

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

Fernanda Ramos

Helmintoses de ruminantes: i. viabilidade econômica do tratamento anti-helmíntico; ii. perfil da resistência anti-helmíntica de nematódeos gastrointestinais de ruminantes

Santa Maria, RS, Brasil

2019

Fernanda Ramos

**HELMINTOSES DE RUMINANTES: I. VIABILIDADE ECONÔMICA DO TRATAMENTO
ANTI-HELMÍNTICO; II. PERFIL DA RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA DE
NEMATÓDEOS GASTROINTESTINAIS DE RUMINANTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**

Orientador: Fernanda Silveira Flores Vogel

Santa Maria, RS, Brasil

2019

Ramos, Fernanda

Helmintoses de ruminantes: i. viabilidade econômica do tratamento anti-helmíntico; ii. perfil da resistência anti-helmíntica de nematódeos gastrointestinais de ruminantes / Fernanda Ramos.- 2019.

88 p.; 30 cm

Orientadora: Fernanda Silveira Flôres Vogel

Coorientador: Luis Antonio Sangioni

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2019

1. Resistência parasitária 2. Helmintos 3. Bovinos 4. Ovinos I. Silveira Flôres Vogel, Fernanda II. Sangioni, Luis Antonio III. Título.

Fernanda Ramos

HELMINTOSES DE RUMINANTES: I. VIABILIDADE ECONÔMICA DO TRATAMENTO ANTI-HELMÍNTICO; II. PERFIL DA RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA DE NEMATÓDEOS GASTROINTESTINAIS DE RUMINANTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**

Fernanda Silveira Flores Vogel, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Luis Antônio Sangioni

Patricia Bräunig

Giovana Camillo

Luciana Dalla Rosa

Santa Maria, RS

2019

RESUMO

HELMINTOSES DE RUMINANTES: I. VIABILIDADE ECONÔMICA DO TRATAMENTO ANTI-HELMÍNTICO; II. PERFIL DA RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA DE NEMATÓDEOS GASTROINTESTINAIS DE RUMINANTES

AUTOR: Fernanda Ramos
ORIENTADOR: Fernanda Silveira Flores Vogel

A resistência de nematódeos do trato gastrointestinal é um problema emergente dentro da produção de ruminantes no Brasil e outras regiões do mundo, sendo amplamente relacionada a déficits nos índices produtivos devido aos seus efeitos no bem-estar e saúde destes animais. No entanto, alguns aspectos como o impacto econômico decorrente desta problemática, por exemplo, ainda necessitam de maior investigação. Portanto, os objetivos deste estudo foram: (1) verificar a relação custo/benefício do tratamento com diferentes compostos anti-helmínticos na produtividade de animais naturalmente infectados em propriedades de sistema extensivo de criação de bovinos de corte com diferentes estratégias nutricionais após o desmame; (2) avaliar a população de nematódeos em bovinos e ovinos que compartilham áreas de pastejo antes e após o tratamento com diferentes anti-helmínticos, e avaliar a eficácia destes tratamentos nestas espécies de ruminantes em animais naturalmente infectados oriundos de sete propriedades. Adicionalmente, para os grupos de bovinos e ovinos tratados com um benzimidazole, investigar a presença de co-infecções por *Haemonchus* através de avaliações via reação em cadeia da polimerase (PCR). No Capítulo 1, avaliamos a eficácia de 5 anti-helmínticos diferentes e sua relação com o ganho de peso de terneiros sob regimes alimentares diferentes após o desmame, realizando uma análise econômica com os dados obtidos após 150 dias de avaliação em quatro propriedades do estado do Rio Grande do Sul. Em duas destas fazendas, 1 e 3, o anti-helmíntico mais eficaz resultou no maior retorno financeiro e nas demais (propriedades 2 e 4) o grupo ivermectina 3.15% e grupo controle, respectivamente, obtiveram os melhores resultados. No Capítulo 2, primeiramente, avaliamos 6 compostos anti-helmínticos diferentes no tratamento de bovinos e ovinos e a população de nematódeos presentes nestes ruminantes em áreas de pastejo compartilhadas. Os resultados obtidos revelaram certa similaridade tanto nos status de eficácia dos produtos como nos helmintos infetando nestes animais. Em uma segunda etapa, através de PCR observamos a presença de co-infecção nos bovinos e ovinos por espécies de *Haemonchus*, principalmente nas culturas de fezes pré-tratamento, bem como a possibilidade da infecção causada por híbridos deste parasito em uma das propriedades avaliadas.

Palavras-chave: Helmintos. Resistência; Anti-helmínticos; Análise econômica; PCR

ABSTRACT

HELMINTHES OF RUMINANTS: I. ECONOMIC VIABILITY OF ANTHELMINTIC TREATMENT; II. PROFILE OF THE ANTHELMINTIC RESISTANCE OF GASTROINTESTINAL NEMATODES OF RUMINANTS

AUTHOR: Fernanda Ramos
ADVISER: Fernanda Silveira Flores Vogel

Resistance of gastrointestinal nematodes is an emerging problem in ruminant production in Brazil and other regions of the world, and is largely related to deficits in productive indexes due to its effects on the welfare and health of these animals. However, some aspects such as the economic impact resulting from this problem, for example, still need further investigation. Thus, the aims of this study were: (1) to verify the cost / benefit of the treatment with different anthelmintic compounds in the productivity of naturally infected animals in extensive system farms of beef cattle with different nutritional strategies after weaning; (2) to evaluate nematode populations in cattle and sheep that share grazing areas before and after treatment with different anthelmintics, and to evaluate the efficacy of these treatments on naturally infected ruminants from seven different farms. Additionally, for groups of cattle and sheep treated with a benzimidazole, we investigated the presence of co-infections by *Haemonchus* through polymerase chain reaction (PCR) evaluations. In Chapter 1, we evaluated the efficacy of five different anthelmintics and their relationship to the weight gain of calves under different diets after weaning by performing an economic analysis with the data obtained from 150 days of evaluation at four farms from Rio Grande do Sul state. In two of these properties, farms 1 and 3, the most effective anthelmintic resulted in the highest financial return and in the others (farms 2 and 4) the ivermectin group 3.15% and control group, respectively, obtained the best results. In Chapter 2, we first evaluated six different anthelmintic compounds in the treatment of cattle and sheep and the nematode population present in these ruminants in shared grazing areas. The results obtained revealed a certain similarity both in the efficacy status of the products and in the helminths presents in these animals. In a second moment, we observed the presence of co-infection in cattle and sheep by *Haemonchus* species, especially in pre-treatment feces cultures, as well as the possibility of infection caused by hybrids of this parasite in one of the evaluated properties

Key words: Molecular diagnosis. DNA sequencing. Serological tests. Protozoa.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figure 1- Amplification pattern of PCR reactions for Haemonchus species identification using DNA extracted from mixed fecal cultures of third stage (L3) larvae prior and post treatment with albendazol of sheep and cattle naturally infected by gastrointestinal nematodes that share grazing áreas in Rio Grande do Sul state.....63

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 - Classe dos diferentes compostos anti-helmínticos para ruminantes, ano de introdução destes fármacos no mercado e respectiva data de relato de resistência.....20

3. CAPÍTULO I – Artigo científico

TABLE 1-Arithmetic mean (AM) and standard deviation (SD), minimum (MIN) and maximum (MAX) fecal egg counts, and proportions of genera identified before the treatments (D-2) in the feces of naturally infected beef cattle from four farms in the state of Rio Grande do Sul.....44

TABLE 2- Arithmetic mean (AM) and standard deviation (SD), minimum (MIN) and maximum (MAX) fecal egg counts, and proportions of genera identified before the treatments (D-2) in the feces of naturally infected beef cattle from four farms in the state of Rio Gran ..44

TABLE 3-Arithmetic mean fecal egg counts (EPG) per experimental groups on each experimental day on beef cattle naturally infected by gastrointestinal nematodes on four farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.....45

TABLE 4- Efficacy (%) of different anthelmintic drugs against each genus of gastrointestinal nematode fourteen days after treatment in naturally infected beef cattle at four farms in the state of Rio Grande do Sul. Brazil.....46

TABLE 5-Arithmetic mean (AM) and standard deviation (SD), minimum (MIN) and maximum (MAX) values of weight per experimental group of naturally infected beef cattle from four farms in the state of Rio Grande do Sul before anthelmintic treatment.....46

TABLE 6-Arithmetic mean value of weight (Kg) of naturally infected calves from four farms in the state of Rio Grande do Sul after the treatment with different anthelmintic compounds.47

TABLE 7-Economical analyses of viability of different anthelmintic treatments based on live weight gain 150 days after the treatment of naturally infected calves from four farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.....48

4. CAPÍTULO II – Artigo científico

TABLE 1- Arithmetic mean (AM, and standard deviation), minimum (MIN) and maximum (MAX) faecal egg counts and percentage of the different genera identified before the treatments (D-2) in the feces of naturally infected beef cattle that share grazing areas with sheep from seven diferente farms in the state of Rio Grande do Sul. 64

TABLE 2-Arithmetic mean (AM, and standard deviation), minimum (MIN) and maximum (MAX) faecal egg counts and percentage of the different genera identified before the treatments (D-2) in the feces of naturally infected sheep that share grazing areas with beef cattle from seven diferente farms in the state of Rio Grande do Sul..... 64

TABLE 3- Percentage of EPG reduction (and 95% confidence interval) calculated by the fecal egg count reduction test (FECRT) fourteen days after anthelmintic treatment in beef cattle naturally infected by gastrointestinal nematodes that share grazing areas with sheep at seven famrs in the state of Rio Gramde do Sul, Brazil..... 65

TABLE 4-Percentage of EPG reduction (and 95% confidence interval) calculated by the fecal egg count reduction test (FECRT) fourteen days after anthelmintic treatment in sheep naturally infected by gastrointestinal nematodes that share grazing areas with cattle at seven farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil..... 65

TABLE 5-Efficacy (%) of different anthelmintic drugs on each genus of gastrointestinal nematode fourteen days after treatments on naturally infected beef cattle that share grazing areas with sheep, at seven farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. 66

TABLE 6-Efficacy (%) of different anthelmintic drugs on each genus of gastrointestinal nematode fourteen days after treatments on naturally infected sheep that share grazing areas with beef cattle, at seven farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil 67

TABLE 7-Molecular identification of Haemonchus species from third stage larvae of cattle and sheep that share grazing areas before and after the treatment with a benzimidazole at seven farms in Rio Grande do Sul state, Brazil..... 68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. Importância das principais helmintoses que acometem bovinos e ovinos.....	12
2.2 Aspectos epidemiológicos	14
2.3 Métodos de controle e profilaxia da infecção por helmintos em ruminantes	15
2.4 Resistência parasitária.....	18
2.4.1 Métodos de diagnóstico da resistência anti-helmíntica.....	21
2.4.1.1 Métodos “ <i>in vivo</i> ”.....	21
2.4.1.1.1 Teste de redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF).....	21
2.4.1.1.2 Teste controlado.....	21
2.4.1.2 Métodos “ <i>in vitro</i> ”	22
2.4.1.2.1 Teste de eclodibilidade de ovos –TEO.....	22
2.4.1.2.2 Teste de desenvolvimento larvar –TDL.....	23
2.4.1.2.3 Teste de motilidade larvar e migração larvar.....	23
2.4.3 Técnicas moleculares para diagnóstico da resistência.....	24
2.5 Caracterização de <i>Haemonchus</i> spp. em bovinos	26
3. CAPÍTULO I – Artigo científico	29
4. CAPÍTULO II – Artigo científico	49
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, os ruminantes de produção são parasitados por diferentes nematódeos do trato gastrointestinal, os quais são relacionados à diferentes efeitos deletérios nos índices produtivos. Dentre estes parasitos, helmintos dos gêneros *Cooperia*, *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Nematodirus*, *Oesophagostomum* e *Strongyloides* são considerados os principais vilões no desenvolvimento adequado de bovinos e ovinos nas diferentes regiões do país (LIMA, 2000; RAMOS et al., 2004; AMARANTE et al., 2004; COSTA, 2007).

As infecções por nematódeos gastrointestinais em animais de criação determinam importantes perdas econômicas devido à efeitos diretos e indiretos decorrentes do parasitismo como subdesenvolvimento dos animais, mortalidade, perda de peso, redução na produção de leite e efeitos na reprodução, por exemplo (WEST et al., 2009; SUTHERLAND and SCOTT, 2010). Nas atuais condições de criação dos ruminantes, onde comumente observa-se uma alta densidade de animais por área disponível, o desafio no controle destes helmintos se torna cada vez mais evidente nos diferentes sistemas de produção. Neste sentido, o acompanhamento de um médico veterinário no momento da escolha do anti-helmíntico mais adequado se faz imprescindível para garantir o sucesso dos manejos profiláticos e de tratamento (WALLER et al., 2004; GEORGE et al., 2017).

Entretanto, corriqueiramente a aquisição de drogas anti-parasitárias é feita sem nenhum critério técnico no momento da escolha do princípio ativo, além dos tratamentos serem realizados de forma supressiva, por conveniência entre manejos e em momentos epidemiológicos aleatórios. Dentre os princípios ativos utilizados, produtos de largo espectro pertencente aos grupos das lactonas macrocíclicas, benzimidazoles e imidazotiazóis são os mais utilizados (CEZAR et al. 2010; BAIK, LEHNEN, ROCHA, 2018).

Este tipo de prática, aliado ao uso supressivo e rotação desordenada das bases químicas existentes, levou a emergência de diversos casos de resistência parasitária por parte dos helmintos presentes tanto em bovinos como ovinos em diferentes regiões do mundo (RAMOS et al., 2004; DEMELER et al., 2009; DE GRAEF, CLAEREBOU, GELDHOF, 2013; FORTES e MOLENTO, 2013; COTTER et al., 2015). Além disto, as condições climáticas do nosso país, onde predominantemente o clima é tropical, aliado a forma como nossos animais são criados (majoritariamente a pasto) facilitam o contato dos mesmos com estes parasitas (AMARANTE et al. 2004).

Segundo alguns autores como Cotter et al. (2015), as evidências de falha dos anti-helmínticos apontam para um controle parasitário sub-ótimo e, como consequência, uma redução na produção animal, sendo importante o entendimento da amplitude geográfica e severidade dos casos de resistência. Neste contexto, alguns aspectos como o impacto econômico decorrente dos tratamentos anti-helmínticos e a viabilidade destes dentro dos sistemas produtivos, por exemplo, são aspectos que necessitam de maior investigação. Assim, diante do exposto, esta tese apresenta o compilado de estudos realizados na forma de dois capítulos, os quais visam avaliar diferentes aspectos ligados a temática da resistência parasitária de helmintos de ruminantes. Os estudos foram relacionados (1) a viabilidade econômica do tratamento anti-helmíntico e sua relação com ganho de peso dos animais; e (2) a semelhança da população de nematódeos presentes em bovinos e ovinos que compartilham áreas de pastejo, bem como o status de eficácia do tratamento com diferentes compostos anti-helmínticos nos animais sob esta condição de criação; ainda, por meio de PCR, nos grupos tratados com um benzimidazol, investigamos a presença de co-infecções por espécies de *Haemonchus* spp.

A tese está composta por uma revisão de literatura sobre os nematódeos do trato gastrointestinal de ruminantes, abordando os principais aspectos de epidemiologia, resistência parasitária, diagnóstico e controle. Na sequência são apresentados dois artigos científicos com os objetivos de i. verificar o efeito do tratamento com diferentes compostos anti-helmínticos na produtividade de animais naturalmente infectados e a viabilidade econômica destes tratamentos em sistemas de produção extensivos de bovinos de corte com diferentes estratégias nutricionais após o desmame; ii. avaliar a população de nematódeos infectando bovinos e ovinos que compartilham áreas de pastejo antes e após o tratamento com diferentes compostos anti-helmínticos, investigando a eficácia destes tratamentos nestas duas espécies de ruminantes em animais naturalmente infectados de sete propriedades do estado do Rio Grande do Sul, Brazil. Adicionalmente, para os grupos de bovinos e ovinos tratados com um benzimidazole, avaliamos a presença de co-infecções por *Haemonchus* spp. através de reações da cadeia da polimerase (PCR). As considerações finais encontram-se no final desta tese e apresentam comentários gerais sobre os estudos realizados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. IMPORTÂNCIA DAS PRINCIPAIS HELMINTOSES QUE ACOMETEM BOVINOS E OVINOS

Por ser um país de clima tropical e com vasta extensão de terra, o Brasil possui papel de destaque entre os principais países produtores de bovinos e ovinos no mundo, com grande potencial para atender a demanda mundial nos próximos anos. Além disso, a carne proveniente destas criações vem de sistemas de produção que usam recursos nutricionais de baixo custo relativo, como as gramíneas tropicais existentes no seu território (HOFFMANN et al., 2014; IBGE, 2014).

Assim, pela maneira como são criados os ruminantes no Brasil, não é incomum que estes tenham contato com parasitas do trato gastrointestinal que comumente contaminam as pastagens. As infecções por estes nematódeos determinam importantes perdas econômicas pela queda de índices produtivos, como mortalidade dos animais, comprometendo o capital investido em insumos e genética do rebanho, além de poder acarretar o descarte involuntário dos indivíduos (AMARANTE, 2004; STOTZER et al., 2014).

As perdas econômicas associadas ao parasitismo por nematódeos gastrointestinais em ruminantes são globalmente aceitas, sendo que vários estudos tentam estimar o efeito de diferentes níveis de parasitismo nos índices produtivos dos animais. Entretanto, estudos que abordem de forma holística o aspecto econômico das perdas produtivas ou custos e benefícios de possíveis medidas de controle, seguem escassos (CHARLIER et al., 2009).

Sabe-se que o custo com o tratamento/prevenção de doenças não deve levar em consideração somente os gastos relacionados à compra de medicamentos e sim incluir todo o investimento com as operações, assistência técnica para diagnóstico e tratamento das enfermidades e compra de animais para substituição de indivíduos comprometidos (OTTE e CHILONDA, 2001). No Brasil, Grisi et al. (2014) estimaram que as perdas anuais de US\$7,11 bilhões devido ao impacto das endoparasitoses na produção de leite e ganho de peso dos animais.

O parasitismo por helmintos do trato gastrointestinal está intimamente relacionado a redução do bem-estar e desenvolvimento dos animais afetados. Ademais, diferentes autores apontam outros aspectos negativos da infecção por estes parasitas como o comprometimento do desempenho reprodutivo, do sistema imunológico, produção de leite e carne, redução do

ganho de peso e conversão alimentar (SOUZA et al., 2008; WEST et al., 2009). Particularmente em ovinos, além dos impactos anteriormente citados, observa-se redução na produção e qualidade da lã, reduzida resistência a outras enfermidades e a alta mortalidade de animais jovens devido ao parasitismo por helmintos do trato gastrointestinal, destacando-se o *Haemonchus contortus*, espécie altamente prevalente e patogênica devido ao seu hábito hematófago (KASSAI, 1999; FALZON et al., 2014).

Segundo Amarante (2001), a infecção por endoparasitas nem sempre resulta em doença, pois a maioria dos hospedeiros possui mecanismos imunológicos que possibilita manter a população de parasitos em controle. Isto corrobora com as observações de outros autores como Costa et al. (2004) e Souza et al. (2008), quando afirmam que as consequências do parasitismo muitas vezes passam despercebidas pelos produtores por cursarem de forma subclínica.

Entretanto, esta relação de equilíbrio entre hospedeiro-parasito é comumente quebrada por diversos fatores como, por exemplo, condições climáticas desfavoráveis ou estado fisiológico dos animais. Ainda, medidas de manejo inapropriadas como a criação intensiva de animais (altas lotações), transferência de animais para áreas de alto desafio e o uso incorreto de anti-helmínticos pelos pecuaristas acabam por promover maior desequilíbrio nesta relação, favorecendo os parasitos (AMARANTE, 2001).

Autores como Soutello et al. (2002) estimaram perdas de 53Kg em bovinos pela ausência de tratamento anti-helmíntico adequado. Por outro lado, Bianchin et al. (2007) registrou ganho de peso de 33 Kg em média em bovinos tratados com endectocida em comparação com animais não tratados. Em ovinos, Echevarria (1988) relatou uma perda entre 20 a 60% no ganho de peso dos animais e ocorrência de mortalidade entre 20 a 40% devido ao parasitismo.

Desta forma, pelo fato de refletir negativamente nos sistemas produtivos, o investimento em diagnóstico, prevenção e controle de nematódeos gastrointestinais se faz imprescindível. Ainda, é recomendável aliar o uso racional e correto dos tratamentos anti-helmínticos, a adoção de programas alternativos de controle parasitário a fim de prolongar a vida útil destes compostos nas propriedades e retardar o aparecimento de resistência parasitária (MOLENTO et al., 2011).

2.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Os nematódeos gastrointestinais são comumente observados em ruminantes em todo o mundo, principalmente em zonas temperadas e úmidas, provocando lesões que se estendem desde o abomaso até o intestino (COSTA, 2007). Tanto em pequenos como grandes ruminantes, estes parasitos ocasionam alterações digestórias, além de atraso no crescimento de animais jovens, diminuição na produção e ocasionalmente anemia (VIVEIROS, 2009).

Quando a relação parasita-hospedeiro se encontra em equilíbrio, há possibilidade destes coexistirem sem que o hospedeiro manifeste sinais clínicos de doença. Entretanto, diversos fatores podem quebrar este equilíbrio, dentre os quais, destacam-se fatores externos como as condições climáticas desfavoráveis e fatores inerentes ao animal, como, por exemplo, o estado fisiológico do mesmo (AMARANTE, 2001).

Devido as condições de umidade e temperatura favoráveis ao desenvolvimento das principais espécies de nematódeos, estes estão disponíveis praticamente durante todo o ano no Brasil, servindo como uma fonte contínua de infecção para os ruminantes (LIMA, 1989). As infecções parasitárias normalmente são mistas e compreendem diversas famílias e gêneros, sendo que os mais representativos pertencem a família *Trichostrongylidae*, com destaque para os gêneros *Cooperia*, *Haemonchus*, *Ostertagia* e *Trichostrongylus*, e família *Chabertiidae* representada pelo gênero *Oesophagostomum* (VIVEIROS, 2009).

Independente do sistema de exploração, alguns indivíduos são mais susceptíveis ao parasitismo devido a fatores como exposição prévia, fase do ciclo reprodutivo, comportamento, predisposição genética ou sensibilidade a parasitos. Por outro lado, devido às diferenças no que tange a patogenicidade dos helmintos, a carga parasitária necessária para causar doença clínica varia consideravelmente (SOUZA, 2013).

O ciclo evolutivo dos parasitos é direto, podendo-se observar duas fases distintas, uma exógena e outra endógena. A primeira inicia-se pela eliminação dos ovos pelo hospedeiro através das fezes, prolongando-se até a formação de larvas de terceiro estágio (L3) ou infectantes (URQUHART et al., 1996). A quantidade de ovos excretado dependente de fatores inerentes ao hospedeiro (idade, estado imunitário, consistência fecal) e da espécie de nematódeo em questão. Alguns gêneros são muito prolíficos, como é o caso de *Haemonchus* (5000-10000 ovos/dia), enquanto outros não atingem mais de 50 ovos/dia, como *Nematodirus* (DIAS, 2007).

O tempo transcorrido entre a eliminação dos ovos nas fezes até o desenvolvimento a L3 é variável, porém em condições ideais (26ª a 27°C, 80-100% de umidade), pode ocorrer em um período de cinco dias (RAMOS, 2013). As larvas em estágio L3 são dotadas de grande mobilidade em comparação as outras fases de desenvolvimento, sendo que possuem capacidade de se deslocarem em diversos planos: horizontal, sobre o solo e vertical, sobre as hastes das forragens e no sentido da profundidade do solo (GEVREY, 1971). Entretanto, alguns autores apontam que condições como índices pluviométricos podem estar fortemente relacionados com a sobrevivência destas larvas no ambiente, conforme demonstrado por Guimarães (1972), o qual não foi capaz de recuperar larvas de nematódeos gastrointestinais de bovinos em pastagens durante a estação seca do ano.

Para que ocorra a fase endógena do ciclo é necessário que as L3 estejam viáveis e sejam ingeridas pelos hospedeiros. Para tanto, certos fatores são importantes e influenciam no sucesso do desenvolvimento e migração das larvas, como: umidade, luminosidade, temperatura, altura e densidade da vegetação (ALMEIDA et al., 2005). A ingestão das larvas ocorre juntamente com o pasto ou a água, sendo que estas migram para o abomaso, intestino delgado ou intestino grosso, dependendo da espécie do parasito. Nos próximos 4 a 8 dias, ocorre a muda para L4, em nível da mucosa gástrica ou entérica, ou nas glândulas gástricas. Passados 14 dias, ocorre a muda para L5 ou adultos jovens, sendo que a produção de ovos inicia ao redor da terceira semana após a ingestão das primeiras larvas (URQUHART et al. 1996).

2.3 MÉTODOS DE CONTROLE E PROFILAXIA DA INFECÇÃO POR HELMINTOS EM RUMINANTES

A infecção por nematódeos do trato gastrointestinal determinam diversas perdas econômicas e produtivas conforme relatado anteriormente. Visando reduzir o número de larvas infectantes, desenvolveram-se diferentes métodos de controle, os quais podem ser classificados como químicos, imunológicos, de manejo e biológicos (JACSON, 2004). Dentre os métodos existentes, o mais difundido é o controle dos parasitos com emprego de anti-helmínticos (AMARANTE, 2004).

Nas últimas décadas, os anti-helmínticos pertencentes aos grupos dos benzimidazóis, dos imidazotiazóis e das lactonas macrocíclicas têm sido as drogas mais frequentemente

utilizadas (SUAREZ, 2002). Embora estes compostos tenham demonstrado um impacto positivo inicial durante uma década, atualmente existem diversos relatos de resistência dos parasitos aos tratamentos com estes compostos. Isto se deve à ausência de orientação técnica na escolha do composto a ser utilizado, aliado a execução de tratamentos de forma empírica, com excessos ou subdosagens, além da aplicação em épocas inadequadas, sem levar em consideração os aspectos epidemiológicos das doenças (CHARLES e FURLONG, 1996; WALLER et al., 1996, CEZAR et al., 2010).

Nos últimos 10-15 anos houve um aumento no interesse em novas alternativas para controle de nematódeos do trato gastrointestinal de animais de produção. Isto foi reflexo dos crescentes relatos de resistência parasitária, tanto em pequenos como grandes ruminantes, aliado ao tempo e custos envolvidos para o registro de novas drogas, pressão do mercado consumidor por produtos livres de resíduos químicos e a crescente preocupação com o efeito das drogas antiparasitárias sobre o meio ambiente (WALLER, 1997, LARSEN, 2000; CEZAR, CATTO e BIANCHIN, 2008).

Uma das alternativas ao controle químico tem sido a seleção de animais geneticamente resistentes às infecções e aos seus efeitos, contribuindo para reduzir a contaminação ambiental e o uso de compostos químicos (MILLER e GRAY, 1996). Sabe-se que a resistência natural aos parasitos é uma característica herdável, sendo que estimativas dos coeficientes de herdabilidade em ovinos variam de 0,3 a 0,5 e em bovinos de aproximadamente 0,3 (BARGER, 1989; GASBARRE et al., 2001). Ainda, alguns trabalhos demonstram uma maior resistência de certas raças como, por exemplo, Santa Inês e Crioula Lanada, apontando estas como alternativas para cruzamentos e seleção de animais visando o aumento da produtividade sem aumentar a susceptibilidade à verminose (BRICARELLO et al., 2004, ROCHA et al., 2004, AMARANTE et al., 2009).

Particularmente em ovinos, por serem altamente prejudicados pela Hemoncose, desenvolveu-se o método FAMACHA, o qual reside sobre o princípio de que uma minoria de animais dentro de uma população alberga a maioria dos parasitos, sendo possível fazer o tratamento somente destes indivíduos (MOLENTO et al., 2013). Desta forma, é possível reduzir significativamente a utilização de quimioterápicos, além de permitir a manutenção de uma parcela abundante da população em refúgio, ou seja, sem exposição às drogas, desacelerando o processo de seleção parasitária as mesmas (VAN WYK, 2001).

Outras opções compreendem o uso de fitoterapia, homeopatia, controle biológico (fungos nematófagos, besouros coprófagos), vacinas e manejo de pastagens (CEZAR, CATTO, BIANCHIN, 2008; MOLENTO et al., 2013). Entretanto, devido a possibilidade de variabilidade dos princípios ativos e, conseqüentemente, dificuldade de reprodutibilidade das pesquisas, o desenvolvimento de fitoterápicos para o controle parasitário ainda está limitado. No mesmo sentido, estudos com o uso da homeopatia populacional para auxílio no manejo sanitário de rebanhos são relativamente recentes, embora alguns destes demonstrem resultados positivos, ainda são necessárias mais pesquisas em diferentes locais e com raças diferentes (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; VERÍSSIMO, 2008).

O controle biológico constitui uma das formas mais sustentáveis de combate às parasitoses, possibilitando a redução da frequência de tratamentos com anti-helmínticos e assume um papel de grande importância em sistemas de produção que visam mercados de produtos orgânicos (FONTENOT et al., 2013, CEZAR, CATTO, BIANCHIN, 2008). Contudo, os métodos atuais que englobam esta categoria de controle dos helmintos ainda esbarraram no custo/benefício, aplicabilidade e segurança na obtenção de resultados (WALLER, 2002). Da mesma forma, o desenvolvimento de vacinas encontra muitas dificuldades mercadológicas, como a ausência de vacinas de amplo espectro, praticidade de uso, efeito duradouro para minimizar o manejo, além de custos elevados de produção, transporte e armazenamento (SONSTEGARD e GASBARRE, 2001).

O manejo das pastagens pode auxiliar de forma bastante significativa no controle das endoparasitoses. Este pode ser realizado através do pastejo rotacionado, alternância entre as atividades agrícolas e pecuárias, alternância entre espécies de herbívoros ou a implantação de novas áreas de pastagem. Todas estas práticas, visam o melhor aproveitamento das áreas de pastejo e a diminuição da taxa de contaminação das pastagens. Entretanto, o período que a pastagem permanece em descanso muitas vezes não é suficiente para ocorrer a descontaminação significativa desta e, além disso, este sistema permite uma maior taxa de lotação, podendo expor os animais a um grande número de larvas infectantes. Logo, deve-se avaliar se a propriedade conta com uma estrutura adequada para realizar este tipo de manejo e o custo/benefício envolvido nesta prática (AMARANTE, 2005; STROMBERG e AVERBECK, 1999; CEZAR, CATTO, BIANCHIN, 2008).

2.4 RESISTÊNCIA PARASITÁRIA

Após a introdução das drogas anti-helmínticas no mercado mundial em 1940, observou-se o aumento gradativo no uso das mesmas e simultaneamente o surgimento de novas drogas. Com o surgimento dos compostos endectocidas entre 1980 e 1990, observou-se o emprego destes produtos em larga escala (NEVES, 2014).

Entretanto, vários fatores vieram a comprometer a eficácia destes quimioterápicos ao longo dos anos, dentre estes, destaca-se a ampla gama de fármacos disponíveis no mercado, com diferentes princípios ativos, formulações, concentrações, vias de administração e nomes comerciais, o que acaba por confundir os produtores, os quais, utilizam critérios aleatórios na compra e aplicação destes compostos nos seus rebanhos (McKELLAR e JACKSON, 2004). Além disso, acresce-se o uso intensivo destes anti-helmínticos, aliado a alternância incorreta de bases químicas, diagnóstico incorreto e alta frequência de tratamentos, acarretando no aparecimento de diversos casos de resistência parasitária em ruminantes domésticos em todo mundo (JACKSON e COOP, 2000; SOUZA et al., 2008; CONDI et al., 2009).

Esta é definida como a capacidade hereditária de uma população parasitária em reduzir sua sensibilidade à ação de uma droga (FIEL et al., 2003). O surgimento de isolados resistentes aos diferentes anti-helmínticos é entendida como uma seleção natural de uma população de parasitas que, originalmente, contém alguns indivíduos com a capacidade genética de sobreviver ao tratamento. Ao se executar sucessivamente este, ocorre a eliminação dos indivíduos sensíveis e, desta forma, a próxima geração consistirá da progênie daqueles poucos parasitos que sobreviveram, sendo que muitos destes terão herdado a capacidade de sobrevivência à exposição anti-helmíntica (GRIFFITHS et al., 1998).

A resistência parasitária pode ser classificada em lateral, cruzada ou múltipla. Denomina-se resistência lateral aquela que se desenvolve quando, a partir da pressão de seleção exercida por fármaco de determinada classe química, ocorre, concomitantemente, o desenvolvimento de resistência para outro(s) composto(s) desta mesma classe química. A resistência cruzada corresponde aquela que se dá entre princípios ativos pertencentes a grupos químicos distintos. Ela ocorre quando, ainda que indiretamente, a pressão de seleção exercida por determinado composto sobre a população parasitária provoca, concomitantemente, o desenvolvimento de genótipos resistentes a outra(s) droga(s) de grupo(s) químico(s) distinto(s) ao primeiro. Quando existem indivíduos resistentes a dois ou mais grupos de anti-helmínticos quimicamente distintos e com mecanismos de ação diferentes, diz-se que a

resistência é múltipla ou cruzada inespecífica (van WYK et al., 1997; SANGSTER, 1999; MOTTIER e LANUSSE, 2001).

Apesar de os principais fatores responsáveis pelo rápido surgimento da resistência serem operacionais, alguns fatores genéticos também são importantes (MARTIN, 1987). Sangster (2001) e Coles (2005) apontam como fatores determinantes na taxa de seleção: a dominância dos alelos para resistência, o número e a frequência inicial dos genes envolvidos, a diversidade genética da população, a relativa adaptabilidade dos organismos resistentes e a oportunidade de recombinação gênica.

Após um período relativamente curto da introdução dos compostos anti-helmínticos no mercado, o desenvolvimento de resistência por parte dos parasitas a estas drogas foi reportado em diversas regiões, conforme demonstrado na Tabela 1 (De GRAEF et al., 2013). Particularmente no Brasil, os primeiros relatos de resistência aos compostos anti-helmínticos em ovinos foram realizados por Dos Santos e Gonçalves (1967) e em bovinos por Pinheiro e Echevarria (1990), não faltando outros relatos sobre nematódeos resistentes aos principais fármacos comercializados e utilizados no país desde então. Na região sul, detectou-se resistência no estado do Paraná (THOMAZ-SOCCOL et al., 2004), Santa Catarina (RAMOS et al., 2004) e no Rio Grande do Sul (ECHEVARRIA e TRINDADE, 1989; ECHAVARRIA et al., 1996, CEZAR et al., 2010). Outros estudos apontaram a disseminação da resistência parasitária em todo o país, como, por exemplo, demonstrado por diversos autores nos estados de Pernambuco, Bahia, Alagoas, Ceará e Mato Grosso do Sul (CHARLES et al., 1989; VIEIRA e CAVALCANTE, 1989; MELO et al., 1998, MELO e BEVILAQUA, 2002; VIEIRA et al., 1992; SCZESNY-MORAES et al. 2010).

Tabela 1- Classe dos diferentes compostos anti-helmínticos para ruminantes, ano de introdução destes fármacos no mercado e respectiva data de relato de resistência.

Classe helmíntica	anti-	Nome do composto	Ano de introdução no mercado	de Relato de resistência	de Referência
Compostos heterocíclicos		Fenotiazina	1940	1957	(Leland et al., 1957)
		Piperazina	1954	1966	(Drudge et al., 1988)
Benzimidazóis		Tiabendazole	1961	1964	(Drudge et al., 1964)
		Cambendazol	1970	1975	(Berger, 1975)
		Oxifendazol	1970	1985	(Drudge et al., 1985)
		Mebendazol	1972	1975	(Berger, 1975)
		Albendazol	1972	1983	(Cawthorne e Whitehead, 1983)
		Fenbendazol	1975	1982	(Boersema e Lewing van der Wiel, 1982)
		Oxfendazol	1976	1981	(Le jambre et al., 1981)
		Triclabendazol	1983	1998	(Mitchell et al., 1998)
Imidazotiazóis e tetrahidropirimidinas		Levamisol	1970	1979	(Sangster et al., 1979)
		Pirantel	1974	1996	(Chapman et al., 1996)
		Morantel	1970	1979	(Sangster et al., 1979)
Lactonas macrocíclicas		Abamectina	Final de 1970	2001	(Wooster et al., 2001)
		Ivermectina	1981	1988	(van Wyk e Malan, 1988)
		Moxidectina	1991	1995	(Leathwick, 1995)
		Doramectina	1993	2007	(Borgsteede et al., 2007)
		Eprinomectina	1996	2003	(Loveridge et al., 2003)
Derivados acetónitros	amino-	Monepantel	2009	2013	(Scott et al., 2013)

2.4.1 Métodos de diagnóstico da resistência anti-helmíntica

2.4.1.1 Métodos “*in vivo*”

2.4.1.1.1 Teste de redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF)

Este é o método mais amplamente utilizado para a detecção da resistência parasitária de nematódeos do trato gastrointestinal de ruminantes. É um teste simples, de execução relativamente fácil e que pode ser aplicável a todos os grupos de anti-helmínticos, independente do mecanismo de ação. A eficácia dos compostos é estimada por meio da comparação das contagens de ovos de nematódeos nas fezes antes e depois o tratamento, sendo o tempo entre estas duas coletadas determinado pelo grupo químico dos anti-helmínticos testados (COLES et al. 2006, FORTES e MOLENTO, 2013).

Esta prova pode ser aplicada em animais infectados naturalmente ou experimentalmente, utilizando-se a dose do anti-helmíntico recomendada vide bula. A resistência parasitária é confirmada se a eficiência das drogas for menor que 95% quando calculada pelas médias aritméticas dos grupos testados conforme a fórmula proposta por COLES et al. (1992) (Eficácia = $(1 - [\text{OPG pós tratamento} / \text{OPG pré tratamento}]) \times 100$). Ressalta-se que devem haver animais suficientes para produzir resultados estatisticamente significativos (COLES et al., 2006).

Geralmente, um grupo controle é incluído no teste de redução da contagem de ovos nas fezes, para monitorar quaisquer mudanças na contagem de ovos de nematoides que possam ocorrer durante o período de teste. Entretanto, os resultados do teste podem não estimar de forma acurada a eficácia anti-helmíntica pelo fato de que a produção de ovos de nematoides nem sempre se correlaciona de forma correta com o número de parasitas reais (TAYLOR; HUNT; GOODYEAR, 2002). Desta forma, alguns autores como Neves et al. (2014) recomendam que o teste seja realizado avaliando-se as médias aritméticas do mesmo grupo pré- e pós-tratamento, pois os resultados gerados são mais fidedignos e apresentam menores intervalos de confiança. Ressalta-se, que este teste somente é confiável se mais de 25% dos nematódeos for resistente, apresentando assim baixa habilidade em detectar baixos níveis de resistência (JACKSON, 1993; MARTIN; ANDERSON, JARRETT, 1989).

2.4.1.1.2 Teste controlado

Consiste em outro método de diagnóstico *in vivo* apresentando melhores resultados que o TRCOF por avaliar a taxa de infecção e o efeito dos compostos de forma mais

condizente com a realidade. Neste teste, podem ser utilizados animais naturalmente ou experimentalmente infectados, os quais são separados em grupos (tratado (s) e controle) e a dose do anti-helmíntico utilizado deverá ser a dose terapêutica recomendada pelo fabricante, sendo esperada uma eficácia $\geq 99\%$ (FORTES e MOLENTO, 2013).

Após a necropsia dos animais, realiza-se a contagem dos parasitos presentes no hospedeiro. Então, observa-se a redução ou eliminação completa dos helmintos, e estima-se a eficácia do tratamento, sendo que se esta for menor que 95%, confirma-se a resistência anti-helmíntica. Se houver uma baixa prevalência de nematódeos resistentes, estes podem não ser detectados devido a pequenos aumentos na dose, que pode causar a morte de 95% dos parasitos. Desta forma, como a dose registrada geralmente é maior do que a real dose efetiva necessária para remoção dos helmintos, algum ajuste deve ser feito para realização do teste controlado. Ainda, destaca-se que este teste é normalmente utilizado em instituições de pesquisa para fins específicos, envolvendo mão de obra qualificada e elevado custo de execução (COLES et al., 2006; COSTA; BORGES, 2013).

2.4.1.2 Métodos “*in vitro*”

2.4.1.2.1 Teste de eclodibilidade de ovos –TEO

Este teste consiste na incubação de ovos não desenvolvidos em concentrações crescentes do anti-helmíntico, podendo ser usado com sucesso para detecção da resistência aos benzimidazóis, uma vez que a ação destes fármacos impede o embrionamento e eclosão dos ovos de nematódeos (SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009). A maioria dos estudos que avaliaram o uso deste teste para detecção de nematódeos resistentes aos benzimidazóis mostraram uma boa concordância com os resultados obtidos com o TRCOF em ovinos e bovinos, demonstrando que esta é uma alternativa prática e economicamente viável (DÍEZ-BAÑOS et al., 2008; DEMELER et al., 2012).

A droga de escolha para realização do TEO é o tiabendazol por possuir uma solubilidade relativamente elevada em água. A longo prazo, a sua estabilidade em soluções de DMSO não é conhecida, mas quando as diluições são realizadas em água, pode haver uma redução das concentrações esperadas. Como a sensibilidade do TBZ diminui na medida em que os ovos se desenvolvem, as fezes destinadas ao teste devem ser manipuladas até três horas após a coleta ou armazenadas anaerobicamente, sendo este fator, muitas vezes, responsável por limitar o uso deste método no diagnóstico de rotina (Coles et al., 2006).

Alguns fatores que podem influenciar nos resultados obtidos com o TEO incluem: diferentes fontes de água (destilada, desionizada ou água da torneira); grau de limpeza dos ovos (presença de detritos); e o método de dissolução da amostra (DMSO e água, por exemplo). Pelo fato dos ovos serem muito frágeis e sensíveis a variação térmica, a detecção de tais fatores é imprescindível para que os diferentes laboratórios possam obter resultados igualmente eficazes (FORTES e MOLENTO, 2013).

2.4.1.2.2 Teste de desenvolvimento larvar –TDL

Desde sua primeira descrição por Coles et al. (1988) para detecção da resistência aos benzimidazóis e levamisol, muitas variações do TDL foram publicadas descrevendo seu uso para o diagnóstico da resistência de vários anti-helmínticos em nematódeos de ovinos (HUBERT e KERBOUEF 1992, GILL et al., 1995). Embora exista um teste comercial (*DrenchRite1*®) desenvolvido na Austrália para determinar a resistência contra o levamisol, benzimidazóis e lactonas macrocíclicas em nematódeos de ovinos e caprinos, este é pouco utilizado na rotina devido ao seu preço elevado.

O TDL em microágar foi descrito inicialmente por Coles et al. (2006) e assim como o TEO, encontrou-se boa concordância entre os dados obtidos após a realização do TRCOF (LEATHWICK et al., 2006; VÁRADY et al., 2006). Porém, ao contrário do TEO, para este teste pouco importa a idade dos ovos presentes nas fezes, uma vez que as larvas são obtidas para diferenciação entre gêneros. Logo, a principal vantagem deste método é a sua capacidade de avaliação simultânea de resistência a várias drogas do grupo dos benzimidazóis, lactonas macrocíclicas e levamisol em uma mesma placa (FORTES e MOLENTO, 2013).

2.4.1.2.3 Teste de motilidade larvar e migração larvar

Os testes de motilidade e migração larvar são utilizados para avaliar o efeito de compostos anti-helmínticos que causam paralisia na musculatura somática dos parasitos. A motilidade das larvas pode ser avaliada por meio de observação, detectores eletrônicos (instrumentos que medem o grau de refração da luz e fornecem um índice de motilidade) ou migração através de peneiras. Devido à grande necessidade de um diagnóstico mais acurado para resistência as lactonas macrocíclicas, tem-se estimulado o desenvolvimento de testes como este, para determinação da motilidade dos helmintos (FORTES e MOLENTO, 2013).

Outros testes, os quais mensurem a paralisia larval, foram desenvolvidos para detecção da resistência ao levamisol e morantel (MARTIN e LeJAMBRE, 1979). Alguns autores como

Sutherland & Lee (1990) descreveram uma modificação deste método para detecção de resistência ao tiabendazol; na sequência Gill et al. (1991) e Gill e Lacey (1998) relataram um testes de migração para avaliação da resistência de *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* e *T. circumcincta* à ivermectina, porém a avaliação da motilidade das larvas foi demasiadamente subjetiva. Desta forma, foi feita a avaliação e validação do uso de peneiras e ágar a fim de separar larvas de terceiro estágio (L3) migrantes/sobreviventes e não migrantes/mortas para uma quantificação confiável (KOTZE et al., 2006). Embora outras publicações tragam variedades deste teste utilizando diferentes drogas e espécies de nematódeos, não se observaram dados quanto a repetibilidade dos resultados obtidos dentro de um mesmo laboratório ou a reprodutibilidade destes entre laboratórios distintos (FORTES e MOLENTO, 2013).

O teste de inibição da migração larvar (TIML) foi padronizado na Europa (DEMELER et al., 2010), a fim de realizar a detecção de resistência à ivermectina, permitindo a separação das larvas móveis das imóveis por meio da migração através de peneiras. Embora este protocolo tenha demonstrado resultados altamente reprodutíveis, a aplicabilidade deste no campo, onde as infecções normalmente são mistas, ainda precisa ser melhor estudado, sendo necessários estudos que possibilitem a diferenciação das espécies presentes (KOTZE et al., 2006).

Um estudo conduzido por DEMELER et al. (2012), demonstrou boa concordância entre os resultados obtidos a partir do TIML com o TRCOF em bovinos. Este método também foi utilizado para avaliar a eficácia *in vitro* de ivermectina e moxidectina em isolados de *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp. (ALMEIDA et al., 2013; FORTES et al., 2013). Comparando-se o TDL ao TIML, este último é um teste simples e fácil, passível de ser realizado na maioria dos laboratórios uma vez que, requer somente larvas de terceiro estágio, as quais podem ser facilmente obtidas a partir de coproculturas e podem ser mantidas em geladeira até seu uso (DEMELER et al., 2010).

2.4.3 Técnicas moleculares para diagnóstico da resistência

Atualmente existe grande fomento para o desenvolvimento de métodos moleculares de diagnóstico da resistência anti-helmíntica. Porém, pelo fato de as populações apresentarem um caráter extremamente poligênico, existe um desafio contínuo por parte dos pesquisadores

para descobrirem mecanismos de resistência as drogas e divulgar um ou mais candidatos a marcador específico (FORTES e MOLENTO, 2013).

Sabe-se que o principal mecanismo molecular associado a resistência aos benzimidazóis consiste em variações genóticas na forma de polimorfismos únicos de nucleotídeos (SNPs- *single nucleotide polymorphism*) nos códons 167, 198 e 200 no isotipo 1 do gene da β -tubulina (ARAFÁ et al., 2016). O polimorfismo observado na posição 200 envolve uma transversão de T para A (códon TTC modifica-se para TAC), levando a substituição de uma fenilalanina por uma tirosina. Da mesma forma, demais transversões levam a substituição de uma fenilalanina por uma tirosina na posição 167 (TTC por TAC) e a substituição do glutamato por alanina (GAA por GCA) na posição 198. Curiosamente, as SNPs observadas nas regiões 200 e 198 também estão associadas a resistência à lactonas macrocíclicas (MOTTIER e PRICHARD, 2008; ARAFA et al. 2016).

Os SNPs nas regiões 200 e 167 foram identificados em isolados de *H. contortus*, *T. colubriformis* e *O. circumcincta*, já a trasversão no códon 198 foi observada em isolados de *H. contortus* resistentes aos benzimidazóis (SILVESTRE e HUMBERTO, 2000, SILVESTRE e CABARET, 2002; RUFENER et al., 2009). Desta forma, segundo Silvestre e Cabaret (2002) as mutações observadas nestes respectivos códons podem ser utilizadas como marcadores para detecção a resistência aos compostos do grupo dos benzimidazóis nestes parasitos, sendo importante conhecer os efeitos da associação entre os SNPs e o nível de homozigose/heterozigose presente.

Ainda, para a determinação da resistência, resultados promissores foram obtidos através do pirosequenciamento, técnica esta que se mostrou rápida e adequada para detecção de múltiplos SNPs (SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2007). Este método aliado ao PCR em tempo real possibilita a quantificação dos alelos de resistência/susceptibilidade no DNA extraído de *pool* de larvas de nematódeos, permitindo uma avaliação sensível, confiável e economicamente acessível do nível de resistência em populações de *H. contortus* no campo (HÖGLUND et al., 2009). Além disso, para detecção de mutações no códon TAC na posição 200 técnicas de PCR-RFLP (*restriction fragmente length polymorphism* ou polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) foram desenvolvidas para *H. contortus* e *T. circumcincta* (TIWARI et al., 2006; SHAYAN et al., 2007).

A base molecular da resistência para as demais moléculas como ivermectina e levamisol ainda é motivo de muita atenção e estudo, sendo que não existem testes disponíveis

para todas espécies de parasitos para tais compostos (FORTES e MOLENTO, 2013). Em *Caenorhabditis elegans* foi relatado que quatro conjuntos de proteínas contribuem para resistência deste parasita ao levamisol, entretanto, para outras espécies, muitos aspectos ainda necessitam de esclarecimento quanto ao processo de resistência a este composto, sendo que a principal suspeita envolve a perda de sensibilidade nas subunidades UNC38, UNC29, UNC63, LEV1 e ACR13 do receptor colinérgico em outros locais dos parasitos (PRICHARD e TAIT, 2001; MARTIN e ROBERTSON, 2007; MARTIN et al., 2012). Para ivermectina, estudos recentes apontam para o envolvimento dos canais de cloro, da β -tubulina e da glicoproteína-p como os principais fatores associados ao mecanismo de resistência em *H. contortus* e *T. colubriformis*. A função da glicoproteína-p consiste em retirar produtos nocivos do interior ou da parede da célula de vários organismos através do efluxo celular ativo (DANAHER et al., 2006). Alguns estudo como de Xu et al.(1998) observaram que os níveis de RNA mitocondrial de glicoproteína-p em *H. contortus* foram mais significativos em isolados resistentes à ivermectina em detrimento aos susceptíveis. Além dos fatores citados anteriormente, a resistência a este último composto está relacionada a proteínas associada à resistência a múltiplas drogas juntamente com membros da família de transportadores do tipo ABC (XU et al., 1998; PRICHARD, 2007)

2.5 CARACTERIZAÇÃO DE *HAEMONCHUS* spp. EM BOVINOS

Devido ao seu clima subtropical/tropical, no Brasil os bovinos são parasitados por uma diversidade de helmintos, dentre os quais, destacam-se: *Haemonchus placei*, *Haemonchus similis*, *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus axei*, *Cooperia punctata*, *Cooperia spatulata*, *Cooperia pectinata*, *Trichostrongylus columbriformis*, *Bunostomum phlebotomum*, *Oesophagostomum radiatum*, *Trichuris discolor* e *Trichuris globulosa* (CATTO et al., 1993; AMARANTE et al., 1997; ROCHA et al, 2008; CEZAR et al., 2010). Dentre estes, os gêneros *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp. predominam numericamente sobre os outros, porém, este último, é um dos mais prejudiciais a esta espécie animal devido ao seu hábito hematófago, acarretando em anemia e redução no ganho de peso dos animais (GENNARI et al., 1991).

Inicialmente, houve um grande debate entre pesquisadores a respeito da relação entre *H. contortus* e *H. placei* (CHAUNDHRY et al., 2015). Neste sentido, alguns autores como

Gibbons (1979), chegaram a considerar *H. contortus* e *H. placei* como uma única espécie de parasito. Entretanto, estudos subsequentes, os quais avaliaram características morfológicas, moleculares e genéticas, evidenciaram que se tratavam de espécies diferentes (CHAUNDHRY et al., 2015). Segundo Amarante et al. (1997) e Le Jambre e Royal (1980), existem diferenças cariotípicas visualizadas em DAPI durante a metáfase, sendo que todos os cromossomos de *H. contortus*, incluindo o cromossomo X, são de tamanho similar, enquanto no *H. placei* o cromossomo X é maior que os autossômicos.

Para Blouin et al. (1997), existem evidências moleculares que diferenciam as duas espécies baseadas no estudo de sondas (rDNA *external-spacer region*) e clonagem do DNA genômico, além do sequenciamento da região ITS-2 (*second internal transcribed spacer region*). Ainda, destacam-se estudos de marcadores RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) realizados em localidades de Maurîtânia em amostras de *H. contortus*, *H. placei* e *H. longistipes*, além do uso de diferenças sequenciais no rDNA NTS (*non-transcribed spacer region*) e no DNA mitocondrial (mtDNA), particularmente no gene da NADH desidrogenase subunidade 4 (ND4) (STEVENSON et al. 1995; ZARLENGA et al., 1994a; CHRISTENSEN et al., 1994).

Em locais em que existe o pastejo simultâneo de bovinos e ovinos, a predileção do *Haemonchus contortus* pela espécie ovina é evidente (AMARANTE et al., 2017). No entanto, infecções cruzadas poderão ocorrer em áreas onde as duas espécies de *Haemonchus* spp. são simpátricas, além desta situação favorecer a produção de híbridos pelo cruzamento destes parasitos (HUSSAIN et al, 2014). Neste sentido, alguns autores como Le Jambre e Royal (1980) e Chaudhry et al. (2015) investigaram de modo mais acurado estes parasitos e demonstraram que os híbridos produzidos pelo cruzamento de *H. placei* e *H. contortus* apresentam baixa fecundidade ou esterilidade, devido a anormalidades meióticas. Mesmo assim, existem evidências da ocorrência de fluxo gênico nestes espécimes, havendo a passagem de características importantes, como, por exemplo, a resistência a determinados anti-helmínticos (CHAUDHRY et al., 2015).

Assim, além dos prejuízos provocados pelo parasitismo em si pelo gênero *Haemonchus*, diversos estudos demonstram que estes nematódeos apresentam resistência aos mais diferentes quimioterápicos utilizados para seu controle (MILLER e GRAY, 1996; CEZAR et al., 2010). Salvos fatores associados a condições intrínsecas aos animais e ao manejo dos próprios anti-helmínticos, a falha destes compostos em combater as infecções

parasitárias pode estar relacionada a potencial diversidade genética presente na espécie, o que contribui para o surgimento de linhagens resistentes (URQUHART et al.1996).

Estudos como de Redman et al. (2008) apontam que a espécie *Haemonchus contortus* apresentam alta variabilidade genética tanto no DNA nuclear como mitocondrial, o que já foi comprovado através de SNPs, elementos de inserção dos transposons e marcadores microssatélites. No mesmo sentido, autores como Brasil et al. (2012) e Chaudhry et al. (2014) encontraram SNPs em alguns espécimes de *Haemonchus placei* associadas a resistência aos benzimidazóis, sugerindo que esta problemática está se tornando cada vez mais frequente nesta espécie de parasito altamente patogénico para bovinos. O alto fluxo gênico observado entre populações desta espécie de nematódeo resulta da troca constante de animais entre propriedades, além do seu alto potencial biótico, elevado tamanho efetivo populacional e rápido ciclo de vida (ECHEVARRIA e TRINDADE, 1989; REDMAN et al. 2008; BRASIL et al. 2012).

Desta forma, devido a indiscutível importância desta parasitose em termos produtivos, além da plasticidade fenotípica apresentada por este gênero de nematódeo e demais fatores discutidos anteriormente, a correta identificação deste é imprescindível. Mesmo que existam problemas na padronização de técnicas para diferenciação destas espécies, estudos neste sentido se fazem importantes para se definirem estratégias de controle e conhecer aspectos mais precisos a respeito da epidemiologia desta enfermidade nas diferentes regiões produtoras de bovinos no Brasil (POULIN, 1997; AMARANTE, 2011).

3. CAPÍTULO I – Artigo científico

Este capítulo originou um artigo científico que foi aceito para publicação na Parasitology Reseach

Economic viability of anthelmintic treatment in naturally infected beef cattle under different nutritional strategies after weaning

Fernanda Ramos^{a,*}, Camila Balconi Marques^a, Caroline Zamperete Reginato^a, Fernando de Souza Rodrigues^a,

Luciana Pötter^b, Luis Antônio Sangioni^a, Fernanda Silveira Flôres Vogel^a

^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 Departamento de Zootecnia, UFSM, Santa Maria, RS, Brazil.

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

E-mail address: fernandamos_7@yahoo.com.br (Ramos, F.)

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of treatment with different anthelmintic compounds on the productivity of naturally infected calves and the economic viability of these treatments within extensive breeding system properties with different nutritional strategies after weaned. For this propose, four farms which presented 42-60 calves naturally infected by gastrointestinal nematodes were selected. Calves were distributed into 6 groups (of 7-10 animals) per farm and treated with ivermectin 1%, ivermectin 3.15%, eprinomectin 5%, levamisole 7.5%, albendazole 15%, and control group (no treatment). These animals were evaluated during an experimental period of 150 days. Levamisole 7.5% presented the best capacity for reduction egg per gram of feces (EPG) counts in all herds evaluated, followed by albendazole 15% and eprinomectin 5%. Parasite resistance to multiple drugs was found in all herds, especially in genera *Cooperia*, *Haemonchus*, *Oesophagostomum*, and *Trichostrongylus*. Differences in weight gain and EPG reduction percentages provide, at farm 1, a gap of US \$285.06 between levamisole and ivermectin 3.15% groups. The same occurred for farm 3 for levamisole and ivermectin 1%, with a difference of US \$399.37 due to final weight gain in these groups. For farms 2 and 4, the ivermectin 3.15% and control groups were the most profitable respectively, which were unexpected results possibly influenced by variables not measured during the experimental period. This study suggested that anthelmintic treatments should always precede an efficacy test to ensure adequate control of the infection by gastrointestinal nematodes, once these are demonstrated to be the most profitable in adequate breeding conditions.

Key words: anthelmintic resistance, cost-benefits, gastrointestinal nematodes, beef cattle

1. Introduction

Considering the way that ruminants are raised in Brazil, it is not unusual that these animals are infected by gastrointestinal (GI) nematodes that are commonly present in the grazing areas. Infections caused by these parasites provide important economic losses due to the reduction of productive indexes, compromising the capital invested in inputs and genetics of the herd, as well as being able to cause the involuntary dismissal of individuals (Amarante, 2004; Stotzer et al., 2014).

In recent years, many farmers have been seeking different strategies to minimize losses related to parasitism by GI nematodes, including improvement of animal genetics, nutrition, and grazing management (Borges et al., 2013; Neves et al., 2014). However, the main tool used to control these parasites is still the use of broad-spectrum anthelmintics. Therefore, an increase in cases of low efficacy of these products has been reported in Brazil and different countries due to the development of resistance by the nematode populations (Souza et al., 2008; Condi, Soutello, Amarante, 2009; Cezar et al. 2010; Miller et al., 2012).

In 2014, Grisi et al. demonstrated that the potential losses associated with the control of GI nematodes may exceed USD 7 million in both beef and dairy cattle. Furthermore, Fazzio et al. (2014) observed, after a period of 126 days of evaluation, a deleterious effect on weight gain of ivermectin-treated animal due to the resistance of *Cooperia* spp. and *Haemonchus* spp. in these animals.

Thus, the aim of this study was to verify the effect of treatment with different anthelmintic compounds on the productivity of naturally infected animals and the economic viability of these treatments within extensive breeding system proprieties of beef cattle with different nutritional strategies after weaned.

2. Material and methods

2.1. Farms and animals

The study was conducted on four farms located in 3 counties of the central region of the state of Rio Grande do Sul: São Gabriel (2 farms), Dilermando de Aguiar (1 farm), and Restinga Sêca (1 farm).

Preliminarily, herds were selected based on location and previous consent by the farmers. Furthermore, in order to be included in the study, the farms should use extensive systems to raise beef cattle, the presence of *Bos Taurus/Bos indicus* crossbred calves (females and castrated males aging from 7 to 9 months), and have 42-60 animals per farm with EPG counts of ≥ 200 . It was also important that the animals remained without any

anthelmintic treatment 60 days before the experimental period. Calves were weaned approximately six months after birth and were managed according to the forage availability of the farms during the study execution. The use of animals was approved by the Committee of Ethics in Animal Experimentation of the Federal University of Santa Maria under protocol no. 7650140817.

2.2 Forage management during the experimental period

During the experimental period, the nutritional plan made by the farm owners was followed. The experimental period ranged from March to November 2017, which covers periods of food supply with low quantity and quality, so the farmers adopted different nutritional strategies to go through this period after weaned of the animals. On farm 1, from D0 to D30, the animals were kept in a Tifton (*Cynodon* spp.) pasture and were later transferred to white oats (*Avena sativa*) and Italian ryegrass (*Lolium* spp.) pasture. On farm 2, the animals were kept in the native grazing areas throughout all the experimental period and received a supplementation with 18% protein. On farms 3 and 4, the animals were maintained from D0 to D90 in Italian ryegrass (*Lolium* spp.) and white oats pasture (*Avena sativa*), being transferred to native grazing areas on D90 to D150 due to the alternation between livestock and agricultural activities. In all farms, the animals had water and mineral supplementation *ad libitum* during the experimental period.

2.3 Anthelmintic treatments historic

For further evaluations, once the resistance status of the anthelmintic compounds used in this study was obtained, it was acquired more information about anthelmintic use with the farmers. For this, it was obtained the historic of anthelmintic use on beef cattle in the past 5 years and checked which of those compounds are the most used for the treatment of the animals nowadays. This will allow us to understand some results and get better information for classifying the anthelmintic resistance status at the farms as: lateral, crossed or multiple resistant.

2.4 Anthelmintic treatment

At all farms, five commercially available anthelmintic compounds were tested, being administered by a veterinarian participant of the study following the manufacturer's recommendations. The anthelmintic drugs used were: ivermectin 1% (0.2mg/kg, subcutaneous, Ivomec ®, MERIAL), ivermectin 3.15% (0.63 mg/kg,

subcutaneous, Ivomec Gold ®, Merial), eprinomectin 5% (1 mg/kg, subcutaneous, LongRange™, Merial), levamisole 7.5% (3.75 mg/kg, subcutaneous, Ripercol L® Zoetis), albendazole 15% (3.4 mg/kg, subcutaneous, Agebendazol® Agener União). During the entire experimental period, an untreated group was kept as control at each farm for monitoring natural changes in the evaluated parameters.

2.5 Experimental groups, fecal analysis and weighing of animals

Fecal samples were collected directly from the rectum of each calf 2 days prior to treatment (D-2) and after 14 days, for assessing the efficacy of the treatments according to the recommendations of Coles et al. (2006). All samples were collected in plastic bags, labeled, and kept in isothermal boxes for the transport to the laboratory. Once they arrived at the laboratory, the samples were immediately processed or stored at 10° C for up to 12 h after collection as recommended by McKenna (1998). This same procedure was repeated on day 30(D+30), 60 (D+60), 90 (D+90), 120 (D+120), and hundred and 150 (D+150) after the treatment, for evaluation of the EPG dynamics of the animals of all experimental groups.

For EPG counts, a McMaster modified technique with a sensitivity of 50 EPG was performed. Animals that had an EPG count ≥ 200 on D-2 were selected. At all farms, the animals were distributed into six randomized blocks based on EPG and weight before the treatment. In addition, at farms 1, 2, and 3 where there was the presence of castrated males and females, the genders of the animals were considerate for group formation, being these distributed as homogeneously as possible in experimental groups according to the availability of animals. At farm 4, there were only females.

Five of these groups received one of the different anthelmintic compounds, and one group remained untreated during the experimental period of 150 days. The number of animals per experimental group ranged from 7 to 10 animals, according to the availability of calves at each farm. The total number of animals evaluated was 222, where 60 were from farm 1(39 castrated males and 21 females), 60 from farm 2 (36 castrated males and 24 females), 48 from farm 3 (36 castrated males and 6 females), and, 54 from farm 4 (all females).

In addition, feces from all calves were *pooled*, mixed with sterile wood shavings, and stored for larval cultures (moisturized daily with sterile water) on days D-2, D+14, D+30, D+60, D+90, D+120, D+150. These cultures were incubated for seven days at 22-27°C and 80% humidity, according to the recommendations of Coles et al. (2006). After incubation, larvae were recovered by baermanization, in which 100 third-stage larvae in each culture were identified (by genera) following the criteria described by Van Wyk and Mayhew (2013).

Furthermore, the animals were weighed on days D-2, D+30, D+60, D+90, D+120, and D+150 to evaluate the effect on body weight due to anthelmintic treatment. In order to avoid significant variations, both fecal collections and weighing were performed at the same time of the day to allow the evaluation of the economic viability of the different treatments according to their respective efficacies.

2.6 Productivity analysis

An economic analysis was performed to estimate the cost-benefit of each treatment, taking into consideration the cost of treatment (cost of each drug plus the value paid by each farmer to two of its employees) and work (considering two hours of work per farm) for the number of animals used at each farm. The financial remuneration for the weight gain after each treatment was estimated to verify their economic viability according to its efficacy. The value of the commercial dollar for the analysis was considered at US\$ 3,25 with all costs being converted into US dollars.

2.7 Statistical analysis

The efficacy of each treatment was estimated by the fecal egg reduction counts test (FERCT) using the pre-treatment and post-treatment EPG counts for each group (Neves et al. 2014). The approach described by Torgerson et al. (2014) was used (available at <http://shiny.math.uzh.ch/user/furrer/shinyas/shiny-eggCounts/>). This approach incorporates random sampling error and aggregations between individual hosts in the treatment groups to provide 95% confidence intervals, which were taken as the 2.5 and 97.5 percentiles of the resulting efficacy distribution.

The efficacy of each treatment against each genus of GI nematodes was calculated based on the proportion of each genus of helminth in larvae cultures at days D-2 and D+14. For this propose, the following formula was used: $PR = 100 \times (1 - PER_{final}/PER_{initial})$, where PR is the percentage reduction by genus; and PER_{initial} and PER_{final} are the percentages of each genus before (D-2) and (D+14) after treatment, respectively (Coles et al., 1992, 2006; Neves et al., 2014).

For the values of weight, at farms that presented females and castrated males in the experimental groups, it was evaluated if there was significative differences on weight gain as an influence of the gender of these on the different experimental days. Also, on days D30, D60, D90, D120, and D150, Shapiro Wilk test for normality of all properties was used. To analyze the statistical difference between the values of weight within each property, the analysis of variance (ANOVA) was performed using the Tukey post hoc test. EPG values of

each farm on days D-2, D14, D30, D60, D90, D120, and D150, were transformed (log₁₀) to meet the assumptions of a multivariate analysis of variance and analyzed by Tukey test.

Spearman's rank correlation was also performed between the values of weight and EPG in the control groups. For the group that showed the highest values of EPG reduction in the different experimental periods at each farm, p-values <0.5 were considered statistically different using the program R (R Core Team 2016).

2.8 Interpretation of the results

The recommendations of Lyndal-Murphy et al. (2014) and of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines on anthelmintic resistance were used to interpret the anthelmintic resistance status (Coles et al., 1992). For this propose, the EPG reduction percentage was considered according to the upper 95% confidence limit (UCL) and lower 95% confidence limit (LCL). Thus, each treatment was classified as effective (when the EPG reduction percentage and upper 95% confidence limit were both equal to or above 95% and the lower 95% confidence limit was equal to or above 90%), ineffective (parasite resistance confirmed, when the EPG reduction percentage and upper 95% confidence limit were below 95% and the lower 95% confidence limit was below 90%), or inconclusive (when none of the other criteria were fulfilled). Moreover, according to the recommendations of James et al. (2009), multi-drug resistant parasites were defined as parasite populations that were resistant to anthelmintic drugs of different chemical classes.

3. Results

TABLE 1 presents the arithmetic means, minimum and maximum EPG counts, and the percentages of each genus of gastrointestinal nematodes found before the treatment in each herd. The efficacy of each treatment on the farms is presented in **TABLE 2**. In **TABLE 3**, the EPG counts during the entire experimental period for each group at all farms are shown. Furthermore, **TABLE 4** shows the percentage reduction of each genus after the different treatments at each property. Of all compounds tested, levamisole showed the highest percentages of EPG count reduction in all herds evaluated, followed by albendazole and eprinomectin. However, considering the results of EPG, UCL, and LCL at 95% CL, levamisole demonstrated inconclusive results in its efficacy at farms 2, 3, and 4 and was ineffective at farm 1. The other compounds were not able to control the infection in the herds, being classified as ineffective at all farms (**TABLE 2**). The fecal cultures of all herds showed the presence of mixed infections containing the genera *Cooperia*, *Haemonchus* and *Oesophagostomum*, except on farm 1

where this last genus was not present (**TABLE 1**). The presence of multi-drug resistant nematodes was a common observation at all farms included in this study. The genera, *Cooperia*, *Haemonchus*, *Oesophagostomum*, and *Trichostrongylus*, were the most resistant to the different treatments administered in general.

The arithmetic means, higher and lower values, and standard deviation of weight on D-2 per experimental group, for the properties studied, are presented in **TABLE 5**. The values of weight of the animals on days D+30, D+60, D+90, D+120, and D+150, are presented in **TABLE 6**. A statistical analysis was conducted, comparing the values of weight between each treatment on each farm. As can be observed in **TABLE 6**, there was statistically significant difference for levamisole and ivermectin 1% groups only at farm 3 on day D+150 ($p < 0.05$). Also, for farms 1, 2, and 3, which presented animals from both genders, there was not statistical difference on the values of weight gain between these animals ($p > 0.05$).

Correlation analysis between values of EPG and weight at farm 2 ($r = -0.32$; $p = 0.013$), 3 ($r = -0.36$; $p = 0.0042$), and 4 ($r = -0.31$; $p = 0.02$), demonstrated significant negative correlation between this data for the levamisole group, which was the compound with the highest percentage of reduction of EPG. At farm 1, although a negative correlation was observed between EPG and weight in the levamisole group ($r = -0.23$), it was not statistically significant ($p = 0.073$). This same analysis was made for the control groups of all farms, and a negative correlation was observed only at farm 2 ($r = -0.41$; $p = 0.011$).

An economic analysis of the different treatments administered at each farm is presented in **TABLE 7**. This table also includes the data for the control groups. Only at farms 1 and 3, the group with the highest EPG reduction (levamisole) was also the one that brought the best financial remuneration for the increase in live body weight during the experimental period. At the other farms, this did not occur. The best remuneration at farm 2 was demonstrated by the ivermectin 3.15% group and at farm 4 by the control group.

The historic of anthelmintic use at the farms was obtained with the owners. At farm 1, the compounds that already had been used were: ivermectin, abamectin, doramectin, nitroxinil, levamisole, and albendazole; farm 2 used ivermectin, moxidectin, doramectin, and levamisole for the control of the main parasites; at farm 3, ivermectin, albendazol, and levamisol were the main drugs applied; and at farm 4, ivermectin, doramectin, moxidectin, levamisole, and albendazol have already been employed. The frequency of use of these drugs was very variable at all farms, and it was not noticed any specific technical criteria the treatments, being the drugs

applied in accordance with its availability. Most of these anthelmintics were apply in times of weaning and for the control of other parasites as ticks, which represent an important problem in the state of Rio Grande do Sul.

4. Discussion

Infection caused by gastrointestinal nematodes is a constant threat to the health and well-being of different herds in the world (Perry et al. 2002, Craig, 2018). The control of those parasites resides, basically, in three broad-spectrum chemical groups: macrocyclic lactones, benzimidazoles, and imidazothiazoles, which could be notice by the historic of anthelmintic use provide by the farmers (Sutherland and Scott, 2009). Many of the drugs contemplated in these chemical groups are associated with cases of parasite resistance, as could be seen in the results obtained in our study and in different reports from many states of Brazil and other countries (Cezar et al., 2010; Gasbarre, 2014; Cristel et al., 2017; Candy et al., 2018).

The low efficacy of both ivermectins tested in our study was an expected result, since these compounds have been largely used for controlling infections caused by tick and gastrointestinal nematodes at all farms for many years. In addition, although none of them had ever used eprinomectin prior to the experimental period, this drug has not shown a satisfactory percentage of EPG reduction at any of the farms. This could indicate side resistance of the nematode population once at almost all farms another compound from the avermectins group had already been used. Other studies, such as those by Mello et al. (2006), Cezar et al. (2010), and Ramos et al. (2016) obtained similar results, showing that the use of different compounds and concentrations of macrolactones do not result in significant efficacy in controlling the nematode populations of the herds evaluated.

Before the treatment, all the herds studied showed infections by different genera of nematodes (TABLE 1). Some of this genera, as *Trichostrongylus* spp. and *Ostertagia* spp., only appeared on the post-treatment possible because they were present at low proportions prior the treatments. Among the genera observed at D+14, it can be notice that *Cooperia* spp., *Haemonchus* spp., *Oesophagostomum* spp., and *Trichostrongylus* spp. were the most resistant to the compounds used in this study (TABLE 4). Moreover, these genera have already been associated with anthelmintic resistance, as seen in the reports of Bianchin, Catto, and Kichel (2007), Fazzio et al. (2014), and Candy et al. (2018) from Brazil and other countries.

Throughout the study period, *Cooperia* spp. was, proportionally, one of the most prevalent genera on all experimental days of all evaluated groups from the four properties (data not shown). The resistance of this parasite to different anthelmintic compounds is not unusual; however, farmers do not perceive this failure because of the low pathogenicity of some *Cooperia* species (Fazzio et al., 2014; Zanetti Lopes et al., 2014). Even so, massive infections caused by some species of *Cooperia* spp. (for example, *C. oncophora* and *C. punctata*), can lead to decreased weight gain and diarrhea, according to the studies of Demeler et al. (2009) and Candy et al. (2018). Despite the presence of a resistant population of this parasite and others with significant pathogenic capacity, e.g. *Haemonchus* spp., clinical signs were not apparent in calves during the entire experimental period in all studied herds (Gasbarre, 2014).

The use of anthelmintic drugs with a known capacity of EPG reduction is fundamental for achieving satisfactory production indexes. Indeed, Fazzio et al. (2014) demonstrated a difference of 14 (± 1.9) kg of weight gain in animals treated with an efficient anthelmintics combination (100 % efficacy) in comparison with the control group. In this study, other compounds with inefficient reduction of EPG percentages also provided weight gain, but it was not significant when compared with the untreated group. Furthermore, the study did not include an economical evaluation of the different treatments applied.

An important factor at farms 1, 2, and 3 is the presence of animals from both genders (females and castrated males) that were included on the experimental groups, which could have explained some differences in the weight gain of some groups at these properties. However, in the same way as the results of Hedrick et al. (1969) which found a difference of 10% between these genders, at our study there was not significant differences in the weight gain pattern during the experimental period for these animals.

An important strategy that could be used to control GI parasites is the association of an efficient anthelmintic treatment and the supply of protein on the animals diet (Coop and Kyriazakis, 2001). This nutritional strategy was applied at all farms evaluated, or by supplementation as in farm 2, or in the pasture offered for the animals that presented significant protein content, as in farms 1, 3 and, 4 (Nelson and Moser, 1994). Nevertheless, at farm 2, where the animals were kept in natural pastures, the supplementation was not enough to control the infections, once the correlation analyses of the control group demonstrated a deleterious effect on the weight of the animals with the increase of EPG counts. This corroborates with studies as Pathak (2017), which demonstrate that adequate protein supplementation either in the form of by-pass protein or higher dietary protein improves resilience and expression of immunity to GI parasites.

Some authors, such as Hawkins (1993), mention that although the economic losses with parasitism in cattle are universally accepted, the losses associated with these infections are very hard to measure. Indeed, in our study, only at farms 1 and 3 the treatments with greater EPG reduction percentages showed consistent economical differences from effectiveness treatments, with statistical differences for weight gain detected only at farm 3 ($p < 0.05$) (TABLE 6).

This fact could have occurred as a result of the following limitations: number of infected animals available at the beginning of the study; the difference between weights of treatment groups that could not be corrected due to number of animals available on D-2, mainly on farm 4 (TABLE 5); influence of genetics on weight gain (which was a characteristic not possible to measure); and influence of environmental factors (e.g. climate, food quality and quantity). Notably, this last factor is very important and could have strongly influenced the results mainly at farm 2, where the animals were kept on natural pastures that lack in quality (about 8% protein content) during the period that the experiment was performed (Pellegrini et al. 2016). Nevertheless, these are variables that possibly reflected the final remuneration obtained at all farms despite the efficacy of the treatments (Hakins, 1993; Cezar, Catto, Bianchin et al., 2008; Sutherland and Leathwick, 2011).

In the same way, Prichard (1980) and Sutherland and Leathwick (2011) comment that accurate measurement of the cost of anthelmintic resistance is difficult, given that the impact of some factors, such as those mentioned above, which could tamper the final results. Also, these researchers mentioned other important factors: variability of worm species present, intensity of challenge, status of the host (genotype, nutritional and immune status), the presence of other parasites such as liver fluke, and proportion of the total worms present which are able to survive treatment (SARGISON et al. 2010).

Despite some contradictory results with respect to weight gain and economical returns of the treatments at some farms, specially farm 4, the use of anthelmintic drugs with proved efficacy is always the better way to ensure the best production indexes and development of young calves (Cristel et al. 2017). Indeed, farms 1 and 3 demonstrated the most consistent results. The final remuneration per animal between levamisole and ivermectin 3.15% groups at farm 1 was US \$28.51, and at farm 3 a difference of US \$49.92 was found for levamisole and ivermectin 1% groups, which were also groups with a consistent difference in EPG reductions. At farm 2, there was a small difference between levamisole and ivermectin 3.15% groups (US\$ 0.78), which could be a result of the difference of performance and weight gain pattern of the animals of this groups, although there was significant differences on EPG reduction on D-14 for these treatments (TABLES 2, 3 and 7).

Candy et al. (2018) conducted a field trial to evaluate the effect of using anthelmintics with incomplete efficacy on live weight gain and found a difference of 12.9 kg in animals treated with eprinomectin with an efficacy of 51%. Also, Grisi et al. (2014), estimates that losses in milk production and weight gain with gastrointestinal infections could reach US\$ 7.11 billion, evidencing the importance of an adequate control of these parasites for the sustainability of the different production systems.

Thus, this study suggested that treatments with anthelmintics that present an adequate capacity for EPG reduction are more profitable and result in better cost-benefits due better performance (weight gain) of animals. Although this result was not repeated for all properties it is important to notice that we worked under natural conditions of the commercial farms evaluated and some variables could not be controlled or corrected. It could encourage that more studies be performed using a great number of farms and animals, but the evidence provided by other authors and our results support that the association of proper nutritional strategies and anthelmintic treatment with efficient EPG reduction capacity after weaning period, are more like lead to a better development of the animals, the achievement of good production indexes, and the economic viability of the anthelmintic treatments in the different production systems.

Conflict of interest

The authors of this manuscript have no financial or personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgments

The authors are grateful for the availability and collaboration of producers and their employees to carry out this work.

5. References

- Amarante, A.F.T. 2004. Controle integrado de helmintos de bovinos e ovinos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 13, 68-71.
- Bianchin, I., Catto, J.B., Kichel, A.N. 2007. The effect of the control of endo- and ectoparasites on weight gains in crossbred cattle (*Bos Taurus taurus*×*Bos taurus indicus*) in the central region of Brazil Trop. Anim. Health Prod. 39, 287–296.

- Borges, F.A., Almeida, G.D., Heckler, R.P., Lemes, R.T. Onizuka, M.K., Borges, D.G.L. 2013. Anthelmintic resistance impact on tropical beef cattle productivity: effect on weight gain of weaned calves. *Trop. Anim. Health Prod.* 45, 723-727.
- Candy, P.M., Waghorn, T.S, Miller, C.M., Ganesh, S, Leathwick, D.M. 2018. The effect on liveweight gain of using anthelmintics with incomplete efficacy against resistant *Cooperia oncophora* in cattle. *Vet. Parasitol.* 251, 56–62.
- 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 lactones macrocíclicas on resistant strains of nematodes of cattle. *Pesqui. Vet. Bras.* 30, 523-528.
- Cezar, S.A., Catto, J.B., Bianchin, I. 2008. Alternative control of the gastrointestinal nematodes of the ruminants: actuality and perspectives. *Cienc. Rural.*38:7, 2083-2091.
- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H., 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.
- Condi, G.K., Soutello, R.G.V., Amarante, A.F.T. 2009. Moxidectin-resistant nematodes in cattle in Brasil. *Vet. Parasitol.* 161, 213-217.
- Coop, R.L., Kyriazakis, I. 2001. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends Parasitol* 17, 325-330.
- Craig, T.M. 2018. Gastrointestinal nematodes, diagnosis and control. *Vet Clin Food Anim* 34, 185–199
- Cristel, S., Fiel, C., Anziani O., Descarga, C., Cetrá, B., Romero, J., Fernández, S., Entrocasso, C., Lloberasi, M., Medus, D., Steffan, P., 2017. Anthelmintic resistance in grazing beef cattle in central and northeastern areas of Argentina — an update. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports.* 9, 25-28
- Demeler, J., Van Zeveren, A.M., Kleinschmidt, N., Vercruyse, J., Höglund, J., Koopmann, R., Cabaret, J., Claerebout, E., Areskog, M., Von Samson-Himmelstjerna, G. 2009. Monitoring the efficacy of ivermectin and albendazole against gastro intestinal nematodes of cattle in Northern Europe. *Vet. Parasitol.* 160, 109–115.

- Fazzio, L.E., Sánchez, R.O., Streitenberger N., Galvan, W.R., Giudici, C.J, Gimeno, E.J. 2014. The effect of anthelmintic resistance on the productivity in feedlot cattle. *Vet. Parasitol.* 206, 240–245.
- Gasbarre, L.C., 2014. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in the US. *Vet. Parasitol.* 204, 3–11.
- Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R.D.S., Barros, A.T.M.D., Andreotti, R., Cançado, P. H. D., León, A.A.P; Villela, H. S. 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Vet. Bras. Parasitol. Vet.* 23: 2, 150-156.
- Hawkins, J.A., 1993. Economic benefits of parasite control in cattle. *Vet. Parasitol.* 46:159-173.
- Hedrick, H.B., Thompson, G.B., Krause, G.F., 1969. Comparison of feedlot performance and carcass characteristics of half-sib bullus, steers and heifers. *J. Anim. Sci.* 29:5, 687-694.
- James, C. E., Hudson, A.L., Davey, M. W. 2009. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? *Trends Parasitol.* 25:7, 328-335
- Lopes, W.D.Z., Felippelli, G., Pires Teixeira, W.F., Cruz, B.C., Maciel, W.G., Buzzulini, C., Shigaki de Matos, L.V., Costa Gomes, L.V., Melo Pereira, J.C., Fávero, F.C., Oliveira, G.P., da Costa, A.J., 2014. Resistance of *Haemonchus placei* infection, *Cooperia punctate* and *Oesophagostomum radiatum* to ivermectin pour-on of 500 mcg kg⁻¹ in cattle herds in Brazil. *Cien. Rural.* 44, 847-853.
- Lyndal-Murphy, M., Swain, A.J., Pepper, P.M. 2014. Methods to determine resistance to anthelmintics when continuing larval development occurs. *Vet. Parasitol.* 199, 191-200.
- Martínez-Valladares, M., Geurden, T., Bartram, D. J., Martínez-Pérez, J. M., Robles-Pérez, D., Bohórquez, A., Florez, E., Meana, A., Rojovázquez, F. A. 2015. Resistance of gastrointestinal nematodes to the most commonly used anthelmintics in sheep, cattle and horses in Spain. *Vet. Parasitol.* 211, 228-233.
- McKenna, P.B. 1998. The effect of previous cold storage on the subsequent recovery of infective third stage nematode larvae from sheep faeces. *Vet. Parasitol.* 80, 167 -172.
- Mello, M.H.A, Depner, R., Molento, M.B., Ferreira, J.J. 2006. Side-resistance to macrolactones in cattle nematodes. *Arch. Vet. Sci.* 11: 1, 8-12.
- Miller, C.M., Waghorna, T.S., Leathwick, D.M., Candy, P.M., Olivera, A.-M.B., Watson, T.G. 2012. The production cost of anthelmintic resistance in lambs. *Vet. Parasitol.* 186: 376–381.
- Nelson, C. J., Moser, L. E. Plant factors affecting forage quality. In: FAHEY Jr., G. C. (Ed.). Forage quality, evaluation, and utilization. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science

Society of America, 1994. Chap. 3, p. 115-154.

Neves, J.H.D., Carvalho, N., Rinaldi, L., Cringoli, G., Amarante, A.F.T. 2014. Diagnosis of anthelmintic resistance in cattle in Brazil: a comparison of different methodologies. *Vet Parasitol* 2014; 206: 216 - 226.

Pellegrini, C.B., Medeiros, R.B., Carlotto, S.B., Garcia, R.P.A., Lisboa, C.V., Bruning, G., 2016. Nutritive value of a native pasture dominated by *Eragrostis plana* Nees and its relation with metabolic profile of primiparous cows supplemented from pregnancy to postpartum. *Cienc. anim. bras.*, 17, 154-163.

Perry, B.D., Randolph, T.F., McDermott, J.J., Sones, K.R., Thornton, P.K. 2002. Investing in animal health research to alleviate poverty. Nairobi: ILRI. 148pp.

Prichard, R.K. 1980. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Aust. Vet. J.* 56, 239–251.

Ramos, F., Portella, L. P., Rodrigues, F. S., Reginato, C.Z.Pötter, L, Cezar, A. S., Sangioni, L. A., Vogel, F.S.F. 2016. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of beef cattle in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 6, 93-101.

Sargison, N.D., Wilson, D.J., Penny, C.D., Bartley, D.J. 2010. Unexpected production loss caused by helminth parasites in weaned beef calves. *Vet. Rec.* 167, 753–754.

Souza, A. P., Ramos, C.I., Bellato, V., Sartor, A.A., Schelbauer, C.A. 2008. Anthelmintics resistance of bovine gastrointestinal helminths in Santa Catarina Plateau. *Cienc. Rural*, 38: 5, 1363-1367.

Stotzer, E. S., Lopes, L.B., Eckstein, C., Moraes, M.C.M.M., Rodrigues, D.S., Bastianetto, E. 2014. Impacto econômico das doenças parasitárias na pecuária. Uma Revisão. *Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanity.* 8:3, 198 –221.

Sutherland I.A., Leathwick D.M. 2011. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? *Trends Parasitol.* 27, 176-181.

Sutherland, I.A. and Scott, I. (2009) Anthelmintics. In *Gastrointestinal Nematodes of Sheep and Cattle: Biology and Control.* WileyBlackwel, 256pp.

Torgerson, P.R., Paul, M., Furrer, R.2014. Evaluating faecal egg count reduction using a specifically designed package “eggCounts” in R and a user friendly web interface. *Int. J. Parasitol.* 44, .299-303.

Van Wyk, J.A., Mayhew, E. 2013. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. *J. Vet. Res.* 80, 1-14.

Zanetti Lopes, W.D., Felippelli, G., Pires Teixeira, W.F., Cruz, B.C., Maciel, W.G., Buzzulini, C., Shigaki de Matos, L.V., Costa Gomes, L.V., Melo Pereira, J.C., Fávero, F.C., Oliveira, G.P., da Costa, A.J., 2014.

Resistance of *Haemonchus placei* infection, *Cooperia punctate* and *Oesophagostomum radiatum* to ivermectin pour-on of 500 mcg kg⁻¹ in cattle herds in Brazil. Cien. Rural. 44, 847-853.

TABLE 1-Arithmetic mean (AM) and standard deviation (SD), minimum (MIN) and maximum (MAX) fecal egg counts, and proportions of genera identified before the treatments (D-2) in the feces of naturally infected beef cattle from four farms in the state of Rio Grande do Sul.

Farm	EPG			Genera of the gastrointestinal nematodes(%)		
	AM(SD)	MIN	MAX	<i>Cooperia</i> spp.	<i>Oesophagostomum</i> spp.	<i>Haemonchus</i> spp.
1	403.33(224.1)	200	1350	96		4
2	550(414)	200	2150	76	6	18
3	429.16 (279.7)	200	1300	82	8	10
4	452.83 (371.3)	200	1900	30	10	60

TABLE 2- Arithmetic mean (AM) and standard deviation (SD), minimum (MIN) and maximum (MAX) fecal egg counts, and proportions of genera identified before the treatments (D-2) in the feces of naturally infected beef cattle from four farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Anthelmintic treatments	Reduction of EPG after treatment on each farm (%)			
	1	2	3	4
Ivermectin 1%	1 (0.03-4.8)	27.9 (6.3-45.8)	39.1 (11.9-58.1)	13 (0.9-33.1)
Ivermectin 3.15%	0.8 (0.03-4.4)	6.3 (0.2- 22)	6.2 (0.3- 23.1)	4 (0.15- 17.1)
Eprinomectin	2.3 (0.08- 10.8)	48 (29.1- 62.3)	57.1 (35-72.6)	17.2 (1.4-38.4)
Albendazole 15%	0.9 (0.03 - 4.8)	27.2 (5.1-45.2)	64.6 (45.4-78.3)	59.2 (40.5 - 72.7)
Levamisole 7.5%	63.6 (45-76.3)	93.1 (86.4-96.9)	90.2 (80-95.8)	90.8 (82.1- 95.8)

TABLE 3-Arithmetic mean fecal egg counts (EPG) per experimental groups on each experimental day on beef cattle naturally infected by gastrointestinal nematodes on four farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Farm	Experimental group	Arithmetic mean EPG counts per group before and after treatment on each farm						
		D-2	D14	D30	D60	D90	D120	D150
1	Ivermectin 1%	400 a ₁	1065 a ₁ 1188.9	410 a ₁	470 a ₁	730 a ₁	95 a ₁	175 a ₁
	Ivermectin 3.15%	395 a ₁	a ₁	1100 a ₁	1010 a ₁	655 a ₁	510 a ₁	165 a ₁
	Eprinomectin 5%	405 a ₁ 418.8	665 a ₁ 1193.8	385 a ₁	770 a ₁ 1093.8	500 a ₁	260 a ₁	235 a ₁
	Albendazole 15%	a ₁	a ₁	818.8 a ₁	a ₁	765 a ₁	495 a ₁	230 a ₁
	Levamisole 7.5%	420 a ₁	150 b ₁	716.7 a ₁	577.8 a ₁	455 a ₁	350 a ₁	315 a ₁
	Control	390 a ₁	1105 a ₁	630 a ₁	795 a ₁	360 a ₁	420 a ₁	315 a ₁
	2	Ivermectin 1%	545 a ₂	385 a ₂	460 a ₂	285 a ₂	370 a ₂	210 a ₂
Ivermectin 3.15%		550 a ₂	580 a ₂	830 a ₂	530 a ₂	380 a ₂	210 a ₂	245 a ₂
Eprinomectin 5%		550 a ₂	280 a ₂	520 a ₂	275 a ₂	130 a ₂	405 a ₂	310 a ₂
Albendazole 15%		550 a ₂	395 a ₂	435 a ₂	475 a ₂	440 a ₂	270 a ₂	245 a ₂
Levamisole 7.5%		555 a ₂	35 b ₂	130 b ₂	325 a ₂	370 a ₂	415 a ₂	345 a ₂
Control		550 a ₂	620 a ₂	680 a ₂	385 a ₂	310 a ₂	195 a ₂	270 a ₂
3		Ivermectin 1%	425 a ₃ 431.3	250 a ₃	ab ₃	150 a ₃	a ₃	a ₃
	Ivermectin 3.15%	a ₃	583.3 a ₃	575 a ₃	362.5 a ₃	375 a ₃ 331.3	a ₃	525 a ₃
	Eprinomectin 5%	425 a ₃	175 a ₃	400 ab ₃	487.5 a ₃	a ₃ 350.0	200 a ₃ 443.8	437.5 a ₃
	Albendazole 15%	425 a ₃ 431.3	143.7 a ₃	625 a ₃	356.3 a ₃	a ₃ 143.8	a ₃	393.8 a ₃
	Levamisole 7.5%	a ₃ 437.5	37.5 b ₃	68.75 b ₃	150 a ₃ 368.75	a ₃ 393.8	325 a ₃ 656.3	331.3 a ₃
	Control	a ₃	556.2 a ₃	662.5 a ₃	a ₃	a ₃	a ₃	518.8 a ₃
	4	Ivermectin 1%	483.3	438.9	483.3 a ₄	377.8 a ₄	200 a ₄	a ₄
Ivermectin 3.15%		483.3	616.7 a ₄	a ₄	494.4 a ₄	a ₄	a ₄	922.2 a ₄
Eprinomectin 5%		a ₄ 422.2	355.6 a ₄	705.6 a ₄	277.8 a ₄	88.9 a ₄	66.7 a ₄	400 a ₄
Albendazole 15%		511.1	194.4	438.8 a ₄	116.6 a ₄	55.5 a ₄	a ₄	177.7 a ₄
Levamisole 7.5%		a ₄ 466.7	ab ₄	111.1 b ₄	238.9 a ₄	266.7	311.1	294.4 a ₄
Control		a ₄	38.9 b ₄	111.1 b ₄	238.9 a ₄	a ₄	a ₄	294.4 a ₄
Control		405.6	388.9 a ₄	395.6 a ₄	288.9 a ₄	55.6 a ₄	161.1	300 a ₄

* EPG means followed by different small letters in the same column within each farm differ by Tukey test (P<0,05).

* a₁, ab₁, b₁: letters relative to statistical analyses at farm 1; a₂, ab₂, b₂: letters relative to statistical analyses at farm 2; a₃, ab₃, b₃: letters relative to statistical analyses at farm 3; a₄, ab₄, b₄: letters relative to statistical analyses at farm 4.

TABLE 4-- Efficacy (%) of different anthelmintic drugs against each genus of gastrointestinal nematode fourteen days after treatment in naturally infected beef cattle at four farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Farm	Genus	Anthelmintic treatments and reduction percentage for each genus after treatment				
		Ivermectin 1%	Ivermectin 3.15%	Eprinomectin 5%	Levamisole 7.5%	Albendazole 15%
1	Coop	0	2.08	10	0	0
	Haem	0	0	0	100	50
	Oesop	-	0	0	-	-
	Trich	-	-	-	-	-
	Ostert	-	-	-	-	-
2	Coop	0	26.30	17.9	34	0
	Haem	11	0	0	0	44.4
	Oesop	0	33.33	0	100	0
	Trich	-	-	-	0	-
	Ostert	-	-	-	-	-
3	Coop	12	19	39	66	2
	Haem	0	0	0	0	40
	Oesop	50	0	0	0	0
	Trich	0	0	0	0	-
	Ostert	-	-	-	-	-
4	Coop	0	0	0	0	0
	Haem	87	76	77	71	70
	Oesop	60	0	40	100	0
	Trich	-	-	-	-	-
	Ostert	-	-	-	-	-

Coop: Cooperia spp.; Haem: Haemonchus spp.; Oesop: Oesophagostomum spp.; Ostert: Ostertagia spp.; Trich: Trichostrongylus spp.

TABLE 5-Arithmetic mean (AM) and standard deviation (SD), minimum (MIN) and maximum (MAX) values of weight per experimental group of naturally infected beef cattle from four farms in the state of Rio Grande do Sul before anthelmintic treatment.

Farm	Weight (kg) AM (SD)						P*
	Ivermectin 1%	Ivermectin 3.15%	Eprinomectin 5%	Levamisole 7.5%	Albendazole 15%	Control	
1	187.5(20.2)	193.2 (14.1)	189.8 (29.0)	191.6(25.6)	190.5 (20.9)	187.1(14.6)	0.985
2	173 (23.7)	172.8(18.4)	175(21.4)	172,6 (27.6)	173.8(16.5)	174.8 (30.6)	0.999
3	146.6 (39.4)	142.9 (37.9)	143.1 (35.7)	137.4 (22.6)	148.9(29.5)	136.9 (90)	1.000
4	136.7 (23.4)	140.7 (20.4)	143.8(29.5)	131.9(28.76)	134.3 (15.1)	144.5 (30.4)	0.874

*Probability of f test between the anthelmintics within each farm

Table 6-Arithmetic mean value of weight (Kg) of naturally infected calves from four farms in the state of Rio Grande do Sul after the treatment with different anthelmintic compounds.

Farm	Anthelmintic treatment	Arithmetic mean values of weight (Kg) per experimental group after treatment				
		D30	D60	D90	D120	D150
1	Ivermectin 1%	4.5	-14.4	-16.9	8.75	39.0
	Ivermectin 3.15%	2.6	-26.9	-34.6	-17.8	21.3
	Eprinomectin 5%	4.8	-14.1	-21.2	5.4	35.7
	Albendazole 15%	2.4	-31.4	-31.9	-8.1	27.4
	Levamisole 7.5%	6.7	-23.2	-22.0	10.7	39.3
	Control	0.2	-22.0	-18.4	5.7	35.6
2	Ivermectin 1%	8.75	11.1	13.0	17.3	18.0
	Ivermectin 3.15%	9.6	10.2	9.4	16.9	20.0
	Eprinomectin 5%	11.2	14.1	12.4	14.8	14.5
	Albendazole 15%	11.5	10.2	10.6	15.5	16.0
	Levamisole 7.5%	10.2	13.6	12.7	18.4	19.4
	Control	7.3	9.4	6.5	11.3	11.1
3	Ivermectin 1%	12.25	16.5	41.0	49.0	43.7 a ₃
	Ivermectin 3.15%	15.3	23.6	50.5	63.4	53.0
	Eprinomectin 5%	15.1	19.8	50.9	62.4	66.0
	Albendazole 15%	20.1	27.0	52.8	65.6	63.4
	Levamisole 7.5%	14.3	22.6	49.1	62.8	77.3 b ₃
	Control	17.6	23.5	40.4	50.9	52.8
4	Ivermectin 1%	13.3	24.7	37.1	53.2	70.3
	Ivermectin 3.15%	1.7	14.4	29.4	42.8	64.6
	Eprinomectin 5%	3.2	22.1	35.8	50.6	70.7
	Albendazole 15%	6.3	22.0	36.8	50.8	74.5
	Levamisole 7.5%	11.7	22.6	38.4	48.1	65.0
	Control	5.2	21.3	35.9	54.4	74.8

a₃,b₃= values statically different (p<0,05)

TABLE 7-Economical analyses of viability of different anthelmintic treatments based on live weight gain 150 days after the treatment of naturally infected calves from four farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Farm	Experimental group	U\$/ml	Costs of anthelmintic treatment per group	Workmanship costs (considering 2 persons working 2 hours)	Final cost of anthelmintic treatment	Final live weight gain per group	U\$/Kg	Final remuneration per animal per group (U\$)
1	Levamisole 7.5%	0.03	3.24	0.96	4.20	393	1.57	61.28
	Eprinomectin 5%	1.48	50.16	0.96	51.12	356.67	1.57	50.88
	Ivermectin 1%	0.10	3.92	0.96	4.88	389.5	1.57	60.66
	Ivermectin 3.15%	0.15	5.71	0.96	6.67	213	1.57	32.77
	Albendazole 15%	0.03	1.20	0.96	2.16	274	1.57	42.80
	Controle	0	0	0.00	0.96	356	1.57	55.79
	2	Levamisole 7.5%	0.03	2.92	0.93	3.85	193.5	1.57
Eprinomectin 5%		1.48	51.69	0.93	52.62	145	1.57	17.06
Ivermectin 1%		0.10	3.62	0.93	2.69	179.5	1.57	27.37
Ivermectin 3.15%		0.15	5.11	0.93	6.04	199.5	1.57	30.19
Albendazole 15%		0.03	1.09	0.93	2.02	160	1.57	24.43
Control		0	0	0	0	110.5	1.57	17.01
3		Levamisole 7.5%	0.03	1.92	0.57	2.49	619	1.57
	Eprinomectin 5%	1.48	33.82	0.57	34.39	528	1.57	97.34
	Ivermectin 1%	0.10	2.43	0.57	3.00	360	1.57	68.92
	Ivermectin 3.15%	0.15	3.41	0.57	3.98	424	1.57	81.12
	Albendazole 15%	0.03	0.73	0.57	1.30	507	1.57	97.43
	Control	0	0	0	0	422	1.57	81.23
	4	Levamisole 7.5%	0.03	2.01	0.77	2.78	585	1.57
Eprinomectin 5%		1.48	38.25	0.77	39.02	636	1.57	104.49
Ivermectin 1%		0.10	2.58	0.77	3.35	633	1.57	107.94
Ivermectin 3.15%		0.15	3.74	0.77	4.51	581	1.57	98.91
Albendazole 15%		0.03	0.68	0.77	1.45	596	1.57	101.82
Control		0	0	0	0.00	673	1.57	115.15

4. CAPÍTULO II – Artigo científico

Este capítulo originou um artigo científico que foi submetido para publicação na revista Parasitology Reaserch

Field and molecular evaluation of anthelmintic resistance of nematode populations from cattle and sheep naturally infected pastured on mixed grazing areas at Rio Grande do Sul, Brazil.

Fernanda Ramos^{a,*}, Camila Balconi Marques^a, Caroline Zamperete Reginato^a, Patricia Bräuning^a, Vanessa Osmari^a, Fagner Fernandes^a, Luis Antônio Sangioni^a, Fernanda Silveira Flôres Vogel^a

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

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

E-mail address: fernandamos_7@yahoo.com.br (Ramos, F.)

Abstract

This study aimed to evaluate the nematode populations affecting cattle and sheep that share grazing areas before and after treatment with different anthelmintic compounds, and investigate the efficacy of the anthelmintic treatment in these ruminants in naturally infected animals at seven farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Moreover, the presence of co-infections by *Haemonchus* species was investigated by polymerase chain reactions (PCR) for the groups treated with a benzimidazole. For this, seven farms located in Rio Grande do Sul state were selected by: farmers' consent; the presence of 42-60 (or more) calves and sheep per farm with counts of ≥ 200 eggs per gram of feces (EPG); availability of calves and lambs aging from 6 to 9 months; the absence of anthelmintic treatment for both species for 60 days before the experimental period; and shared grazing areas between this species on each farm. These animals were distributed into 6 treatment groups for each ruminant species per farm and treated with ivermectin, doramectin, moxidectin, levamisole, albendazole, and closantel. Levamisole was the most effective anthelmintic compound for both species. *Cooperia* spp., *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp. were the genus related to the inefficacy of the treatments tested in general. PCR reactions showed the presence of co-infections of *Haemonchus* species between cattle and sheep, and, possibly, the presence of hybrids of this nematode at one of the farms evaluated. Thus, this study demonstrated a similarity between the nematode population affecting different ruminant species that share pastures and the presence of multi-resistant nematodes. Also the presence of co-infections by *Haemonchus* species was detected, which has also reflected negatively on the success of the treatments.

Key words: drug resistance, FERCT, PCR, *Haemonchus*

1. Introduction

Gastrointestinal parasites from the strongyles group are an important issue related to economic losses in tropical and sub-tropical areas of the world (Amarante & Amarante, 2016). In order to avoid the losses related to this infection on ruminants, many farmers use the frequent application of broad-spectrum anthelmintics mainly macro lactones, benzimidazoles, and imidazothiazoles chemical groups, which has led to the emergence and spread of resistance (Neves et al., 2014; Stephanie et al., 2018).

The reports of lack of efficacy of most of the anthelmintic compounds for ruminants associated with the time necessary for creating new molecules has made urgent the adoption for alternatives methods of control, as pasture management and decontamination of grazing areas strategies (Cezar, Catto, and Bianchi, 2008; Molento et al., 2013). Particularly this last strategy is one of the most employed in the state of Rio Grande do Sul. For that, different animal species as horses, cattle, and sheep are pastured in the same areas, which provide decontamination of the grazing areas based in the specificity of gastrointestinal nematodes (Sutherland and Leathwick, 2011)

Different studies have demonstrated good results from this kind of practice. In this context Marley et al. (2006), have found better results on the development of lambs that are kept on the same area that adult cattle. On the other hand, some studies as have demonstrated the possibility of crossed infections due this kind of practice with some important nematodes as *Haemonchus contortus*, *Haemonchus placei*, and *Cooperia* spp. (Pinheiro 1983; Santiago et al., 1975)

Thus, the aim of this study was to evaluate the nematode populations affecting cattle and sheep that share grazing areas before and after treatment with different anthelmintic compounds, and investigate the efficacy of the anthelmintic treatment in these two species of ruminants in naturally infected animals at seven farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. In addition, for the group of cattle and sheep treated with a benzimidazole, we investigated the presence of co-infections by *Haemonchus* species by PCR reactions.

2. Material and methods

2.1 Animals and farms

The study was performed on seven farms located in seven counties of the Rio Grande do Sul state in southern Brazil: São Gabriel, São Martinho da Serra, Dilermando de Aguiar, Bagé, Capão do Cipó, São

Francisco de Assis, and Santa Maria. The farms and herds were selected based on previous consent by the farms and by the extensive system used to raise both cattle and sheep. Also, the following technical criteria were considered: the presence of 42-60 (or more) calves and sheep per farm with counts of ≥ 200 eggs per gram of feces (EPG); availability of *Bos Taurus/Bos indicus* crossbred calves and lambs of any breed aging from 6 to 9 months; the absence of anthelmintic treatment for both species for 60 days before the experimental period; and common grazing areas between this species on each farm. First, all animals that met these criteria were included in the study; therefore, animals with fewer than 200 EPG before treatment were excluded. The animals were kept in the same grazing area before and during the study on each farm. The use of animals was approved by Committee of Ethics in Animal Experimentation of the Federal University of Santa Maria under protocol no. 7650140817.

2.2. Anthelmintic treatment

Six commercially available anthelmintic compounds were used to perform the efficacy tests on each farm. These compounds were administered by a veterinarian participant of the study following the manufacturer's recommendations: ivermectin 1% (200 mcg/kg, subcutaneous, Ivomec, Merial), doramectin 1% (200 mcg/kg, subcutaneous, Dectomax, Zoetis), moxidectin 1% (200 mcg/kg, subcutaneous, Cydectin, Zoetis), levamisole 7.5% (3.75 mg/kg, subcutaneous, Ripercol L, Zoetis), albendazole 15% (3.4 mg/kg, subcutaneous, Agebendazol, Agener União), and closantel 10% (10 mg/kg, oral, Diantel, HIPRA).

2.3 Experimental groups and fecal analysis

All samples were collected directly from the rectum of each animal from both species 2 days prior to treatment (D-2) and 14 days after (D+14), according to the recommendations of Coles et al. (2006). EPG counting was performed using a modified McMaster technique, with a sensitivity of 50 EPG. For both cattle and sheep, animals that had an EPG count ≥ 200 on D- 2 were selected. These animals were distributed into 6 randomized blocks (6 blocks for cattle and 6 blocks for sheep) based on EPG at each farm, to balance the mean and the frequency distributions of EPG counting among the groups before the treatments. The number of calves and lambs in each experimental group ranged from 7 to 10 animals depending on the available infected animals at each farm. The number of animals used per farm was: 56 calves and 42 sheep (farm 1), 48 calves and 48 sheep

(farm 2), 60 calves and 60 sheep (farm 3), 48 calves and 60 sheep (farm 4), 60 calves and 60 sheep (farm 5), 52 calves and 48 sheep (farm 6), and 60 calves and 48 sheep (farm 7).

Larval cultures were made on each collection day from fecal samples of calves and lambs in each experimental group. Pooled feces were mixed with sterile wood shavings and stored for larvae cultures (moisturized daily with sterile water under incubation for seven days at 22-27°C and 80% humidity), according to the recommendations of Coles et al. (2006). After incubation, larvae were recovered by baermanization, and 100 third-stage larvae in each culture were identified (by genera) following the criteria described by Van Wyk and Mayhew (2013).

2.4 Statistical analysis and interpretation of the results

To calculate the efficacy based on the reduction in EPG, in both species, pre- and post-treatment EPG counts were used. For this, the approach described by Torgerson et al (2014) was used (available at <http://shiny.math.uzh.ch/user/furrer/shinyas/shiny-eggCounts/>). This approach incorporated random sampling error and aggregations between individual hosts in the treatment groups to provide 95% confidence intervals, which were taken as the 2.5 and 97.5 percentiles of the resulting efficacy.

For each genera of gastrointestinal nematode identified, the efficacy of the treatments was also estimated. The proportion of each genus of nematode in the larvae cultures at D-2 and D+14 from both animal species was considered using the following formula: $PR = 100 \times (1 - PER_{final} / PER_{initial})$, where PR is the percentage of reduction by genus; and PER_{initial} and PER_{final} are the percentages of each genus before (D-2) and 14 days after (D+14) treatment, respectively (Coles et al., 1992, 2006; Neves et al. 2014). The anthelmintic resistance status was evaluated according to the recommendation of Lyndal-Murphy et al. (2014).

2.5 Obtainment of larvae of third stage (L3) and adult *Haemonchus* specimens for PCR reactions

L3 larvae of *Haemonchus* spp. resistant to treatment to a benzimidazole (albendazole 15%, Agabendazol, Agener União), were obtained from the fecal cultures on D-2 and D+14 of the FECRT carried out on the first part of the study. This drug was selected based on its wide use in the farms for treatment of both ruminants' species (Coles et al., 2006; Van Wyk and Mayhew, 2013, Ramos et al. 2016). After the identification of the cultures, the larvae were transferred to Eppendorf's with 3ml of distilled water, and kept on freezer (10°C), until the DNA extraction. All cultures before and after treatment from these ruminants present

mixed infections by different genus of nematodes including *Haemonchus* spp. Although there was other genus present, the *Haemonchus* spp. L3 was not *pooled* or separated, once the primers used for the PCR analyses were specific for this nematode species.

As positive and negative PCR controls we used individual adult specimens of *Haemonchus* spp.. For this propose, we obtained samples of adult specimens of *Haemonchus contortus* from sheep raised in São Gabriel, and *Haemonchus placei* from cattle raised Uruguaiana, both counties of Rio Grande do Sul state. These adult specimens were kindly donated. The identity of both *Haemonchus* specimens was confirmed by PCR using the primers developed by Amarante et al. (2017).

2.6 DNA extraction

For L3 larvae it was followed the recommendations of Minho, Gaspar and Yoshihara (2015), Test (2015), and Bekelaar et al. (2018). Briefly, the suspensions of larvae cultures kept on the freezer were incubate with 180 µl of 3.5% sodium hypochlorite during 5 minutes in petri dish for sheath removal. After this, all content of the petri dish was transferred to 15ml falcon tube and centrifuged at 3.000 RPM for 5 minutes. This process was repeated four times with distilled water, to completely removing hypochlorite residues. Once this last step was conclude, 300 µl containing the unsheath larvae pellet was transferred to a cryotube and kept for 2 hour on the liquid nitrogen vapor. The content of the cryotube was transferred into the liquid nitrogen during 5 minutes and trasfered to 45°C water content until completly defronging. This process was repeted 4-5 times and after the DNA concentration was measure on spectrophotometer picodrop microliter.

For adults specimens, the DNA was extracted from single larvae of *Haemonchus* spp. with the PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, USA) according to the manufacture's instructions. After this, the concentration of DNA was also measure as described above.

2.7 PCR reactions

The extracted DNA from L3 samples prior and after treatment with abendazol for both ruminants species and the adults samples of *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* were submitted to PCR using the primers and reaction condition developed by Amarante et al. (2017). Briefly, two specie specific primers were used, one for *H.contortus* (*HcBotuF1* 5'-TGTCGAACACGAAACTCGTC-3' and *HcBotuR2* 5'-TGTGTCTCTACCGCCCGAGT-3', and other for *H. placei* (*HpBotuF* 5'-CCAGACCCGAGACTCGCC-3' and

HpBotuR 5'-CTGAAGGTAATGTCAAAATTTCT-3)'. Each DNA sample was tested with both primer pairs. For *H. contortus* a 260-bp was expected, and for *H. placei* a 459-bp. The T100™ thermalcycler (BIORAD) was employed to perform PCR reactions. Amplification was carried out in a 25 µl reaction mix containing 25mM MgCl₂ (Promega), 1x buffer (Promega), 10 µM each deoxynucleoside triphosphate (dNTP - KAPA BIOSYSTEMS), 20–50 ng genomic DNA, 1 U GoTaq®Hot Start Polymerase (Promega), 10 µM each primer. The cycling conditions for the primer pair *HpBotuF/R* were as follows: 95°C for 5min; followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, 58.5° C for 15 s and 72°C for 30 s; followed by 5min at 72°C and 4°C to finalize. The cycling conditions for the primer pair *HcBotuF1/R2* were largely the same, except the annealing time and temperature: 59°C for 40 s. PCR products were electrophoresed on 1,5 % agarose gels, colored with red gl 1/500 (UNISCENCE), and photographed under UV light (HoeferMacroVue UV-20) using a Canon PowerShot A640 (Canon, Melville, New York, USA).

3. Results and Discussion

Tables 1 and 2 presents the arithmetic means, standard deviation, minimum and maximum EPG counts, and percentages of each genus of gastrointestinal nematodes found on cattle and sheep, respectively, prior the treatment of each animal category at all farms. The presence of gastrointestinal nematodes with multiple resistance to the anthelmintic compounds used in this study was detected at all farms. Of all anthelmintic applied, levamisole 7.5% demonstrated the greatest percentage of reduction of EPG for both cattle and sheep at most of the farms, followed by moxidectin 1% for cattle and closantel for the sheep flocks (TABLES 3 and 4). Most of the nematode populations evaluated from both cattle and sheep presented multi-resistance to the treatments tested, witch is a common result to other studies as the ones made by Sangison et al., 2007; Cezar et al., 2010; Burgess et al., 2012; Lopes et al., 2014 Charlier et al. 2014).

Larvae cultures from both ruminant species showed the presence of mixed infections before treatment, containing the genera *Cooperia*, *Haemonchus*, *Oesophagostomum*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, and *Strongyloides* (TABLES 1 and 2). For most of the farms evaluated, *Cooperia* spp., *Haemonchus* spp., and *Trichostrongylus* spp. were nematodes resistant to the different treatments applied on cattle, whereas *Oesophagostomum* spp. was the most susceptible. For sheep, *Haemonchus* spp., and *Cooperia* spp. presented significant resistance levels to the anthelmintic compounds tested, while the genera *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, and *Oesophagostomum* were the most susceptible (TABLES 5 and 6). These genera have

already been associated with cases of resistance in several regions of Brazil and other countries, as demonstrated in the studies made by Cesar et al. (2010), Neves et al. (2014), and Cristel et al. (2017)

In view of the great number of resistance reports in gastrointestinal nematodes of ruminants, it is clear that there is a necessity for alternative methods of control. Although the mixed grazing with different ruminant species could be a good strategy for pasture decontamination, it is important to be aware of the possibility for cross-infection, once some species can parasite both ruminants, such as *Trichostrongylus axei* and *Cooperia punctata* (Pinheiro et al. 1987; Fernandes et al. 2004; Sczesny-Moraes et al., 2010).

The age of the animals is another important factor in continuously mixed grazing areas. The animals used in our study were aged 6 to 9 months, and it can be noted that mainly in sheep, it reflected a significantly greater EPG count before the treatment (TABLES 1 and 2). Similarly, Pinheiro (1983) noted that the presence of calves and lambs in mixed grazing systems resulted in unsatisfactory results. Still, some years later, Pinheiro et al. (1987) found that good pasture decontamination was only obtained when lambs shared pasture with adult cattle, with similar results found by Fernandes et al. (2004), Rocha et al. (2008), and Santos (2010).

The results of PCR reactions are presented in Figures 1 and 2. For all PCR reactions the amplification patterns were similar to the ones obtained by Amarante et al. (2017). PCR reactions results for both sheep and cattle from each farm are presented in Table 7. It is possible to notice that most of the farms presented co-infections between the *Haemonchus* species in these ruminants.

Farms 1, 3, 5, and 6 (58%) presented similar results. At these farms, cattle were infected by both *Haemonchus* species before treatment, and the lack of efficacy of the treatment related with *Haemonchus* spp. was due to *H. contortus* resistant to albendazol. Also, at these farms, the flocks presented infections only by *H. contortus* pre and post-treatment.

At farm 2 (14%), there were similar results as the ones described above for cattle but the sheep presented infection by *H. contortus* and *H. placei* before the treatment. Different from the results of the other farms, at farm 4 (14%) all cultures from both ruminants presented only *H. contortus*, and at farm 7 (14%) sheep were infected only by *Haemonchus contortus* while for cattle PCR reactions were positive for both species of this helminths pre and post treatment.

The accurate identification of nematodes species by molecular technics is crucial not only for diagnosis but for treatment and control of infections. Although *H. contortus* and *H. placei* are separated species based on morphology, genetic crossing studies and molecular markers, they are phylogenetically close and have

very similar morphology, making accurate species differentiation both challenging and time consuming (Amarante et al., 1997; Chaudhry et al., 2015). *H. contortus* and *H. placei* are usually considered to predominantly infect small ruminants and cattle, respectively, this first nematode species is known to be able of infecting a large number of different ruminant hosts, as was observed at farm 4 (Lichtenfels et al., 1994). Although *H. placei* appears to be somewhat less promiscuous, it can infect small ruminants as well as cattle, which was demonstrated at farm 2 (Amarante et al. 1997; Gasbarre et al., 2009a).

In this context, the results obtained at this study, point to a worrying situation once they suggest an adaptation of these nematodes to hosts that usually are not of their preference at some farms of the study, reflecting in lack of efficacy of anthelmintic treatments. Also, the results obtained at farm 7, suggest the infection of cattle by both species or the presence of hybrids infecting these animals (Chaudhry et al., 2015). According to Chaudhry et al. (2015), the presence of co-infections, as was observed at some farms of the study, raises the possibility of interspecies hybridization occurring in the field.

Different studies as Pinheiro (1983), Amarante et al. (1997), Jacquet et al. (1998), Achi et al. (2003), Gasbarre et al., (2009 a,b), and Brasil et al. (2012), demonstrated the occurrence of crossed-infections of *H. placei* and *H. contortus* in sheep, goats, cattle and buffalo. Although the use of mixed grazing strategies with different species of ruminants is an alternative option for the decontamination of pastures assisting the anthelmintic control, it could favor the crossed infections as was observed at our study (Cezar, Catto and Biachin, 2008; Molento et al. 2013).

In the same way, results obtained by Pinheiro (1983) and Pinheiro et al. (1987) demonstrated the possibility of crossed infections involving *H. placei* and *H. contortus*, and unsatisfactory results when lambs and calves shared mixed grazing. This results demonstrate that observing the age of cattle and sheep when keeping this animals together, is a fundamental practice for an effective pasture decontamination, which did not occurred on the farms that were evaluated in this study, once both ruminant species presented significative EPG counts prior the treatments. Indeed, it was an criterial used by Rocha et al. (2007) for its study, which obtained positive results when evaluating alternately grazing by 2 years old cattle and sheep.

Many studies have demonstrated nematodes populations resistant to different benzimidazoles treatments as well as other anthelmintic classes in cattle and sheep. However, most *Haemonchus* infections diagnosed on the field are not evaluated to the species level, which brings a lack of data on true species prevalence and the extent of co-infections (Sutherland and Leathwick, 2011; Neves et al., 2014; Chaudhry et al., 2015).

In many states of Brazil, not only at Rio Grande do Sul, farmers use the same grazing areas for cattle and sheep without considering the age of the animals. In face of this, a specific diagnosis is very important once these ruminants normally harbor mixed infections, as was observed in the fecal cultures of the animals of this study, which can favor the production of hybrids (Hussain et al., 2014).

Also, the frequent anthelmintic treatment made without any technical criteria for the selection of the appropriated drug, which is a common practice, could lead to genetic flux between populations, with further implications for the efficacy of anthelmintic treatments, what could explain the results of the FERCT observed. This situation assistance interspecies transmission of resistance genes, as well as the introgression of genes involved in pathogenicity and host specificity (Chaudhry et al., 2015).

Thus, this study showed that there were some similarities between the nematode population of sheep and cattle that share grazing areas continuously at the farms evaluated, with most of it showing multiple resistance to the anthelmintic drugs tested. In addition, at some farms, PCR tests demonstrated the presence of co-infections of *Haemonchus* spp. or possible presence of hybrids infecting these animals, which points to the adaptation of this nematode to different host at some farms with important implications in the success of anthelmintic treatments. Further studies, which aim evaluating the occurrence of co-infection and genetic flux of resistance between nematode species are necessary to identify the specific cause of drugs effectiveness and delay the appearance of new cases

Conflict of interest

The authors of this manuscript have no financial or personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgments

The authors are grateful for the availability and collaboration of producers and their employees to carry out this work.

References

Achi YL, Zinsstag J, Yao K, Yeo N, Dorchie P, Jacquiet P (2003) Host specificity of *Haemonchus* spp. for domestic ruminants in the savanna in northern Ivory Coast. *Vet Parasitol* 116: 151–158

- Amarante AFT & Amarante MRV (2016) Advances in the diagnosis of the gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Braz J Vet Res Anim Sci* 53: 127–137
- Amarante MRV, Santos MC, Bassetto CC, Amarante AFT (2017) PCR primers for straightforward differentiation of *Haemonchus contortus*, *Haemonchus placei* and their hybrids. *J Helminthol* 91(6):757-76
- Amarante AF, Bagnola Junior J, Amarante MR, Barbosa MA (1997) Host specificity of sheep and cattle nematodes in Sao Paulo state, Brazil. *Vet Parasitol* 73:89–104
- Bekelaar K, Waghorn T, Tavendale M, McKenzie C, Leathwick D (2018) Heat shock, but not temperature, is a biological trigger for the exsheathment of third-stage larvae of *Haemonchus contortus*. *Parasitol Res* 117: 2395–2402
- Brasil BS, Nunes, RL, Bastianetto E, Drummond MG, Carvalho DC, Leite RC, Molento MB, Oliveira DA (2012) Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. *Int J Parasitol* 42: 469–479
- Burgess CGS, Bartley Y, Redman E, Skuce PJ, Nath M, Whitelaw F, Tait A, Gilleard JS, Jackson F (2012) A survey of the trichostrongylid nematode species present on UK sheep farms and associated anthelmintic control practices. *Vet Parasitol* 189: 299-307
- Cezar AS, Catto JB, Bianchin I (2008) Alternative control of the gastrointestinal nematodes of the ruminants: actuality and perspectives. *Cienc Rural* 8: 2083-2091
- Cezar AS, Toscan G, Camillo G, Sangioni LA, Ribas HO, Vogel FSF (2010) Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different skid drugs in the sheep flock in southern Brazil. *Vet Parasitol* 173:157-160
- Charlier J, Morgan ER, Rinaldi L, van Dijk J, Demeler J, Höglund J, Hertzberg H, Van Ranst B, Hendrickx G, Vercruyse J, Kenyon F (2014) Practices to optimise gastrointestinal nematode control on sheep, goat and cattle farms in Europe using targeted (selective) treatments. *Vet Rec* 175(10):250-5
- Chaudhry U, Elizabeth M, Redman EM, Abbas M, Muthusamy R, Ashraf K, Gilleard JS (2015) Genetic evidence for hybridisation between *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* in natural field populations and its implications for interspecies transmission of anthelmintic resistance. *Int J Parasitol* 45: 149–159
- Coles GC, Bauer C, Borgsteede FH, Geerts S, Klei TR, Taylor MA, Waller PJ (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 GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, Samson-Himmelstjerna GV, Silvestre A, Taylor MA, Vercruyse J (2006) The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 136: 167-185
- Cristel S, Fiel C, Anziani O, Descarga C, Cetrá B, Romero J, Fernández S, Entrocasso C, Lloberasi M, Medus D, Steffan P (2017) Anthelmintic resistance in grazing beef cattle in central and northeastern areas of Argentina — an update. *Vet. Parasitol. Reg Stud Reports* 9:25-28
- Fernandes LH, Seno MCZ, Amarante AFT, Souza H, Belluzzo CEC (2004) Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas. *Arq Bras Med Vet Zootec* 56: 733-740
- Gasbarre LC, Smith LL, Hoberg E, Pilitt PA (2009a) Further characterization of a cattle nematode population with demonstrated resistance to current anthelmintics. *Vet Parasitol* 166: 275–280
- Gasbarre LC, Smith LL, Lichtenfels JR, Pilitt PA (2009b) The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the US. *Vet Parasitol* 166: 281–285
- Hussain T, Periasamy K, Nadeem A, Babar ME, Pichler R & Diallo, A (2014) Sympatric species distribution, genetic diversity and population structure of *Haemonchus* isolates from domestic ruminants in Pakistan. *Vet Parasitol* 206: 188–199
- Jacquiet P, Cabaret J, Thiam E, Cheikh D (1998) Experimental and natural *Haemonchus* spp. cross infections of domestic ruminants in Sahelian West Africa. *Ann N Y Acad Sci* 849: 465–469
- Lichtenfels JR, Pilitt PA, Hoberg EP (1994). New morphological characters for identifying individual specimens of *Haemonchus* spp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) and a key to species in ruminants of North America. *J Parasitol* 80: 107-11
- Lopes WDZ, Felippelli G, Teixeira WFP, Cruz BC, Maciel WG, Buzzulini C, Matos LVS, Gomes LVC, Pereira JCM, Fávero FC, Oliveira GP, Costa AJ (2014) *Haemonchus placei*, *Cooperia punctata* and *Oesophagostomum radiatum* resistant to ivermectin pour-on 500mcg/kg-1in cattle from Brazil. *Cienc Rural* 44: 847-853
- Lyndal-Murphy M, Swain AJ, Pepper PM (2014) Methods to determine resistance to anthelmintics when continuing larval development occurs. *Vet Parasitol* 199: 191- 200
- Marley CL, Fraser MD, Davies DA, Rees ME, Vale JE, Forbes AB (2006). The effect of mixed or sequential grazing of cattle and sheep on the faecal egg counts and growth rates of weaned lambs when treated with anthelmintics. *Vet Parasitol* 142: 134-141

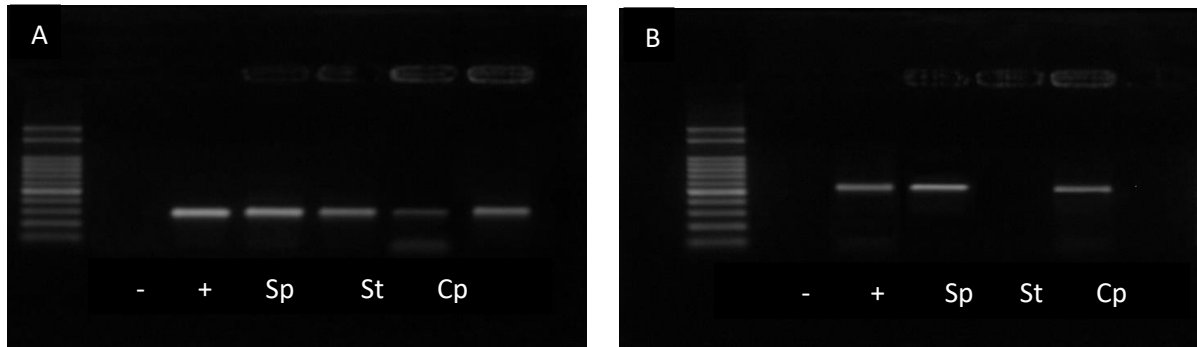
- Minho AP, Gaspar EB, Yoshihara E (2015) Manual de Técnicas Laboratoriais e de Campo para a Realização de Ensaio Experimentais em Parasitologia Veterinária: Foco em Helminhos Gastrointestinais de Ruminantes 148:1-33. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/136882/1/DT-148-online.pdf>
- Molento MB, Verissimo CJ, Amarante AT, Van Wyk JA, Chagas ACS, Araújo JV, Borges FA (2013) Alternatives for the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Arq Inst Biol São Paulo* 80, 253-263
- Neves JHD, Carvalho N, Rinaldi L, Cringoli G, Amarante AFT (2014) Diagnosis of anthelmintic resistance in cattle in Brazil: a comparison of different methodologies. *Vet Parasitol* 206, 216-226
- Pinheiro AC (1983) Verminose ovina. *Hora Vet* 12:5-9.
- Pinheiro AC, Echevarria FAM, Branco FPJA, Macedo JBRR (1987). Descontaminação da pastagem de ovinos pelo pastoreio alternado com bovinos. In: *Coletânea das Pesquisas: Medicina Veterinária—Parasitologia*. EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Ovinos, 275-278.
- Rocha RA, Bresciani KDS, Barros TFM, Fernandes LH, Silva MB, Amarante AFT (2008) Sheep and cattle grazing alternately: Nematode parasitism and pasture decontamination. *Small Ruminant Res* 75(2-3):135-143
- Santiago MAM, Costa UC, Benevenga SF (1975) Estudo comparativo da prevalência de helmintos em ovinos e bovinos criados na mesma pastagem. *Pesq Agropecu Bras* 10: 51-56
- Santos VRV (2010) Efeito dos sistemas de pastejo isolado, simultâneo e alternado de ovinos com bovinos sobre as características da forragem, desempenho, consumo e características de carcaça dos ovinos, (unpublished PhD thesis, University of Brasília).
- Sargison ND, Jackson F, Bartley DJ, Wilson DJ, Stenhouse LJ, Penny CD (2007) Observations on the emergence of multiple anthelmintic resistance in sheep flocks in the southeast of Scotland. *Vet Parasitol* 145: 65-76
- Sczesny-Moraes EA, Bianchin I, Silva KF, Catto JB, Honer MR, Paiva F (2010) Resistência anti-helmíntica de nematóides gastrointestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. *Pesq Vet Bras* 30, 229-236
- Stephanie E, Gina LP, David JB, Jane EH, Jacqueline BM (2018) A survey of experiences of UK cattle and sheep farmers with anthelmintic prescribers; are best practice principles being deployed at farm level? *Prev Vet Med* 155:27-37
- Sutherland IA, Leathwick DM (2011) Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? *Trends Parasitol* 27:176-181.

Testi AJP (2015). AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO PARA MANUTENÇÃO DE LINHAGEM DE *Haemonchus contortus* EM LABORATÓRIO. Dissertation, State University of São Paulo (UNESP).

Torgerson PR, Paul M, Furrer R (2014) Evaluating faecal egg count reduction using a specifically designed package “eggCounts” in R and a user friendly web interface. Int J Parasitol 44: 299-303

Van Wyk JA, Mayhew E (2013) Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. J Vet Res 80:1-14

Figure 1-- Amplification pattern of PCR reactions for *Haemonchus* species identification using DNA extracted from mixed fecal cultures of third stage (L3) larvae prior and post treatment with albendazole of sheep and cattle naturally infected by gastrointestinal nematodes that share grazing areas in Rio Grande



do Sul state.

(A) Amplification using HcBotu F/R primers.(B) Amplification using HpBotu F/R primers.First columns demonstrate negative and positive controls, followed by DNA samples of L3 from sheep prior the treatment (Sp), L3 from sheep after the treatment with albendazole (St), L3 from cattle prior the treatment (Cp), and L3 from cattle after the treatment with albendazole (Ct). All samples were submitter to PCR for two primers for identification of *Haemonchus* species.

TABLE 1- Arithmetic mean (AM, and standard deviation), minimum (MIN) and maximum (MAX) faecal egg counts and percentage of the different genera identified before the treatments (D-2) in the feces of naturally infected beef cattle that share grazing areas with sheep from seven diferente farms in the state of Rio

Farm	OPG			Genera of gastrointestinal nematodes (%)			
	MA(DP)	MIN	MAX	<i>Cooperia</i> spp.	<i>Oesophagostomum</i> spp.	<i>Haemonchus</i> spp.	<i>Ostertagia</i> spp.
1	559.82 (487.7)	200	3200	72	7	21	
2	397.5(188.3)	200	900	16	2	80	2
3	401.04 (223.2)	200	1150	14	4	82	
4	477.5(300.4)	200	1350	28	12	60	
5	515 (282.5)	200	1300	68	2	28	2
6	378.4(361.4)	200	1900	33	6	61	
7	313.1(141.4)	200	750	40	22	38	

Grande do Sul.

TABLE 2 -Arithmetic mean (AM, and standard deviation), minimum (MIN) and maximum (MAX) faecal egg counts and percentage of the different genera identified before the treatments (D-2) in the feces of naturally infected sheep that share grazing areas with beef cattle from seven diferente farms in the state of Rio Grande do Sul.

Farm	OPG			Genera of gastrointestinal nematodes(%)					
	MA(DP)	MIN	MAX	<i>Cooperia</i> spp.	<i>Oesophagostomum</i> spp.	<i>Haemonchus</i> spp.	<i>Ostertagia</i> spp.	<i>Trichostrongylus</i> spp.	<i>Strongyloides</i> spp.
1	604.76 (718)	200	3250	2		98			
2	425.83 (200.94)	200	900	12		78		10	
3	522.92 (431.2)	200	2100	8	14	48	10	20	
4	2213.4(2149.7)	200	9100		10	88		2	
5	1092.5 (688.8)	200	2750	2		92	2		
6	2238(2124.1)	200	10050	2		96		2	
7	1781.81 (1475.5)	400	7359	8		64		6	22

TABLE 8-. Percentage of EPG reduction (and 95% confidence interval) calculated by the fecal egg count reduction test (FECRT) fourteen days after anthelmintic treatment in beef cattle naturally infected by gastrointestinal nematodes that share grazing areas with sheep at seven farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Farm	Anthelmintic compound					
	Ivermectin 1%	Doramectin 1%	Moxidectin 1%	Levamisole 7.5%	Albendazole 15%	Closantel 10%
1	27.9 (6.3 -45.8)	5.8 (0.2-21.6)	86.1 (77.8-91.8)	93.1 (86.4-96.9)	27.2 (5.2-45.2)	4.5 (0.1-17.7)
2	39.3 (11.9-58.1)	80.5 (73.4-86.2)	76 (65.7-83.8)	90.2 (80-95.8)	64.6 (45.4-78.3)	75.9(65.7-83.8)
3	45.2 (18.7-64.1)	45.1 (17.9-64.1)	55.1 (30.4-71.3)	72.8 (54-85)	79.9 (64.9-89.6)	82.3 (68.5-91.1)
4	1.89 (0.06-9.42)	5 (0.22- 1.91)	34 (8.8-53)	91.7 (82.3- 96.9)	74 (58.9-84.5)	87.3(76.6-93.7)
5	7.63 (0.36- 28.8)	13.7 (0.67-38.3)	39.8 (8.62- 63)	75.6 (54.4-88)	24.3 (2.28-50.2)	55.8 (25-75)
6	4.7(0.1-18.5)	4.6 (0.1-18.1)	49.3 (30.4-63.9)	91.7(84.7-96.1)	19.5(2.0-39.3)	30.5(8.4-48.7)
7	13 (0.9-33.1)	4.7(0.1-20.8)	18.6(1.1-45.1)	90.8 (82.1-95.8)	59.2 (40.5-72.7)	50.1 (16.1-71.7)

TABLE 4-Percentage of EPG reduction (and 95% confidence interval) calculated by the fecal egg count reduction test (FECRT) fourteen days after anthelmintic treatment in sheep naturally infected by gastrointestinal nematodes that share grazing areas with cattle at seven farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Farm	Anthelmintic compound					
	Ivermectin 1%	Doramectin 1%	Moxidectin 1%	Levamisole 7.5%	Albendazole 15%	Closantel 10%
1	1.8 (0.06- 8.5)	1.04 (0.03-5.4)	1.2 (0.04-5.92)	5.2 (0.2-19.9)	11.4 (0.68-31.1)	1.18 (0.05- 2.52)
2	3.04 (0.11- 13.7)	1.59 (0.05-7.75)	1.17 (0.04-5.86)	38.7 (14.7-56.1)	1.92 (0.07-9)	36.3 (10.8-55.1)
3	67.9 (50.9-79.8)	86.1 (75.6-92.9)	99.2 (95.6-100)	39.9 (15.6-57.5)	82.9 (70.5-90.8)	57.3 (36.7-71.7)
4	9.49 (0.81-21.9)	49.9 (39.9-58.5)	3.53 (0.13- 13)	98.1 (96.1-99.3)	20 (6.3-31.7)	73.3(67.5-78.2)
5	2.1(0.09-9.3)	2.17(0.07-9.83)	2.25(0.1-10.2)	61.7(50.6-70.6)	1.62(0.06-7.3)	46.6 (33.1-57.5)
6	59(51.2-65.9)	23.8(5.7-40.2)	11.3(1.3-22.6)	78.8(72.2-84.1)	7.05(0.3-18.2)	81.9(76.9-86)
7	45.6 (34.3-55)	67.1 (59.9-73.2)	76.8 (70-82.2)	93 (89-95.9)	61.5 (53.6-68.2)	80.1 (74.5-84.7)

TABLE 59-Efficacy (%) of different anthelmintic drugs on each genus of gastrointestinal nematode fourteen days after treatments on naturally infected beef cattle that share grazing areas with sheep, at seven farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Farm	Genus	Anthelmintic treatments and reduction percentage for each genus after treatment					
		Ivermectin 1%	Doramectin 1%	Moxidectin 1%	Levamisole 7.5%	Albendazole 15%	Closantel 10%
1	Coop	0	50	7.8	34	0	0
	Haem	11	0	0	0	44	52
	Oesop	0	0	0	100	0	0
	Trich				0		
	Ostert						
2	Coop	87.5	75	37.5	87.5	0	0
	Haem	0	0	20	33	15	70
	Oesop	0	0	0	0	0	0
	Trich		0				0
	Ostert	100	100	100	100	100	100
3	Coop	0	14.3	0	0	0	0
	Haem	14.6	12.1	31.7	18.2	58.5	59.7
	Oesop	50	0	0	100	100	100
	Trich						
	Ostert						
4	Coop	0	0	85.7	28.5	0	0
	Haem	40	26.7	46.7	55	90	93.3
	Oesop	83.3	0	0	0		100
	Trich			0	0		0
	Ostert						
5	Coop	9	9	9	0	0	0
	Haem	0	0	0	39.2	92.8	92.8
	Oesop	0	100	0	100	0	0
	Trich						
	Ostert	100	100	100	100	100	100
6	Coop	0	0	0	0	0	0
	Haem	87	36.6	45.1	71	70	100
	Oesop	60	0	80	100	0	60
	Trich				0		
	Ostert						
7	Coop	0	5	0	0	0	0
	Haem	0	0	0	26.3	0	100
	Oesop	54.5	90	45	81.8	90	100
	Trich						
	Ostert						

Coop: *Cooperia* spp.; Haem: *Haemonchus* spp.; Oesop: *Oesophagostomum* spp.; Ostert: *Ostertagia* spp.; Trich: *Trichostrongylus* spp.

TABLE 610-Efficacy (%) of different anthelmintic drugs on each genus of gastrointestinal nematode fourteen days after treatments on naturally infected sheep that share grazing areas with beef cattle, at seven farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil

Farm	Genus	Anthelmintic treatments and reduction percentage for each genus after treatment					
		Ivermectin 1%	Doramectin 1%	Moxidectin 1%	Levamisole 7.5%	Albendazole 15%	Closantel 10%
1	Coop	0	0	0	100	100	0
	Haem	0	2	4	0	36.7	24
	Oesop						
	Trich				0	0	
	Ostert					0	0
	Stron					0	
2	Coop	33.3	100	50	66.6	100	
	Haem	0	0	0	0	0	0
	Oesop						56
	Trich	80	20	0	100	80	
	Ostert		0	0			0
	Stron						
3	Coop	0	50	100	50	0	73.3
	Haem	0	0	100	0	0	54.1
	Oesop	42.8	100	100	0	100	0
	Trich	90	90	100	70	100	90
	Ostert		90	100	0	0	
	Stron						
4	Coop					0	0
	Haem	0	0	0	16	4	91
	Oesop	100	100	100	100	100	20
	Trich	0	100	100	100	100	100
	Ostert		0		0	0	
	Stron						
5	Coop	66	100	100	66	66	100
	Haem	0	0	0	6.5	0	0
	Oesop				0		
	Trich		0		0		
	Ostert	100	100	100	100	100	100
	Stron						
6	Coop	0	0	0	0	0	0
	Haem	4.1	2	29.1	6.2	8	85.4
	Oesop						
	Trich	100	100	100	100	100	0
	Ostert						0
	Stron			0	0	0	0
7	Coop	75	100	75	100	100	75
	Haem	0	0	0	0	0	0
	Oesop				0		

Trich	100	100	33	66.7	66.7	0
Ostert				0	0	0
Stron	100	100	100	100	100	100

Coop: *Cooperia* spp.; Haem: *Haemonchus* spp.; Oesop: *Oesophagostomum* spp.; Ostert: *Ostertagia* spp.; Trich: *Trichostrongylus* spp.; Stron: *Strongyloides* spp.

TABLE 7 - Molecular identification of *Haemonchus* species from third stage larvae of cattle and sheep that share grazing areas before and after the treatment with a benzimidazole at seven farms in Rio Grande do Sul state, Brazil.

Farm	Ruminant species	Before treatment		After treatment	
		<i>H. contortus</i>	<i>H. placei</i>	<i>H. contortus</i>	<i>H. placei</i>
1	Cattle	+	+	+	-
	Sheep	+	-	+	-
2	Cattle	+	+	+	-
	Sheep	+	+	+	-
3	Cattle	+	+	+	-
	Sheep	+	-	+	-
4	Cattle	+	-	+	-
	Sheep	+	-	+	-
5	Cattle	+	+	+	-
	Sheep	+	-	+	-
6	Cattle	+	+	+	-
	Sheep	+	-	+	-
7	Cattle	+	+	+	+
	Sheep	+	-	+	-

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em diferentes regiões do Brasil e de outros países, casos de resistência parasitária tem sido identificados tanto em bovinos como ovinos, comprometendo o capital investido na compra dos medicamentos, na mão-de-obra demandado para realizar estes manejos e outros aspectos como a melhoria genética do rebanho (BIANCHIN et al., 2007; CEZAR et al. 2010; RAMOS et al., 2016; BIAK, LEHNEN e ROCHA, 2018). Logo, diante das evidências já demonstradas na literatura, os resultados que encontramos em nossos experimentos relacionados à resistência por parte dos nematódeos e ineficácia de boa parte das drogas utilizadas não foi uma surpresa.

Atualmente, verificamos no mercado a existência de uma ampla gama de fármacos antiparasitários, com diferentes princípios ativos, formulações, concentrações, vias de administração e nomes comerciais, o que acaba por confundir boa parte dos pecuaristas no momento de aquisição destes compostos (McKELLAR; JACKSON, 2004). Além disso, observa-se que muitos abdicam do acompanhamento técnico, o qual poderia direcionar mais corretamente esta escolha, bem como determinar os momentos mais adequados para o tratamento dos animais. Ainda, medidas de manejo inapropriadas como manutenção de animais em altas lotações (criações intensivas), transferência de animais em condição fisiológica inapropriada (doentes ou em terço final de gestão, p.e.) para piquetes de alto desafio, acabam por promover maior desequilíbrio na relação parasito-hospedeiro, favorecendo estes nematódeos (AMARANTE, 2001).

Este cenário, reflete a realidade que se observa no campo, a qual é compatível com a amplitude dos problemas de resistência parasitária que se observam nas mais diferentes regiões do mundo e foram também confirmados através dos experimentos realizados (WOLSTENHOLME et al., 2004; BORGES et al., 2013). Assim, a realização de estudos os

quais visem elucidar o real impacto sobre a produtividade e saúde animal em decorrência da infecção por estes helmintos se faz cada vez mais importante, tendo em vista o tempo necessário para se criarem novas alternativas farmacológicas por parte da indústria. Por outro lado, a exemplo do que se observou nos estudos desenvolvidos por nossa equipe, existem diferentes limitações, sendo necessários considerar as particularidades inerentes a cada rebanho, as quais não devem ser generalizadas, sendo, assim, necessárias várias repetições para obtenção de resultados mais fidedignos (HAWKINS, J.A., 1993; VILLELA, 2014; GEURDEN et al., 2015).

Somando-se ao diagnóstico a campo dos diferentes casos de resistência, o uso de técnicas moleculares e estudos *in vitro* têm grande importância. Estas técnicas podem auxiliar na identificação mais acurada dos parasitos responsáveis pela falha dos tratamentos, bem como permitir um maior controle em relação aos fatores desencadeadores dos mecanismos de resistência nas populações parasitárias, já que nesses modelos experimentais se podem evitar certas variáveis como os efeitos ambientais, por exemplo (van Zeveren et al., 2007; FORTES e MOLENTO, 2013).

Como conclusão dos estudos realizados, no capítulo 1, foi observado que o uso de anti-helmínticos com maior capacidade de redução de OPG tendem a prover uma melhor relação custo benefício para os pecuaristas. Entretanto, vale ressaltar que os estudos foram conduzidos em condições naturais, onde, possivelmente, fatores como carga genética dos animais, qualidade da dieta, condições ambientais, presença de outras enfermidades concomitantes subclínicas, etc., podem ter interferido nos resultados finais obtidos em algumas das propriedades. No capítulo 2, novamente presenciamos uma falha por grande parte dos anti-helmínticos testados, sendo considerados ineficazes para maioria dos tratamentos realizados tanto nos bovinos como nos ovinos. Ainda, presenciamos certa similariedade na população de

nematódeos presentes nestes animais sob a condição de pastejo consorciado. As análises de PCR realizadas nos grupos tratados com albendazole, nos auxiliaram a entender parte da ineficácia deste princípio, justificada pela presença de co-infecções por espécies de *Harmonchus* e a sobrevivência e adaptação deste parasito em hospedeiros que naturalmente não seriam de sua preferência. Adicionalmente, em uma das propriedades, identificamos um possível caso de hibridização deste parasito, o que pode trazer sérias consequências para o sucesso de futuros tratamentos realizados devido ao fluxo gênico de características de resistência parasitária, o que pode comprometer o desenvolvimento destes animais em sistemas de pastejo consorciados. Logo, os resultados encontrados devem encorajar novas pesquisas a investigar mais a fundo os casos de ineficácia de compostos anti-helmínticos, para que alternativas sejam desenvolvidas e as devidas orientações para retardar o aparecimento de novos casos de resistência sejam repassadas aos proprietários.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKKARI, H., JEBALI, J., GHARBI, M., MHADHBI, M., AWADI, S., DARGHOUTH, M.A. Epidemiological study of sympatric *Haemonchus* species and genetic characterization of *Haemonchus contortus* in domestic ruminants in Tunisia. *Veterinary Parasitology* 193, 118–125, 2013.

ALMEIDA G.D., FELIZ D.C., HECKLER R.P., BORGES D.G.L., ONIZUKA M.K.V., TAVARES L.E.R., PAIVA F. & BORGES F.A. Ivermectin and moxidectin resistance characterization by larval migration inhibition test in field isolates of *Cooperia* spp. in beef cattle, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.191, p.59-65, 2013.

ALMEIDA, L. R., CASTRO, A.A., SILVA, F.J.M., FONSECA, A.H. Desenvolvimento, sobrevivência e distribuição de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de ruminantes, na estação seca da Baixada Fluminense RJ. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Rio de Janeiro, v.14, n. 3, p. 89-94, 2005.

AMARANTE M.R.V., SANTOS M.C., BASSETTO C.C., A.F.T. AMARANTE. PCR primers for straightforward differentiation of *Haemonchus contortus*, *Haemonchus placei* and their hybrids. *Journal of Helminthology*, p.1-5, 2017.

AMARANTE, A. F. T. Controle da verminose ovina. *Revista CFMV.*, n.34, p.19- 30, 2005.

AMARANTE, A. F. T.; BAGNOLA Jr., J; AMARANTE, M. R. V.; BARBOSA, M. A. Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.73, p. 89-104, 1997.

AMARANTE, A.F.T. Controle de endoparasitoses dos ovinos. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba, SP Anais... Piracicaba, SP: FEALQ, p.461 - 473, 2001.

AMARANTE, A.F.T. CONTROLE INTEGRADO DE HELMINTOS DE BOVINOS E OVINOS. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, suplemento 1, 2004.

AMARANTE, A.F.T. Why is it importante to correctly identify *Haemonchus* species? *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.20, n.4, Jaboticabal Dec. 2011.

AMARANTE, A.F.T.; SUZIN, I.; ROCHA, M.B.; MENDES, C.Q.; PIRES, A.V. Resistance of Santa Ines and crossbred ewes to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Veterinary Parasitology*, v.165, n.3, p.273-280, 2009.

ARAF A W.M., HOLMAN P.J., CRAIG T.M. Genotypic and phenotypic evaluation for benzimidazole resistance or susceptibility in *Haemonchus contortus* isolates. *Parasitology Research*, v.116, n.2, p.797-807, 2016.

BAIAK, B.H.B.; LEHNEN, C.R.; DA ROCHA, R.A. Anthelmintic resistance in cattle: A systematic review and meta-analysis. *Livestock Science*, v.217, p.127–135, 2018.

BARGER, I.A. Genetic resistance of hosts and its influence on epidemiology. *Veterinary Parasitology*, v. 32, p. 21-35. 1989

BERGER, J. The resistance of a field strain of *Haemonchus contortus* to five benzimidazole anthelmintics in current use. *Journal of the South African Veterinary Association*, v.46, p.369-72, 1975.

BIANCHIN, I.; CATTO, J.B.; KICHEL, A.N.; TORRES, R.A.A.; HONER, M.R. The effect of the control of endo- and ectoparasites on weight gains in crossbred cattle (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) in the central region of Brazil. *Tropical Animal Health Production*, v.39, p.287-296, 2007.

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

BOERSEMA J.H., LEWING-VAN der Wiel P.J. Benzimidazole resistance in a field strain of *Haemonchus contortus* in the Netherlands. *Veterinary Record*, v.110, p. 203-204, 1982.

BORGES, F.A., ALMEIDA, G.D., HECKLER, R.P., LEMES, R.T., ONIZUKA, M.K.V., BORGES, D.G.L. Anthelmintic resistance impact on tropical beef cattle productivity: effect on weight gain of weaned calves. *Tropical Animal Health Production*, v. 45, p.723–727, 2013.

BORGSTEEDE F.H., DERCKSEN D.D., HUIJBERS R. Doramectin and albendazole resistance in sheep in the Netherlands. *Veterinary Parasitology*, v.144, p.180-183, 2007.

BRASIL B.S.A.F, NUNES R.L., BASTIANETTO E., DRUMMOND M.G., CARVALHO D.C., LEITE R.C., MOLENTO M.B., OLIVEIRA, D.A.A. Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. *International Journal for Parasitology*, v.42, n.5, p.469-79, 2012.

BRICARELLO, P. A.; GENNARI, S.M.; OLIVEIRASEQUEIRA, T.C.G.; VAZ, C.M.S.L.; GONÇALVES, I.G.; ECHEVARRIA, F.A.M. Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research*, v.51, p.73-81, 2004.

BRICARELLO, P.A., ZAROS, L.G., COUTINHO, L.L., ROCHA, R.A., KOOYMAN, F.N., DEVRIES, E., GONCALVES, J.R., LIMA, L.G., PIRES, A.V., AMARANTE, A.F. Field study on nematode resistance in Nelore-breed cattle. *Veterinary Parasitology*, v.148, p. 272–278, 2007.

CATTO, J. B.; BARROS, A. T. M.; COSTA, C. A. F. Efeito de tratamentos anti-helmínticos no ganho de peso de bezerros desmamados, criados em pastagens nativas, no pantanal matogrossense, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.2, n.2, p.127-132, 1993

CAWTHORNE, R.J., WHITEHEAD, J.D. Isolation of benzimidazole resistant strains of *Ostertagia circumcincta* from British sheep. *Veterinary Record*, v.112,p.274-277, 1983.

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

CEZAR, A.S., TOSCAN, G., CAMILLO, G., SANGIONI, L.A., RIBAS, H.O., VOGEL, F.S.F. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.173, p.157-160, 2010.

CEZAR, A.S., VOGEL, F.S.F., SANGIONI, L.A., ANTONELLO, A.M., CAMILLO, G., TOSCAN, G., ARAUJO, L.O. Anthelmintic action of different formulations of lactones macrocíclicas on resistant strains of nematodes of cattle. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, p.523-528, 2010.

CHAPMAN M.R., FRENCH D.D., MONAHAN C.M., KLEI T.R. Identification and characterization of a pyrantel pamoate resistant cyathostome population. *Veterinary Parasitology* v.66, p.205-212, 1996.

CHARLES, T.P. FURLONG, J. A survey of dairy cattle worm control practices in Southeast Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.65, p.65-73, 1996.

CHARLES, T.P.; POMPEU, J.; MIRANDA, D.B. Efficacy of three broad-spectrum anthelmintics against gastrointestinal nematode infections of goats. *Veterinary Parasitology*, v.34, p.7175. 198

CHARLIER, J., HÖGLUND, J., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., DORNY, P., VERCRUYSSE, J. Gastrointestinal nematode infections in adult dairy cattle: Impact on production, diagnosis and control. *Veterinary Parasitology*, v. 164, p.70–79, 2009.

CHAUDHRY U., MILLER M., YAZWINSKY T., KAPLAN R., GILLEARD J. The presence of benzimidazole resistance mutations in *Haemonchus placei* from US cattle. *Veterinary Parasitology*, v.204, p.411-415, 2014.

CHAUDHRY, U., REDMAN, E.M., ABBAS, M., MUTHUSAMY, R., KAMRAN ASHRAF, JOHN S. GILLEARD. Genetic evidence for hybridisation between *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* in natural field populations and its implications for interspecies transmission of anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology*, v.45, p.149–159, 2015.

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

COLES G.C.; TRITSCHLER J.J. II; GIORDANO D.J.; LASTE N.J.; SCHMIDT A.L. A larval development test for detection of anthelmintic resistant nematodes. *Res. Veterinary Science*, v.45, p.50-53, 1988.

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

COLES, G.C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F.H.M.; GEERTS S.; KLEI, T.R; TAYLOR, M.A.; WALLER, P.J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, v.136, p.167-185, 2006.

CONDI, G.K.; SOUTELLO, R.G.V; AMARANTE, A.F.T. Moxidectin-resistant nematodes in cattle in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 161, p.213–217, 2009.

COSTA, A.J. et al. Avaliação comparativa da ação anti-helmíntica e do desenvolvimento ponderal de bezerros tratados com diferentes avermectinas de longa ação. *A Hora Veterinária*, v.24, n.139, p.31-34, 2004

COSTA, F. S. M. Dinâmica das infecções por helmintos gastrintestinais de bovinos na região do vale do Mucuri, MG. 2007. 128 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 2007.

COSTA, J.A.; BORGES, F.A. Controle de endoparasitos em bovinos de corte. In: ALEXANDRE VAS PIRES (Ed.) Bovinocultura de corte. Piracicaba, SP: PLD, p. 901-922, 2010.

COTTER, J.L.; VAN BURGEL, A.; BESIER, R.B. Anthelmintic resistance in nematodes of beef cattle in south-west Western Australia. *Veterinary Parasitology*, v.207, n.3-4, p.276–284, 2015.

DANAHER, M.; HOWELLS, L.C.; CROOKS, S.R.H.; CERKVENIK-FLAJS, V.; O'KEEFFE, M. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B*, v.844, p.175-203, 2006

DE GRAEF, J.; CLAEREBOU, E.; GELDHOF, P. Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes cattle. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr*, v.82, 113-12, 2013.

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

DEMELER J.; KUTTLER U.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Adaptation and evaluation of three different in vitro tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle. *Veterinary Parasitology*, v.170, p.61-70, 2010.

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

DEMELER, J.; Van ZEVEEREN, A.M.; KLEINSCHMIDT, N.; VERCRUYSSSE, J.; HÖGLUND, J.; KOOPMANN, R.; CABARET, J.; CLAEREBOU, E.; ARESKOG, M.; Von SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Monitoring the efficacy of ivermectin and albendazole against gastro intestinal nematodes of cattle in Northern Europe. *Veterinary Parasitology*, n.160, p. 109–115, 2009.

DIAS, S. A. Relação entre larvas recuperadas da pastagem e contagem de ovos por gramas de fezes (opg) de nematóides gastrintestinais de bovinos na microrregião de Viçosa, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Viçosa, v.16, n.1, p.33-36, 2007

DÍEZ-BAÑOS P.; PEDREIRA J.; SÁNCHEZ-ANDRADE R.; FRANCISCO I.; SUÁREZ J.L.; DÍAZ P.; PANADERO R.; ARIAS M.; PAINCEIRA A.; PAZ-SILVA, A.;

MORRONDO P. Field evaluation for anthelmintic-resistant ovine gastrointestinal nematodes by *in vitro* and *in vivo* assays. *Journal of Parasitology*, v.94, p.925-928, 2008.

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

DRUDGE J.H., LYONS E.T., TOLLIVER S.C., LOWRY S.R., FALLON E.H.. Piperazine resistance in population-B equine strongyles: a study of selection in Thoroughbreds in Kentucky from 1966 through 1983. *American Journal of Veterinary Research*, v.49, p. 986-994, 1988.

DRUDGE, J.H., LYONS, E.T., TOLLIVER, S.C., SWERCZEK, T.W. Use of oxibendazole for control of cambendazole-resistant small strongyles in a band of ponies: a six-year study. *American Journal of Veterinary Research*, v.46, p. 2507-2511, 1985.

DRUDGE, J.H., SZANTO, J., WYANT, Z.N., ELAM, G. Field Studies on Parasite Control in Sheep: Comparison of Thiabendazole, Ruelene, and Phenothiazine. *American Journal of Veterinary Research*, v.25, p.1512-1508, 1964.

ECHEVARRIA, F. Doenças parasitárias de ovinos e seu controle. *Anais do 3º Simpósio Paranaense de Ovinocultura*, Londrina, PR, p.46-47, 1988.

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

ECHEVARRIA, F.; TRINDADE, G.N.P. Anthelmintic resistance by *Haemonchus contortus* to ivermectin in Brazil. *Veterinary Record*, v.124, p.147-148, 1989.

FALZON, L.C., O'NEILL, T.J., MENZIES, P.I., PEREGRINE, A.S., JONES-BITTON, A., VAN LEEUWEN, J., et al. A systematic review and meta-analysis of factors associated with anthelmintic resistance in sheep. *Preventive Veterinary Medicine*, v.117, n.2, p.388-402, 2014.

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).

FIEL, C. A., ANZIANI, O., SUÁREZ, V., VÁZQUEZ, R., EDDI, C., ROMERO, J., JORGE CARACOSTANTÓGOLO, J. et al., Resistência antihelmíntica em bovinos: causas, diagnóstico y profilaxis. *Veterinária Argentina*, v.18, n.171, p.21-33, 2003.

FONTENOT, M.E., MILLER, J.E., PEÑA, M.T., LARSEN, M., GILLESPIE, A. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. *Veterinary Parasitology*, v.118, p.203-213, 2003.

FORTES, F.S., KLOSTER, F.S., SCHAFER, A.S., BIER, D., BUZATTI, A., YOSHITANI, U.Y., MOLENTO, M.B. Evaluation of resistance in a selected field strain of *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin using the Larval Migration on Agar Test. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.33, n.2, p.183-187, 2013.

FORTES, F.S., MOLENTO M.B. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.33, n.12, p.1391-1402, 2013.

GASBARRE, L.C. LEIGHTON, E.A., SONSTEGARD, T. Role of bovine immune system and genome in resistance to gastrointestinal nematode. *Veterinary Parasitology*, v.98, p.51-64, 2001.

GENNARI, S. M.; VIEIRA BRESSAN, M. C. R.; ROGERO, J. R.; MacLean, J. M.; DUNCAN, J. L. Pathophysiology of *Haemonchus placei* infection in calves. *Veterinary Parasitology*, v.38, p.163-172, 1991.

GEORGE, M.M.; PARAS, K.L.; HOWELL, S.B.; KAPLAN, R.M.. Utilization of composite fecal samples for detection of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of cattle. *Veterinary Parasitology*, v. 240, p. 24–29, 2017

GEVREY, J. Les formes libres des strongles digestifs des ovins. Morphologie e culture au laboratoire. *Ecologie*. 1971. 206 f. Tese (Docteur es-Sciences Naturelles-Parasitologie) – École Nationale Vétérinaire de Lyon, Lyon, 1971.

GEURDENA,T.; CHARTIERB,C.; FANKEC, J; DI REGALBONOD, A.F.; TRAVERSAE, D.; von SAMSON-HIMMELSTJERNAC, G.; DEMELERC, J.; VANIMISSETTIF, H.B.; BARTRAMG, D.J.; DENWOOD, M.J.. Anthelmintic resistance to ivermectin and moxidectin ingastrointestinal nematodes of cattle in Europe. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, n. 5, p. 163-171, 2015.

GIBBONS, L.M. Revision of the genus *Haemonchus* Cobb, 1898 (Nematoda: Trichostrongylidae). *Systematic Parasitology*. v.1, p. 3–24, 1979.

GILL, J.H., LACEY, E. Avermectin/milbemycin resistance in trichostrongyloid nematodes. *International Journal for Parasitology*, v.28, p.863-877, 1998.

GILL, J.H., REDWIN, J.M., VAN WYK, J.A., LACEY, E. Detection of resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. International journal for Parasitology, v.21, p.771-776, 1991.

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

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química Nova, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

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

GRISI, L., LEITE, R. C., MARTINS, J. R. D. S., BARROS, A. T. M. D., ANDREOTTI, R., CANÇADO, P. H. D., LEÓN, A.A.P; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

GUIMARÃES, M. P. Variação estacional de larvas infestantes de nematóides parasitas de bovinos em pastagens de cerrado de Sete lagoas, MG. Arquivos da Escola de Veterinária da U.F.M.G, v. 24, n. 1, p. 97-113, 1972.

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

HOFFMANN, A., MORAES, E. H. B. K., MOUSQUER, C.J., SIMIONI, T.A., GOMES, F.J., FERREIRA, V.B. Produção de bovinos de corte no sistema de pasto-suplemento no período seco. Nativa, Sinop, v. 02, n. 02, p. 119-130, 2014.

HÖGLUND, J., GUSTAFSSON, K., LJUNGSTRÖM, B.L., ENGSTRÖM, A., DONNAN, A., SKUCE, P. Anthelmintic resistance in Swedish sheep flocks based on a comparison of the results from the faecal egg count reduction test and resistant allele frequencies of the beta-tubulin gene. Veterinary Parasitology, v.161, p.60-68, 2009.

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

Hussain, T., Periasamy, K., Nadeem, A., Babar, M.E., Pichler, R. & Diallo, A. Sympatric species distribution, genetic diversity and population structure of *Haemonchus* isolates from domestic ruminants in Pakistan. Veterinary Parasitology 206, 188–199, 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2015. Disponível em: <<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias.html?view=noticia&id=1&idnoticia=3006&busca=1&t=ppm-2014-rebanho-bovino-alcanca-212-3-milhoes-cabecas>>. Acesso em: 15 abril 2017.

JACKSON, F. Anthelmintic resistance - the state of play. *British Veterinary Journal*, v.149, p.123-138, 1993.

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

KASSAI T. *Veterinary Helminthology*. Oxford: Butterworth & Heineann, 260 p., 1999.

KOTZE, A.C., LE JAMBRE, L.F., O'GRADY, J. A modified larval migration assay for detection of resistance to macrocyclic lactones in *Haemonchus contortus*, and drug screening with Trichostrongylidae parasites. *Veterinary Parasitology*, v.137, p.294-305, 2006.

LARSEN, M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious microfungi. *Parasitology*, v.120, p. 121-131, 2000.

LE JAMBRE, L.F., PRICHARD, P.K., HENNESSY, D.R., LABY, R.H. Efficiency of oxfendazole administered as a single dose or in a controlled release capsule against benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Research in Veterinary Science*, v.31, n. 3, p.289-94, 1981.

LE JAMBRE, L.F. & ROYAL, W.M. Meiotic abnormalities in backcross lines of hybrid *Haemonchus*. *International Journal for Parasitology*, v.10, p.281-286, 1980.

LEATHWICK D.M. A case of moxidectin failing to control ivermectin resistant *Ostertagia* species in goats. *Veterinary Record* v.136, p.443-444, 1995.

LEATHWICK, D.M., MILLER, C.M., ATKINSON, D.S., HAACK, N.A., ALEXANDER, R.A., OLIVER, A.M., et al. Drenching adult ewes: implications of anthelmintic treatments pre- and post-lambing on the development of anthelmintic resistance. *New Zealand Veterinary Journal*, v.54, p.297-304, 2006.

LELAND, S.E.JR., DRUDGE, J.H., WYANT, Z.N., ELAM, G.W. Strain variation in the response of sheep nematodes to action of phenothiazine. III. Field observations. *American Journal of Veterinary Research*, v.18, p.851-860, 1957.

LIMA, W.S. Dinâmica das populações de parasitos gastrintestinais em bovinos de corte, alguns aspectos da relação parasito-hospedeiro e do comportamento dos estádios de vida livre

na região do vale do Rio Doce, MG. Brasil. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, p.178, 1989. (Tese, doutorado).

LIMA, W.S. Controle das Helminthoses de Bovinos. In M Bressan Práticas de 50 manejo sanitário em bovinos de leite, Embrapa Gado de Leite/ Comunicação Empresarial, Juiz de Fora, 2000.

LOVERIDGE, B., McARTHUR, M., McKENNA, P.B., MARIADASS, B. (2003). Probable multigeneric resistance to macrocyclic lactone anthelmintics in cattle in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, v.51, p.139-141, 2003.

MOLENTO, M.B. et al. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. *Arquivo do Instituto Biológico*, v.80, n.2, p.253-263, 2013.

MARTIN, P.J., LEJAMBRE, L.F. Larval paralysis test as an in vitro assay of levamisole and morantel tartrate resistance in *Ostertagia*. *Veterinary Science Communications*, v.3, p.159-164, 1979.

MARTÍNEZ-VALLADARES, M., GEURDEN, T., BARTRAM, D. J., MARTÍNEZ-PÉREZ, J. M., ROBLES-PÉREZ, D., BOHÓRQUEZ, A., FLOREZ, E., MEANA, A., ROJOVÁZQUEZ, F. A. Resistance of gastrointestinal nematodes to the most commonly used anthelmintics in sheep, cattle and horses in Spain. *Veterinary Parasitology*, v.211, p.228-233, 2015.

MARTIN R.J., ROBERTSON A.P., BUXTON S.K., BEECH R.N., CHARVET C.L. & NEVEU C. Levamisole receptors: a second awakening. *Trends for Parasitology*, v.28, p.289-296, 2012.

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

MARTIN, P.J., ANDERSON, N., JARRETT, R.G. Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and in vitro assays. *Australian Veterinary Journal*, v. 66, p. 236–240, 1989.

MARTIN, R.J.; ROBERTSON, A.P. Mode of action of levamisole and pyrantel, anthelmintic resistance, E153 a fnd Q57. *Parasitology*, v.134, n.7, p.1093-1104, 2007.

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

McKENNA, P.B. The effect of previous cold storage on the subsequent recovery of infective third stage nematode larvae from sheep faeces. *Veterinary Parasitology*, v.80, p.167 a 172, 1998.

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

MELO, A.C.F.L.; BEVILAQUA, C.M.L.; VILLAROEL, A.S.; GIRÃO, M.D. Resistência a anti-helmínticos em nematóides gastrintestinais de ovinos e caprinos no município de Pentecoste, estado do Ceará. *Ciência Animal*, v.8, p.7-11, 1998.

MILLER, J.E. GRAY, G.D. Resistência genética a helmintos em ruminantes. In: Controle dos nematódeos gastrintestinais dos ruminantes. Terezinha Padilha (Ed.). Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, p.237- 257, 1996.

MITCHELL, G.B., MARIS, L., BONNIWELL, M.A. Triclabendazole- resistant liver fluke in Scottish sheep. *Veterinary Record* v.143, p.399, 1998.

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

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

MOTTIER, L; LANUSSE, C. Bases moleculares de la resistencia fármacos anti-helmínticos. *Revista de Medicina Veterinária*, v.82, p.74-85, 2001.

NEVES, J.H.D., CARVALHO, N, RINALDI, L., CRINGOLI, G., AMARANTE, A.F.T. Diagnosis of anthelmintic resistance in cattle in Brazil: a comparison of different methodologies. *Veterinary Parasitology* v.206, p.216–226, 2014.

OTTE, M.J. CHILONDA. Animal health economics: an introduction. *Livestock Information, Sector Analysis and Policy Branch, Animal Production and Health Division (AGA), FAO, Rome, Italy, 2001.*

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

POULIN, R. Evolutionary ecology of parasites: from individuals to communities. 214 p., 1997.

PRICHARD R. Ivermectin resistance and overview of the consortium for anthelmintic resistance SNPs. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2007 v.2, n.1,p.41-52, 2007.

PRICHARD, R., TAIT, A. The role of molecular biology in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology*, 98, 169-194, 2001.

RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; SOUZA, A. P.; AVILA, V. S.; COUTINHO, G. C.; DALAGNOL, C. A. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1889-1895, 2004.

RAMOS, F., PORTELLA, L. P., RODRIGUES, F. S., REGINATO, C.Z.PÖTTER, L., CEZAR, A. S., SANGIONI, L. A., VOGEL, F.S.F. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of beef cattle in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v.6, p. 93 a 101, 2016.

RAMOS, S. C. J. Avaliação das parasitoses gastrintestinais em bovinos de raça brava durante a primavera e verão. 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Técnica de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária. 2013

REDMAN, E., PACKARD, E., GRILLO, V., JUDITH SMITH, J., JACKSON, F., GILLEARD, J.S. Microsatellite analysis reveals marked genetic differentiation between *Haemonchus contortus* laboratory isolates and provides a rapid system of genetic fingerprinting. *International Journal for Parasitology*, v. 38, p. 111-122. 2008.

ROCHA, R. A.; BRESCIANI, K. D. S.; BARROS, T. F. M.; FERNANDES, L. H.; SILVA, M. B.; AMARANTE, A. F. T. Sheep and cattle grazing alternately: Nematode parasitism and pasture decontamination. *Small Ruminant Research*, v.75, p.135-143, 2008.

ROCHA, R.A.; AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A. Comparison of the susceptibility of Santa Inês and Ile de France ewes to nematode parasitism around parturition and during lactation. *Small Ruminant Research*, v.55, n.1, p.65-75, 2004.

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

SAMSON-HIMMELSTJERNA G., BLACKHALL W.J., MCCARTHY J.S. & SKUCE P.J. Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes. *Parasitology*, v.134, p.1077-1086, 2007.

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., COLES, G.C., JACKSON, F., BAUER C., BORGSTEEDE, F., CIRAK, V.Y., DEMELER, J., DONNAN, A., et al. Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. *Parasitology Research*, v.105, p.825-834, 2009.

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

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

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

SANTOS, M. C., VENDRAME, M.R., SILVA, M.R.L., AMARANTE, A.F.T. Differentiation of *Haemonchus placei* from *Haemonchus contortus* by PCR and by morphometrics of adult parasites and third stage larvae. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, Jaboticabal, v. 23, n. 4, p. 495-500, 2014.

SCOTT, I., POMROY, W.E., KENYON, P.R., SMITH, G., ADLINGTON, B., MOSS, A. Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*, v.198, p. 166–171, 2013.

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

SHAYAN, P., ESLAMI, A., BORJI, H. Innovative restriction site created PCR-RFLP for detection of benzimidazole resistance in *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitology Research*, v.100, p.1063-1068, 2007.

SILVESTRE, A., CABARET, J. Mutation in position 167 of isotype 1 betatubulin gene of trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? *Molecular Biochemical Parasitology*, v.120, p.297-300, 2002.

SILVESTRE, A., HUMBERT, J.F. A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites. *Experimental Parasitology*, v.95, p.271-276., 2000.

SILVESTRE, A., HUMBERT, J.F. A Molecular Tool for Species Identification and Benzimidazole Resistance Diagnosis in Larval Communities of Small Ruminant Parasites. *Experimental Parasitology*, v.95, p. 271–276, 2000.

SONSTEGARD, T.S., GASBARRE, L.C. Genomic tools to improve parasite resistance. *Veterinary Parasitology*, v.101, p.387-403, 2001.

SOUTELLO, R.V.G., SENO, M.C., AMARANTE, A.F. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern Sao Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.148, p. 360–364, 2007.

SOUTELLO, R.V.G., CONDI, G.K., PAES, F., FONZAR, J.F. Influência do parasitismo e da suplementação proteica no desenvolvimento ponderal de novilhos mestiços Angus-Nelore e da raça Guzerá. *Cienc. Agr. Saúde*, v.2, p.21-27, 2002.

SOUTELLO, R. V. G.; COELHO, W.M.; OLIVEIRA, F.P.; FONZAR, J.F.; LUQUETTI, B.C.; SOUZA, R.F.; SENO, M.C.; AMARANTE, A.F.. Evaluation of reduction in egg shedding of gastrointestinal nematodes in cattle following administration of anthelmintics. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 19, n. 3, p. 183-185, 2010.

SOUZA, A. P., RAMOS, C.I., BELLATO, V., SARTOR, A.A., SCHELBAUER, C.A. Anthelmintics resistance of bovine gastrointestinal helminths in Santa Catarina Plateau. *Ciência Rural*, v.38, n.5, p.1363-1367, 2008.

SOUZA, M. F. Recuperação de larvas infectantes, carga parasitária e desempenho de cordeiros terminados em pastagens com distintos hábitos de crescimento. 2013. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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

STOTZER, E.S., LOPES, L.B., ECKSTEIN, C. , MORAES, M.C.M.M. , RODRIGUES, D.S. , EDUARDO BASTIANETTO, E. Impacto econômico das doenças parasitárias na pecuária. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v. 08, n. 3, p. 198-221, 2014.

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.33-9;, 1999.

SUAREZ, V.H. Helminthic control on grazing ruminants and environmental risks in South America. *Veterinary Research*. v. 33, p. 563–573, 2002.

SUTHERLAND, I.A., LEE, D.L. A larval paralysis assay for the detection of thiabendazole resistance in trichostrongyles. *Parasitology*, v.100, p.131- 135, 1990.

SUTHERLAND, I.A.; LEATHWICK, D.M. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? *Trends in Parasitology*, v.27, n.4, p.176–81, 2011.

SUTHERLAND, I.A.; SCOTT, I. Gastrointestinal nematodes of sheep and cattle. Biology and Control. Wiley-Blackwell 242 ppp, 2010.

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

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F. P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E. A.; MILCZEWSKI, V.; MOCELIN, G.; PESSÔA SILVA, M. C. Resistance of gastrointestinal nematoda to anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 47, n.1, p. 41-47, 2004.

TIWARI J., KUMAR S., KOLTE A.P., SWARNKAR C.P., SINGH D. & PATHAK K.M. Detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using RFLP-PCR technique. *Veterinary Parasitology*, v.138, p.301-307, 2006.

TORGERSON, P.R., PAUL, M., FURRER, R.. Evaluating faecal egg count reduction using a specifically designed package “eggCounts” in R and a user friendly web interface. *International Journal for Parasitology*, v.44, p.299 a 303, 2014.

TORINA, A., FERRANTELLI, V., SPARAGANO, O.A.E.; REALE,S., VITALE,F., CARACAPPA, S. Climatic conditions and gastrointestinal nematode egg production. Observation in breeding sheep and goats. *Annals of New York Academy of Sciences*, v.1026, p.203-209, 2004.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. Manual para diagnóstico das helmintoses em ruminantes. JAPAN INTERNATIONAL OOPERATION AGENCY. 4ª ed. 149p. 1998.

URQUHART et al. *Parasitologia Veterinária*. 2 ed. Rio de Janeiro, 1996.

van WYK J.A., MALAN F.S. Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxanide and the benzimidazoles in South Africa. *Veterinary Record* v.123, p.226-228, 1988.

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., MAYHEW, E. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. *Journal of Veterinary Research*, v.80, p.1 a14, 2013.

VAN WYK, J.A. Refugia-overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v.68, n.1, p.55-67, 2001.

VÁRADY, M., CERNANSKÁ, D., CORBA, J. Use of two in vitro methods for the detection of anthelmintic resistant nematode parasites on Slovak sheep farms. *Veterinary Parasitology*, v.135, p.325-331, 2006.

VERÍSSIMO, C.J. Homeopatia e controle da verminose. In: VERÍSSIMO, C.J. (Ed.) *Alternativas de controle da verminose em pequenos ruminantes*. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, p. 65-71, 2008.

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

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

VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Vet. Bras. Parasitol. Vet.* V.23, n. 2, p. 150-156, 2004.

VIVEIROS, C. T. Parasitoses gastrintestinais em bovinos na ilha de S. Miguel, Açores – Inquéritos de exploração, resultados laboratoriais e métodos de controle. 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Técnica de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária. 2009

WALLER, P.J. Global perspectives on nematode parasite control in ruminant livestock: the need to adopt alternatives to chemotherapy, with emphasis on biological control. In:

WALLER, P.J. Sustainable helminth control of ruminants in developing countries. *Veterinary Parasitology*, v.71 p.195-207, 1997

WALLER, P.J., ECHEVARRIA, F., EDDI, C., MACIEL, S., NARI, A., HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: General over view. *Veterinary Parasitology*, v.62, p. 181-187, 1996.

WEST, D.M., Pomroy, W.E, Kenyon, P.R, Morris, S.T., Smith, S.L. Burnham, D.L. Estimating the cost of subclinical parasitism in grazing ewes. *Small Ruminant Research*, v. 86, n. 1, p. 84-86, 2009.

WOLSTENHOLME, A.J.; FAIRWEATHER, I.; PRICHARD, R.; von SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SANGSTER, N.C. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitology*, v.20, n. 10, p.469-76, 2004.

WOOSTER, MJ., WOODGATE, R.G., CHICK, B.F. Reduced efficacy of ivermectin, abamectin and moxidectin against field isolates of *Haemonchus contortus*. *Australian Veterinary Journal*, v.79, p.840-842, 2001.

XU M., MOLENTO M., BLACKHALL W., RIBEIRO P., BEECH R., PRICHARD R. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.91, p.327-335, 1998.

ZARLENGA D.S., STRINGFELLOW, F., NOBARY, M., LICHTENFELS, J. R. Cloning and characterization of Ribosomal RNA Gens from three species of *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongyloidea) and Identification of PCR primers for Rapid Differentiation. *Experimental parasitology*, v. 78, p.28-36, 1994a.

ZARLENGA, D.S., LICHTENFELS, J.R., STRINGFELLOW, F. Cloning and sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene from *Nematodirus battus*. *Journal of Parasitology*, v.80, p.342-344, 1994b.