

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**FATOR DE RESISTÊNCIA A IVERMECTINA E
MOXIDECTINA EM ISOLADOS DE CAMPO DE *COOPERIA*
SPP. EM BOVINOS DE CORTE, MATO GROSSO DO SUL,
BRASIL**

**IVERMECTIN AND MOXIDECTIN RESISTANCE FACTOR
IN FIELD ISOLATES OF *COOPERIA* SPP. IN BEEF CATTLE,
MATO GROSSO DO SUL, BRAZIL**

Gabriel Daltoé de Almeida

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL
FEVEREIRO - 2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**FATOR DE RESISTÊNCIA A IVERMECTINA E
MOXIDECTINA EM ISOLADOS DE CAMPO DE *COOPERIA*
SPP. EM BOVINOS DE CORTE, MATO GROSSO DO SUL,
BRASIL**

**IVERMECTIN AND MOXIDECTIN RESISTANCE FACTOR
IN FIELD ISOLATES OF *COOPERIA* SPP. IN BEEF CATTLE,
MATO GROSSO DO SUL, BRAZIL**

Gabriel Daltoé de Almeida

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Almeida Borges

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal. Área de concentração: Saúde Animal

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL

FEVEREIRO - 2011

Gabriel Daltoé de Almeida

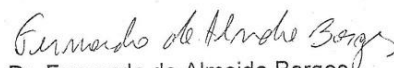
"Fator de resistência a ivermectina e moxidectina em isolados de campo de *Cooperia* spp em bovinos de corte, Mato Grosso do Sul, Brasil"

"Ivermectin and moxidectin resistance factor in field isolates of *Cooperia* spp in beef Cattle, Mato Grosso do Sul, Brasil"

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre.

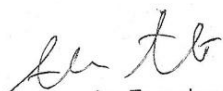
Área concentração: Saúde Animal

APROVADA: 28/02/2011


Dr. Fernando de Almeida Borges

Orientador


Dr. Fernando Paiva


Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante

DEDICO

Aos meus Pais José Manoel de Almeida e Nelei J. Daltoé de Almeida,
pelo amor e apoio incondicional e incansável em todas as minhas conquistas

A Silvestre Daltoé,
um dos homens mais correto, honesto e digno que conheci,
que, infelizmente não está mais presente entre nós, porém com certeza estaria contente
por mais uma das minhas conquistas (*In memorian*)... e a Gênura G. Daltoé pelo
carinho, amor e ensinamentos...

MINHA ETERNA GRATIDÃO

A minha namorada Andréia Coletto Lopes
pelo amor, amizade, confiança e incentivo em minhas empreitadas,
mesmo nas mais distantes.

A todos meus parentes, familiares e amigos que de alguma forma contribuíram para a
execução deste meu trabalho ...

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

À Universidade Federal do Mato Grosso do Sul/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia por possibilitar condições para a realização de meus estudos e do presente trabalho.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – Fundect, pelo apoio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa concedida.

Ao Professor Dr. Fernando de Almeida Borges, pela orientação e auxílio na condução do experimento.

Aos Professores Dr. Fernando Paiva e Professor Dr. Luiz Eduardo Roland Tavares pelos ensinamentos e auxílio na realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, pelos ensinamentos.

Aos estagiários Dyego e Marcel que prestaram sua ajuda na realização desse trabalho.

Ao Daniel da Costa Feliz e ao Rafael Pereira Heckler, que contribuíram para a execução deste estudo.

A todas as pessoas que contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

SUMÁRIO

	“Página”
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	Vi
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.1. O que é resistência e como ocorre?.....	8
2.2. Situação da resistência anti-helmíntica no mundo.....	9
2.3. Situação da resistência anti-helmíntica no Brasil.....	13
2.4. Métodos para identificar a resistência anti-helmíntica.....	15
3. REFERÊNCIAS.....	20
 Fator de resistência a ivermectina e moxidectina em isolados de campo de <i>Cooperia</i> spp. em bovinos de corte, Mato Grosso do Sul, Brasil.....	27
Abstract	27
Resumo.....	28
Introdução	29
Material e Métodos	31
Obtenção de isolados de campo de <i>Cooperia</i> spp. resistentes a ivermectina e moxidectina.....	31
Caracterização dos isolados de campo.....	31
Produção de culturas de larvas monoespecíficas.....	32
Fármacos testados.....	33
Teste de sensibilidade: Migração de larvas em gel de Agar.....	33
Análise de dados.....	34
Resultados e Discussão	35
Conclusão.....	39
Referências.....	40
Lista de Tabelas.....	45
Lista de Figuras.....	46

RESUMO – O presente experimento foi realizado com isolados de *Cooperia* spp. obtidos de propriedades em Mato Grosso do Sul, no período de julho de 2009 a janeiro de 2011. O objetivo do presente trabalho foi determinar a concentração efetiva requerida para paralisar 50% das larvas do gênero *Cooperia* (CE50), em isolados resistentes de campo em Mato Grosso do Sul, utilizando ivermectina e moxidectina para o teste *in vitro*, e calcular o fator de resistência (FR) para este gênero. Foram utilizados oito isolados para o teste de migração em gel de ágar para ivermectina, os isolados Sensível, e os resistentes Nova Alvorada do Sul I, Campo Grande BNA, Campo Grande TBR, Nova Alvorada do Sul II, Bandeirantes, Campo Grande II e Porto Mortinho. Sete isolados foram utilizados para o teste com moxidectina, o Sensível, Campo Grande BNA, Campo Grande TBR, Nova Alvorada do Sul II, Bandeirantes, Campo Grande II e Porto Mortinho. Foram observados os seguintes valores de CE50 de ivermectina para os isolados: Sensível, 1,16 η mol; Nova Alvorada do Sul I, 4,09 η mol (FR= 3,52); Campo Grande BNA, 3,57 η mol (FR= 3,07); Campo Grande TBR, 4,09 η mol (FR= 3,52); Nova Alvorada do Sul II, 2,50 η mol (FR= 2,15); Bandeirantes, 11,35 η mol (FR= 9,78); Campo Grande II, 6,03 η mol (FR= 5,20); e Porto Mortinho, 8,63 η mol (FR= 7,44). Para moxidectina foram observados os seguintes valores de CE50: Sensível, 0,75 η mol; Campo Grande BNA, 0,93 η mol (FR= 1,24); Campo Grande TBR, 0,36 η mol (FR= 0,48); Nova Alvorada do Sul II, 2,57 η mol (FR= 3,42); Bandeirantes, 1,43 η mol (FR= 1,90); Campo Grande II, 1,08 η mol (FR= 1,44); e Porto Mortinho, 0,49 η mol (FR= 0,65). O teste *in vitro* utilizando a técnica de migração de larvas em gel de ágar permitiu a diferenciação fenotípica entre isolados sensível e resistentes, apresentou maior sensibilidade do que o FECRT e mostrou-se uma forma prática e uma possível ferramenta para o diagnóstico da resistência de ivermectina em isolados de campo de *Cooperia* spp..

Palavras-chave: migração, *in vitro*, nematodas, lactonas macrocíclicas.

ABSTRACT – This experiment was conducted with isolates of *Cooperia* spp. obtained of properties in Mato Grosso do Sul, between the periods of July 2009 to January 2011. The objective of this study was to determinate the required effective concentration to paralyze 50% of the larvae of thr genus *Cooperia* (EC50), in field resistants isolates in Mato Grosso do Sul, using ivermectin and moxidectin for *in vitro* test, and calculate the resistance factor (RF) for this genus. Eight field isolates were used to the larval migration in agar test to ivermectin, using ivermectin-sensitive isolate, Nova Alvorada do Sul I, Campo Grande BNA, Campo Grande TBR, Nova Alvorada do Sul II, Bandeirantes, Campo Grande II and Porto Mortinho resistant isolates. Seven field isolates were used to moxidectin test, the moxidectin-sensitive, Campo Grande BNA, Campo Grande TBR, Nova Alvorada do Sul II, Bandeirante, Campo Grande II and Porto Mortinho isolates. The following EC50 values of ivermectin were observed for isolates: Sensitive, 1.16 η mol; Nova Alvorada do Sul I, 4.09 η mol (RF= 3.52); Campo Grande BNA, 3.570 η mol (RF= 3.07); Campo Grande TBR, 4.09 η mol (RF= 3.52); Nova Alvorada do Sul II, 2.50 η mol (RF= 2.15); Bandeirantes, 11.35 η mol (RF= 9.78); Campo Grande II, 6.03 η mol (RF= 5.20); and Porto Mortinho, 8.63 η mol (RF= 7.44). To moxidectin were observed following EC50 values: Sensitive, 0.75 η mol; Campo Grande BNA, 0.93 η mol (RF= 1.24); Campo Grande TBR, 0.36 η mol (RF= 0.48); Nova Alvorada do Sul II, 2.57 η mol (RF= 3.42); Bandeirantes, 1.43 η mol (RF= 1.90); Campo Grande II, 1.08 η mol (RF= 1.44); and Porto Mortinho, 0.49 η mol (RF= 0.65). The *in vitro* test, using the larval migration in agar technique allowed phenotypic differentiation between sensitive and resistant isolates, showed higher sensitivity than FECRT and has been demonstrated a practical way and a possible tool for diagnosis of ivermectin resistance in field isolates of *Cooperia* spp.

Keywords: migration, *in vitro*, nematode, macrocyclic lactones.

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da população humana, melhoria nos padrões de vida e aumento das negociações internacionais em relação aos produtos de origem animal, é de fundamental importância a diminuição dos fatores ambientais que reduzam ou minimizem os resultados produtivos, que supririam as crescentes necessidades mercantis. Segundo Bianchin (1987) dentre estes fatores, destacam-se as helmintoses, oscilações estacionais na disponibilidade e qualidade da pastagem, doenças, o manejo inadequado e carências minerais como causadores de prejuízos na pecuária de corte no Brasil. Estima-se que a mortalidade de bezerros no Rio Grande do Sul, causada por helmintoses varia de 10 a 30%, e que a diferença entre os animais não tratados e tratados seja de 50 kg/bezerro (PINHEIRO et al., 2000).

O parasitismo causado por nematodas gastrintestinais em bovinos, de maneira diferente do que ocorre em ovinos, geralmente se apresenta com evolução subclínica. Desta forma, compostos que apresentem percentuais de eficácia entre 50% e 70% podem controlar os efeitos adversos causados por estes parasitos. Isto faz com que a resistência a anti-helmínticos em bovinos seja diagnosticada com menor facilidade do que em ovinos (FAO, 2004).

No início da década de 80, com o lançamento das avermectinas, principalmente da ivermectina, ocorreu uma revolução no mercado de produtos veterinários para o controle de parasitos (GEARY, 2005). No entanto, com o final da vigência de patente deste fármaco, várias formulações contendo avermectinas foram liberadas no mercado com preço reduzido, o que resultou em seu uso indiscriminado e, conseqüentemente na seleção de populações resistentes de ecto e endoparasitos (RODRIGUES, 2007). Esta forma de uso de drogas antiparasitárias e o não conhecimento sobre os aspectos epidemiológicos do agente parasitário pelos produtores têm provocado a seleção dos parasitos resistentes à ação dos medicamentos utilizados, podendo apresentar-se como um dos principais problemas sanitários da cadeia de produção animal (PAIVA et al., 2001).

O método mais empregado para o controle de helmintoses de ruminantes domésticos é o uso de produtos químicos. No entanto, a utilização de anti-helmínticos como instrumento exclusivo de controle, tem seu futuro comprometido devido ao progressivo aumento do número de relatos de resistência anti-helmíntica e também pela

falta de perspectiva de desenvolvimento de novas moléculas com propriedades antiparasitárias. Sendo então, de grande importância adotar medidas que permitam prolongar a vida útil das drogas disponíveis no mercado (FAO, 2003), monitorando a resistência a fim de diagnosticá-la ainda quando presente em pequena proporção na população de parasitos. Tais problemas têm levado ao desenvolvimento de pesquisas em medidas de controle não químico, tais como pastejo alternado (FERNANDES et al., 2004), seleção de animais geneticamente resistentes (AMARANTE & AMARANTE, 2003), controle biológico utilizando fungos nematófagos (ARAÚJO et al., 2004), manejo nutricional, vacina e fitoterapia (BIANCHIN & CATTO, 2008).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O que é resistência e como ocorre?

A resistência antiparasitária é definida como a habilidade de uma população de parasitos em suportar doses de drogas que seriam letais para a maioria dos indivíduos de uma população susceptível desta mesma espécie (STONE, 1972).

Uma população tem em sua composição uma maioria de indivíduos homozigotos susceptíveis (SS), poucos indivíduos heterozigotos (SR e/ou RS) e uma pequena proporção de indivíduos homozigotos resistentes (RR). A presença de uma mínima parcela de indivíduos RR (sendo apenas 0,01%) já permite o início do processo de seleção, mesmo sendo após o primeiro contato com um produto antiparasitário (MOLENTO, 2005). Uma dose que tem a capacidade de eliminar todos parasitos susceptíveis e alguns parasitos heterozigotos poderia promover o aparecimento da resistência em uma população suscetível (SILVESTRE et al., 2002).

Segundo Kaplan (2004), muitos nematodas parasitos de importância veterinária apresentam características genéticas que favorecem o desenvolvimento de resistência aos anti-helmínticos. De acordo com Mottier e Lanusse (2001), as características genéticas que podem ser atribuídas à resistência são traduzidas nas seguintes modificações bioquímicas que reduzem do efeito da droga contra o parasito: diminuição do número e/ou da afinidade dos receptores aos quais a droga se liga, modificações de sistemas enzimáticos que degradam a droga, alterações estruturais que reduzem a captação do princípio ativo, aumento do metabolismo enzimático e/ou efluxo.

O desenvolvimento da resistência sofre influência de fatores como prática de manejo, clima e idade dos animais que são tratados, principalmente quando os produtores utilizam apenas um produto químico durante períodos prolongados, utilizando doses de forma inadequada ou vários produtos com intervalos de tempo muito curtos para o controle de helmintoses, assim podendo não eliminar de maneira eficaz os parasitas e provocando a resistência aos fármacos (VÁSQUES et al., 2007).

A possibilidade de surgimento de populações de parasitas resistentes é, geralmente, pouco observada pelos médicos veterinários, como também pelos produtores, porque a eficácia dos anti-helmínticos não é clinicamente evidente, e apenas pode ser detectada se for averiguada especificamente (PRICHARD, 1994 e WALLER, 1994). No entanto, se essa resistência ocorrer, não será revertida mesmo suspendendo uso da classe de anti-helmínticos que foi utilizada (MARTIN et al., 1998); isso ocorre pelo fato de que os genes que conferem a resistência podem estar presentes em frequência muito alta nos parasitas e isto lhes permite mecanismos metabólicos que tem a capacidade de impedir ou mesmo superar os efeitos letais da droga (GILL & LACEY, 1998).

Estratégias para retardar o processo de seleção da resistência e controlar cepas resistentes, usualmente agregam mínimos tratamentos químicos, procurando maximizar a eficácia da droga e, se possível, elencar uma alternância lenta de drogas procurando limitar o contato do hospedeiro com parasita pela manipulação do ambiente de pastejo (JACKSON, 1993).

2.2. Situação da resistência anti-helmíntica em bovinos no mundo

Os relatos de resistência em bovinos eram pouco encontrados na literatura, não significando que os seus parasitas tenham menor diversidade genética para expressão da resistência, mas sim pela menor frequência de tratamentos aos quais são submetidos quando comparados com ovinos e caprinos (PAIVA et al., 2001). Atualmente há um crescente número de relatos de resistência anti-helmíntica em bovinos e o gênero predominante nos registros é *Cooperia* (JACKSON et al., 1987; VERMUNT et al., 1995; COLES et al., 1998; ACUÑA & PAIVA, 2000; FIEL et al., 2001; PAIVA et al., 2001; FASHANU & FAGBEMI, 2003; BORGES et al., 2005; RANGEL et al., 2005; MELLO et al., 2006; SOUTELLO et al., 2007 SUAREZ & CRISTEL, 2007; CARDOSO et al., 2008; SOUZA et al., 2008; CONDI et al., 2009; DEMELER et al.,

2009; GASBARRE et al., 2009; CEZAR et al., 2010; DEMELER et al., 2010; EDMONDS et al., 2010 e EL-ABDELLATI et al., 2010).

Jackson et al. (1987) relataram pela primeira vez espécies resistentes de *Cooperia* spp. em bovinos na Nova Zelândia. Estes autores utilizaram o teste de redução na contagem de ovos (FECRT) e o teste de eclodibilidade de ovos (teste *in vitro*), identificando percentuais de redução na contagem de ovos para o grupo tratado com oxfendazole de 65,4% e 100% para o grupo tratado com levamisole. Já no teste *in vitro*, observou-se a concentração efetiva mediana (CE50) de 0,52 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ de oxfendazole para o isolado de *Cooperia* spp. resistente e CE50 de 0,23 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ para isolado susceptível.

Vermunt et al. (1995) relataram resistência anti-helmíntica múltipla em *Cooperia* spp. na Nova Zelândia, utilizando o FECRT. Ivermectina apresentou 64% de eficácia depois de oito dias do tratamento e eficácia nula após 14 dias, enquanto oxfendazole apresentou 93% e 59% de eficácia após oito e 14 dias, respectivamente.

Coles et al. (1998) realizaram um estudo no Reino Unido onde bezerros foram tratados com ivermectina. Após sete dias do tratamento, utilizando FECRT, foi verificada eficácia de 65%, sendo realizada necropsia em dois animais, identificando a presença de 12% de *Nematodirus helvitianus*, 78% de *C. oncophora* e 10% de *C. mcmasteri*. Posteriormente, infectaram oito bezerros machos, livres de infecção por helmintoses, com larvas extraídas de culturas de fezes de dois animais naturalmente infectados e, após 35 dias com avaliação do FECRT a ivermectina apresentou 44% de eficácia.

Fiel et al. (2001) realizaram um trabalho na região dos Pampas, na Argentina, utilizando a metodologia FECRT e o teste anti-helmíntico controlado. Com a utilização do FECRT foi possível observar uma redução de 65% para ivermectina formulação aquosa, redução negativa (-20%) para ivermectina longa ação (formulação oleosa) e 85% para doramectina. Para moxidectina e febendazole, obtiveram uma redução de 95% e 100% respectivamente. No teste anti-helmíntico controlado, a eficácia para *C. oncophora* foi de 62,7 e 48%, para ivermectina formulação aquosa e ivermectina longa ação respectivamente.

Fashanu & Fagbemi (2003) realizaram uma pesquisa utilizando dez rebanhos bovinos totalizando 630 animais, em Shaki, estado de Oyo na Nigéria. A metodologia utilizada foi a de desenvolvimento larval (teste *in vitro*), na qual foram testados princípios ativos, albendazole, febantel, levamisole e morantel. Para a realização da

técnica *in vitro* foram coletadas amostras fecais aleatoriamente em cada rebanho, sendo detectada a resistência para os quatro princípios ativos. A resistência ao albendazole foi detectada em dois rebanhos e ao febantel em um rebanho, ambos com uma CE50 maior que $0,10 \mu\text{g/mL}^{-1}$. Para o levamisole e morantel foram detectadas resistência em três e dois rebanhos respectivamente com a CE50 maior que $1,0 \mu\text{g/mL}^{-1}$.

Suarez & Cristel (2007) avaliaram 25 rebanhos de gado de corte na Região Oeste Pampeana na Argentina, quanto à ocorrência da resistência anti-helmíntica e espécies de nematóides envolvidos. A resistência anti-helmíntica foi detectada em 16 (64%) rebanhos, sendo a resistência à ivermectina encontrada em 15 (60%) rebanhos com eficácia estimada pelo FECRT entre 0 – 85%. *Cooperia* spp. foi o nematoda predominante pós-tratamento em todos os rebanhos com resistência à ivermectina, o que demonstrou um alto nível de resistência na região de engorda da Argentina.

Demeler et al. (2009) realizaram o FECRT em 20 propriedades na Europa, sendo sete na Bélgica, cinco na Suécia e oito na Alemanha. Após 14 dias ao tratamento foi observada resistência à ivermectina em quatro propriedades, uma na Bélgica (74% de redução), outra na Suécia (83%) e outras duas na Alemanha (87% e 69%). No entanto, 21 dias após o tratamento, o número de propriedades com resistência aumentou para nove, Bélgica (58%, 67% e 73%), Suécia (47%, 88% e 79%) e Alemanha (84%, 81% e 35%), sendo a espécie *C. oncophora* mais prevalente (85%) em 17 das 20 propriedades identificadas nas culturas após o 14º dia de tratamento, e em todas as propriedades após 21 dias. Também encontraram *O. ostertagia* em algumas fazendas da Suécia e Alemanha, porém em menor número.

Gasbarre et al. (2009) nos Estados Unidos, relataram resistência anti-helmíntica para diversas bases, moxidectina, doramectina eprinomectina, ivermectina e albendazole. Dentre todas as formulações testadas, a média de nenhum grupo alcançou a eficácia acima de 85% para o FECRT, sendo o maior valor moxidectina (82%) e menor para eprinomectina (42%). As espécies de maior prevalência recuperadas em necropsias de todos os grupos tratados foram *Haemonchus contortus* (entre 55 – 99%), *H. placei* (entre 0 – 45%) e *C. punctata* (85 – 100%).

Edmonds et al. (2010) realizaram um estudo anti-helmíntico controlado no sudoeste de Idaho, Estados Unidos, com 50 novilhas com alta contagem de ovos por grama de fezes. Febendazole e oxfendazole obtiveram eficácias maiores que 90% contra vermes adultos de *Cooperia* spp. quando comparados com o grupo controle. Moxidectina obteve 88% de redução contra *Cooperia* spp. no pós-tratamento, em

relação ao grupo controle, enquanto o grupo tratado com ivermectina não apresentou redução quanto à forma adulta deste gênero. Baseado nas médias geométricas, os quatro grupos obtiveram eficácias maiores que 90% contra formas adultas de *O. ostertagi* quando comparados com o grupo controle. Febendazole e moxidectina foram igualmente eficazes contra o desenvolvimento e inibição das fases iniciais de L4 de *O. ostertagi*. Ivermectina não foi eficaz contra o desenvolvimento ou inibição das fases iniciais de L4.

Na Bélgica, El-Abdellati et al. (2010) acompanharam a evolução da resistência de *C. oncophora* à ivermectina em bovinos em uma fazenda durante quatro anos, utilizando o FECRT. Destacou-se em 2006 pela primeira vez, a presença desta espécie como resistente a ivermectina, com uma redução de 73%, abaixo de 40% em 2007 e redução nula em 2008. Para moxidectina em 2009, o percentual de redução foi de 83%, demonstrando uma resistência lateral das lactonas macrocíclicas. Por outro lado, os benzimidazóis obtiveram 100% de eficácia. Nesta propriedade, havia o histórico do uso prolongado de ivermectina do período entre 1991 e 2006. Estes pesquisadores também utilizaram o teste de inibição da migração larval com uma versão modificada, de acordo com Demeler et al. (2010), utilizando um isolado sensível de *C. oncophora* e dois isolados resistentes à ivermectina, CoIVR07 (2007) e o CoIVR08 (2008). Os resultados de CE50 para CoIVR07 foi de 542 η M e para CoIVR08 foi de 698 η M, sendo 4,5 e 5,8 vezes maiores que o CE50 do isolado sensível (120 η M).

Demeler et al. (2010) adaptaram três diferentes métodos *in vitro* para detectar a resistência anti-helmíntica em bovinos. Os métodos foram: teste de desenvolvimento larval (LDT) utilizando ivermectina e thiabendazole, teste de inibição da migração larval (LMIT) para levamisole e ivermectina e o teste de avaliação da motilidade larval (MMT) avaliando somente ivermectina. Os ovos de nematodas e as larvas de terceiro estágio de *O. ostertagi* e *C. oncophora* foram isolados de fezes de bovinos experimentalmente infectados. Foram utilizados isolados sensíveis de *C. oncophora* e *O. ostertagi* e resistente a ivermectina e thiabendazole respectivamente. Para os isolados sensíveis de *C. oncophora* e *O. ostertagi* os valores de CE50 foram entre 0,0051 e 0,0018 mg/mL para thiabendazole e entre 3,19 e 1,64 η M para ivermectina, para *C. oncophora* resistente o CE foi igual 16,3 η M, no teste LDT. Embora os valores de CE50 de ivermectina para *O. ostertagi* e *C. oncophora* sensíveis tenham sido semelhantes, os valores de CE50 de ivermectina para o teste LMIT foram cerca de 3 vezes superiores (CE50= 123 η M para *C. oncophora* sensível e CE50= 404 η M para *O.*

ostertagi sensível) e para *C. oncophora* resistente chegou a ser 5 vezes superiores (CE50= 621 η M) . Para o teste MMT, os resultados de CE50 referentes a *C. oncophora* suscetível e resistente foram 1,68 e 8,17 η M respectivamente, tendo fator de resistência (FR) igual a 4,86. Segundo os pesquisadores, os três testes são confiáveis, identificando diferenças significativas na resposta para ivermectina ($p<0,0001$) entre isolado sensível e resistente de *C. oncophora*, tendo um fator de resistência de aproximadamente cinco para ivermectina e 2,8 para levamisole. O teste de desenvolvimento larval também detectou diferenças nas repostas entre os isolados de *O. ostertagi* sensíveis e os selecionados ($p<0,001$) com um fator de resistência igual a 2 para thiabendazole.

2.3. Situação da resistência anti-helmíntica no Brasil

No Brasil, o primeiro relato de resistência anti-helmíntica em bovinos foi realizado por Pinheiro & Echevarria (1990) no município de Bagé, no estado de Rio Grande do Sul, onde constataram resistência ao oxfendazole (60% de redução), albendazole 5 mg/kg (81%) e albendazole 7,5 mg/kg (88%) para *Haemonchus* spp., utilizando o método FECRT. *Trichostrongylus axei* e as espécies dos gêneros *Ostertagia* e *Cooperia* foram sensíveis às formulações anti-helmínticas, com eficácia superior a 90%.

Acuña & Paiva (2000) relataram resistência de espécies parasitos gastrintestinais de bovinos ao realizarem teste de campo em propriedade localizada no município de Caraguatatuba, São Paulo, Brasil, empregando FECRT para comparação de duas formulações comerciais: moxidectina e ivermectina. No 14º dia pós-tratamento, verificaram uma redução de 82,5% no grupo tratado com ivermectina, já o grupo tratado com moxidectina não apresentou ovos até o 14º dia pós-tratamento. Pelos critérios sugeridos pela World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology - W.A.A.V.P. (COLES et al., 1992), nos casos em que as reduções são menores de 90% na contagem de ovos por grama de fezes (OPG), a droga pode ser considerada moderadamente efetiva e a suspeita de resistência anti-helmíntica pode ser considerada.

Posteriormente, Paiva et al. (2001) utilizaram uma técnica *in vitro* de desenvolvimento das formas parasíticas imaturas com modificações daquelas descritas por Stringfellow (1988) e Rothwell & Sangster (1993). Para a realização desta técnica, foram utilizados os isolados da Fazenda Modelo da Embrapa Gado de Corte - MS (75% de *Cooperia* sp., 10% *Haemonchus* sp. e 15% *Oesophagostomum* sp.) e CNPGC (55%

Cooperia sp., 35% *Haemonchus* sp. e 10% *Oesophagostomum* sp.), ambas em Campo Grande, MS, e isolado Serramar (71% *Cooperia* sp., 28% *Haemonchus* sp. e 01% *Oesophagostomum* sp.) provindo de uma propriedade em Caraguatatuba, SP. O isolado sensível, proveniente da Fazenda Modelo, apresentou CE50 de 10,04 ηg de ivermectina; e o isolado Serramar de 580.172,30 ηg , que corresponde ao fator de resistência (FR) de 57.786,08. No isolado sensível (CNPGC) o valor de CE50 foi de 130,39 $\eta\text{g/mL}^{-1}$ com um FR de 12,98.

Vários outros estudos demonstraram a resistência a anti-helmínticos em nematodas parasitos de bovinos no Brasil. Rangel et al. (2005) observaram resistência de *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp., à ivermectina e doramectina, pelo FECR município de Betim, Minas Gerais. Também neste mesmo Estado, Borges et al. (2005) avaliaram a eficácia de ivermectina na dose de 630 $\mu\text{g/kg}$ e observaram após 14 dias depois do tratamento, resistência de *H. placei*, *C. punctata* e *C. spatulata* nos cinco rebanhos avaliados e de *C. pectinata* em dois deles, utilizando necropsias parasitológicas. Mello et al. (2006) avaliaram a eficácia anti-helmíntica de diferentes lactonas macrocíclicas em bovinos no município de Santa Maria, Rio Grande do Sul, sendo constatada a resistência de *Trichostrongylus* spp. e *Cooperia* spp. a todas formulações.

Soutello et al. (2007) realizaram um estudo em 25 propriedades rurais na região noroeste de São Paulo, avaliando a eficácia de ivermectina, moxidectina, sulfóxido de albendazole e fosfato de levamisole, demonstraram resistência de *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp. a estes princípios ativos em 23, 0, 5 e 2 propriedades, respectivamente.

Cardoso et al. (2008) realizaram dois testes controlados no município de Seropédica, Rio de Janeiro, em 1998, e observaram resistência de *C. punctata* à ivermectina e à doramectina, que apresentaram 53,9% e 82,4% de eficácia, respectivamente.

Souza et al. (2008) avaliaram a eficácia de ivermectina, fosfato de levamisole e sulfóxido de albendazole em 39 propriedades localizadas no Planalto Catarinense, dentre as quais, 82,1% apresentaram animais com helmintos resistentes à ivermectina, 15,4% ao fosfato de levamisole e 7,8% ao sulfóxido de albendazole. Em apenas 10,3% das propriedades a eficácia de todos os anti-helmínticos foi superior a 95%. Os gêneros predominantes resistentes à ivermectina foram *Cooperia* e *Haemonchus*.

Condi et al. (2009) relataram resistência à moxidectina no estado de São Paulo, utilizando o método FECRT, com percentuais de redução para o grupo tratado de 88, 85, 88 e 92% após três, sete, 10 e 14 dias depois do tratamento respectivamente comparados ao grupo controle. Os gêneros predominantes nas coproculturas depois do tratamento foram *Cooperia* e *Oesophagostomum*. No teste do anti-helmíntico controlado, moxidectina apresentou-se 100% eficaz contra *Haemonchus* e *Trichostrongylus*, e eficácia de 81,4% para *Trichuris*, 65,2% para *Cooperia* (*C. punctata* e *C. pectinata*) e 44,8% para *Oesophagostomum radiatum*.

Cezar et al. (2010) relataram resistência às lactonas macrocíclicas em baixas (1%) e altas concentrações (3,5%), como também associações (ivermectina + abamectina) para os gêneros *Cooperia*, *Haemonchus* e *Trichostrongylus*, em um rebanho com 149 bovinos, situado no município de São Pedro do Sul, no Rio Grande do Sul.

Diante destes expostos, é possível observar o crescente problema da resistência no território nacional, destacando-se o gênero *Cooperia*. As lactonas macrocíclicas (avermectinas/milbemicinas) são os produtos mais comercializados para controle de endo e ectoparasitos e é uma das classes de anti-helmínticos para a qual mais se encontram relatos de resistência na literatura mundial.

2.4. Métodos para identificar a resistência anti-helmíntica

Para identificação da resistência anti-helmíntica, existem testes utilizando metodologia *in vivo* e *in vitro*.

Dentre os testes *in vivo*, há o teste anti-helmíntico controlado, envolvendo tratamento e necropsia de animais infectados, e o cálculo da eficácia do anti-helmíntico é determinado pela comparação da carga parasitária encontrada entre os animais tratados e não tratados. Os animais são randomizados em grupos e medicados, sendo a data da necropsia de acordo com a farmacocinética do anti-helmíntico avaliado, então os parasitos são recuperados, contados e identificados (WOOD, et al., 1995). É uma técnica onerosa, que exige equipe especializada e o tempo para o resultado final pode ser muito longo, porém é a de maior acurácia.

A metodologia mais comumente utilizada é o teste de redução da contagem de ovos nas fezes (FECRT), que é simples e relativamente fácil de executar. Porém apresenta resultados que não podem estimar com precisão a eficácia de anti-helmínticos,

porque a produção de ovos de nematódeos nem sempre se correlacionam bem com os números reais de vermes e o teste mede apenas os efeitos sobre a produção de ovos de vermes adultos (TAYLOR et al., 2002). Muito embora o resultado deste teste não seja consistente, sendo pouco sensível, podendo apresentar uma variação acima de 20%, pode-se estimar a presença da resistência quando a eficácia de determinado produto esteja abaixo de 95%. O teste não tem a sensibilidade para detectar os níveis de resistência quando esta se encontra abaixo de 25% da população de parasitos (MARTIN et al., 1989).

Le Jambre et al. (1999) consideram que o quesito mais importante para o combate à resistência, no intuito de conservar a sensibilidade anti-helmíntica nas populações parasitos, é a capacidade em detectá-la enquanto em baixos níveis. Isto já é possível pela utilização de testes *in vitro*, pois têm grande precisão, são bastante sensíveis, permitem medidas quantitativas da sensibilidade e/ou resistência, estudo do modo de ação dos anti-helmínticos e dos mecanismos de resistência (TAYLOR & HUNT, 1989; ROTHWELL & SANGSTER, 1993), porém são técnicas trabalhosas e exigem tempo e instalações para produção de culturas monoespecíficas, quando assim feitas.

Os testes *in vitro* para avaliação de eficácia de drogas anti-helmínticas podem representar um importante instrumento para o diagnóstico de resistência de nematodas parasitos de ruminantes. Todas as metodologias para realização destes testes utilizam concentrações seriais dos anti-helmínticos a serem testados, de acordo com características do modo de ação. Quando são utilizadas diferentes concentrações nos testes *in vitro*, é possível calcular as concentrações efetivas (CE) para, por exemplo, considerar qual concentração irá matar 50 ou 90 % da população (CE₅₀ ou CE₉₀) e assim concluir pela presença ou não da resistência; assim esta conclusão terá como referencial a dose terapêutica, sendo transformadas as respostas encontradas e expressas em uma regressão linear em relação à dose (TAYLOR & HUNT, 1989).

Muitos autores avaliaram testes *in vitro*, expondo os diferentes estágios do ciclo evolutivo dos parasitos aos fármacos, de acordo com seu modo de ação, tais como: testes de eclodibilidade de ovos indicado para benzimidazóis (LE JAMBRE, 1976; DOBSON et al., 1986 e VARADY et al., 1996); desenvolvimento de larvas indicado para benzimidazóis e lactonas macrocíclicas (COLES et al., 1988; TAYLOR, 1990; LACEY et al., 1990, GILL et al., 1995; AMARANTE et al., 1997; ATHANASIADOU et al., 2001; KAPLAN et al., 2007;); avaliação da motilidade das larvas que pode ser

utilizado para morantel, lactonas macrocíclicas e levamisol (COLES et al., 1989; GILL et al., 1991; D'ASSONVILLE et al., 1996 e VARADY et al., 1998), o teste de desenvolvimento de fases imaturas de parasitos podendo ser aplicada para todos as classes de anti-helmínticos (STRINGFELLOW, 1988; ROTHWELL & SANGSTER, 1993 e SMALL & COLES, 1993), o teste de inibição da alimentação das larvas, desenvolvidas para lactonas macrocíclicas e imidatiazóis (ÁLVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2005, DÍEZ-BAÑOS et al., 2008), e o teste de inibição da eliminação da cutícula, avaliado para extrato de plantas taníferas (BAHUAUD et al., 2006 e BRUNET & HOSTE, 2006), sendo a maioria destes testes desenvolvidas para parasitos de ovinos, havendo poucos trabalhos envolvendo parasitos gastrintestinais de bovinos (JACKSON et al., 1987; PAIVA et al., 2001; FASHANU & FAGBEMI, 2003; EL-ABDELLATI et al., 2010 e DEMELER et al., 2010).

O teste de eclodibilidade de ovos foi desenvolvido para diferenciar cepas sensíveis e cepas resistentes de nematodas gastrintestinais para benzimidazóis e levamisol (FAO, 2004). O teste original foi descrito por Le Jambre (1976) e tem sido usado desde então, com algumas modificações por muitos outros pesquisadores. Este teste tem como objetivo determinar a proporção de ovos que não eclodiram apos serem incubados em concentrações seriadas de benzimidazóis por um tempo determinado (CUTULLÉ et al., 1999). É um método preciso para avaliação da susceptibilidade de populações mistas de nematodas gastrointestinais, e é comparativamente mais rápido e mais econômico do que o FECRT (FAO, 2004). A principal desvantagem desta é exigência de ovos não desenvolvidos. Esse problema ocorre porque os benzimidazóis atuam apenas sobre o ovo na primeira parte do desenvolvimento, já quando a embrionação acontece, os ovos tornam-se menos suscetíveis a este grupo de anti-helmínticos e assim pode resultar em falsos positivos (CUTULLÉ et al., 1999).

Teste de motilidade larval é baseado na determinação do percentual de larvas que são paralisadas após serem expostas por 24 horas em diluições seriadas de anti-helmínticos. Para execução deste teste, é necessário isolado sensível a ser testado em paralelo com isolados supostamente resistentes (MARTIN & LE JAMBRE, 1979). Os testes que avaliam a motilidade através da migração por um sistema de ágar e telas, consistem em contar o número de larvas que são capazes de migrar através deste sistema pela exposição de luz, após serem expostas a diluições de anti-helmínticos (GILL et al., 1991; D'ASSONVILLE et al., 1996, MOLENTO & PRICHARD, 2001 e KOTZE et al., 2006). Os testes têm a vantagem de usar larvas de terceiro estágio, que

são facilmente obtidas de coproculturas, e a sua execução é relativamente fácil, porém esta técnica tem algumas desvantagens, como por exemplo, ocorre uma atípica dose-resposta, no modo que altas concentrações elevadas de levamisole são menos eficazes do que baixas concentrações para imobilizar as larvas (CUTULLÉ et al., 1999).

Para o teste de desenvolvimento larval, ovos de nematódeos são incubados em poços que contém meios nutritivos e as concentrações seriadas dos anti-helmínticos para assim posteriormente identificar se há o desenvolvimento até o terceiro estágio larval (COLES et al., 1988). Os testes de desenvolvimento larval são os únicos que permitem a detecção de resistência contra todas as drogas, independentemente do seu modo de ação (FAO, 2004). As desvantagens desta técnica são a necessidade de uma monitoração cuidadosa da placa na qual os ovos são colocados para a eclosão, e a necessidade dos ovos serem livres de qualquer resíduo orgânico (CUTULLÉ et al., 1999). Outros fatores importantes são que as contagens e a determinação da CE50 são demoradas, e é preciso como em outras técnicas *in vitro*, a utilização de uma cepa susceptível e uma resistente (FAO, 2004).

Os testes moleculares até então só são indicados para analisar a resistência frente aos benzimidazoles, devido ao fato de que os mecanismos moleculares da resistência para lactonas macrocíclicas, levamisole e pirantel ainda não são totalmente compreendidos (COLES et al., 2006). As técnicas de PCR e RT-PCR são muito sensíveis, se baseiam na utilização de DNA e RNA respectivamente, para detectar genes de resistência em baixas frequências em populações de parasitos suscetíveis (CUTULLÉ, 1999).

De acordo com a revisão feita por Taylor et al. (2002), o teste da união da tubulina, é baseado nas alterações bioquímicas dos parasitos com a ligação dependente da estrutura particular dos benzimidazóis. Este teste é rápido, tem alta reprodutibilidade e é sensível para pequenas alterações no status de resistência de populações de parasitos (FAO, 2004). Porém esse teste exige trabalho com isótopos radioativos que requerem instalações aprovadas, laboratório e pessoal especialmente treinado, o uso de equipamentos caros e também pelo fato de ser uma técnica que leva tempo para sua realização (CUTULLÉ et al., 1999).

O teste de inibição da alimentação larval é uma técnica baseada na avaliação da ingestão de *Escherichia coli*, identificadas com fluoresceína-5-isotiocianato, por larvas de primeiro estágio incubadas em diluições seriadas de anti-helmínticos. As larvas que ingeriram *E. coli* são identificadas através da mudança na coloração intestinal,

observadas em microscópio de fluorescência invertido (ÁLVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2005). Segundo estes autores, esta técnica tem a vantagem de ser mais simples e mais rápida, quando comparada ao teste de desenvolvimento larval.

Smout et al. (2010), adaptaram uma técnica originalmente utilizada para medir o crescimento celular em tempo real, para avaliar a eficácia de drogas sobre os principais helmintos de humanos e animais, como por exemplo, *H. contortus*, *Strongyloides ratti*, ancilostomídeos adultos e vermes que parasitam o sangue. A nova aplicação é baseada em um dispositivo de monitoração de eventos celulares (xCELLigence), avaliando em tempo real de forma automatizada, a transferência elétrica de microeletrodos integrados na parte inferior da placa de cultivo celular, que informam qualquer alteração de ovos, larvas e vermes adultos em relação ao efeito de anti-helmínticos. Segundo os pesquisadores, é uma técnica simples e objetiva, para detectar em tempo real a eficácia de anti-helmínticos sobre os diferentes estágios dos parasitos, e a sua utilização será valiosa para detecção da resistência e desenvolvimento de outros fármacos.

Com a redução dos investimentos na descoberta de novos fármacos anti-helmínticos, por centros de pesquisas e pela indústria farmacêutica veterinária, e o conhecimento limitado sobre a biologia dos parasitos, sendo a medida que poderia apontar para novos mecanismos de ação de drogas, reduzem a perspectiva do desenvolvimento de novos grupos químicos, principalmente aqueles com ação endectocidas, como as lactonas macrocíclicas (GEARY & THOMPSON, 2003). Desta maneira, são de fundamental importância o monitoramento e a realização de testes para avaliação dos níveis de resistência anti-helmíntica.

O objetivo do presente trabalho foi determinar a concentração efetiva requerida para paralisar 50% das larvas do gênero *Cooperia* (CE50), resistentes em isolados de campo no Estado de Mato Grosso do Sul, utilizando ivermectina e moxidectina para o teste *in vitro*, e calcular o fator de resistência (FR) para este gênero isolado.

3. REFERÊNCIAS

- ACUÑA, A. H & PAIVA, F. Evaluation of EPG reduction after treatment with moxidectin or ivermectin applied on cattle naturally infected. In: XXI WORLD BUIATRICS CONGRESS. PUNTA DEL ESTE, Uruguay, 2000.
- ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, M. A.; PÉREZ GARCÍA, J.; BARTLEY, D.; JACKSON, F.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A. The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. **Experimental Parasitology**, v.110, p.56-61, 2005.
- AMARANTE, A. F. T. ; AMARANTE, M. R. V. Breeding sheep for resistance to nematode infections. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v.2, n.3, p. 147-161, 2003.
- AMARANTE, A. F. T.; POMROY, W. E.; CHARLESTON, W. A. G.; LEATHWICK, D. M; TORNEROS, M. T. T. Evaluation of larval development assay for the dection of anthelmintic resistance in *Ostertagia circumcincta*. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n.3, p. 305-311, 1997.
- ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; ALVES, P. H.; CAMPOS, A. K.; GANDRA, J. R. Controle biológico de *tricostrongilídeos* (Nematoda: *Trichostrongyloidea*) gastrintestinais de bovinos pelo fungo *Monacrosporium sinense*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.4, p. 467-471, 2004.
- ATHANASAIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; COOP, R. L. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vivo* and *in vitro* studies. **Veterinary Parasitology**, v. 99, p. 205-219, 2001.
- BAHUAUD, D.; MARTINEZ-ORTIZ DE MONTELLANO, C.; CHAUVEAU, S.; PREVOT, F.; TORRES-ACOSTA, F.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. **Parasitology**, v.132, p.545-554, 2006
- BIANCHIN, I. Controles estratégicos dos nematódeos gastrintestinais em bovinos de corte no Brasil. **A Hora Veterinária**, v.39, p.49-53, 1987.
- BIANCHIN, I. & CATTO, J. B. Epidemiologia e alternativas de controle de helmintos em bovinos de corte na região central do Brasil. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, Curitiba, PR, 2008.
- BORGES, F. A.; RODRIGUES, D. C.; LOPES, W. D. Z.; SILVA, H. C.; OLIVEIRA, G. P.; COSTA, A. J *Haemonchus placei*, *Cooperia punctata*, *C. spatulata*, and *C. pectinata* resistant to Ivermectin in bovines In: 20TH INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE WORLD ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 2005, Nova Zelândia. **Anais...** Christchurch, Nova Zelândia , 2005.

BRUNET, S. & HOSTE, H. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.7481-7487, 2006.

CARDOSO, J. M. S.; MARTINS, I. V. F.; SANT'ANNA, F. B.; CORREIA, T. R.; TANCREDI, I. P.; COUMENDOUROS, K.; TANCREDI, M. G. F.; SCOTT, F. B.; GRISI, L. Identification of ivermectin and doramectin-resistant *Cooperia punctata* (LINSTOW, 1907) in a dairy herd in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, suplemento, p.75-81, 2008.

CEZAR, A. S.; VOGEL, F. S. F.; SANGIONI, L. A. ANTONELLO, A. M.; CAMILLO, G.; TOSCAN, G.; ARAUJO, L. O. Ação anti-helmíntica de diferentes formulações de lactonas macrocíclicas em cepas resistentes de nematódeos de bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 523-528, 2010.

COLES, G. C.; JACKSON, F.; POMROY, W. E.; PRICHARD, R. K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M. A.; VERCURYSSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.136, p.167-185, 2006.

COLES, G. C.; STAFFORD, K. A.; MACKAY, P. H. S. *Cooperia* species from calves on a farm in Somerset. **The Veterinary Record**, v.7, p.255-256, 1998.

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

COLES, G. C.; FOLZ, S. D. & TRITSCHLER, J. P. Motility response of levamisole / benzimidazole resistant. **Veterinary Parasitology**, v.31, n.34, p.253-257, 1989.

COLES, G. C.; TRITSCHLER, J. P.; GIORDANO, D. J.; LASTE, N. J. & SCHMIDT, A. L. Larval development test for detection of anthelmintic. **Research in Veterinary Science**, v.45, n.1, p.50-53, 1988.

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.

CUTULLÉ, C.; EDDI, C.; CARACOSTANTOGOLO, J.; CASTAÑO ZUBIETA, R.; SHAPIRO, J. Métodos *in vitro* para el diagnóstico de resistencia anti-helmíntica. **Veterinaria Argentina**, v 16, n.157, p.514-521, 1999.

D'ASSONVILLE, J. A.; JANOVSky, E. & VERSTER, A. *In vitro* screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. **Veterinary Parasitology**, v.61, n.1-2, p.73-80, 1996.

DEMELER, J.; KUTTLER, U.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Adaptation and evaluation of three different *in vitro* tests for the detection of resistance to

anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle. **Veterinary Parasitology**, v.170, n.1-2, p. 61-70, 2010.

DEMELER, J.; VAN ZEVEEREN, A. M. J.; 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 gastrointestinal nematodes of cattle in Northern Europe. **Veterinary Parasitology**, v.160, p.109-115, 2009.

DÍEZ-BAÑOS, P.; PEDREIRA, J.; SÁNCHEZ-ANDRADADE, R.; FRANCISCO, I.; SUÁREZ, J. L.; DÍAZ, P.; PANADERO, R.; ARIAS, M.; PAINCEIRA, A.; PAZ-SILVA, A.; MORRONGO, P. Field evaluation for anthelmintic-resistant ovine gastrointestinal nematodes by *in vitro* and *in vivo* assays. **The Journal of Parasitology**, v.94, n.4, p.925-928, 2008.

DOBSON, R. J.; DONALD, A. D.; WALLER, P. J. & SNOWDON, K. L. An egg-hatch assay for resistance to levamisole in trichostrongylid nematode parasites. **Veterinary Parasitology**, v.19, n.1/2, p.77-84, 1986.

EDMONDS, M. D.; JOHNSON, J. D.; EDMONDS, J. D. Anthelmintic resistance of *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* to macrocyclic lactones in cattle from the western United States. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p.224-229, 2010.

EL-ABDELLATI, A.; GELDHOF, P.; CLAEREBOU, E.; VERCRUYSSSE, J.; CHARLIER, J. Monitoring macrocyclic lactone resistance in *Cooperia oncophora* on a Belgian cattle farm during four consecutive years. **Veterinary Parasitology**, v. 171, p. 167-171, 2010.

FAO. Module 2. helminths: anthelmintic resistance: diagnosis, management and prevention. **Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants**. FAO:Roma, p. 78-118, 2004.

FAO. **Resistencia a los antiparasitarios: estado actual con énfasis en América Latina**. Roma:FAO, Salud Animal, p.1-52, 2003.

FASHANU, S. O.; FAGBEMI, B. O. A preliminary investigation of resistance to anthelmintics in strongyles of cattle in shaki, nigría. **African Journal of Biomedical Research**, v. 6, p.111-112, 2003.

FERNANDES, L. H.; SENO, M. C. Z.; AMARANTE, A. F. T.; SOUZA, H.; BELLUZZO, C. E. C. Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.6, p.733-740, 2004.

FIEL, C. A.; SAUMELL, C. A.; STEFFAN, P. E.; RODRIGUEZ, E. M. Resistance of *Cooperia* to ivermectin treatments in grazing cattle of the Humid Pampa, Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.97, p. 211-217, 2001.

GASBARRE, L. C.; SMITH, L. L.; LICHTENFELS, J. R.; PILITT, P. A. The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple class of anthelmintics in

a commercial cattle population in the US. **Veterinary Parasitology**, v.166, p.281-285, 2009.

GEARY, T. G. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. **Trends in Parasitology**. v..21,n. 11, 2005.

GEARY, T.G.; THOMPSON, D.P. Development of antiparasitic drugs in the 21st century. **Veterinary Parasitology**, v.115, p167-184, 2003.

GILL, J. H. & LACEY, E. Avermectin/milbemycin resistance in *trichostrongyloides* nematodes. **International Journal for Parasitology**, v.28, n.6, p.863-77, 1998.

GILL, J. H.; REDWIN, J. M.; VAN-WYK, J. A.; LACEY, E. Avermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus* - effects of ivermectin resistance. **International Journal for Parasitology**, v.25, n.4, p.463-70, 1995.

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, n.7, p.771-776, 1991.

JACKSON, F. Anthelmintic resistance – the state of play. **British Veterinary Journal**, v.149, n. 2, p.123-138, 1993.

JACKSON, R. A.; TOWNSEND, K. G.; PUKE, C.; LANCE, D. M. Isolation of oxfendazole resistant *Cooperia oncophora* in cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, v.35, p.187, 1987.

KAPLAN, R. M.; VIDYASHANKAR, A. N.; HOWELL, S. B.; NEISS, J. M.; WILLIAMSON, L. H.; TERRILL, T. H. A novel approach for combining the use of *in vitro* and *in vivo* data to measure and detect emerging moxidectin resistance in gastrointestinal nematodes of goats. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p.795-804, 2007.

KAPLAN, R. N. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, v.20, n.10, 2004.

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

LE JAMBRE, L. F.; DOBSON, R. J.; LENANE, I. J.; BARNES, E. H.. Selection for anthelmintic resistance by macrocyclic .**International Journal for Parasitology**, v.29, n.7, p.1101- 1111, 1999.

LE JAMBRE, L. F. Egg hatch as an *in vitro* assay of thiabendazole resistance in nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.2, p.385-391, 1976.

MARTIN, R. J. MURRAY, I.; ROBERTSON, A. P.; BJORN, H.; SANGSTER, N. Anthelmintics and ion-channels: after a puncture, use a patch. **International Journal for Parasitology**, v.28, n.6, p.849-862, 1998.

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

MELLO, M. H. A.; DEPNER, R.; MOLENTO, M. B.; FERREIRA, J. J. Resistência lateral às macrolactonas em nematodas de bovinos. **Archives of Veterinary Science**, v.11, n.1, p.8-12, 2006.

MOLENTO, M. B. Resistência parasitária em helmintos de eqüídeos e propostas de manejo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, dez. 2005.

MOLENTO, M. B.; PRICHARD, R. K. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, p.117-121, 2001.

MOTTIER, L.; LANUSSE, C. Bases moleculares de la resistencia a fármacos anti-helmínticos. **Revista de Medicina Veterinária**, v.82, n.2, p.74-85, 2001.

PAIVA, F.; SATO, M. O.; ACUNA, A. H.; JENSEN, J. R.; BRESSAN, M. C. R. V. Resistência a ivermectina constatada em *Haemonchus placei* e *Cooperia punctata* em bovinos. **A Hora Veterinária**, v.20, n.120, p.29-32, 2001.

PINHEIRO, A. C.; ALVES-BRANCO, F. P. J.; SAPPER, M. F. M. Programa básico de orientação para o controle da verminose dos bovinos de corte no Rio Grande do Sul. In: Controle dos principais ectoparasitos e endoparasitos em bovinos de corte no Rio Grande do Sul. Bagé, Embrapa Pecuária Sul, Documentos, 18, p. 39, 2000.

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

PRICHARD, R. K. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v.54, n.1/3, p. 259-268, 1994.

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

RODRIGUES, D. C. **Avaliação da toxicidade de avermectinas em bovinos com idade inferior a trinta dias**. Jaboticabal, 2007. 18-19p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/pan/m/2901.pdf>

ROTHWELL, J. T & SANGSTER, .N.C.. An *in vitro* assay utilising parasitic larval *Haemonchus contortus* to detect resistance to closantel and other anthelmintics. **International Journal for Parasitology**, v.23, n.5, p.573-578, 1993.

SILVESTRE, A.; LEIGNEL, V.; BERRAG, B.; GASNIER, N.; HUMBERT, J.; CHARTIER, C.; CABARET, J. Sheep and goat nematode resistance to anthelmintics: pro and cons among breeding management factors. **Veterinary Research**, v. 33, p.465-480, 2002.

SMALL, A. J.& COLES, G. C. Detection of anthelmintic resistance by culture *in vitro* of parasitic stages of ovine nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.51, n.1-2, p.163-166, 1993.

SMOUT, M. J.; KOTZE, A. C.; MCCARTHY, J. S.; LOUKAS, A. A novel high throughput assay for anthelmintic drug screening and resistance diagnosis by real-time monitoring of parasite motility. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.4, n.11, p.1-10, 2010.

SOUTELLO, R. G. V.; SENO, M. C. Z.; AMARANTE, A. F. T. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern Sao Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.148, n.3/4, p.360-364, 2007.

SOUZA, A. P.; RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; SCHELBAUER, C, A. Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1363-1367, 2008

STONE, B. F. The genetics of resistance by ticks to acaricides. **Australian Veterinary Journal**, v.48, p.345-350, 1972.

STRINGFELLOW, F. An *in vitro* test for drug resistance in *Haemonchus contortus*. **Proceedings of the helminthological Society of Washington**, v.55, n.1, p.19-23, 1988.

SUAREZ, V. H. & CRISTEL, S. L. Anthelmintic resistance in cattle nematoda in the western Pampeana Region of Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.111-117, 2007.

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

TAYLOR, M. A. A. Larval development test for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of sheep. **Research in Veterinary Science**, v.49, n.2, p.198-202, 1990.

TAYLOR, M. A. & HUNT, K. R. Anthelmintic drug resistance in the UK. **Veterinary Record**, v.125, p.143-147, 1989.

VARADY, M; CORBA, J.; HRCKOVA, G. The *in vitro* motility response to various anthelmintics of third-stage larvae of *Oesophagostomum* spp. from pigs. **Veterinary Research**, v, 2, n.5, p.299-304, 1998.

VARADY, M.; BIORN, H.; NANSEN, P. *In vitro* characterization of anthelmintic susceptibility. **International Journal for Parasitology**, v.26, n.7, p.733-740, 1996.

VÁSQUEZ, P. T.; SANMIGUEL, G. A. P.; LARA, D. M. Resistencia antihelmíntica en los nemátodos gastrointestinales del bovino. **Revista de Medicina Veterinária**, v.13, p.59-76, 2007.

VERMUNT, J. J.; WEST, D. M.; POMROY, W. E. Multiple resistance to ivermectin and oxfendazole in *Cooperia* species of cattle in New Zealand. **Veterinary Record**, v.137, p.43-45, 1995.

WALLER, P. J. The development of anthelmintic resistance in ruminant. **Acta Tropica**, v.56, n.2/3, p.233-243, 1994.

WOOD, I. B.; AMARAL, N. K.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J. L.; KASSAI, T.; MALONE, J. B. Jr.; PANKAVICH, J. A.; REINECKE, R. K.; SLOCOMBE, O.; TAYLOR, S. M.; VERCRUYSSSE, J. World Association for Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluation the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology**, v.58, n.3, p.181-213, 1995.

Fator de resistência a ivermectina e moxidectina em isolados de campo de *Cooperia* spp. em bovinos de corte, Mato Grosso do Sul, Brasil

Ivermectin and moxidectin resistance factor in field isolates of *Cooperia* spp. in beef cattle, Mato Grosso do Sul, Brazil

Gabriel Daltoé de Almeida^{1*}; Daniel C. Feliz¹; Rafael P. Heckler¹; Dyego G. L. Borges²; Marcel K. V. Onizuka²; Fernando Paiva³, Fernando A. Borges⁴

¹ Aluno do Programa de Pós - graduação em Ciência Animal, FAMEZ/UFMS

² Aluno do curso de graduação de Medicina Veterinária, UFMS

³ Departamento de Parasitologia, CCBS/UFMS

⁴ Departamento de Medicina Veterinária, FAMEZ/UFMS

Abstract

The objective of this study was to determinate the required effective concentration to paralyze 50% of the larvae of thr genus *Cooperia* (EC50), in field resistant isolates in State of Mato Grosso do Sul, using ivermectina (IVM) and moxidectin (MXD) for *in vitro* test, and calculate the resistance factor (RF) for this genus. Eight field isolates were used to the larval migration in agar test to ivermectin, using IVM-sensitive (CNPqC/UFMS) isolate, Nova Alvorada do Sul I, Campo Grande BNA, Campo Grande TBR, Nova Alvorada do Sul II, Bandeirantes, Campo Grande II and Porto Mortinho resistant isolates. MXD was evaluated in all these isolates, except the Nova Alvorada do Sul I. The following EC50 values of IVM were observed for isolates: Sensitive, 1.16 η mol; Nova Alvorada do Sul I, 4.09 η mol (RF= 3.52); Campo Grande BNA, 3.570 η mol (RF= 3.07); Campo Grande TBR, 4.09 η mol (RF= 3.52); Nova Alvorada do Sul II, 2.50 η mol (RF= 2.15); Bandeirantes, 11.35 η mol (RF= 9.78);

* Laboratório de Doenças Parasitárias – LADPAR,
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FAMEZ,
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS,
Bolsista do CNPq,
e-mail: gabrieldaltoe@hotmail.com
Foram seguidas as normas da Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.

Campo Grande II, 6.03 μmol (RF= 5.20); and Porto Mortinho, 8.63 μmol (RF= 7.44). To MXD were observed following EC50 values: Sensitive, 0.75 μmol ; Campo Grande BNA, 0.93 μmol (RF= 1.24); Campo Grande TBR, 0.36 μmol (RF= 0.48); Nova Alvorada do Sul II, 2.57 μmol (RF= 3.42); Bandeirantes, 1.43 μmol (RF= 1.90); Campo Grande II, 1.08 μmol (RF= 1.44); and Porto Mortinho, 0.49 μmol (RF= 0.65). The *in vitro* test, using the larval migration in agar technique allowed phenotypic differentiation between sensitive and resistant isolates, showed higher sensitivity than FECRT and has been demonstrated a practical way and a possible tool for diagnosis of ivermectin resistance in field isolates of *Cooperia* spp.

Keywords: migration, *in vitro*, nematode, macrocyclic lactones.

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi determinar a concentração efetiva requerida para paralisar 50% das larvas do gênero *Cooperia* (CE50), resistentes em isolados de campo no Estado de Mato Grosso do Sul, utilizando ivermectina (IVM) e moxidectina (MXD) para o teste *in vitro*, e calcular o fator de resistência (FR) para este gênero isolado. Foram utilizados oito isolados de campo para o teste de migração em gel de ágar para IVM, o isolado Sensível (CNPGC/UFMS), e os resistentes Nova Alvorada do Sul I, Campo Grande BNA, Campo Grande TBR, Nova Alvorada do Sul II, Bandeirantes, Campo Grande II e Porto Mortinho. Os mesmos foram utilizados para avaliação de MXD, exceto o isolado Nova Alvorada do Sul I. Foram observados os seguintes valores de CE50 de IVM para os isolados: Sensível, 1,16 μmol ; Nova Alvorada do Sul I, 4,09 μmol (FR= 3,52); Campo Grande BNA, 3,57 μmol (FR= 3,07); Campo Grande TBR, 4,09 μmol (FR= 3,52); Nova Alvorada do Sul II, 2,50 μmol (FR= 2,15); Bandeirantes, 11,35 μmol (FR= 9,78); Campo Grande II, 6,03 μmol (FR= 5,20); e Porto Mortinho, 8,63 μmol (FR= 7,44). Para MXD foram observados os seguintes valores de CE50: Sensível, 0,75 μmol ; Campo Grande BNA, 0,93 μmol (FR= 1,24); Campo Grande TBR, 0,36 μmol (FR= 0,48); Nova Alvorada do Sul II, 2,57 μmol (FR= 3,42); Bandeirantes, 1,43 μmol (FR= 1,90); Campo Grande II, 1,08 μmol (FR= 1,44); e Porto Mortinho, 0,49 μmol (FR= 0,65). O teste *in vitro* utilizando a técnica de migração de larvas em gel de ágar permitiu a diferenciação fenotípica entre isolados sensível e resistentes, apresentou

maior sensibilidade do que FECRT e mostrou-se uma forma prática e uma possível ferramenta para o diagnóstico da resistência de ivermectina em isolados de campo de *Cooperia* spp.

Palavras – chave: migração, *in vitro*, nematodas, lactonas macrocíclicas.

Introdução

Desde o descobrimento das moléculas para tratamento de verminoses, o método mais utilizado para o controle de helmintos em ruminantes domésticos é o uso destes produtos químicos. Entretanto, a utilização de anti-helmínticos como instrumento exclusivo no controle, tem seu futuro comprometido devido a um crescente aumento no número de casos de resistência e à falta de perspectiva de lançamento de novos fármacos com propriedades terapêuticas antiparasitárias. Sendo assim, é de grande importância adotar medidas que prolonguem a vida útil das drogas disponíveis no mercado (FAO, 2003).

No início da década de 80, com o lançamento das avermectinas, principalmente da ivermectina (IVM), ocorreu uma revolução no mercado de produtos veterinários para o controle de parasitos (GEARY, 2005). No entanto, com o final da vigência de patente deste fármaco, várias formulações contendo avermectinas foram liberadas no mercado com preço reduzido, o que resultou em seu uso indiscriminado e, conseqüentemente, na seleção de populações resistentes de ecto e endoparasitos (RODRIGUES, 2007). Esta forma de uso de drogas antiparasitárias pelos produtores, sem que haja um estudo sobre os aspectos epidemiológicos do agente parasitário, tem provocado a seleção dos parasitos resistentes à ação dos medicamentos utilizados, podendo apresentar-se como um dos principais problemas sanitários da cadeia de produção animal (PAIVA et al., 2001).

A resistência tem como definição a capacidade de uma população de parasitos em tolerar doses de drogas que seriam letais para a maioria dos indivíduos de uma população susceptível desta mesma espécie (STONE, 1972). Os relatos de resistência em bovinos eram poucos encontrados na literatura, não significando que os seus parasitos tenham menor diversidade genética para expressão da resistência, mas sim pela menor frequência de tratamentos aos quais são submetidos quando comparados

com ovinos e caprinos (PAIVA et al., 2001). Atualmente, há um crescente número de relatos de resistência anti-helmíntica em bovinos e o gênero predominante nos registros de resistência é *Cooperia*, sendo estes relatos feitos na Nova Zelândia (JACKSON et al., 1987 e VERMUNT et al., 1995), Reino Unido (COLES et al., 1998 e FAMILTON et al., 2001) Argentina (ANZIANI et al., 2000; FIEL et al., 2001; MEJÍA et al., 2003; SUAREZ & CRISTEL, 2007), Nigéria (FASHANU & FAGBEMI, 2003), e Brasil (PINHEIRO & ECHEVARRIA, 1990; PAIVA et al., 2001; RANGEL et al., 2005; MELLO et al., 2006; SOUTELLO et al., 2007; CARDOSO et al. 2008; SOUZA et al., 2008; CONDI et al., 2009 e CEZAR et al., 2010) destacando o crescente problema da resistência para este gênero no território nacional. Na Europa foi relatada recentemente por Demeler et al. (2009) na Suécia, Bélgica e Alemanha. El-Abdellati et al. (2010) relataram também na Bélgica, e nos Estados Unidos foi relatado por Gasbarre et al. (2009) e Edmonds et al. (2010).

A primeira e mais importante medida para reduzir a seleção de populações resistentes é o diagnóstico precoce e preciso da resistência. Os métodos *in vivo* podem ser imprecisos (teste de redução da contagem de ovos - FECRT), caros e trabalhosos (teste anti-helmíntico controlado). O FECRT é o principal método para diagnosticar a resistência, sendo de metodologia simples e pouco onerosa, porém é pouco sensível (COLES et al., 1992) e pode apresentar resultados que não estimam com precisão a eficácia de anti-helmínticos, porque a produção de ovos de nematodas nem sempre se correlacionam com o número real de vermes, e o teste só mede os efeitos sobre a produção de ovos de vermes adultos (TAYLOR et al., 2002). O teste não tem a sensibilidade para detectar os níveis de resistência quando esta se encontra abaixo de 25% da população de parasitos (MARTIN et al., 1989).

Le Jambre et al. (1999) consideraram que o quesito mais importante para o combate à resistência, no intuito de conservar a sensibilidade anti-helmíntica nas populações parasitas, é a capacidade em detectá-la enquanto em baixos níveis. Isto já é possível pela utilização de testes *in vitro*, pois têm maior precisão, são bastante sensíveis, permitem medidas quantitativas da sensibilidade/resistência, estudo do modo de ação dos anti-helmínticos e dos mecanismos de resistência (TAYLOR & HUNT, 1989; ROTHWELL & SANGSTER, 1993), porém são técnicas trabalhosas e exigem tempo para produção de culturas monoespecíficas, quando assim feitas.

Quando são utilizadas técnicas *in vitro*, elimina-se o efeito hospedeiro, não é considerada a interação hospedeiro versus droga versus parasito, mas apenas o efeito

droga versus parasito, o que permite avaliar com maior precisão a susceptibilidade do parasito do anti-helmíntico.

A técnica *in vitro* comumente utilizada para o diagnóstico da resistência, o teste de eclodibilidade de ovos (LE JAMBRE, 1976; WHITLOCK et al., 1980 e COLES et al., 1992), baseia-se na atividade ovicida de benzimidazóis, formando a base para outros testes *in vitro* (VARADY & CORBA, 1999). Esta técnica não pode ser utilizada para lactonas macrocíclicas, que têm atividade em formas imaturas e adultas de helmintos, por isso o método de migração de larvas é a medida alternativa para esta classe anti-helmíntica (GILL et al., 1991 e D'ASSONVILLE et al., 1996).

O objetivo do presente trabalho foi determinar a concentração efetiva requerida para paralisar 50% das larvas do gênero *Cooperia* (CE50), resistentes em isolados de campo no Estado de Mato Grosso do Sul, utilizando ivermectina e moxidectina para o teste *in vitro*, e calcular o fator de resistência (FR) para este gênero isolado.

Material e Métodos

Obtenção de isolados de campo de *Cooperia* spp. resistentes a IVM e MXD

Entre o período de 13/06/09 e 03/12/10 foram obtidos os isolados de *Cooperia* spp. em propriedades nos municípios de Nova Alvorada do Sul (isolados Nova Alvorada do Sul I e Nova Alvorada do Sul II), Campo Grande (isolados Campo Grande BNA, Campo Grande TBR e isolado Campo Grande II), Bandeirantes (isolado Bandeirantes) e Porto Mortinho (isolado Porto Mortinho). Nestas propriedades coletaram-se fezes de mais de 160 bovinos mestiços, com aproximadamente um ano de idade, mantidos em pastagem de *Brachiaria* spp. e portadores de infecção helmíntica naturalmente adquirida e não dosificados nos últimos noventa dias que antecederam a coleta.

Caracterização dos isolados de campo

O fenótipo de resistência a lactonas macrocíclicas foi caracterizado pelo teste de redução na contagem de ovos nas fezes (COLES et al., 1992), em trabalho previamente realizado (FELIZ, 2011) e está apresentado na Tabela 1.

Após a caracterização da resistência à IVM, foram realizadas coproculturas, conforme a técnica descrita por Roberts & O' Sullivan (1950). O critério para identificação dos gêneros foi aquele proposto por Keith (1953). As larvas obtidas nas coproculturas, no pré-tratamento dos bovinos de cada isolado, foram utilizadas no teste *in vitro* de migração de larvas em gel de ágar. No entanto, esta técnica exige o uso de culturas puras de parasitos, ou seja, presença de apenas um gênero de nematoda. Por este motivo, como houve a presença de mais de um gênero (infecção mista) na mesma propriedade, houve a necessidade de isolamento e produção monoespecífica de larvas.

Além dos isolados das amostras pré-tratamento das propriedades citadas anteriormente, também foi utilizado outro isolado Sensível (CNPGC/UFMS) à IVM e à MXD, mantido no Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte (CNPGC – Embrapa, MS), o qual estava criopreservado desde 2004 sendo descongelado em oito de novembro de 2009, para o cálculo do fator de resistência (FR).

Produção de culturas de larvas monoespecíficas

Dois bezerros mestiços, machos em bom estado sanitário, com idade de 90 dias, foram mantidos no setor de isolamento animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), em baias individuais que foram higienizadas periodicamente com hipoclorito de sódio e vassoura de fogo, medidas que auxiliam evitar reinfecções helmínticas. Os animais receberam água *ad libitum* e silagem de milho duas vezes ao dia.

Estes animais foram medicados sistematicamente antes de cada nova infecção com dois produtos, triclorfone¹ em uma solução a 10% diluído em água, sendo administrados 0,5 mL via oral, por quilo de peso vivo e com levamisole² injetável na dose de 7,5 mg/kg, de forma alternada entre cada nova infecção, para que estivessem livres de parasitismo por nematodas. Isto foi confirmado pelo exame de ovos por grama de fezes (OPG) segundo Gordon & Whitlock (1939) modificada, realizado em três dias consecutivos após o terceiro dia de tratamento no Laboratório de Doenças Parasitárias (LADPAR) da FAMEZ/UFMS.

¹ Neguvon® Solução Pulverização, Bayer Saúde Animal. Partida 009/08.

² Ripercol L 150 F® Fort Dodge Saúde Animal. Partida 019/09.

Os animais foram induzidos à infecção experimental via oral, com 500 larvas por quilo de peso vivo, contendo *Cooperia* spp., *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp. e *Oesophagostomum* spp., provindas das propriedades citadas anteriormente. Uma vez que o período pré-patente de *Cooperia* spp. é inferior ao das outras espécies, cerca de 14 a 16 dias, os ovos eliminados após estes dias e até o 22º dia pertenciam a este gênero. Durante este período foram realizadas coproculturas para obtenção das larvas. Passados sete dias as L3 foram extraídas, realizou-se a confirmação pela morfologia (KEITH, 1953) e então utilizadas no teste *in vitro* para a determinação da concentração efetiva mediana (CE50).

Fármacos avaliados

Para execução do teste de migração de larvas em gel de ágar, foram utilizadas ivermectina comercial³ e moxidectina comercial⁴, diluídas em água destilada em soluções estoque para as diluições seriadas.

- Ivermectina: solução estoque A: 0,57 η mol/mL; solução estoque B: 5,7 η mol/mL; solução estoque C: 57 η mol/mL e solução estoque D: 144 η Mol/mL.
- Moxidectina: solução estoque A: 285 η mol/0,5 mL e solução estoque B: 28,5 η mol/0,5 mL.
- Diluições utilizadas para os dois fármacos em cada teste de migração: 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 η mol/0,5 mL.

Teste de sensibilidade: Migração de larvas em gel de ágar

Foi seguida a metodologia de D'Assonville et al. (1996) modificada por Molento & Prichard (2001), com seguintes alterações: foram utilizadas 1000 L3/0,5 mL, que foram colocadas em contato com hipoclorito de sódio 0,048%⁵ durante 20 minutos, avaliadas a cada cinco minutos, para o desembainhamento. Cilindro de plástico (0,8 cm de altura x 3,0 cm de diâmetro) sobreposto a duas telas metálicas, uma delas com abertura de 38 μ m e outra com abertura maior, fora preenchida com 25 mL de água

³ Ivomec® Solução Injetável, Merial Saúde Animal. Partida 060/08.

⁴ Cydectin® Solução Injetável, Fort Dodge Saúde Animal. Partida 014/08.

⁵ Hipoclorito de sódio 4-6% P.A. VETEC Química Fina LFDA. Lote 0801237.

destilada; para estimular a motilidade, foi utilizada uma fonte de luz incandescente de 40W, a uma distância de 40 cm.

A IVM foi utilizada em concentrações crescentes para o teste de migração de larvas em gel de ágar para o isolado Sensível, e os oito isolados resistentes descritos anteriormente, enquanto o isolado Nova Alvorada do Sul I não foi utilizado para a realização do teste de migração em gel de ágar para a MXD, pelo fato de não haver número suficiente de larvas.

Análise de dados

Os valores das concentrações de IVM e MXD foram transformados logaritmicamente e as médias de contagens de larvas foram expressas como percentual da frequência (normalização). Para cada isolado, foram construídas curvas sigmóides de regressão não linear da relação dose x resposta destes dados transformados e normalizados. Utilizando-se estes valores foi calculada a concentração efetiva (CE) requerida para paralisar 50% das larvas por meio da seguinte equação:

$$Y = 100 / (1 + 10^{(\text{LogCE50} - X)})$$

Em que:

X= logaritmo da concentração

Y= número de larvas

Para a comparação entre os isolados, o fator de resistência (FR) foi expresso como:

$$\text{FR} = \text{CE isolado resistente} / \text{CE isolado sensível (AMARANTE et al., 1997)}.$$

A comparação entre as médias de larvas de cada isolado submetidas a diferentes concentrações de IVM ou MXD foi realizada utilizando-se os dados normalizados (número de larvas) e transformados em logaritmo (concentrações de drogas), procedendo-se análise de variância fatorial (Two-way ANOVA) e o teste de Bonferroni foi aplicado para verificar diferenças entre os grupos ao nível de significância de 95%. Para análise de correlação entre a eficácia do FECRT e o FR, foi realizado o teste F ($P < 0,05$). Estas análises estatísticas foram realizadas empregando o programa GraphPad

Prism. Version 5.03 (GraphPad Software, San Diego, California,. USA, <http://www.graphpad.com>).

Para o cálculo de eficácia de cada concentração de IVM e MXD, foi utilizada a fórmula recomendada por Wood et al. (1995):

$$\text{Percentual eficácia} = \frac{\text{Média do número de larvas do grupo controle} - \text{Média do número de larvas do grupo tratado}}{\text{Média do número de larvas do grupo controle}} \times 100$$

Resultados e Discussão

As médias das larvas sobreviventes à exposição à IVM em concentrações crescentes e a eficácia para os isolados Sensível, Nova Alvorada do Sul I, Campo Grande BNA, Campo Grande TBR, Nova Alvorada do Sul II, Bandeirantes, Campo Grande II e Porto Mortinho no teste de migração em gel de ágar, estão apresentadas na Tabela 2. As médias das larvas sobreviventes à exposição à MXD e a eficácia das concentrações crescentes para o isolado Sensível, para o isolado Campo Grande BNA, Campo Grande TBR, Nova Alvorada do Sul II, Bandeirantes, Campo Grande II e Porto Mortinho para o mesmo teste, estão registradas na Tabela 3. A partir destes dados observou-se uma relação dose x resposta positiva tanto para IVM como para MXD.

Há poucos relatos de teste *in vitro* para o gênero *Cooperia* na literatura, demonstrando a fundamental importância de novas pesquisas utilizando estes métodos para elucidar a real situação das espécies deste gênero frente à resistência anti-helmíntica.

O teste *in vitro* de migração em gel de ágar, para os isolados de campo de *Cooperia* spp., demonstrou-se eficiente em construir a curva sigmóide da relação dose x resposta para cada isolado utilizando-se os dados do controle, IVM e MXD em concentrações crescentes, porém é uma nova metodologia e ainda sem a padronização das diluições discriminatórias, que tornam o método mais prático e sensível. Segundo Demeler et al. (2010a) o teste de inibição da migração larval é capaz de identificar baixos níveis de resistência em isolados resistentes para IVM, como também tem habilidade de diferenciar o status de resistência em diferentes isolados de nematodas de bovinos.

Foram obtidos os seguintes valores de CE50 de IVM para os isolados: Sensível, 1,16 η mol (Figura 1); Nova Alvorada do Sul I, 4,09 η mol (Figura 2); Campo Grande BNA, 3,57 η mol (Figura 3); Campo Grande TBR, 4,09 η mol (Figura 4); Nova Alvorada do Sul II, 2,50 η mol (Figura 5); Bandeirantes, 11,35 η mol (Figura 6); Campo Grande II, 6,03 η mol (Figura 7) e Porto Mortinho, 8,63 η mol (Figura 8). Estes resultados foram obtidos por análise de regressão não linear com intervalo de confiança de 95% e estão apresentados na Tabela 4.

Na avaliação da MXD, também foi possível construir a curva dose x resposta, porém, estas apresentaram mais lineares e menos sigmóides do que IVM. Os valores de CE50 de MXD para os isolados foram: Sensível, 0,75 η mol (Figura 9); Campo Grande BNA, 0,93 η mol (Figura 10); Campo Grande TBR, 0,36 η mol (Figura 11); Nova Alvorada do Sul II, 2,57 η mol (Figura 12); Bandeirantes, 1,43 η mol (Figura 13); Campo Grande II, 1,08 η mol (Figura 14); e Porto Mortinho, 0,49 η Mol (Figura 15). Sendo estes dados obtidos através de regressão não linear com intervalo de confiança de 95% e estão apresentados na Tabela 5.

A comparação de dados relatados em outros trabalhos se torna difícil, quando os resultados são obtidos sob condições experimentais distintas, como, por exemplo: técnica utilizada, unidades de medidas, espécie de parasito, fármacos testados e análise dos dados.

Na Bélgica El-Abdellati et al. (2010) utilizaram o teste de inibição da migração larval com uma versão modificada, proposta por Demeler et al. (2010b), empregando um isolado sensível e dois isolados de *C. oncophora* resistentes à IVM, o CoIVR07 (2007) e o CoIVR08 (2008). O cálculo de CE50 e CE95 foi determinado pela regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism, o mesmo utilizado por Kotze et al., (2006), Kopp et al. (2008), Demeler et al. (2010a), Demeler et al. (2010b) e no presente estudo. Os resultados de CE50 para CoIVR07 foi de 542 η M e para CoIVR08 foi de 698 η M, sendo 4,5 e 5,8 vezes maiores que o CE50 do isolado sensível (120 η M), respectivamente, correspondendo ao fator de resistência. Para o mesmo fármaco e mesmo gênero de nematoda, Paiva et al. (2001) utilizando o teste *in vitro* de desenvolvimento das formas parasíticas imaturas, encontraram FR= 57.786,08 para o isolado Serramar e o isolado CNPGC o FR= 12,98 .

Demeler et al. (2010b) encontraram valores de CE50 de IVM para *O. ostertagi* sensível, 3 vezes superiores (CE50= 404 η M para *O. ostertagi* sensível) à *C. oncophora* sensível (CE50= 123 η M) no teste de inibição da migração larval (LMIT), e para *C.*

oncophora resistente, 5 vezes superiores ($CE_{50}= 621 \text{ } \mu\text{M}$), correspondendo com o FR encontrado para o isolado Campo Grande II (FR= 5,20) para IVM no presente estudo, apesar dos valores de unidades de medidas serem diferentes.

Comparando a caracterização fenotípica por meio de teste *in vivo* (FECRT) realizada por Feliz (2011) e *in vitro* (FR) para os mesmos isolados de *Cooperia* spp. resistentes à IVM, realizada no presente estudo (Tabela 4), observou-se que os dois modelos experimentais diferem no teste F ($P<0,05$). Os resultados obtidos para MXD demonstram grande diferença nos resultados das duas metodologias, observado nos isolados Bandeirantes e Nova Alvorada do Sul II que apresentaram FR= 1,90 e 3,42, respectivamente, e apresentaram número médio de larvas estatisticamente superiores ($P<0,05$) ao isolado sensível, resultados obtidos por meio de teste *in vitro*, enquanto no teste *in vivo* (FECRT) ambos os isolados foram caracterizados como 100% sensíveis. O FR delimita melhor o nível da resistência quando comparado ao FECRT, pois mede com maior precisão quantas vezes a mais é necessária a dose de um fármaco para o isolado resistente em relação ao sensível. É possível inferir que a técnica *in vitro* tem mais sensibilidade para detectar a resistência do que o FECRT, quando a frequência de parasitos resistentes ainda é baixa na população, tendo a capacidade de detectá-la quando presente em 4% destes (VÁRADY et al., 2007), sendo mais eficiente e recomendada (DÍEZ-BAÑOS et al., 2008), e estando de acordo com Le Jambre et al. (1999), que consideram o quesito mais importante para o combate à resistência, no intuito de conservar a sensibilidade anti-helmíntica nas populações parasitos, a capacidade em detectá-la enquanto em baixos níveis.

No teste com MXD (Tabela 6) o isolado Campo Grande BNA apresentou o FR= 1,24, e o isolado Campo Grande TBR apresentou FR= 0,48, porém para estes dois isolados não há a caracterização de eficácia para *Cooperia* spp. pelo FECRT. O isolado Nova Alvorada do Sul II apresentou FR= 3,42, já a eficácia pelo FECRT, é de 100%, demonstrando que esse valor, pode ter sido influenciado pela baixa sensibilidade desse teste. O isolado Bandeirantes apresentou FR= 1,90, enquanto a redução na contagem de ovos de *Cooperia* spp. foi de 100%. O isolado Campo Grande II apresentou FR= 1,44 (100% de eficácia no FECRT) e o isolado Porto Mortinho apresentou FR= 0,65 (96,35% de eficácia no FECRT).

Os resultados obtidos para MXD demonstram valores menores de FR, em relação ao mesmo isolado, do que a IVM, exceto para o isolado Nova Alvorada do Sul II. Os isolados Campo Grande TBR ($CE_{50}= 0,36 \text{ } \mu\text{mol}$ e FR= 0,48) e Porto Mortinho

(CE50= 0,49 η mol e FR= 0,65) apresentaram CE50 de MXD menores do que o do isolado Sensível (CE50= 0,75 η mol), demonstrando assim elevada suscetibilidade a esta molécula.

O número médio de larvas sobrevivente à exposição à IVM em todos isolados não apresentaram diferença estatística ($P>0,05$) nas concentrações 0,5, 32 e 64 η mol. Porém para a concentração 1 η mol, houve diferença estatística ($P<0,05$) do isolado Sensível em relação aos isolados Nova Alvorada do Sul I, Bandeirantes, Campo Grande II e Porto Mortinho. No entanto não houve diferença ($P>0,05$) na comparação de médias de larvas dos isolados Nova Alvorada do Sul I, Campo Grande BNA, Campo Grande TBR, Bandeirantes, Campo Grande II e Porto Mortinho, para a concentração equimolar de IVM. Os isolados Nova Alvorada do Sul II, Bandeirantes e Campo Grande II não diferiram entre si ($P>0,05$) em relação ao número médio de larvas, quando submetidos ao tratamento na concentração de 1 η mol. Para a concentração 8 η Mol, apenas os isolados Bandeirantes e Porto Mortinho diferiram estatisticamente ($P<0,05$) em relação ao isolado Sensível, porém não houve diferença estatística ($P>0,05$) destes isolados quando comparado aos demais na mesma concentração equimolar. Para a concentração 16 η mol, apenas o isolado Bandeirantes diferiu estatisticamente ($P<0,05$) do isolado Sensível, porém não apresentou diferença estatística ($P>0,05$) quando comparado a média do número de larvas dos isolados Nova Alvorada do Sul I, Campo Grande II e Porto Mortinho. Portanto, a metodologia empregada permitiu a diferenciação entre o isolado sensível e os restantes.

As médias dos números de larvas para cada isolado em diferentes concentrações no teste com MXD estão apresentados na Tabela 3. Para todos isolados analisados no teste com MXD, as médias dos números de larvas não diferiram estatisticamente ($P>0,05$) entre si para o grupo controle e as concentrações 16, 32, e 64 η mol através da análise de variância multifatorial (Two-way ANOVA). Para a concentração 0,5 η mol, o isolado Porto Mortinho não diferiu estatisticamente ($P>0,05$) dos isolados Campo Grande II, Bandeirantes, Nova Alvorada do Sul II, Campo Grande TBR e Sensível, porém diferiu ($P<0,05$) do isolado Campo Grande BNA para esta concentração equimolar.

A diferença na susceptibilidade dos nematodas às duas moléculas avaliadas, mesmo pertencentes ao mesmo grupo químico, pode estar relacionada a diferenças em suas estruturas químicas que podem resultar em menor afinidade da MXD à glicoproteína-P (LESPINE et al., 2007), um dos mecanismos de resistência. Ardelli et

al. (2009), demonstraram que MXD e IVM atuam em genes diferentes nos nematodas, o que também poderia justificar a menor eficácia desta.

Os resultados obtidos demonstram que houve valores distintos encontrados para IVM e MXD no teste de migração de larvas em gel de ágar. Embora a ocorrência de resistência lateral entre estes compostos já tenha sido relatada (VERMUNT et al., 1996; MELLO et al., 2006), a MXD ainda pode ser eficaz contra isolados resistentes à IVM, mesmo que o mecanismo de ação das milbemicinas e avermectinas sejam parecidos (SHOOP et al., 1995). A presença da resistência para MXD pode desenvolver-se mais lentamente em relação à IVM em uma população de parasitos, permitindo assim que estes parasitos resistentes a essa molécula permaneçam susceptíveis à MXD (RANJAN et al., 2002).

Conclusão

Com os resultados obtidos é possível inferir que há diferença na susceptibilidade de isolados de *Cooperia* spp. à IVM e MXD, sendo necessário menores concentrações desta em relação à IVM.

O teste *in vitro* utilizando a técnica de migração de larvas em gel de ágar permitiu a diferenciação fenotípica entre isolados sensível e resistentes, apresentou maior sensibilidade do que o FECRT e mostrou-se uma forma prática e uma possível ferramenta para o diagnóstico da resistência de IVM em isolados de campo de *Cooperia* spp.

Referências

- AMARANTE, A. F. T.; POMROY, W. E.; CHARLESTON, W. A. G.; LEATHWICK, D. M.; TORNEROS, M. T. T. Evaluation of larval development assay for the detection of anthelmintic resistance in *Ostertagia circumcincta*. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n.3, p. 305-311, 1997.
- ANZIANI, O. S.; ZIMMERMANN, G.; GUGLIELMONE, A. A.; VASQUEZ, R.; SUÁREZ, V. Resistencia a las avermectinas de bovinos parasitados por *Cooperia* spp. **Veterinaria Argentina**, v.164, n.17, p.280-281, 2000.
- ARDELLI, B. F.; STITT, L. E.; TOMPKINS, J. B.; PRICHARD, R. K. A comparison of the effects of ivermectin and moxidectin on the *Caenorhabditis elegans*. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.96-108, 2009.
- CARDOSO, J. M. S.; MARTINS, I. V. F.; SANT'ANNA, F. B.; CORREIA, T. R.; TANCREDI, I. P.; COUMENDOUROS, K.; TANCREDI, M. G. F.; SCOTT, F. B.; GRISI, L. Identification of ivermectin and doramectin-resistant *Cooperia punctata* (LINSTOW, 1907) in a dairy herd in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, suplemento, p.75-81, 2008.
- CEZAR, A. S.; VOGEL, F. S. F.; SANGIONI, L. A. ANTONELLO, A. M.; CAMILLO, G.; TOSCAN, G.; ARAUJO, L. O. Ação anti-helmíntica de diferentes formulações de lactonas macrocíclicas em cepas resistentes de nematódeos de bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 523-528, 2010.
- COLES, G. C.; STAFFORD, K. A.; MACKAY, P. H. S. *Cooperia* species from calves on a farm in Somerset. **The Veterinary Record**, v.7, p.255-256, 1998.
- COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.44, p.35-44, 1992.
- 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.
- D'ASSONVILLE, J.A.; JANOVSKY, E. & VERSTER, A. *In vitro* screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. **Veterinary Parasitology**, v.61, n.1-2, p.73-80, 1996.
- DEMELER, J.; KUTTLER, U.; EL-ABDELLATI, A.; STAFFORD, K.; RYDZIK, A.; VARADY, M.; KENYON, F.; COLES, G.; HOGLUND, J. JACKSON, F.; VERCROY, J.; VON SAMSON-HIMMELSTJERA, G. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastrointestinal nematodes of ruminants. **Veterinary Parasitology**, v.174, p.58-64, 2010a.

DEMELE, J.; KUTTLER, U.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Adaptation and evaluation of three different *in vitro* tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle. **Veterinary Parasitology**, v.170, n.1-2, p. 61-70, 2010b.

DEMELE, J.; VAN ZEVEEREN, A. M. J.; KLEINSCHMIDT, N.; VERCRUYSE, J.; HÖGLUND, J.; KOOPMANN, R.; CABARET, J.; CLAEREBOU, E.; ARESKOG, M.; von SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Monitoring the efficacy of ivermectin and albendazole against gastrointestinal nematodes of cattle in Northern Europe. **Veterinary Parasitology**, v.160, p.109-115, 2009.

DÍEZ-BAÑOS, P.; PEDREIRA, J.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; FRANCISCO, I.; SUÁREZ, J. L.; DÍAZ, P.; PANADERO, R.; ARIAS, M.; PAINCEIRA, A.; PAZ-SILVA, A.; MORRONGO, P. Field evaluation for anthelmintic-resistance ovine gastrointestinal nematodes by *in vitro* and *in vivo* assays. **Journal of Parasitology**, v. 94, n.4, p.925-928, 2008.

EDMONDS, M. D.; JOHNSON, J. D.; EDMONDS, J. D. Anthelmintic resistance of *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* to macrocyclic lactones in cattle from the western United States. **Veterinary Parasitology**, v.170, p.224-229, 2010.

EL-ABDELLATI, A.; GELDHOF, P.; CLAEREBOU, E.; VERCRUYSE, J.; CHARLIER, J. Monitoring macrocyclic lactone resistance in *Cooperia oncophora* on a Belgian cattle farm during four consecutive years. **Veterinary Parasitology**, v.171, p. 167-171, 2010.

FAMILTON, A. S.; MASON, P.; COLES, G. C. Anthelmintic resistant *Cooperia* in cattle. **The Veterinary Record**, v.8, p.719-720, 2001.

FAO. **Resistencia a los antiparasitarios: estado actual con énfasis en América Latina**. Roma:FAO, Salud Animal, p.1-52, 2003.

FASHANU, S.O; AND FAGBEMI, B. O. A preliminary investigation of resistance to anthelmintics in strongyles of cattle in shaki, nígeria. **African Journal of Biomedical Research**, v.6, p.111-112, 2003.

FELIZ, D. C. **Resistência a anti-helmínticos em nematodas gastrintestinais de bovinos de corte, no Mato Grosso do Sul, Brasil**. 2011. 41f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

FIEL, C. A.; SAUMELL, C. A.; STEFFAN, P. E.; RODRIGUEZ, E. M. Resistance of *Cooperia* to ivermectin treatments in grazing cattle of the Humid Pampa, Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.97, p.211–217, 2001.

GASBARRE, L. C.; SMITH, L. L.; LICHTENFELS, J. R.; PILITT, P. A. The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple class of anthelmintics in a commercial cattle population in the US. **Veterinary Parasitology**, v.166, p.281-285, 2009.

GEARY, T. G. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. **Trends in Parasitology**, v.21, n.11, p.530-532, 2005.

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, n.7, p.771-776, 1991.

GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v.12, p.50-52, 1939.

JACKSON, R. A.; TOWNSEND, K. G.; PUKE, C.; LANCE, D. M. Isolation of oxfendazole resistant *Cooperia oncophora* in cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, v.35, p.187, 1987.

KEITH, R. K. The differentiation on the infective larvae of common nematode parasites of cattle. **Australian Journal of Zoology**, Victoria, v.1, p.223-235, 1953.

KOPP, S. R.; COLEMAN, G. L.; MCCARTHY, J. S.; KOTZE, A. C. Application of *in vitro* anthelmintic sensitivity assays to canine parasitology: Detecting resistance to pyrantel in *Ancylostoma caninum*. **Veterinary Parasitology**, v.152, p.284-293, 2008.

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

LE JAMBRE, L.F.; DOBSON, R.J.; LENANE, I.J.; BARNES, E.H. Selection for anthelmintic resistance by macrocyclic. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.7, p.1101- 1111, 1999.

LE JAMBRE, L. F. Egg hatch as an *in vitro* assay of thiabendazole resistance in nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.2, p.385-391, 1976.

LESPINE, A.; MARTIN, S.; VERCROYSE, J.; ROULET, A.; PINEAU, T.; ORLOWSKI, S.; ALVINERIE, M. Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: structure-affinity relationship. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.30, p.84-94, 2007.

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.

MELLO, M. H. A.; DEPNER, R.; MOLENTO, M. B.; FERREIRA, J. J. Resistência lateral às macrolactonas em nematodas de bovinos. **Archives of Veterinary Science**, v.11, n.1, p.8-12, 2006.

MEJÍA, M. E.; FERNANDEZ IGARTÚA, B. M.; SCHMIDT, E. E.; CABARET, J. Multispecies and multiple anthelmintic resistance on cattle nematodes in a farm in

Argentina: the beginning of high resistance. **Veterinary Research**, v.34, p.461–467, 2003.

MOLENTO, M. B.; PRICHARD, R. K. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, p.117-121, 2001.

PAIVA, F.; SATO, M. O.; ACUNA, A. H.; JENSEN, J. R.; BRESSAN, M. C. R. V. Resistência a ivermectina constatada em *Haemonchus placei* e *Cooperia punctata* em bovinos. **A Hora Veterinária**, v.20, n.120, p.29-32, 2001.

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

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

RANJAN, S.; WANG, G. T.; HIRSCHLEIN, C. & SIMKINS, K. L. Selection for resistance to macrocyclic lactones by *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v.103, n.1/2, p. 109-117, 2002.

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

RODRIGUES, D. C. **Avaliação da toxicidade de avermectinas em bovinos com idade inferior a trinta dias**. 2007. 77f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/pan/m/2901.pdf>> Acesso em: 27 Mar. 2010.

ROTHWELL, J.T & SANGSTER, .N.C.. An *in vitro* assay utilising parasitic larval *Haemonchus contortus* to detect resistance to closantel and other anthelmintics. **International Journal for Parasitology**, v.23, n.5, p.573-8, 1993.

SHOOP, W. L.; MROZIK, H. & FISHER, M.; H. Struture and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Veterinary Parasitology**, v.59, n.2, p. 139-156. 1995.

SOUTELLO, R. G. V.; SENO, M. C. Z.; AMARANTE, A. F. T. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern Sao Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.148, n.3/4, p.360-364, 2007.

SOUZA, A. P.; RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; SCHELBAUER, C. A.; Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1363-1367, 2008.

STONE, B. F. The genetics of resistance by ticks to acaricides. **Australian Veterinary Journal**, v.48, p.345-350, 1972.

SUAREZ, V. H. & CRISTEL, S. L. Anthelmintic resistance in cattle nematoda in the western Pampeana Region of Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.111-117, 2007.

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

TAYLOR, M.A. & HUNT, K.R. Anthelmintic drug resistance in the UK. **Veterinary Record**, v.125, p.143-147, 1989.

VÁRADY, M.; CUDEKOVÁ, P.; CORBA, J. *In vitro* detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*: Egg hatch test versus larval development test. **Veterinary Parasitology**, v.149, p.104-110, 2007.

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

VERMUNT, J.; WEST, D. & POMROY, W. Inefficacy of moxidectin and doramectina of against ivermectina-resistant *Cooperia* spp. of cattle in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 44, n.5, p.188-193, 1996.

VERMUNT, J.; WEST, D. M.; POMROY, W. E. Multiple resistance to ivermectin and oxfendazole in *Cooperia* species of cattle in New Zealand. **Veterinary Record**, v.137, p.43-45, 1995.

WHITLOCK, H. V.; KELLY, J. D.; PORTER, C. J.; GRIFFIN, D. L.; MARTIN, I. C. A. *In vitro* field screening for anthelmintic resistance in strongyles of sheep and horses. **Veterinary Parasitology**, v.7, p.215-232, 1980.

WOOD, I. B.; AMARAL, N. K.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J. L.; KASSAI, T.; MALONE, J. B. Jr.; PANKAVICH, J. A.; REINECKE, R. K.; SLOCOMBE, O.; TAYLOR, S. M.; VERCROY, J. World Association for Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluation the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology**, v.58, n.3, p.181-213, 1995.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Caracterização fenotípica dos isolados resistentes de *Cooperia* spp. realizada pelo teste de redução na contagem de ovos nas fezes.

Tabela 2. Média do número de L3 e eficácia para tratamentos com IVM em diferentes concentrações para os isolados Sensível, Nova Alvorada do Sul I, Campo Grande BNA, Campo Grande TBR, Nova Alvorada do Sul II, Bandeirantes, Campo Grande II e Porto Mortinho para o teste de migração em gel de ágar.

Tabela 3. Média do número de L3 e eficácia para tratamentos com MXD em diferentes concentrações para os isolados Sensível, Campo Grande BNA, Campo Grande TBR, Nova Alvorada do Sul II, Bandeirantes, Campo Grande II e Porto Mortinho para o teste de migração em gel de ágar.

Tabela 4. Resultados de CE50 para IVM obtidos por regressão não linear.

Tabela 5. Resultados de CE50 para MXD obtidos por regressão não linear.

Tabela 6. Caracterização fenotípica pelo teste de redução na contagem de ovos nas fezes e Fator de Resistência (FR) para isolados de *Cooperia* spp. resistentes à IVM e eficácia para MXD.

Lista de Figuras

Figura 1. Curva dose (Log) x resposta (dados normalizados) de IVM contra o isolado Sensível de *Cooperia* spp. parasito de bovino e resultado do cálculo da CE50.

Figura 2. Curva dose (Log) x resposta (dados normalizados) de IVM contra o isolado Nova Alvorada do Sul I de *Cooperia* spp. parasito de bovino e resultado do cálculo da CE50.

Figura 3. Curva dose (Log) x resposta (dados normalizados) de IVM contra o isolado Campo Grande BNA de *Cooperia* spp. parasito de bovino e resultado do cálculo da CE50.

Figura 4. Curva dose (Log) x resposta (dados normalizados) de IVM contra o isolado Campo Grande TBR de *Cooperia* spp. parasito de bovino e resultado do cálculo da CE50.

Figura 5. Curva dose (Log) x resposta (dados normalizados) de IVM contra o isolado Nova Alvorada do Sul II de *Cooperia* spp. parasito de bovino e resultado do cálculo da CE50.

Figura 6. Curva dose (Log) x resposta (dados normalizados) de IVM contra o isolado Bandeirantes de *Cooperia* spp. parasito de bovino e resultado do cálculo da CE50.

Figura 7. Curva dose (Log) x resposta (dados normalizados) de IVM contra o isolado Campo Grande II de *Cooperia* spp. parasito de bovino e resultado do cálculo da CE50.

Figura 8. Curva dose (Log) x resposta (dados normalizados) de IVM contra o isolado Porto Mortinho de *Cooperia* spp. parasito de bovino e resultado do cálculo da CE50.

Figura 9. Curva dose (Log) x resposta (dados normalizados) de MXD contra o isolado Sensível de *Cooperia* spp. parasito de bovino e resultado do cálculo da CE50.

Figura 10. Curva dose (Log) x resposta (dados normalizados) de MXD contra o isolado Campo Grande BNA de *Cooperia* spp. parasito de bovino e resultado do cálculo da CE50.

Figura 11. Curva dose (Log) x resposta (dados normalizados) de MXD contra o isolado Campo Grande TBR de *Cooperia* spp. parasito de bovino e resultado do cálculo da CE50.

Figura 12. Curva dose (Log) x resposta (dados normalizados) de MXD contra o isolado Nova Alvorada do Sul II de *Cooperia* spp. parasito de bovino e resultado do cálculo da CE50.

Figura 13. Curva dose (Log) x resposta (dados normalizados) de MXD contra o isolado Bandeirantes de *Cooperia* spp. parasito de bovino e resultado do cálculo da CE50.

Figura 14. Curva dose (Log) x resposta (dados normalizados) de MXD contra o isolado Campo Grande II de *Cooperia* spp. parasito de bovino e resultado do cálculo da CE50.

Figura 15. Curva dose (Log) x resposta (dados normalizados) de MXD contra o isolado Porto Mortinho de *Cooperia* spp. parasito de bovino e resultado do cálculo da CE50.

Tabela 1. Caracterização fenotípica dos isolados resistentes de *Cooperia* spp. realizada pelo teste de redução na contagem de ovos nas fezes.

Isolado	IVM		MXD	
	Eficácia geral (%)**	Eficácia contra <i>Cooperia</i> spp. (%)**	Eficácia geral (%)**	Eficácia contra <i>Cooperia</i> spp. (%)**
Nova Alvorada do Sul I	15	0	85	94,4
Campo Grande BNA	46	_*	_*	_*
Nova Alvorada do Sul II	23	8	90,62	100
Campo Grande TBR	12	_*	_*	_*
Bandeirantes	29	0	92,2	100
Campo Grande II	52,7	0	98,6	100
Porto Mortinho	44,4	9,8	97,76	96,35

*Não foi feito cálculo de eficácia

**Dados extraídos de Feliz, 2011.

Tabela 2. Média do número de L3 e eficácia para tratamentos com IVM em diferentes concentrações para os isolados Sensível, Nova Alvorada do Sul I, Campo Grande BNA, Campo Grande TBR, Nova Alvorada do Sul II, Bandeirantes, Campo Grande II e Porto Mortinho para o teste de migração em gel de ágar.

IVM (ηMol/0, mL)	Isolado Sensível	Eficácia %	Isolado Nova Alvorada do Sul I	Eficácia %	Isolado Campo Grande BNA	Eficácia %	Isolado Campo Grande TBR	Eficácia %	Isolado Nova Alvorada do Sul II	Eficácia %	Isolado Bandeirantes	Eficácia %	Isolado Campo Grande II	Eficácia %	Isolado Porto Mortinho	Eficácia %
Controle*	2988,8 ^a	-	1615,5 ^a	-	595,5 ^a	-	760 ^a	-	961,1 ^a	-	580 ^a	-	1110 ^a	-	1365,5 ^a	-
0,5	3251,1 ^a	0	1508,8 ^a	6,6	612,2 ^a	0	626,6 ^a	17,5	792,2 ^a	17,5	570 ^a	1,7	1074,4 ^a	3,2	1275,5 ^a	6,5
1	1840 ^a	38,4	1755,5 ^b	0	554,4 ^{ab}	6,9	645,5 ^{ab}	15	744,4 ^{ac}	22,5	533,3 ^{bc}	8	1022,2 ^{bc}	7,9	1367,7 ^b	0
2	1516,6 ^a	49,2	1346,6 ^b	16,6	664,4 ^b	0	697,7 ^b	8,1	783,3 ^b	18,4	618,8 ^b	0	981,1 ^b	11,6	1040 ^{ab}	23,8
4	1093,3 ^a	63,4	971,1 ^{abc}	39,8	306,6 ^{ab}	48,5	526,6 ^{abc}	30,7	616,6 ^{ab}	35,8	465,5 ^{bc}	19,7	855,5 ^{bc}	22,9	1133,3 ^c	17
8	940 ^a	68,5	736,6 ^{ab}	54,4	214,4 ^{ab}	63,9	484,4 ^{ab}	36,2	574,4 ^{ab}	40,2	453,3 ^b	21,8	670 ^{ab}	39,6	992,2 ^b	27,3
16	897,7 ^a	69,9	568,8 ^{ab}	64,7	201,1 ^a	66,2	347,7 ^a	54,2	471,1 ^a	50,9	404,4 ^b	30,2	586,7 ^{ab}	47,1	766,6 ^{ab}	43,8
32	881,1 ^a	70,5	343,3 ^a	78,7	118,8 ^a	80	315,5 ^a	58,4	466,6 ^a	51,4	261,1 ^a	54,9	478,9 ^a	56,8	560 ^a	58,9
64	765,5 ^a	74,3	303,3 ^a	81,2	127,7 ^a	78,5	305,5 ^a	59,7	400 ^a	58,3	171,1 ^a	70,4	400 ^a	63,9	425,5 ^a	68,8

* As triplicatas receberam apenas água destilada, servindo como grupo controle.
Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Bonferroni (P<0,05).

Tabela 3. Média do número de L3 e eficácia para tratamentos com MXD em diferentes concentrações para os isolados Sensível, Campo Grande BNA, Campo Grande TBR, Nova Alvorada do Sul II, Bandeirantes, Campo Grande II e Porto Mortinho para o teste de migração em gel de ágar.

MXD (η Mol/0,5 mL)	Isolado Sensível	Eficácia %	Isolado Campo Grande BNA	Eficácia %	Isolado Campo Grande TBR	Eficácia %	Isolado Nova Alvorada do Sul II	Eficácia %	Isolado Bandeirantes	Eficácia %	Isolado Campo Grande II	Eficácia %	Isolado Porto Mortinho	Eficácia %
Controle*	573,3 ^a	-	516,6 ^a	-	776,6 ^a	-	614,4 ^a	-	567,7 ^a	-	761,1 ^a	-	1427,7 ^a	-
0,5	397,7 ^{ab}	30,6	616,5 ^c	0	402,2 ^a	48,2	455,5 ^{bc}	25,8	510 ^c	10,1	595,5 ^{ab}	21,7	862,2 ^{ab}	39,6
1	365,5 ^{ac}	36,2	376,6 ^{ac}	27	337,7 ^a	56,5	405,5 ^{bc}	33,9	331,1 ^{ac}	41,6	553,3 ^{ab}	27,3	801,1 ^{ab}	43,8
2	278,8 ^a	51,3	256,6 ^a	50,3	295,5 ^{ab}	61,9	410 ^c	33,2	277,7 ^{ac}	51	518,8 ^{bc}	31,8	781,1 ^{abc}	45,2
4	242,2 ^a	57,7	272,2 ^a	47,3	272,2 ^a	64,9	397,7 ^b	35,2	235,5 ^a	58,5	523,3 ^{ab}	31,2	692,2 ^a	51,5
8	205,5 ^a	64,1	264,4 ^a	48,8	268,8 ^a	65,3	324,4 ^b	47,1	328,8 ^b	42	451,1 ^{ab}	40,7	687,7 ^{ab}	51,8
16	206,6 ^a	63,9	261,1 ^a	49,4	267,7 ^a	65,5	203,3 ^a	66,9	294,4 ^a	48,1	428,8 ^a	43,6	673,2 ^a	52,8
32	204,4 ^a	64,3	252,2 ^a	51,1	297,7 ^a	61,6	130 ^a	78,8	283,3 ^a	50	423,3 ^a	44,3	580 ^a	59,3
64	187,7 ^a	67,2	253,3 ^a	50,9	246,6 ^a	68,2	143,3 ^a	76,6	171,1 ^a	69,8	381,1 ^a	49,9	554,4 ^a	61,1

* As triplicatas receberam apenas água destilada, servindo como grupo controle.
Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Bonferroni ($P < 0,05$).

Tabela 4. Resultados de CE50 para IVM obtidos por regressão não linear.

Isolados	CE50 para IVM	Intervalo de confiança (IC95%)
Sensível	1,16 ηmol	0,913 – 1,491 ηmol
Nova Alvorada do Sul I	4,09 ηmol	2,986 – 5,619 ηmol
Campo Grande BNA	3,57 ηmol	2,719 – 4,695 ηmol
Campo Grande TBR	4,09 ηmol	2,831 – 5,923 ηmol
Nova Alvorada do Sul II	2,50 ηmol	1,499 – 4,193 ηmol
Bandeirantes	11,35 ηmol	7,575 – 17,010 ηmol
Campo Grande II	6,03 ηmol	4,485 – 8,128 ηmol
Porto Mortinho	8,63 ηmol	6,052 – 12,330 ηmol

Tabela 5. Resultados de CE50 para MXD obtidos por regressão não linear.

Isolados	CE50 para MXD	Intervalo de Confiança (IC95%)
Sensível	0,75 ηmol	0,596 – 0,964 ηmol
Campo Grande BNA	0,93 ηmol	0,465 – 1,865 ηmol
Campo Grande TBR	0,36 ηmol	0,286 – 0,466 ηmol
Nova Alvorada do Sul II	2,57 ηmol	1,517 – 4,363 ηmol
Bandeirantes	1,43 ηmol	0,700 – 2,912 ηmol
Campo Grande II	1,08 ηmol	0,632 – 1,870 ηmol
Porto Mortinho	0,49 ηmol	0,307 – 0,788 ηmol

Tabela 6. Caracterização fenotípica pelo teste de redução na contagem de ovos nas fezes e Fator de Resistência (FR) para isolados de *Cooperia* spp. resistentes à IVM e eficácia para MXD.

Isolados	FR para IVM	Eficácia de IVM para <i>Cooperia</i> spp. (%)***	FR para MXD	Eficácia de MXD para <i>Cooperia</i> spp. (%)***
Nova Alvorada dos Sul I	3,52	0 (-68,15)	-.**	94,40
Campo Grande BNA	3,08	-.*	1,24	-.*
Campo Grande TBR	3,52	-.*	0,48	-.*
Nova Alvorada do Sul II	2,15	8	3,43	100
Bandeirantes	9,78	0 (-500)	1,91	100
Campo Grande II	5,20	0 (-20,20)	1,41	100
Porto Mortinho	7,44	9,85	0,65	96,35

*Não foi feito cálculo de eficácia.

**Não foi feito cálculo de FR.

***Dados extraídos de Feliz, 2011.

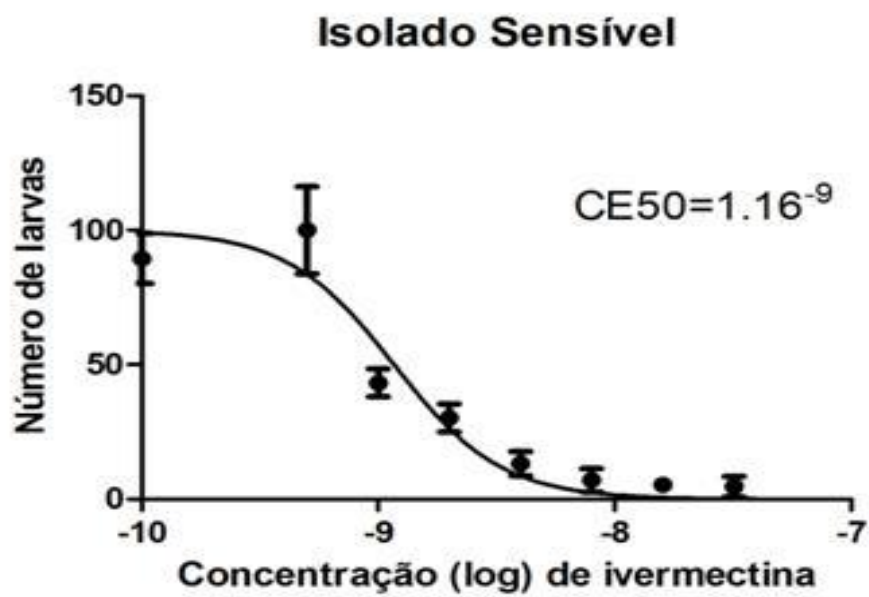


Figura 1.

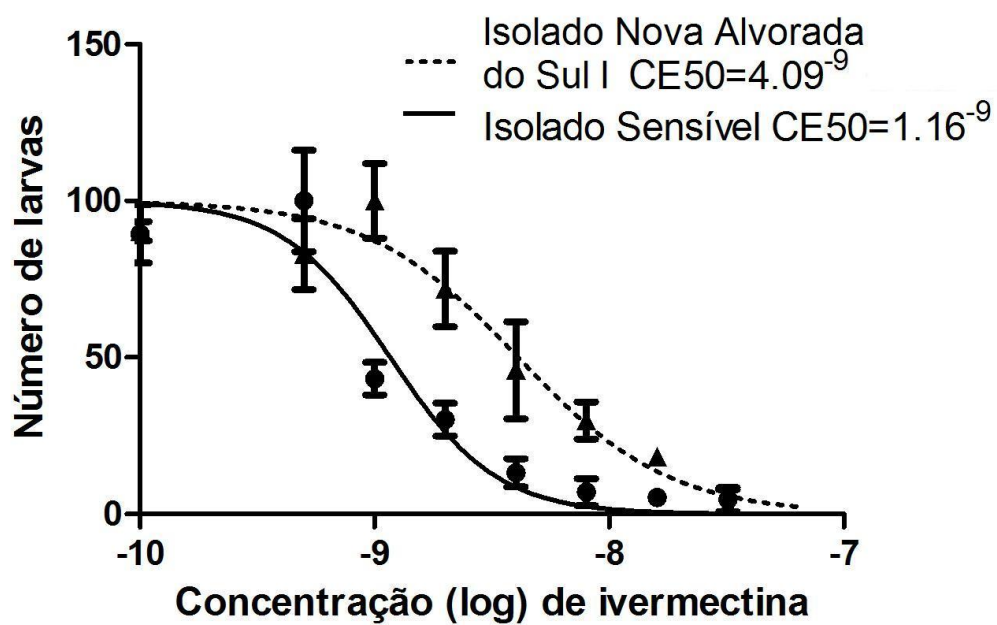


Figura 2.

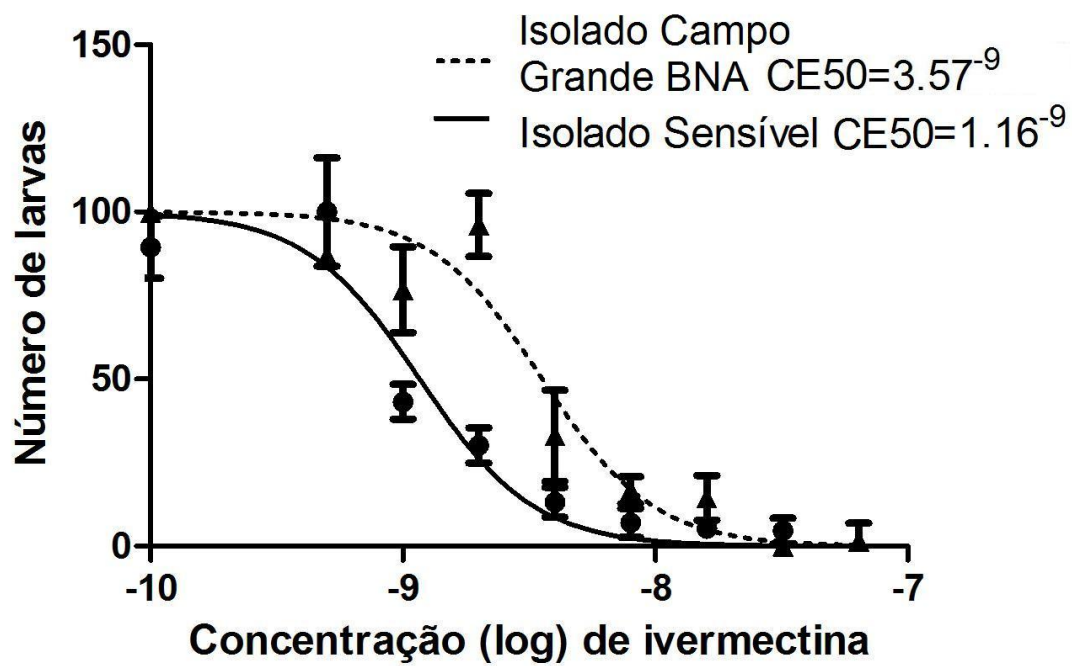


Figura 3.

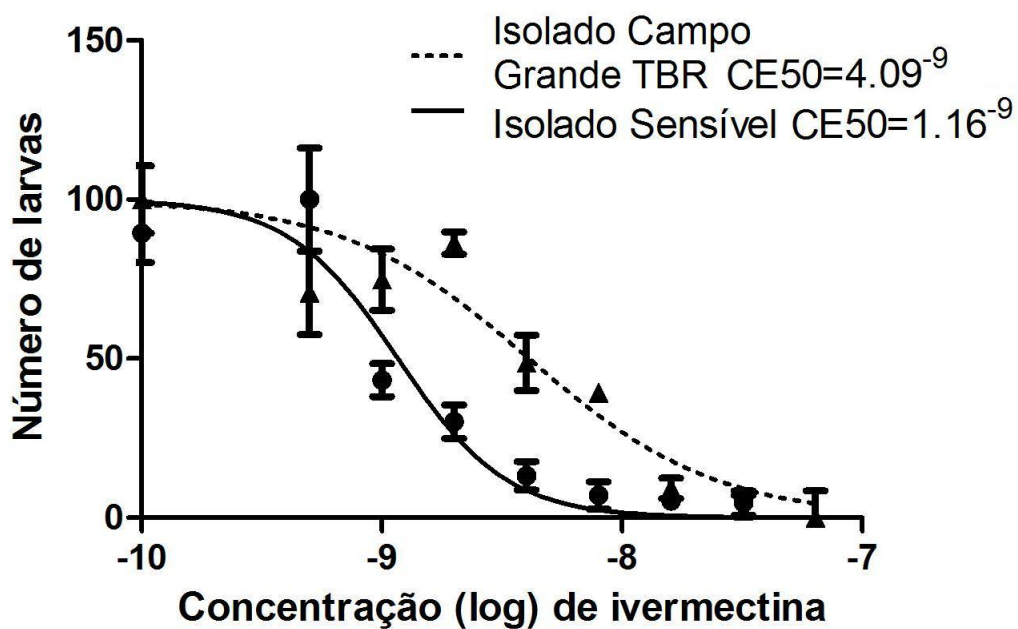


Figura 4.

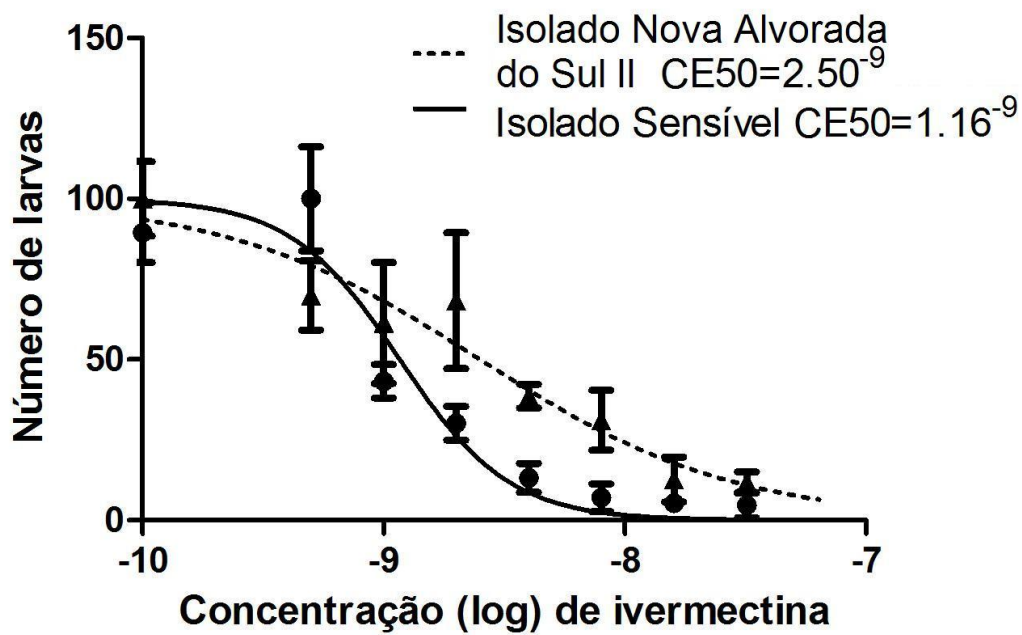


Figura 5.

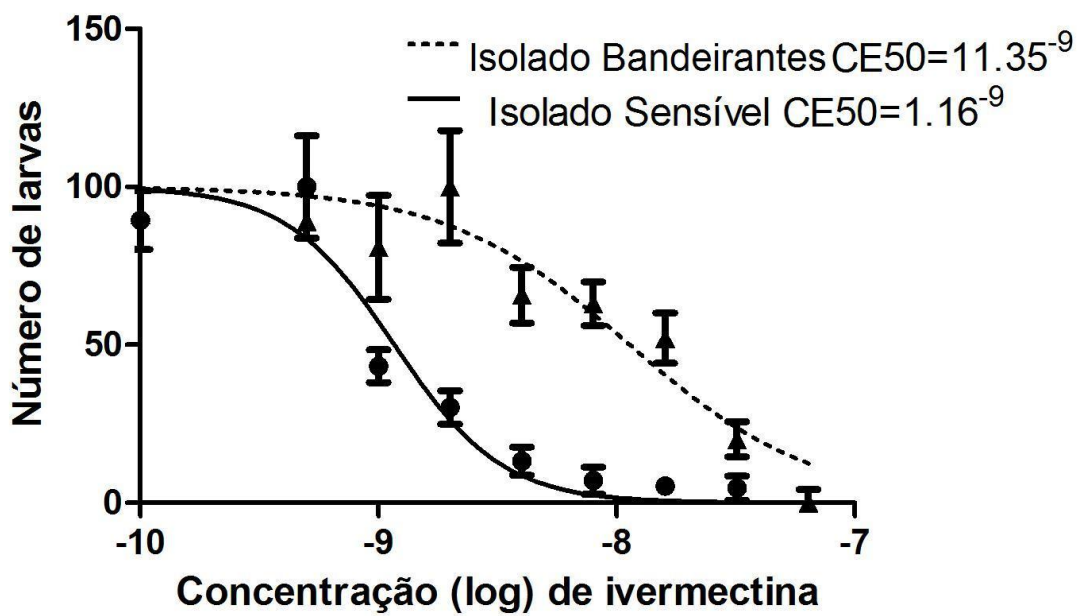


Figura 6.

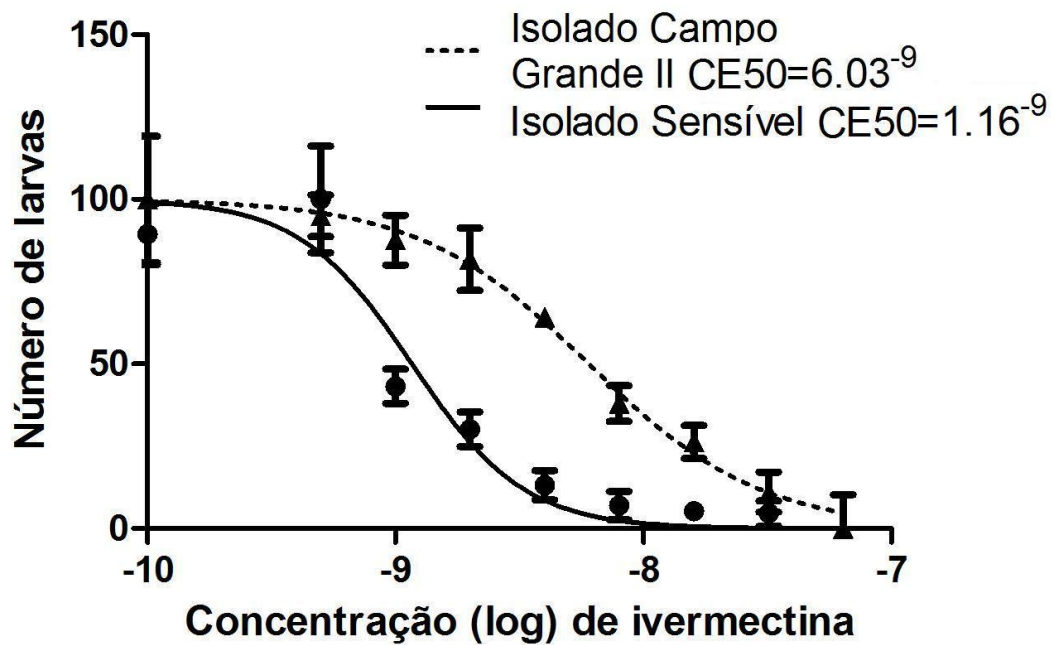


Figura 7.

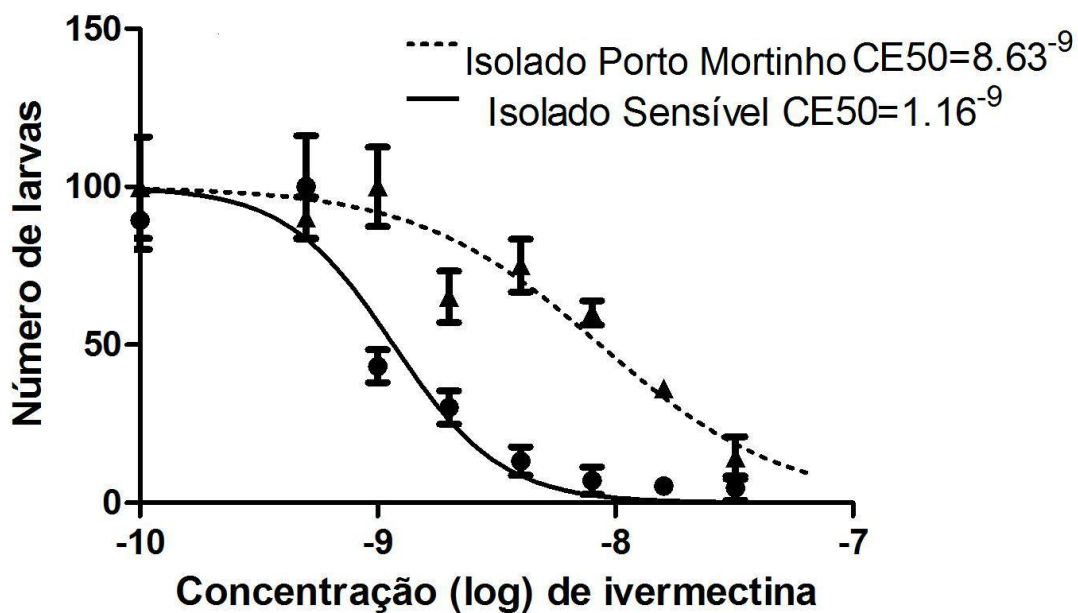


Figura 8.

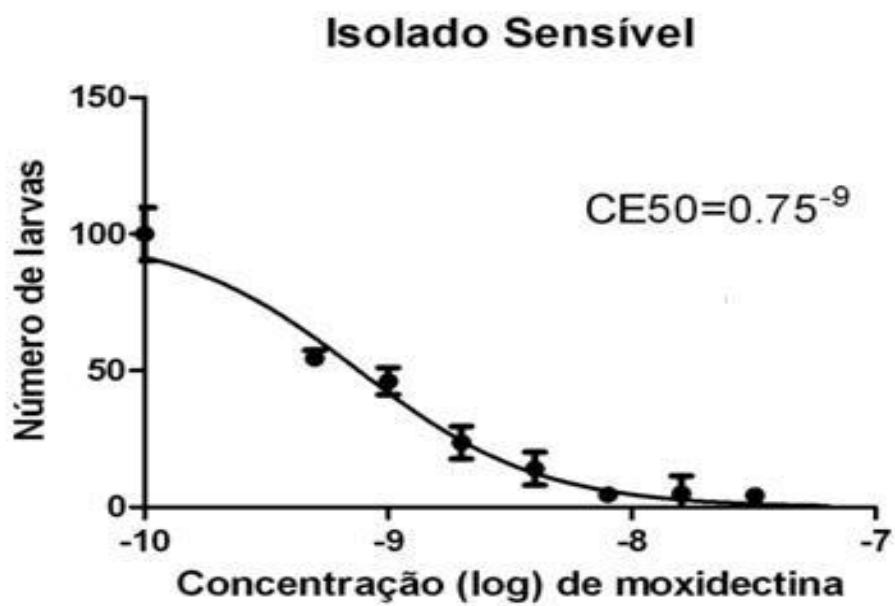


Figura 9.

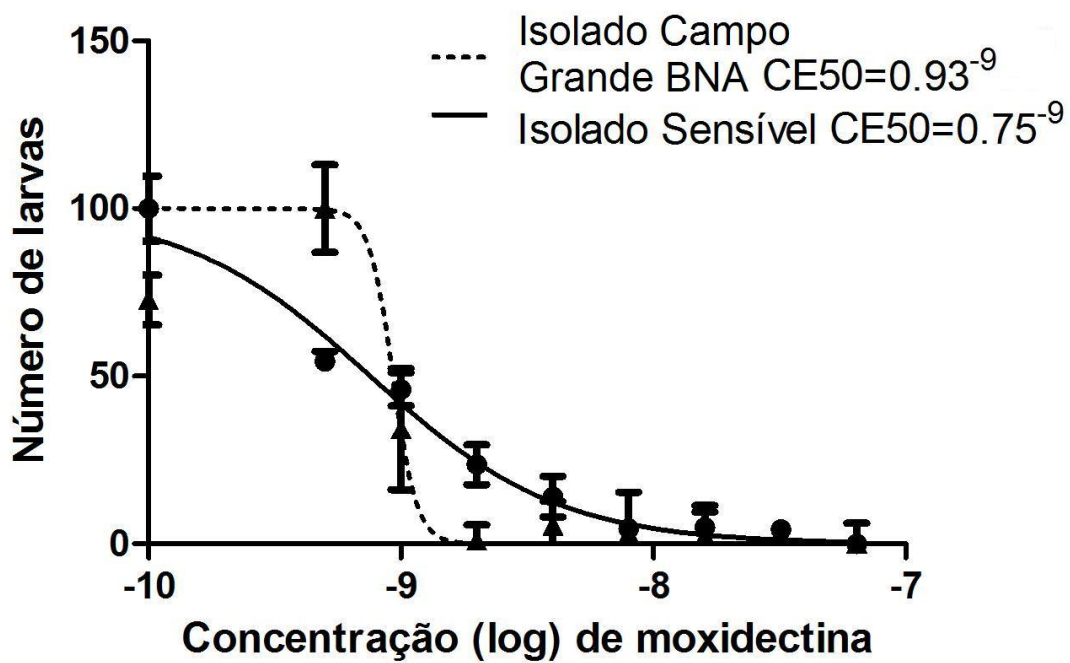


Figura 10.

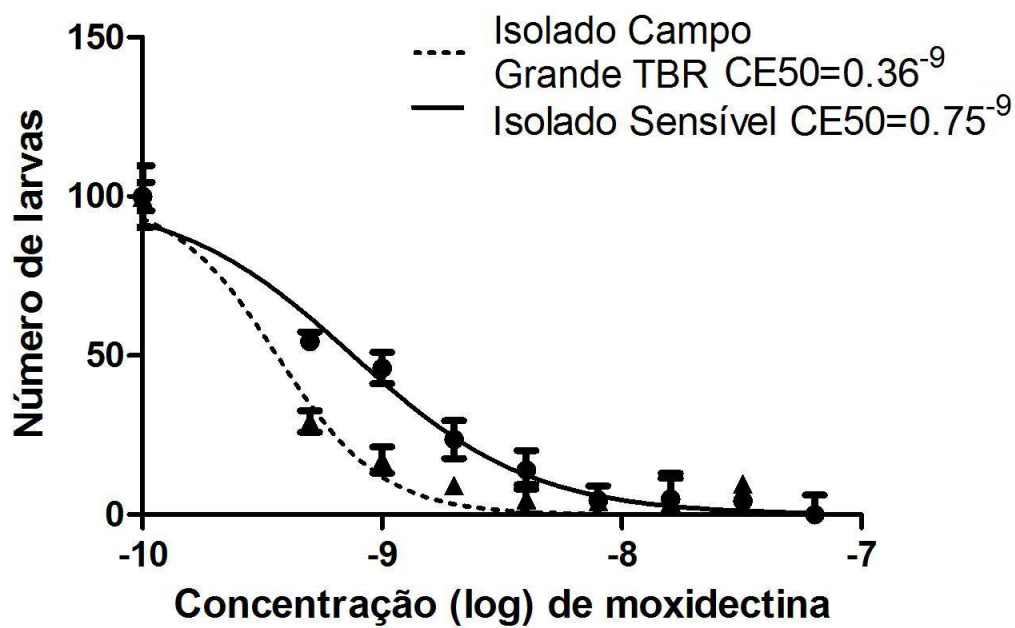


Figura 11.

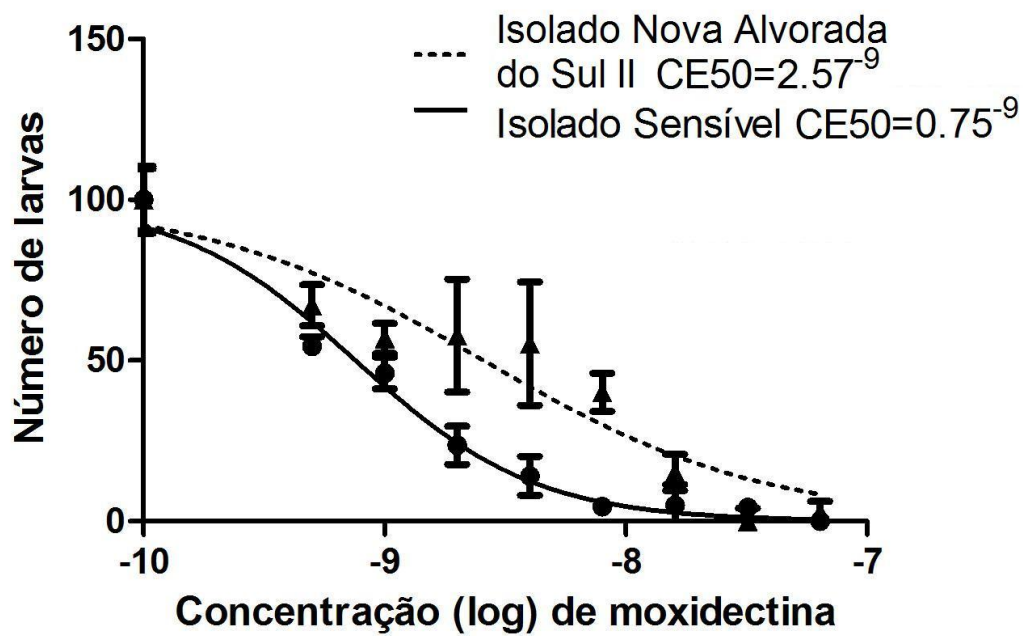


Figura 12.

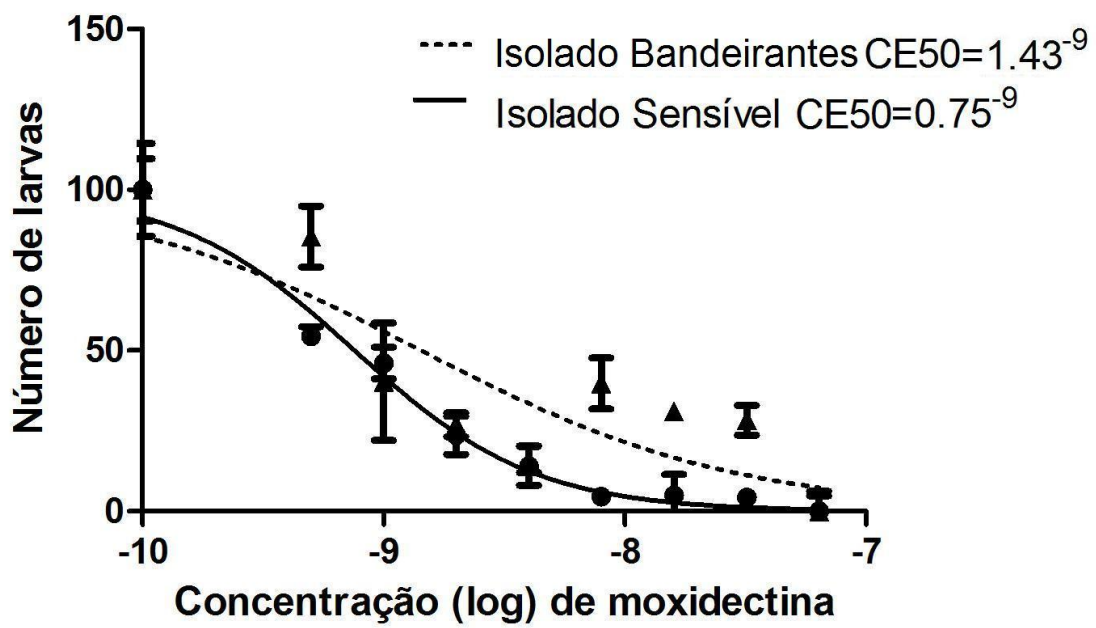


Figura 13.

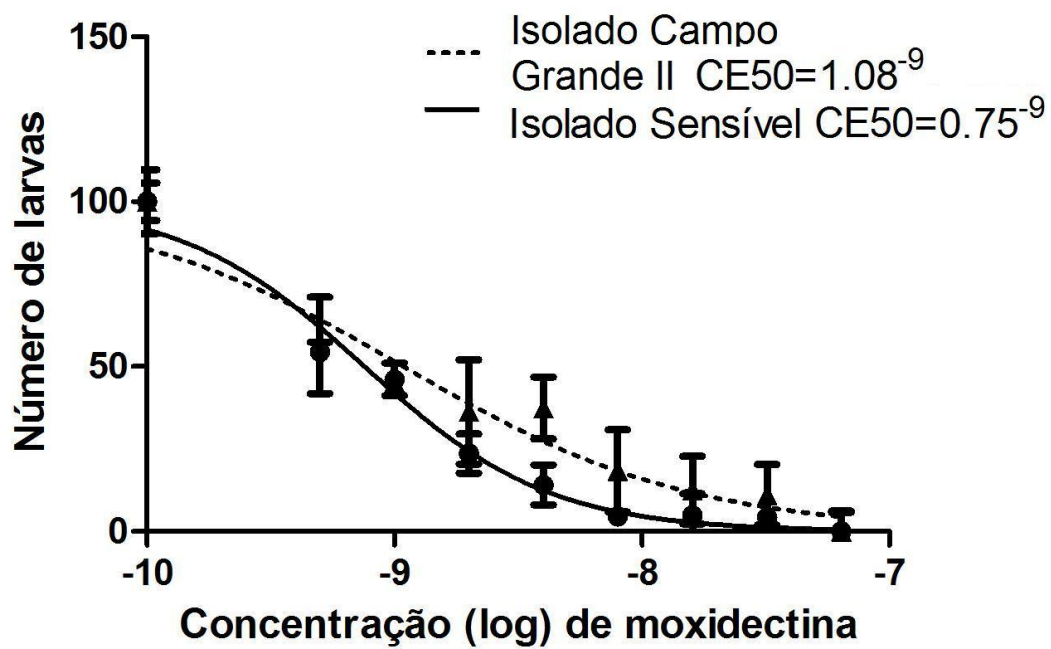


Figura 14.

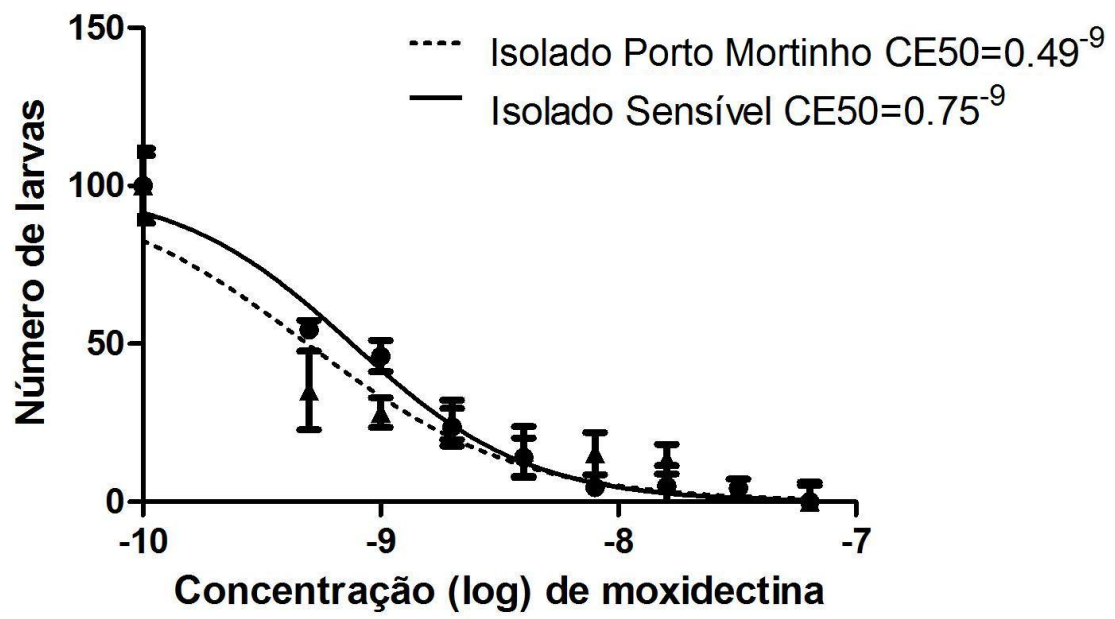


Figura 15.