652
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM