

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO

ETIOLOGIA DA NEMATODIOSE GASTRINTESTINAL EM
BOVINOS DE CORTE NO BRASIL E FREQUÊNCIA GÊNICA
DE RESISTÊNCIA A BENZIMIDAZÓIS

Flávia Carolina Fávero

Campo Grande, MS

2019

2019	Etiologia da nematodiose gastrintestinal em bovinos de corte no Brasil e frequência gênica de resistência a benzimidazóis	FÁVERO
------	---	--------

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**ETIOLOGIA DA NEMATODIOSE GASTRINTESTINAL EM
BOVINOS DE CORTE NO BRASIL E FREQUÊNCIA GÊNICA
DE RESISTÊNCIA A BENZIMIDAZÓIS**

Etiology of gastrointestinal nematodes in beef cattle in Brazil and gene
frequency of resistance to benzimidazoles

Flávia Carolina Fávero

**Orientador: Prof. Dr. Fernando de Almeida Borges
Coorientador: Georg von Samson-Himmelstjerna**

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciência Animal. Área de concentração: Produção Animal.

Campo Grande, MS

2019

Certificado de aprovação

FLÁVIA CAROLINA FÁVERO

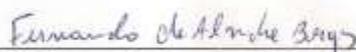
Etiologia da nematodíose gastrointestinal em bovinos de corte no Brasil e
frequência gênica de resistência a benzimidazóis

Etiology of gastrointestinal nematodes in beef cattle in Brazil and gene frequency
of resistance to benzimidazoles

Tese apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de Doutora em Ciência Animal.

Aprovado(a) em: 26-02-2019

BANCA EXAMINADORA:



Dr. Fernando de Almeida Borges
Orientador (UFMS)



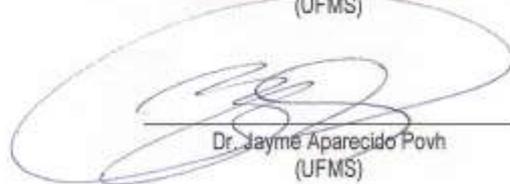
Dr. João Batista Catto
(EMBRAPA)



Dr. Fernando Paiva
(UFMS)



Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos
(UFMS)



Dr. Jayme Aparecido Povh
(UFMS)

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Ao meu orientador professor Dr. Fernando de Almeida Borges, meu carinho e gratidão, pelas oportunidades concedidas, por ter me acolhido, por transmitir seus conhecimentos e experiências, por todo incentivo e apoio, por acreditar e ouvir. Obrigada!

Aos meus pais, Sérgio Luiz Fávero e Marta E. Barbaglia Fávero, minhas irmãs, Juliana E. Fávero e Maria Amélia Fávero, e minha avó Isabel I. Fávero, pelo amor, carinho, apoio e, sobretudo, incentivo e paciência. Obrigada!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul que de forma objetiva e estruturada permitiu a realização deste curso de Doutorado, em especial ao solícito Ricardo O. dos Santos.

À Freie Universität Berlin, na Alemanha, pela parceria que possibilitou o desenvolvimento das análises laboratoriais moleculares de meu estudo, “Danke” ao meu coorientador Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna pela oportunidade e sempre bom humor, à Sabrina Ramünke, Jürgen Krücken, por todo o ensinamento e paciência, aos colegas de pesquisa, em especial a estagiária Carolina Costa pela companhia.

À minha amiga linda Dra. Larissa Bezerra dos Santos, que esteve ao meu lado nos bons e principalmente nos dias difíceis, apoiando seja perto ou longe, meu muito obrigada à você, Deus não nos desampara nunca.

À Theresa Firsching e sua família pela acolhida em Berlim, por todas as dicas, companhia, apoio, por me permitir conhecer cultura, história e tradições fascinantes. Ao meu parceiro e amigo, Rodolpho Ferrari Chiques, por sempre me incentivar e apoiar, por todo carinho e paciência.

Ao amigo Dr. Marcos V. Garcia, e aos que mesmo distantes, em especial à Julyene C. de Oliveira, Guilherme Zanolli e Danieli R. Scarpa, me ajudaram a suportar e superar momentos de dificuldades e profundo desânimo, transformando-os em repleta felicidade.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias (LADPAR), pós-graduandos, estagiários, residentes, principalmente ao Dr. Dyego G. L. Borges, Jéssica Teles, Micheli L. de Souza e ao técnico Ramiro A. Jacinto, pela amizade e dedicação, tornando os dias mais fáceis e alegres.

Ao Dr. Flávio Ribeiro de Araújo, e a técnica do laboratório de imunologia Gisele O. Leguizamón da EMBRAPA gado de corte, por toda simpatia, pelos ensinamentos durante as análises, sendo de fundamental importância para a qualidade desse trabalho.

Ao professor Dr. Carlos Alberto Ramos pela disponibilidade e prontidão em ajudar. À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pela bolsa de estudo concedida durante o curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo que possibilitou a realização do Doutorado Sanduíche.

A todos que direta ou indiretamente me apoiaram e por ventura não foram aqui citados.

Resumo

FÁVERO, Flávia Carolina. *Etiologia da nematodiose gastrintestinal em bovinos de corte no Brasil e frequência gênica de resistência a benzimidazóis*. Ano. 2019. 55f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2019.

A bovinocultura é uma importante atividade econômica no Brasil, entretanto, o parasitismo por nematódeos gastrintestinais (NGIs) e a resistência a anti-helmínticos são limitantes para produção de ruminantes. Para o controle eficaz do parasitismo são necessários estudos epidemiológicos de identificação das espécies de helmintos para serem adotadas medidas eficientes de profilaxia e prevenção. Infecções por *Haemonchus placei* e *Haemonchus contortus* em bovinos criados a pasto já foram relatadas, sendo desconhecida a frequência e relevância de infecção por *H. contortus* em bovinos no Brasil. O estudo da frequência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), responsáveis pela resistência a benzimidazóis (BZDs) em populações de NGIs em bovinos é importante por estabelecer um diagnóstico precoce de resistência. O objetivo do estudo foi determinar a etiologia das NGIs em bovinos no Brasil e determinar a frequência gênica da resistência a BZDs. Para isso, foram colhidas fezes de bovinos de corte em 61 rebanhos, nos estados de: Rondônia, Tocantins, Pará, Maranhão, Alagoas, Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul. Em cada propriedade, foram utilizados 100 animais machos, categoria recria. Coproculturas foram realizadas utilizando um pool com 10-15 g de fezes de cada animal. As larvas infectantes foram extraídas de coproculturas, uma parte foi utilizada para identificação dos gêneros e classificação de espécies de *Haemonchus* por morfologia. O restante das larvas foi utilizado para análise molecular de sequenciamento do DNA, para identificação das espécies de *Haemonchus*, e ensaios de pirosequenciamento, para determinação de frequências alélicas de β -tubulina. Nas coproculturas, foram observadas larvas dos gêneros *Cooperia*, *Haemonchus*, *Oesophagostomum* e *Trichostrongylus*, em todas as regiões. O gênero *Cooperia* apresentou prevalência de 100% nas propriedades avaliadas. *Haemonchus* sp. apresentou prevalência de 92,3% na Região Norte, enquanto nas demais regiões a prevalência foi de 100%. *Oesophagostomum* sp. apresentou prevalência igual/superior a 50% em todas as regiões do país, exceto na Região Norte. Na Região Nordeste e Norte, *Trichostrongylus* sp. alcançou prevalência igual/superior a 50%, e nas Regiões Centro-Oeste e Sudeste a prevalência foi de 16,7% e 14,3%, respectivamente. A riqueza parasitária encontrada nos rebanhos foi maior para presença de três gêneros de NGIs (67,2%) nos bovinos. Em 27,9% das propriedades houve predominância de dois gêneros, *Cooperia* e *Haemonchus*, ressaltando a prevalência destes NGIs. De maneira geral, *Cooperia* sp. foi o NGI dominante, com maior prevalência e intensidade nas coproculturas, seguido de *Haemonchus* sp., sendo estes os NGIs mais relevantes. Os resultados da análise morfométrica de 2.345 larvas indicam que *H. placei* esteve presente em todas as fazendas, enquanto *H. contortus* foi observado em 20,3% das fazendas. Em contrapartida, a análise do isotipo 1 do gene da β -tubulina confirmou 100% de prevalência para *H. placei* e 23,7% para *H. contortus*, o que é maior do que na análise morfológica. Ensaios de pirosequenciamento demonstraram pela primeira vez em *H. placei* de bovinos brasileiros em todas as regiões, SNPs associados à

resistência aos BZDs nos três códons (F167Y, E198A e F200Y) no isotipo 1 do gene da β -tubulina em populações de campo. Frequências elevadas ($\geq 15\%$) de SNPs associados aos alelos de resistência aos BZDs foram observadas em 11,4% das propriedades, e 57% desses SNPs foram observados mais frequentemente no códon E198A. Este estudo confirma a presença de *H. contortus* parasitando bovinos e constata que a resistência aos BZDs está em um estágio inicial, mas já está disseminada em bovinos de corte no país, com a presença de resistência aos BZDs no isotipo 1 da β -tubulina associada aos polimorfismos F167Y, E198A e F200Y em *H. placei*.

Palavras-chave: Coproculturas. Epidemiologia. *Haemonchus* spp. Pirosequenciamento. SNPs. β -tubulina.

Abstract

FÁVERO, Flávia Carolina. *Etiology of gastrointestinal nematodes in beef cattle in Brazil and gene frequency of resistance to benzimidazoles*. Ano. 2019. 55f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2019.

Cattle breeding is an important economic activity in Brazil, however, parasitism by gastrointestinal nematodes (NGIs) and resistance to anthelmintics are limiting for ruminant production. For the effective control of parasitism, epidemiological studies of the identification of helminth species are necessary to adopt efficient prophylaxis and prevention measures. Infections by *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* in cattle raised on grass have been reported, and the frequency and relevance of *H. contortus* infection in cattle in Brazil being unknown. The study of the frequency of single nucleotide polymorphisms (SNPs), responsible for BZD-resistance in NGI populations in cattle is important for establishing an early diagnosis of resistance. The objective of the study was to determine the etiology of NGIs in cattle in Brazil and to determine the gene frequency of BZD-resistance. For this, a sample of fecal from beef cattle was collected from 61 herd of cattle, in the states of: Rondônia, Tocantins, Pará, Maranhão, Alagoas, Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná and Rio Grande do Sul. In each farm, 100 male animals were used, rearing category. Coprocultures were performed using a pool with 10-15 g of faeces from each animal. The infective larvae were extracted from coprocultures, one part was used for identification of genera and classification of *Haemonchus* species by morphology. The rest of the larvae were used for molecular sequencing studies to identify *Haemonchus* species, and pyrosequencing assays for the determination of allelic frequencies of isotype 1 β -tubulin. In the coprocultures, larvae of the genus *Cooperia*, *Haemonchus*, *Oesophagostomum* and *Trichostrongylus* were observed in all regions. The genus *Cooperia* presented a prevalence of 100% in the evaluated properties. *Haemonchus* sp. presented a prevalence of 92.3% in the northern region, while in the other regions the prevalence was 100%. *Oesophagostomum* sp. presented a prevalence of 50% in all regions of the country, except in the northern region. In the northeast and north, *Trichostrongylus* sp. reached a prevalence of 50%, and in the central-west and southeast regions the prevalence was 16.7% and 14.3%, respectively. The parasite richness found in the herds was higher for three genera of NGIs (67.2%) in cattle. In 27.9% of the properties, there were two genera, *Cooperia* and *Haemonchus*, emphasizing the prevalence of these NGIs. In general, *Cooperia* sp. was the dominant NGI, with higher prevalence and intensity in coprocultures, followed by *Haemonchus* sp., these being the most relevant NGIs. The results of the morphometric analysis of 2345 larvae showed that *H. placei* was present in all herd of cattle, while *H. contortus* was observed in 20.3% of herd. In contrast, analysis of isotype 1 β -tubulin gene confirmed 100% prevalence for *H. placei* and 23.7% for *H. contortus*, which is higher than for morphological analysis. Pyrosequencing assays demonstrated, for the first time in *H. placei* of Brazilian cattle from all regions, SNPs associated with BZD-resistance in the three codons (F167Y, E198A and F200Y) in the isotype 1 β -tubulin gene from field populations. High frequencies ($\geq 15\%$) of SNPs associated with BZD-resistance alleles were observed in 11.4% of the farms, and 57% of these SNPs were observed more frequently in the E198A codon. This study

confirms the presence of *H. contortus* parasitizing cattle and finds that resistance to BZDs is at an early stage, but is already widespread in beef cattle in the country, with the presence of BZD-resistance in the isotype 1 β -tubulin associated to polymorphisms F167Y, E198A and F200Y in *H. placei*.

Keywords: Coprocultures. Epidemiology. *Haemonchus* spp. Pyrosequencing. SNPs. β -tubulina.

Lista de abreviaturas e siglas

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μm	Micrometro
BZDs	Benzimidazóis
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FECRT	Teste de Redução de Contagem de Ovos nas Fezes
Fundect	Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul
L3	Larva de terceiro estágio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NGIs	Nematódeos gastrintestinais
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.2 Nematódeos parasitas de bovinos no Brasil.....	3
1.3 Identificação morfológica e molecular das espécies de <i>Haemonchus</i>	5
1.4 Situação da resistência aos benzimidazóis em bovinos no Brasil.....	8
Referências.....	12
CAPÍTULO I.....	22
DISTRIBUIÇÃO DE GÊNEROS DOS NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS EM BOVINOS DE CORTE NO BRASIL.....	22
Resumo.....	22
Introdução.....	22
Material e métodos.....	23
Resultados.....	27
Discussão.....	29
Conclusão.....	31
Agradecimentos.....	31
Referências.....	32
CAPÍTULO II.....	37
<i>Haemonchus</i> sp. EM BOVINOS DE CORTE NO BRASIL: COMPOSIÇÃO DE ESPÉCIES E FREQUÊNCIA GÊNICA DE RESISTÊNCIA A BENZIMIDAZÓIS...	37
Resumo.....	37
Introdução.....	38
Material e métodos.....	40
Resultados.....	44
Discussão.....	48
Agradecimentos.....	50
Referências.....	50

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui um rebanho bovino efetivo de mais de 218 milhões de cabeças. A pecuária é uma importante atividade econômica no país, ocupando um lugar de destaque na produção e exportação de carne bovina, entretanto, o parasitismo por nematódeos gastrintestinais (NGIs) e a resistência a anti-helmínticos são fatores limitantes à produção (EYSKER, 2001; BORGES et al., 2013). Em 2018 o País exportou o recorde de 1.353 milhão de toneladas de carne *in natura*, registrando faturamento de US\$ 5,6 bilhões (CEPEA, 2019).

A Região Centro-Oeste possui o maior número de animais, sendo 34,4% da população de bovinos do país, em que o estado com maior efetivo bovino, Mato Grosso, abrange 30,3 milhões de cabeça, sendo a segunda, terceira e quarta posições no país ocupadas por Minas Gerais (23.637.803 cabeças), Goiás (22.879.411 cabeças) e Mato Grosso do Sul (21.800.990 cabeças), respectivamente. O Norte representa 22%, com destaque os estados do Pará e Tocantins, com aproximadamente 20,5 e 13,7 milhões de cabeças, respectivamente. As Regiões Sudeste, Nordeste e Sul do território brasileiro correspondem a 18%, 13% e 12,6% do rebanho bovino, respectivamente (IBGE, 2016).

As endoparasitoses prejudicam o crescimento, desenvolvimento, reprodução e o ganho de peso dos animais (CATTO et al., 2005), além de aumentarem gastos com mão-de-obra, anti-helmínticos e, assim, favorecer o aparecimento de populações de parasitas resistentes (SOUTELLO et al., 2002; BORGES et al., 2013). As perdas econômicas no país são estimadas em mais de 7 bilhões de dólares anualmente (GRISI et al., 2014).

O sistema de criação de bovinos de corte no Brasil utiliza a intensificação com uso das pastagens, com aproveitamento máximo com mais unidade animal em menores áreas, contribuindo para contaminação das pastagens por helmintos gastrintestinais, o que favorece a presença de infecções, mesmo em níveis baixos. O controle destas infecções, segundo Bianchin (1986), torna-se eficiente e econômico quando a epidemiologia dos helmintos nas diferentes regiões é conhecida, possibilitando o estabelecimento de controle estratégico preventivo.

Haemonchus sp. está entre os mais importantes NGIs de ruminantes no Brasil (AMARANTE et al., 2017), evidenciado por sua alta prevalência e

1 patogenicidade, causando, por exemplo, redução na produtividade de bovinos
2 (GENNARI et al., 1991; BORGES et al., 2013). A especificidade parasitária de
3 *Haemonchus* sp. em ruminantes domésticos não é absoluta, o que contrasta com o
4 tradicional conceito de que *Haemonchus contortus* (RUDOLPHI, 1803; COBB, 1898)
5 seja classificado como um parasita de ovinos e caprinos, e *Haemonchus placei*
6 (PLACE, 1893) e *Haemonchus similis* (TRAVASSOS, 1914) sejam parasitas de
7 bovinos.

8 Há relatos de infecções mistas naturais por *H. placei* e *H. contortus* em
9 bovinos criados a pasto no mundo (ROBERTS e BREMMER, 1955; SANTIAGO,
10 1968; BORBA, 1988; LICHTENFELS et al., 1994; ACHI et al., 2003; HOBBERG et al.,
11 2004; GASBARRE et al., 2009; CHAUDHRY et al., 2015) e no Brasil (AMARANTE et
12 al., 1997; BRASIL et al., 2012), sendo confirmada sua adaptação e patogenicidade
13 ao hospedeiro em infecções experimentais em bovinos (BASSETO et al., 2011;
14 FÁVERO et al., 2016ab). Além das infecções mistas, as recentes evidências de
15 campo da hibridização interespecies entre *H. contortus* e *H. placei* em pequenos
16 ruminantes pode apontar para uma nova forma de transmissão de mutações de
17 resistência anti-helmíntica (CHAUDHRY et al., 2015).

18 Um dos primeiros anti-helmínticos de largo espectro lançados no Brasil foram
19 os benzimidazóis (BZDs), e continuam sendo muito utilizados nos dias de hoje no
20 tratamento dos rebanhos. Pesquisas demonstram que o nível de resistência
21 parasitária aos BZDs ainda é muito baixo (SOUTELLO et al., 2007; SOUZA et al.,
22 2008; BRASIL et al., 2012; NEVES et al., 2014). No entanto, a situação da
23 resistência a BZDs no Brasil pode estar subestimada, uma vez que os estudos são,
24 em sua maioria, baseados em metodologias menos sensíveis de avaliação
25 fenotípica, como teste de redução na contagem de ovos nas fezes (FECRT), teste
26 de desenvolvimento larval (TDL) e teste de eclosão de ovos (TEO).

27 Segundo Coles et al. (2006), a necessidade de melhoria nos métodos de
28 detecção de resistência anti-helmíntica, abrange estudos sobre os fatores ligados ao
29 diagnóstico de resistência anti-helmíntica para a produção de bovinos no Brasil.
30 Neste sentido, registros de frequência de polimorfismos de nucleotídeo único
31 (SNPs), associados à resistência a BZDs em populações de NGIs em bovinos no
32 Brasil são importantes por estabelecer um diagnóstico precoce da resistência por
33 meio de ferramenta molecular sensível e específica.

1.2 Nematódeos parasitas de bovinos no Brasil

A pecuária de corte brasileira ainda é praticada em sua maioria como regime de pasto semiextensivo ou extensivo (ANUALPEC, 2016), o que favorece infecções por parasitos gastrintestinais presentes nas pastagens, uma vez que, as larvas infectantes de parasitos estão disponíveis nas pastagens praticamente durante o ano todo, sendo uma fonte de infecção contínua para os animais (LIMA, 1989).

Como a ingestão das larvas infectantes acontece no momento de pastejo, geralmente as infecções ocorrem de forma mista, ou seja, mais de um gênero ou espécie parasitando o mesmo animal. Estas infecções parasitárias retardam o crescimento e desenvolvimento em animais jovens, diminuem a produção de vacas leiteiras (RAVINET et al., 2016), causam distúrbios gastrintestinais, (SOUZA, 2013), custos com tratamentos e, em casos extremos, podem ocasionar morte do animal (CEZAR e BIANCHIN, 2008).

Estudos realizados no Brasil alistam a presença de várias espécies de NGIs parasitando bovinos, destacando: *Cooperia punctata*, *C. pectinata*, *C. spatulata*, *H. placei*, *H. similis*, *H. contortus*, *Trichostrongylus axei*, *T. colubriformis*, *Oesophagostomum radiatum*, *Ostertagia ostertagi*, *O. lyrata*, *Strongyloides papillosus*, *Trichuris discolor*, *Bunostomum phlebotomum* e *Capillaria bovis* (CATTO e UENO, 1981; CATTO et al., 1993; AMARANTE et al., 1997; BORGES et al., 2001; BRESCIANI et al., 2001; SANTOS et al., 2010; FELIPPELLI et al., 2014; AMARANTE, 2016). No Brasil, *H. similis* ocorre em menor intensidade e prevalência do que as outras duas espécies de *Haemonchus* (SANTOS et al., 2010).

O conhecimento sobre as espécies de parasitas, em especial os NGIs que acometem os bovinos, é fundamental para elaboração de estratégias sustentáveis de controle (AMARANTE, 2011). No entanto, para sua realização é necessário o treinamento de técnicos para a correta identificação das diferentes espécies, bem como o conhecimento sobre a epidemiologia dos parasitas gastrintestinais.

A prevalência e distribuição destes parasitos apresentam variações regionais e sazonais, dependendo de vários fatores como espécie, idade e manejo dos animais, pluviosidade, ecossistema (BIANCHIN e MELO, 1985; FURLONG et al., 1985; GIRÃO et al., 1985; GIRÃO e LEAL, 1999; GENNARI et al., 2002). Quando o comportamento estacional de NGIs em uma região é estudado e conhecido, torna-se possível estabelecer medidas estratégicas de controle (BIANCHIN, 1986).

A prevalência e o percentual médio dos NGIs que parasitam bovinos no Brasil, descritos na literatura por resultados extraídos de coproculturas, estão descritos na TABELA 1 e TABELA 2, respectivamente, sendo que os gêneros mais prevalentes encontrados em todos os estudos foram *Haemonchus* sp., *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp.

Tabela 1. Prevalência dos gêneros de larvas de terceiro estágio oriundas de coproculturas de bovinos, em estados brasileiros.

Estado	Prevalência % por Região			
	Nordeste		Sul	
	PI (a)	PI (b)	RS (c)	RS (d)
Gênero				
<i>Haemonchus</i>	77	80	100	80
<i>Cooperia</i>	56	24	100	100
<i>Oesophagostomum</i>	13	28	50	70
<i>Trichostrongylus</i>	10	10	100	50
<i>Bunostomum</i>	4	5	0	0
<i>Strongyloides</i>	65	57	0	0
<i>Ostertagia</i>	0	0	50	40

(a) Girão e Leal, 1999. (b) Girão et al., 1999. (c) Cezar et al., 2010 (d) Ramos et al., 2016.

Tabela 2. Percentual médio dos gêneros de larvas de terceiro estágio oriundas de coproculturas de bovinos, em estados brasileiros.

Estado	Percentual médio % por Região						
	Norte	Centro-Oeste	Sudeste		Sul		
	AC (a)	MS (b)	RJ (c)	SP (d)	SP (e)	RS (f)	RS (g)
Gênero							
<i>Haemonchus</i>	41	75	73	24,2	38	37,6	15,4
<i>Cooperia</i>	45	22	0	73,4	25,4	48,8	59,8
<i>Oesophagostomum</i>	5	1	3	1,6	21,8	1,9	9,3
<i>Trichostrongylus</i>	9	2	24	0,8	14,8	9,1	12,8
<i>Ostertagia</i>	0	0	0	0	0	2,6	1,8

(a) Costa, 1982. (b) Borges et al., 2013. (c) Silva et al., 2012. (d) Gennari et al., 2002. (e) Oliveira et al., 2009. (f) Cezar et al., 2010 (g) Ramos et al., 2016.

A prevalência dos helmintos adultos que parasitam bovinos estão descritos na TABELA 3, sendo os resultados oriundos da literatura, baseado em necropsia parasitológica de animais infectados naturalmente, em que as espécies de NGIs mais importantes em bovinos criados no Brasil para parasitas do abomaso são: *H. placei*, *O. ostertagi* e *T. axei*. No intestino delgado, destacam-se *C. pectinata* e *C. punctata*, e no intestino grosso é comum a espécie de *O. radiatum*.

1 **Tabela 3.** Prevalência da infecção por nematódeos parasitas de bovinos,
 2 determinadas por necropsia, em estados brasileiros.

Estado	Prevalência % por Região					
	Nordeste	Centro-Oeste		Sudeste		
Espécie	BA (a)	MS (b)	MS (c)	SP (d)	SP (e)	MG (f)
<i>H. contortus</i>	72,9	0	72,7	0	0	0
<i>H. placei</i>	0	0	0	97,6	33,3	100
<i>H. similis</i>	81,3	0	90,9	21,4	33,3	29
<i>Ostertagia spp.</i>	0	0	0	7,1	0	2,6
<i>T. axei</i>	8,3	6,8	75,7	26,2	0	69,7
<i>O. radiatum</i>	79,2	2,6	90,9	73,8	41,7	94,7
<i>B. phlebotomum</i>	52,1	0	36,3	0	0	2,6
<i>Cooperia spp.</i>	95,8	75,8	75,8	92,9	54,2	100
<i>Haemonchus spp.</i>	0	14,4	0	0	0	0

3 (a) Santana et al., 1989. (b) Bianchin et al., 1993. (c) Catto e Ueno, 1981. (d) Borges et al., 2001. (e)
 4 Bresciani et al., 2001. (f) Santos et al., 2010.

5

6 Estudos que identifiquem possíveis infecções naturais em bovinos por *H.*
 7 *contortus* poderiam contribuir para o conhecimento da etiologia da verminose em
 8 bovinos e seu impacto na resistência anti-helmíntica, imunoprofilaxia e em
 9 programas de controle integrado da verminose, com a utilização de diferentes
 10 espécies de hospedeiros em uma mesma área.

11 Embora estes estudos epidemiológicos sejam fundamentais para a
 12 elaboração das estratégias de controle parasitário, hoje em dia são cada vez mais
 13 escassas pesquisas básicas específicas, havendo necessidade de novas pesquisas,
 14 principalmente nos estados de Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do
 15 Sul e Pará, onde estão localizados 54,6% do efetivo bovino do país (IBGE, 2016).

16

17 **1.3 Identificação morfológica e molecular das espécies de *Haemonchus***

18 A maioria dos gêneros/espécies de nematódeos que parasitam o trato
 19 gastrointestinal de bovinos, pertencentes à ordem Strongylida, são identificados a
 20 partir de larvas de terceiro estágio (L3), extraídas da cultura das fezes dos animais
 21 infectados, enquanto alguns gêneros são identificados pela visualização dos ovos
 22 encontrados nas fezes.

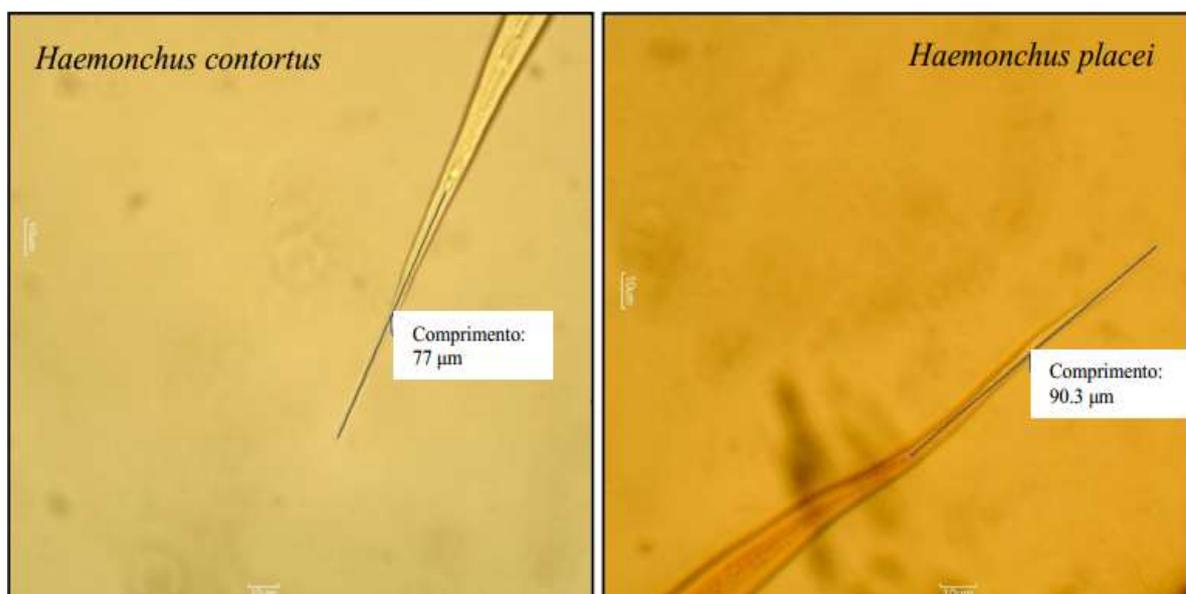
23 Roberts e O'Sullivan (1950) desenvolveram a técnica de coprocultura, que
 24 possibilita o diagnóstico do gênero de endoparasitas estrongilídeos por morfologia
 25 de L3 (KEITH, 1953), obtidas da cultura das fezes de animais infectados. O principal
 26 ponto para diferenciação dos gêneros nesta técnica está na morfologia da

1 extremidade posterior e extremidade anterior da larva, entre outras características
2 que podem ser observadas através por microscopia (KEITH, 1953, VAN WYK et al.,
3 2004).

4 A diferenciação das espécies *H. placei* e *H. contortus* já foi questionada
5 (GIBBONS, 1979), porém já confirmadas como espécies distintas, tendo como
6 hospedeiros em comum bovinos e ovinos (LE JAMBRE, 1979; LICHTENFELS et al.,
7 1994; ZARLENGA et al., 1994; STEVENSON et al., 1995; AMARANTE et al., 1997;
8 ACHI et al., 2003; HOBERG et al., 2004).

9 As espécies de *Haemonchus* possuem características morfológicas distintas
10 que permitem a identificação de adultos ou larvas infectantes; sendo este último um
11 método simples de classificação morfológica, economicamente viável, por trabalhar
12 com helmintos liberados nas fezes dos animais parasitados. Além disso, a
13 identificação de larvas infectantes é considerada mais precisa em comparação com
14 a medida do comprimento dos espículos de machos (SANTOS et al., 2014).

15 A morfometria de larvas infectantes pode ser uma ferramenta útil para
16 identificação das espécies que acometem o rebanho e das espécies resistentes a
17 anti-helmínticos, sendo uma alternativa para substituir a necessidade de necropsia
18 para reconhecimento do parasitismo (AMARANTE, 2011). As larvas infectantes de
19 *H. placei* apresentam comprimento total do parasita e comprimento da cauda,
20 maiores (Figura 1), em relação a *H. contortus* (KEITH, 1953, SANTIAGO, 1968; VAN
21 WYK et al., 2004; SANTOS et al., 2014).



23
24 Figura 1. Distância entre a extremidade posterior da larva e o final da cauda da bainha de larvas
25 infectantes de *Haemonchus contortus* e *Haemonchus placei* (aumento 40x). Fonte: Santos, 2013

1 A identificação de espécies de *Haemonchus* spp. por morfometria tradicional,
2 baseado em L3, embora vantajoso devido à praticidade, rapidez e facilidade de
3 obtenção das amostras, é baseado em diferenças sutis (AMARANTE et al., 2017), e
4 uma limitação importante desta técnica é a sobreposição nas medidas das espécies
5 de *H. placei* e *H. contortus* (CORTICELLI e LAI, 1964; VAN WYK et al., 2004;
6 SANTOS et al., 2014), levando a alguns resultados inconclusivos.

7 Em relação à identificação morfológica das espécies, Hoberg et al. (2004)
8 observaram que *H. placei* e *H. contortus* possuem importantes e diferentes
9 características morfológicas. A identificação morfológica de fêmeas adultas de
10 *Haemonchus* pode ser realizada pela variação nos tipos de vulva (LICHTENFELS et
11 al., 1994), enquanto nos machos adultos, a classificação pode ser através do
12 comprimento total dos espículos, do comprimento de gancho direito e do gancho
13 esquerdo dos espículos, através do cálculo da função discriminante descrita por
14 Jacquiet et al. (1997).

15 Amarante et al. (1996) verificaram que, de modo geral, os exemplares adultos
16 de *H. placei* apresentam os ganchos dos espículos com comprimentos superiores
17 aos de *H. contortus*. Entretanto, Herlich et al. (1958), nos Estados Unidos, obtiveram
18 resultados similares em relação às medidas dos espículos de *Haemonchus* de
19 ovinos e bovinos mantidos em pastagem contaminada por espécies específicas dos
20 dois hospedeiros.

21 Outro método de identificação morfológica utilizado é a contagem de sínlofes
22 (cristas) dos helmintos adultos. As contagens são realizadas por meio de cortes
23 medianos e na junção esôfago-intestino do parasita, sendo posteriormente realizada
24 a contagem das cristas de cada exemplar (LICHTENFELS et al., 1986; FÁVERO et
25 al., 2016a). As espécies *H. similis* e *H. placei* apresentam 34 sulcos, tanto na região
26 posterior como anterior ao esôfago, enquanto *H. contortus* apresenta 30 sulcos, na
27 mesma região de corte. Na região de corte mediano do parasito, as espécies *H.*
28 *contortus* e *H. placei* apresentam 22 sulcos (LICHTENFELS et al., 1994). Um
29 limitante nesta técnica é o aparecimento de cristas extras. Gharamah et al. (2014)
30 verificaram em isolados de *H. contortus* a presença de pequenas cristas extras na
31 sínlofe, principalmente na região da papila cervical, o que prejudica o diagnóstico de
32 espécies.

1 A utilização de técnicas moleculares para identificação das espécies de *H.*
2 *placei* e *H. contortus*, inclui o método por meio de reação em cadeia polimerase
3 (PCR) através da amplificação de DNA ribossomal (ZARLENGA et al., 1994), que é
4 intercalado por dois espaçadores, a região *Internal Transcribed Spacer 1* e 2 (ITS-1
5 e ITS-2) (STEVENSON et al., 1995) e sequenciamento dos amplicons obtidos
6 nestas reações de amplificação. Por comparação, as técnicas moleculares
7 direcionam sequências para ITS-1 e ITS-2 de DNA ribossomal de nematódeos,
8 possuindo potencial para identificação de ovos e/ou larvas de espécies de
9 estrongilídeos com elevado grau de precisão (VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et
10 al., 2002; BOTT et al., 2009; ROEBER et al., 2012; BISSET et al., 2014; KNIGHT e
11 BISSET, 2015).

12 13 **1.4 Situação da resistência aos benzimidazóis em bovinos no Brasil**

14 O número de pesquisas de campo no Brasil, que avaliam a resistência anti-
15 helmíntica em bovinos é inferior a quantidade de estudos com pequenos
16 ruminantes, o que pode subestimar o número de casos de resistência registrados
17 (GRAEF et al., 2013), mesmo a resistência em bovinos mostrando-se, nos últimos
18 anos, um problema emergente no mundo (EDMONDS et al., 2010; SUTHERLAND e
19 LEATHWICK, 2011; O'SHAUGHNESSY et al., 2014; ROSE et al., 2015; BERK et
20 al., 2016).

21 O controle dos nematódeos é realizado, basicamente, com a utilização de
22 anti-helmínticos pertencentes a diversos grupos químicos (VIEIRA e CAVALCANTE,
23 1999), sendo utilizados com frequência nos dias de hoje as lactonas macrocíclicas,
24 os imidazotiazóis (levamisole) e os BZDs, por serem considerados de amplo
25 espectro (KÖHLER, 2001; FORBES, 2013). A utilização destes fármacos favorece o
26 desenvolvimento da resistência anti-helmíntica, impulsionando o crescimento da
27 resistência (GASSER e VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, 2016).

28 O método fenotípico usualmente aplicado a campo, o FECRT, detecta a
29 resistência apenas quando no mínimo de 25% da população de NGIs apresenta
30 alelos para resistência (PAPADOPOULOS, 2008). Dessa forma, as pesquisas têm
31 focado na detecção dos SNPs responsáveis pela resistência a BZDs com o intuito
32 de desenvolver técnicas moleculares sensíveis para diagnóstico precoce da
33 resistência.

1 Segundo Fortes e Molento (2013), diagnosticar o genótipo de uma única larva
2 ou helminto adulto é trabalhoso e relativamente caro, necessitando aprimoramento
3 de testes moleculares para PCR em tempo real ou pirosequenciamento, com
4 diagnóstico baseado no uso de pool de amostras de DNA de larvas. Assim, seria
5 possível utilizar rotineiramente testes moleculares para diagnóstico da resistência. O
6 pirosequenciamento foi uma metodologia padronizada em 2009 (VON SAMSON-
7 HIMMELSTJERNA et al., 2009) para a detecção e quantificação da frequência
8 gênica da resistência de *H. contortus* a BZDs, e em 2013 (DEMELER et al., 2013)
9 para amostras de larvas de diferentes espécies de nematódeos de bovinos.

10 Os BZDs merecem destaque por representarem uma classe de anti-
11 helmíntico mundialmente utilizado no tratamento de doenças parasitárias de
12 animais. Estes fármacos apresentam uma ampla variedade de formulações, alta
13 margem de segurança e longo espectro de ação (KRÍZOVÁ-FORSTOVÁ et al.,
14 2011; FORTES e MOLENTO, 2013), sendo este, motivo de muitos relatos de
15 resistência em pequenos ruminantes, principalmente por *H. contortus*, tornando
16 insustentáveis os sistemas de produção que são dependentes de frequente
17 quimioterapia (GASBARRE et al., 2009; NARI-HENRIOUD, 2011).

18 O mecanismo de ação dos BZDs se deve à capacidade de se ligar à β -
19 tubulina, bloqueando e inibindo a formação dos microtúbulos, e por consequência,
20 ao mesmo tempo, processos de degradação causam colapso do citoesqueleto
21 (LACEY, 1988; KÖHLER, 2001). O efeito desta ligação é a desnutrição completa do
22 parasita por inibição da captação de glicose, da secreção de proteína e da produção
23 de microtúbulos (TAYLOR et al., 2010).

24 Os mecanismos de resistência a BZDs ainda não são totalmente
25 esclarecidos, entretanto, são os mais bem caracterizados. Alguns SNPs já foram
26 descritos como responsáveis pela resistência a BZDs em tricostrongilídeos. Estes
27 polimorfismos levam a modificações estruturais na β -tubulina que impedem a
28 ligação dos BZDs (PRITCHARD et al., 2000; GHISI et al., 2007).

29 Uma das principais mutações ocorre no códon TTC para TAC, que substitui o
30 aminoácido fenilalanina por tirosina na posição 200, no isotipo 1 do gene da β -
31 tubulina, em isolados resistentes de *H. contortus* (KWA et al., 1995). Mutações
32 menos frequentes também foram observadas no códon 167 (SILVESTRE e
33 CABARET, 2002), e no códon 198, que codifica alanina em vez de glutamato, em
34 populações de *H. contortus* resistente a BZDs (GHISI et al., 2007), alterando o

1 códon GAA para GCA. Neste contexto, essas mutações nos códons 167, 198 e 200
2 podem ser utilizadas como marcadores para a detecção de resistência em
3 *Haemonchus* sp. (VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009).

4 Almeida et al. (2010) relataram *H. contortus*, oriundo de ovinos do estado de
5 São Paulo/Brasil, com múltipla resistência a BZDs, levamisole, ivermectina,
6 moxidectina e closantel. Em bovinos a situação também é preocupante, estudos
7 comprovam que espécies de *Haemonchus* são resistentes a diversos anti-
8 helmínticos em várias regiões do território nacional (PAIVA et al., 2001; RANGEL et
9 al., 2005; MELLO et al., 2006; SOUTELLO et al., 2007; SOUZA et al., 2008;
10 BORGES et al., 2013; FELIPPELLI et al., 2014).

11 Estudos em rebanhos leiteiros no Brasil (CHARLES e FURLONG, 1996;
12 DELGADO et al., 2009; PEREIRA, 2011), apontam que os anti-helmínticos mais
13 utilizados pelos pecuaristas são os pertencentes à classe das lactonas
14 macrocíclicas (ivermectina, doramectina, abamectina e moxidectina), seguido dos
15 imidazotiazóis (levamisol) e BZDs (albendazol), havendo na literatura, relatados de
16 resistência anti-helmíntica a todos estes produtos, sendo a maioria dos casos de
17 resistência ligados ao grupo químico das lactonas macrocíclicas, em especial a
18 ivermectina (SOUTELLO et al., 2007; SOUZA et al., 2008; CEZAR et al., 2010;
19 BORGES et al., 2013, LOPES et al., 2014; RAMOS et al., 2016).

20 No Brasil, foram realizados estudos de resistência anti-helmíntica aos BZDs
21 em endoparasitas de bovinos (TABELA 4) nos estados de Paraíba (PORCINO,
22 2015); Minas Gerais (BRASIL et al., 2012; NUNES et al., 2013), São Paulo
23 (SOUTELLO et al., 2007; SOUTELLO et al., 2010; NEVES et al., 2014), Santa
24 Catarina (SOUZA et al., 2008), Rio Grande do Sul (RAMOS et al., 2016).

25

1 **Tabela 4.** Estudos de resistência a benzimidazóis e método de detecção utilizado,
 2 em rebanhos de bovinos no Brasil.

Estado	Droga	Método de detecção	Eficácia média	Gênero nematódeo	Fonte
PB	Albendazole e Oxfendazole	FECRT ¹	20,3 e 28,7	<i>Haemonchus</i> , <i>Trichostrongylus</i> , <i>Oesophagostomum</i>	Porcino, 2015
MG	Benzimidazóis	FECRT ¹ e PCR ²	97,5	<i>Haemonchus</i>	Brasil et al., 2012
MG	Albendazole	FECRT ¹ e PCR ²	96,8	<i>Haemonchus</i>	Nunes et al., 2013
SP	Albendazole	FECRT ¹	90,7	<i>Haemonchus</i> , <i>Trichostrongylus</i> , <i>Oesophagostomum</i> , <i>Cooperia</i>	Soutello et al., 2007
SP	Albendazole	FECRT ¹	100	<i>Haemonchus</i> , <i>Oesophagostomum</i> , <i>Cooperia</i>	Soutello et al., 2010
SP	Albendazole	FECRT ¹	95,4	<i>Haemonchus</i> , <i>Trichostrongylus</i> , <i>Oesophagostomum</i> , <i>Cooperia</i>	Neves, et al., 2014
SC	Albendazole	FECRT ¹	92,1	<i>Cooperia</i>	Souza et al., 2008
RS	Albendazole 15%	FECRT ¹	39,36	<i>Haemonchus</i> , <i>Cooperia</i>	Ramos et al., 2016
RS	Fenbendazole 10%	FECRT ¹	86,54	<i>Haemonchus</i> , <i>Cooperia</i>	Ramos et al., 2016

3 ¹Método fenotípico de detecção de resistência; ²Método molecular qualitativo de detecção de
 4 resistência.

5 Adaptado de Jaeger e Carvalho-Costa, 2017.

6

7 Como apresentado, em alguns estudos realizados em rebanhos bovinos no
 8 Brasil (TABELA 4), BZDs ainda apresentam eficácia superior a 95%, sendo eficazes
 9 no controle de *Haemonchus* spp. (SOUTELLO et al., 2010; BRASIL et al., 2012;
 10 NUNES et al., 2013; NEVES et al., 2014), salientando a importância do
 11 monitoramento dos BZDs para controle da eficácia dos tratamentos.

12 Dada a importância do quadro da resistência anti-helmíntica e diante do
 13 cenário atual na produção e exportação brasileira de carne bovina, estudos que
 14 detectem e quantifiquem a frequência gênica de resistência à anti-helmínticos nos
 15 rebanhos estão cada vez mais sendo avaliados e aplicados, e são fundamentais
 16 para estabelecimento de um diagnóstico precoce da resistência em populações de
 17 parasitas, para aplicação de estratégias eficazes de controle através da utilização de
 18 princípios ativos que ainda apresentam eficácia, sendo ainda notável a carência de
 19 estudos com metodologias sensíveis no país e com maior amplitude de territórios.

20

REFERÊNCIAS

- 1
- 2 ACHI, Y.L.; ZINSSTAG, J.; YAO, K.; YEO, N.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. Host
3 specificity of *Haemonchus* spp. for domestic ruminants in the savanna in northern
4 Ivory Coast. **Veterinary Parasitology**, v.116, p.151-158, 2003.
- 5 ALMEIDA, F.A.; GARCIA K.C.; TORGERSON P.R.; AMARANTE, A.F. Multiple
6 resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus*
7 *colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v.59, n.4, p.622-625,
8 2010.
- 9 AMARANTE, A.F.T. Why is it important to correctly identify *Haemonchus* species?
10 **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.20, n.4, p.263-268,
11 2011.
- 12 AMARANTE, A.F.T. Sustainable control of parasitic gastroenteritis in ruminants.
13 Workshop in Internationalisation in Veterinary Sciences: perspectives for research
14 between UNESP and the University of Glasgow, Scotland, UK, **Veterinária e**
15 **Zootecnia**, p.33-35, 2016.
- 16 AMARANTE, A.F.T.; BAGNOLA, J.; AMARANTE, M.R.V.; BARBOSA, M.A. Host
17 specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil. **Veterinary**
18 **Parasitology**, Amsterdam, v.73, p.89-104, 1997.
- 19 AMARANTE, A.F.T.; PADOVANI, C.R.; BARBOSA, M.A. Contaminação da
20 pastagem por larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais parasitos de
21 bovinos e ovinos em Botucatu-SP. **Revista Brasileira de Parasitologia**
22 **Veterinária**, São Paulo, v.5, n.2, p.65-73, 1996.
- 23 AMARANTE, M.R.V., SANTOS, M.C., BASSETTO, C.C., AMARANTE, A.F.T. PCR
24 primers for straightforward differentiation of *Haemonchus contortus*, *Haemonchus*
25 *placei* and their hybrids. **Journal of Helminthology**, v.91, n.6, p.757-761, 2017.
- 26 ANUALPEC, Anuário da pecuária brasileira, 2016. Disponível em:
27 <http://www.informafnpstore.com.br/anualpec-2016-pr-184-349650.htm>
- 28 BASSETTO, C.C.; SILVA, B.F.; NEWLANDS, G.F.J.; SMITH, W.D.; AMARANTE,
29 A.F.T. Protection of calves against *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus*
30 after immunization with gut membrane proteins from *H. contortus*. **Parasite**
31 **Immunology**, v.33, p.377-381, 2011.
- 32 BERK, Z.; LAURENSEN, Y.C.S.M.; FORBES, A.B.; KYRIAZAKIS, I. Modelling the
33 consequences of targeted selective treatment strategies on performance and
34 emergence of anthelmintic resistance amongst grazing calves. **International**
35 **Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v.6, n.3, p. 258-271, 2016.
- 36 BIANCHIN, I. Controle estratégico de parasitos em bovinos de corte. In:
37 SEMINARIO... Boletim Acrissul, Campo Grande, CNPGC, v.6, n.120, p.6, 1986.
- 38 BIANCHIN, I.; HONER, M.R.; NUNES, S.G.; NASCIMENTO, M.A.; CURVO, J.B.E.;
39 COSTA, F.P. Epidemiologia dos nematódeos gastrintestinais em bovinos de corte

- 1 nos cerrados e o controle estratégico no Brasil. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC,
2 **Circular técnica**, 24, 60p., 1993.
- 3 BIANCHIN, I.; MELO, H.J. Epidemiologia e controle de helmintos gastrintestinais em
4 bovinos de corte nos cerrados. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, Circular
5 técnica, 16, 120p., 1985.
- 6 BISSET, S.A.; KNIGHT, J.S.; BOUCHET, C.L.G. A multiplex PCR-based method to
7 identify strongylid parasite larvae recovered from ovine faecal cultures and/or pasture
8 samples. **Veterinary Parasitology**, v.200, p.117-127, 2014.
- 9 BORBA, M.F.S. Caracterização de espécies de *Haemonchus* Cobb, 1898 adquiridas
10 por cordeiros traçadores em sistemas de pastoreio misto e simples de ovinos e
11 bovinos. **Dissertação (Mestrado)**. Faculdade de Medicina Veterinária,
12 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. 52p, 1988.
- 13 BORGES, F.A.; ALMEIDA, G.D.; HECKLER, R.P.; LEMES, R.T.; ONIZUKA, M.K.V.;
14 BORGES, D.G.L. Anthelmintic resistance impact on tropical beef cattle productivity:
15 effect on weight gain of weaned calves. **Tropical Animal Health Production**, v.45,
16 p.723–727, 2013.
- 17 BORGES, F.A.; SILVEIRA, D.M.; GRAMINHA, E.B.N.; CASTAGNOLLI, K.C.;
18 SOARES, V.E.; NASCIMENTO, A.A.; COSTA, A.J. Fauna helmintológica de bovinos
19 da região de Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**,
20 v.22, p.49-53, 2001.
- 21 BOTT, N.J.; CAMPBELL, B.E.; BEVERIDGE, I.; CHILTON, N.B.; REES, D.; HUNT,
22 P.W.; GASSER, R.B. A combined microscopic-molecular method for the diagnosis of
23 strongylid infections in sheep. **International Journal for Parasitology**, v.39, n.11,
24 p.1277-1287, 2009.
- 25 BRASIL, B.S.A.F., NUNES, R.L., BASTIANETTO, E., DRUMMOND, M.G.,
26 CARVALHO, D.C., LEITE, R.C., MOLENTO, M.B., OLIVEIRA, D.A.A. Genetic
27 diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations
28 isolated from domestic ruminants in Brazil. **International Journal for Parasitology**,
29 v.42, n.5, 469-479, 2012.
- 30 BRESCIANI, K.D.S.; NASCIMENTO, A.A.; COSTA, A.J.; AMARANTE, A.F.T.;
31 PERRI, S.H.V.; LIMA, L.G.F. Frequência e intensidade parasitária de helmintos
32 gastrintestinais em bovinos abatidos em frigorífico da região noroeste do Estado de
33 São Paulo, SP, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, p.93-97, 2001.
- 34 CATTO, J.B.; BARROS, A.T.; COSTA, C.A. Efeito de tratamento anti-helmíntico no
35 ganho de peso de bezerros desmamados, criados em pastagens nativas, no
36 Pantanal Mato-Grossense, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**,
37 São Paulo, v.2, n.2, p.127-132, 1993.
- 38 CATTO, J.B.; BIANCHIN, I.; JUNIOR, R.T. Efeitos da everminação de matrizes e de
39 bezerros lactentes em sistema de produção de bovinos de corte na região de
40 Cerrado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, p.188–194, 2005.

- 1 CATTO, J.B.; UENO, H. Nematodioses gastrintestinais em bezerros zebus no
2 pantanal matogrossense. 1 - prevalência, intensidade de infecção e variação
3 estacional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.16, n.1, p.129-140, 1981.
- 4 CEPEA – Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. ESALQ/USP.
5 2019. Disponível em: [https://www.cepea.esalq.usp.br/br/releases/boi-perspec-2019-
6 apos-exportacao-recorde-em-2018-setor-aposta-em-demanda-interna-em-2019.aspx](https://www.cepea.esalq.usp.br/br/releases/boi-perspec-2019-apos-exportacao-recorde-em-2018-setor-aposta-em-demanda-interna-em-2019.aspx)
- 7 CEZAR, A.S.; BIANCHIN, I. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos
8 ruminantes : atualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.2083-2091, 2008.
- 9 CEZAR A.S.; VOGEL F.S.F.; SANGIONI L.A.; ANTONELLO A.M.; CAMILLO G.;
10 TOSCAN G.; ARAUJO L.O. Ação anti-helmíntica de diferentes formulações de
11 lactonas macrocíclicas em cepas resistentes de nematódeos de bovinos. **Pesquisa
12 Veterinária Brasileira**, v.30, p.523-528, 2010.
- 13 CHARLES, T.P.; FURLONG, J. A survey of dairy cattle worm control practices in
14 Southeast Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 65, n.1-2, p.65-73, 1996.
- 15 CHAUDHRY, U., REDMAN, E.M., ABBAS, M., MUTHUSAMY, R., ASHRAF, K.,
16 GILLEARD, J.S. Genetic evidence for hybridisation between *Haemonchus contortus*
17 and *Haemonchus placei* in natural field populations and its implications for
18 interspecies transmission of anthelmintic resistance. **International Journal for
19 Parasitology**, v.45, n.2-3, p.149-159, 2015.
- 20 COBB, N.A. Extract from MS report on the parasites of stock. **Agricultural Gazette
21 of New South Wales**, v.9, p.296-321, 1898.
- 22 COLES, G.C.; JACKSON, F.; POMROY, W.E.; PRICHARD, R.K.; VON SAMSON-
23 HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M.A.; VERCRUYSSSE, J. The
24 detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance.
25 **Veterinary Parasitology**, v.136, p.167–85, 2006.
- 26 CORTICELLI, B., LAI, M. La diagnosi di tipo d'infestione nella strongilosi
27 gastrointestinale del bovino in Sardegna con le larve infestive. **Veterinaria Italiana**
28 v.15, p.190–213, 1964.
- 29 COSTA, A.L. Helmitos gastrintestinais em bovinos de corte no Acre. Rio. Branco,
30 EMBRAPA-UEPAE Rio Branco, **Comunicado Técnico**, v.32, 3p., 1982.
- 31 DELGADO, F.E.F.; LIMA, W.D.S.; CUNHA, A.P.; BELLO, A.C.P.P.; DOMINGUES,
32 L.N.; WANDERLEY, R.P.B.; LEITE, P.V.B.; LEITE, R.C. Verminoses dos Bovinos:
33 Percepção de Pecuaristas em Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de
34 Parasitologia Veterinária**, v.18, n.3, p.29–33, 2009.
- 35 DEMELER, J.; RAMÜNKE, S.; WOLKEN, S.; IANIELLO, D.; RINALDI, L.; GAHUTU,
36 J.B.; CRINGOLI, G.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; KRÜCKEN, J.
37 Discrimination of gastrointestinal nematode eggs from crude fecal egg preparations
38 by inhibitor-resistant conventional and real-time PCR. **PLoS One**, v.8, e61285, 2013.

- 1 EDMONDS, M.D.; JOHNSON, E.G.; EDMONDS, J.D. Anthelmintic resistance of
2 *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* to macrocyclic lactones in cattle from
3 the western United States. **Veterinary Parasitology**, v.170, n.3-4, p.224–229, 2010.
- 4 EYSKER, M. Gastrointestinal nematode infection in grazing domestic ruminants. **In:**
5 Congresso Internacional de pastagem, fevereiro de 2001, Águas de São Pedro, Cd
6 roon. 14p., 2001.
- 7 FÁVERO, F.C.; BUZZULINI, C.; CRUZ, B.C.; FELIPPELLI, G.; MACIEL, W.G.;
8 SALATTA, B.; TEIXEIRA, W.F.P.; SOARES, V.E.; OLIVEIRA, G.P.; LOPES, W.D.Z.;
9 COSTA, A.J. (a) Experimental infection of calves with *Haemonchus placei* and
10 *Haemonchus contortus*: Assessment of parasitological parameters. **Veterinary**
11 **Parasitology**, v.217, p.25-28, 2016.
- 12 FÁVERO, F.C.; BUZZULINI, C.; CRUZ, B.C.; FELIPPELLI, G.; MACIEL, W.G.;
13 SALATTA, B.; SINISCALCHI, D.; LOPES, W.D.Z.; TEIXEIRA, W.F.P.; SOARES,
14 V.E.; OLIVEIRA, G.P.; COSTA, A.J. (b) Experimental infection of calves with
15 *Haemonchus placei* or *Haemonchus contortus*: Assessment of clinical, hematological
16 and biochemical parameters and histopathological characteristics of abomasums.
17 **Experimental Parasitology**, v.170, p.125-134, 2016.
- 18 FELIPPELLI, G.; LOPES, W.D.Z.; CRUZ, B.C.; TEIXEIRA, W.F.P.; MACIEL, W.G.;
19 FÁVERO, F.C.; BUZZULINI, C.; SAKAMOTO, C.; SOARES, V.E.; GOMES, L.V.C.;
20 OLIVEIRA, G.P.; COSTA, A.J. Nematode resistance to ivermectin (630 and
21 700µg/kg) in cattle from the Southeast and South of Brazil. **Parasitology**
22 **International**, v.63, p.835–840, 2014.
- 23 FORBES, A.B. LongRange™ (eprinomectin 5%) extended-release injection
24 parasiticide and the utility of extended-activity antiparasitics in cattle. **Veterinary**
25 **Parasitology**, v.192, n.4, p.308-312, 2013.
- 26 FORTES, F.S.; MOLENTO, M.B. Resistência anti-helmíntica em nematoides
27 gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico.
28 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.12, p.1391-1402, 2013.
- 29 FURLONG, J.; ABREU, H.G.L.; VERNEQUE, R.S. Parasitoses dos bovinos na
30 região da Zona da Mata de Minas Gerais: I. Comportamento estacional de
31 nematódeos gastrintestinais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.20, p.143-153,
32 1985.
- 33 GASBARRE, L.C.; SMITH, L.L.; HOBERG, E.; PILITT, P.A. Further characterization
34 of a cattle nematode population with demonstrated resistance to current
35 anthelmintics. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.166, p.275-280, 2009.
- 36 GASSER, R.B.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. *Haemonchus contortus* and
37 Haemonchosis - Past, Present and Future Trends. **Advances in Parasitology**.
38 Academic Press; London, UK, v.93, p.1-666, 2016.
- 39 GENNARI, S.M.; BLASQUES, L.S.; RODRIGUES, A.A.R.; CILENTO, M.C.; SOUZA,
40 S.L.P.; FERREIRA, F. Determinação da contagem de ovos de nematódeos no

- 1 período peri-parto em vacas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and**
2 **Animal Science**, São Paulo, v.39, n.1, p.32-37, 2002.
- 3 GENNARI, S.M.; VIEIRA-BRESSAN, M.C.R.; ROGERO, J.R. Pathophysiology of
4 *Haemonchus placei* infection in calves. **Veterinary Parasitology**, v.38, p.163-172,
5 1991.
- 6 GHARAMAH, A.A; RAHMAN, W.A.; SITI AZIZAH, M.N. Morphological variation
7 between isolates of the nematode *Haemonchus contortus* from sheep and goat
8 populations in Malaysia and Yemen. **Journal of Helminthology**, v.88, n.1, p.82-88,
9 2014.
- 10 GHISI, M.; KAMINSKY, R.; MÄSER, P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus*
11 *contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole
12 resistance in nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.313-320, 2007.
- 13 GIBBONS, L.M. Revision of the genus *Haemonchus* COBB, 1898 (Nematoda:
14 Trichostrongylidae). **Systematic Parasitology**, v.1, p.3-24, 1979.
- 15 GIRÃO, E.S.; LEAL, J.A. Verminose em bovinos e seu controle. Teresina, Piauí:
16 EMBRAPA-Meio-Norte, **Comunicado Técnico**, v.96, p.1-5, 1999.
- 17 GIRÃO, E.S.; LEAL, J.A.; GIRAO, R.N.; MEDEIROS, L.P. Verminose bovina.
18 Teresina, Piauí: EMBRAPA-Meio-Norte, **Comunicado Técnico**, v.41, 1999.
- 19 GIRÃO, E.S.; GIRÃO, R.N.; MEDEIROS, L.P. Prevalência, intensidade de infecção e
20 variação estacional de helmintos em bovinos no estado do Piauí. **Pesquisa**
21 **Agropecuária Brasileira**, v.20, n.8, p.889-897, 1999.
- 22 GRAEF, J.; CLAEREBOUT, E.; GELDHOFF, P. Anthelmintic resistance of
23 gastrointestinal cattle nematodes. **Flemish Veterinary Magazine**, v.82, 2013.
- 24 GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.; BARROS, A.T.; ANDREOTTI, R.;
25 CANÇADO, P.H.; LEÓN, A.A.; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. Reassessment of the
26 potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de**
27 **Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, n.2, v.23, 2014.
- 28 HERLICH, H.; PORTER, D.A.; KNIGHT, R.A. A study of *Haemonchus* in cattle and
29 sheep. **American Journal of Veterinary**, Chicago, v.19, p.866- 872, 1958.
- 30 HOBBERG, E.; LICHTENFELS, J.; GIBBONS, L. Phylogeny for species of
31 *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongyloidea): consideration of their evolutionary
32 history and global biogeography among Camelidae and Pecora (Artiodactyla).
33 **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.90, p.1085-1102, 2004.
- 34 IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário. São
35 Paulo, 2016.
- 36 JACQUIET, P.; CABARET, J.; CHEIKH, D.; THIAM, E. Identification of *Haemonchus*
37 species in domestic ruminants based on morphometrics of spicules. **Parasitology**
38 **Research**, Berlin, v.83, p.82–86, 1997.

- 1 JAEGER, L.H.; CARVALHO-COSTA, F.A. Status of benzimidazole resistance in
2 intestinal nematode populations of livestock in Brazil: a systematic review. **BMC**
3 **Veterinary Research**, v.13, p.13-10, 2017.
- 4 KEITH, R.K. The differentiation of the infective larvae of some common nematode.
5 **Australian Veterinary Journal**, v.1, p.223-235, 1953.
- 6 KNIGHT, J.S.; BISSET, S.A. Real-time PCR/DNA melting curve-based assay to
7 identify individual strongylid larvae recovered from ovine faecal cultures. **Veterinary**
8 **Parasitology**, v.214, n.3-4, p.337-341, 2015.
- 9 KÖHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance.
10 **International Journal for Parasitology**, v.31, p.336-345, 2001.
- 11 KRÍZOVÁ-FORSTOVÁ, V.; LAMKA, J.; CVILINK, V.; HANUŠOVÁ, V.; SKÁLOVÁ, L.
12 Factors affecting pharmacokinetics of benzimidazole anthelmintics in food-producing
13 animals: The consequences and potential risks. **Research in Veterinary Science**,
14 v.91, p.333-341, 2011.
- 15 KWA, M.S.G.; VEENSTRA, J.G.; VAN DIJK, M.; ROOS, M.H. β -tubulin genes from
16 the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in
17 *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Molecular Biology**, v.246, p.500-510, 1995.
- 18 LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and
19 mechanism of drug resistance to benzimidazoles. **International Journal for**
20 **Parasitology**, v.18, n.7, p.885-936, 1988.
- 21 LE JAMBRE, L.F. Hybridization studies of *Haemonchus contortus* (RUDOLPHI,
22 1803) and *H. placei* (PLACE, 1893) (Nematoda: Trichostrongylidae). **International**
23 **Journal for Parasitology**, v.9, p.455-463, 1979.
- 24 LICHTENFELS, J.R.; PILITT, P.A.; HOBERG, E.P. New morphological characters for
25 identifying individual specimens of *Haemonchus* sp. (Nematoda:
26 Trichostrongyloidea) and a key to species in ruminants of North America. **The**
27 **Journal of Parasitology**, v.80, n.1, p.107-119, 1994.
- 28 LICHTENFELS, J.R.; PILITT, P.A.; LE JAMBRE, L.F. Cuticular ridge patterns of
29 *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* (Nematoda: Trichostrongyloidea).
30 **Proceedings of Helminthological Society Washington**, v.53, p.94-101, 1986.
- 31 LIMA, W.S. Dinâmica das populações de parasitos gastrintestinais em bovinos de
32 corte, alguns aspectos da relação parasito-hospedeiro e do comportamento dos
33 estádios de vida livre na região do vale do Rio Doce, MG. Brasil. **Tese**, Belo
34 Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 178p, 1989.
- 35 LOPES, W.D.Z.; TEIXEIRA, W.F.P.; FELIPPELLI, G.; CRUZ, B.C.; MACIEL, W.G.;
36 SOARES, V.E.; SANTOS, T.R.; MATOS, L.V.S.; FÁVERO, F.C.; COSTA, A.J.
37 Assessing resistance of ivermectin and moxidectin against nematodes in cattle
38 naturally infected using three different methodologies. **Research in Veterinary**
39 **Science**, v.96, p.133-138, 2014.

- 1 MELLO, M.H.A.; DEPNER, R.A; MOLENTO, M.B.; FERREIRA, J.J. Resistência
2 lateral às macrolactonas em nematodas de bovinos. **Archives of Veterinary**
3 **Science**, v.11, n.1, p.8-12, 2006.
- 4 NARI-HENRIOUD, A. Towards sustainable parasite control practices in livestock
5 production with emphasis in Latin America. **Veterinary Parasitology**, v.180, n.1-2,
6 p.2-11, 2011.
- 7 NEVES, J.H.D.; CARVALHO, N.; RINALDI, L.; CRINGOLI, G.; AMARANTE, A.F.T.
8 Diagnosis of anthelmintic resistance in cattle in Brazil: a comparison of different
9 methodologies. **Veterinary Parasitology**, v.206, p.216-226, 2014.
- 10 NUNES, R.L.; SANTOS, L.L.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, D.A.A.; BRASIL,
11 B.S.A.F. Frequency of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*
12 populations isolated from buffalo, goat and sheep herds. **Revista Brasileira de**
13 **Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.22, n.4, p.548-553, 2013.
- 14 OLIVEIRA, M.C.; ALENCAR, M.M.; CHAGAS, A.C.; GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, H.N.
15 Gastrointestinal nematode infection in beef cattle of different genetic groups in Brazil.
16 **Veterinary Parasitology**, v.166, n.3-4, p.249-254, 2009.
- 17 O'SHAUGHNESSY J.; EARLEY B.; MEE J.F.; DOHERTY M.L.; CROSSON P.;
18 BARRETT D.; PRENDIVILLE R.; MACRELLI M.; WAAL T. Detection of anthelmintic
19 resistance on two Irish beef research farms. **Veterinary Record**, v.175, p.120–121,
20 2014.
- 21 PAIVA, F.; SATO, M.O.; ACUÑA, A.H.; JENSEN, J.R.; BRESSAN, M.C.R.V.
22 Resistência a ivermectina constatada em *Haemonchus placei* e *Cooperia punctata*
23 em bovinos. **Hora Veterinária**, v.120, p.29-34, 2001.
- 24 PAPADOPOULOS, E. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Small**
25 **Ruminant Research**, v.76, p.99-103, 2008.
- 26 PEREIRA, J.R. Práticas de controle e prevalência de helmintos gastrintestinais
27 parasitos de bovinos leiteiros em Pindamonhangaba, São Paulo, Brasil. **Revista de**
28 **Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.10, n.1, p.16-22, 2011.
- 29 PLACE, F.E. Anaemic diarrhoea in young cattle. **Veterinary Record**, v.5, p.589,
30 1893.
- 31 PORCINO, O.D.R. Estudo da resistência parasitária em bovinos (*Bos indicus*) da
32 raça Sindi aos benzimidazóis no município de Patos, Paraíba. **Trabalho de**
33 **conclusão de curso (Medicina Veterinária)**, Universidade Federal de Campina
34 Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos/PB, 24p., 2015.
- 35 PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population
36 structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p.945-959, 2000.
- 37 RAMOS, F.; PORTELLA, L.P.; RODRIGUES, F.S.; REGINATO, C.Z.; PÖTTER, L.;
38 CEZAR, A.S.; SANGIONI, L.A.; VOGEL, F.S.F. Anthelmintic resistance in
39 gastrointestinal nematodes of beef cattle in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

- 1 **International Journal for Parasitology: Drugs and Drugs Resistance**, v.6, p.93-
2 101, 2016.
- 3 RANGEL, V.B.; LEITE, R.C.; OLIVEIRA, P.R.; SANTOS J.R., E.J. Resistência de
4 *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp. as avermectinas em bovinos de corte. **Arquivo**
5 **Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.186-190, 2005.
- 6 RAVINET, N.; CHARTIER, C.; BAREILLE, N.; LEHEBEL, A.; PONNAU, A.;
7 BRISSEAU, N.; CHAUVIN, A. Unexpected Decrease in Milk Production after
8 Fenbendazole Treatment of Dairy Cows during Early Grazing Season. **PloS One**,
9 v.11, n.1, p.95- 109, 2016.
- 10 ROBERTS, F.H.S.; BREMMER, K.C. The susceptibility of cattle to natural infestation
11 of nematode *Haemonchus contortus* (Rudolphi) Cobb 1898. **Australian Veterinary**
12 **Journal**, Brunswick, v.31, p.133-134, 1955.
- 13 ROBERTS, F.H.S.; O´SULLIVAN, P.J. Methods for egg counts and larvas cultures
14 for strongyles infecting tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**,
15 Victoria, v.1, p.99-192, 1950.
- 16 ROEBER, F.; JEX, A.R.; CAMPBELL, A.JD.; NIELSEN, R.; ANDERSON, G.A.;
17 STANLEY, K.K.; GASSER, R.B. Establishment of a robotic, high-throughput platform
18 for the specific diagnosis of gastrointestinal nematode infections in sheep.
19 **International Journal for Parasitology**, v.42, n.13-14, p.1151-1158, 2012.
- 20 ROSE, H.; RINALDI, L.; BOSCO, A.; MAVROT, F.; WAAL, T.; SKUCE, P.;
21 CHARLIER, J.; TORGERSON, P.R.; HERTZBERG, H.; HENDRICKX, G.;
22 VERCRUYSSSE, J.; MORGAN, E.R. Widespread anthelmintic resistance in European
23 farmed ruminants: a systematic review. **Veterinary Record**, v.176, n.21, p.546,
24 2015.
- 25 RUDOLPHI, C.A. Neue beobachtungen über die eingeweidewürmer. **Archiv für**
26 **Zoologie und Zootomie**, v.3, p.1-32, 1803.
- 27 SANTANA, J.C.R.; BARBOSA, S.J.; BATISTA NETO, R.; LUZ, E.A.T. Ocorrência e
28 variação estacional de helmintos parasitos de bovinos na região de Itaju do Colônia.
29 Agrossistema pastoral de Itapetinga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.24, n.10,
30 p.1235-1240, 1989.
- 31 SANTIAGO, M.A.M. *Haemonchus* Cobb, 1898 (Nematoda: Trichostrongyloidea)
32 contribuição ao estudo da morfologia, biologia e distribuição geográfica das espécies
33 parasitas de ovinos e bovinos, no Rio Grande do Sul. **Tese (Livre-Docência)**,
34 Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1968.
- 35 SANTOS, M.C.; AMARANTE, M.R.V.; SILVA, M.R.L.; AMARANTE, A.F.T.
36 Differentiation of *Haemonchus placei* from *Haemonchus contortus* by PCR and by
37 morphometrics of adult parasites and third stage larvae. **Brazilian Journal of**
38 **Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v.23, n.4, p.495-500, 2014.
- 39 SANTOS, T.R.; LOPES, W.D.Z.; BUZULINI, C.; BORGES, F.A.; SAKAMOTO,
40 C.A.M.; LIMA, R.C.A.; OLIVEIRA, G.P.; COSTA, A.J. Helminth fauna of bovines from

- 1 the Central Western, Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v.40, n.4, p.934-938,
2 2010.
- 3 SILVA, J.B.; SOARES, J.P.G.; FONSECA, A.H. Avaliação da carga parasitária de
4 helmintos e protozoários em bezerros manejados em sistema orgânico. **Semina:
5 Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, n.3, p.1103-1112, 2012.
- 6 SILVESTRE, A.; CABARET, J. Mutation in position 167 of isotype 1 β -tubulin gene of
7 Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? **Molecular &
8 Biochemical Parasitology**, v.120, p.297-300, 2002.
- 9 SOUTELLO, R.V.; COELHO, W.M.; OLIVEIRA, F.P.; FONZAR, J.F.; LUGUETTI,
10 B.C.; SOUZA, R.F.; SENO, M.C.; AMARANTE, A.F. Evaluation of reduction in eggs
11 hedding of gastrointestinal nematodes in cattle following administration of
12 anthelmintics. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.3, p.183-
13 185, 2010.
- 14 SOUTELLO, R.V.G.; CONDI, G.K.; PAES, F.; FONZAR, J.F. Influência do
15 parasitismo e da suplementação protéica no desenvolvimento ponderal de novilhos
16 mestiços Angus-Nelore e da raça Guzerá. **Ciências Agrárias e da Saúde**, v.2,
17 p.21–27, 2002.
- 18 SOUTELLO, R.G.V.; SENO, M.C.Z., AMARANTE, A.F.T. Anthelmintic resistance in
19 cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. **Veterinary
20 Parasitology**, v.148, p.360-364, 2007.
- 21 SOUZA, A.P.; RAMOS, C.I.; BELLATO, V.; SARTOR, A.P.; SCHELBAUER, C.A.
22 Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto
23 Catarinense. **Ciência Rural**, v.38, p.1363–1367, 2008.
- 24 SOUZA, M.F. Recuperação de larvas infectantes, carga parasitária e desempenho
25 de cordeiros terminados em pastagens com distintos hábitos de crescimento. 2013.
26 **Dissertação (Mestrado)** - Faculdade de Agronomia - Universidade Federal do Rio
27 Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 107 p., 2013.
- 28 STEVENSON, L.A.; CHILTON, N.B.; GASSER, R.B. Differentiation of *Haemonchus*
29 *placei* from *H. contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) by the ribosomal DNA
30 second internal transcribed spacer. **International Journal for Parasitology**, v.25,
31 n.4, p.483-488, 1995.
- 32 SUTHERLAND, I.A.; LEATHWICK, D.M. Anthelmintic resistance in nematode
33 parasites of cattle: a global issue?. **Trends in Parasitology**, v.27, p.176-181, 2011.
- 34 TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro:
35 Guanabara Koogan, ed. 3, p.646, 2010.
- 36 TRAVASSOS, L.P. Trichostrongylinae brasileiras. **Brazil-Médico**, v.28, 1914.
- 37 VAN WYK, J.A.; CABARET, J.; MICHAEL, L.M. Morphological identification of
38 nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. **Veterinary Parasitology**,
39 v.119, p.277-306, 2004.

- 1 VIEIRA, L.S.; CAVALCANTE, A.C.R. Resistência anti-helmíntica em rebanhos
2 caprinos no Estado do Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.19, p.99-103,
3 1999.
- 4 VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; HARDER, A.; SCHNIEDER, T. Quantitative
5 analysis of ITS2 sequences in trichostrongyle parasites. **International Journal for**
6 **Parasitology**, v.32, n.12, p.1529-1535, 2002.
- 7 VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; WALSH, T.K.; DONNAN, A.A.; CARRIÈRE,
8 S.; JACKSON, F.; SKUCE, P.J.; ROHN, K.; WOLSTENHOLME, A.J. Molecular
9 detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR
10 and pyrosequencing. **Parasitology**, v.136, p.349-358, 2009.
- 11 ZARLENGA, D.S.; STRINGFELLOW, F.; NOBARY, M.; LICHTENFELS, J.R. Cloning
12 and characterization of Ribosomal RNA genes from three species of *Haemonchus*
13 (Nematoda: Trichostrongyloidea) and identification of PCR primers for rapid
14 differentiation. **Experimental Parasitology**, v.78, p.28-36, 1994.

15

CAPITULO I

A ser submetido à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Distribuição de gêneros dos nematódeos gastrintestinais em bovinos de corte no Brasil

RESUMO

O objetivo desse estudo foi apresentar a prevalência, distribuição de gêneros e riqueza parasitária das infecções por Estrongylídeos em bovinos de corte em todas as regiões brasileiras. Foram coletadas fezes de 100 bovinos por propriedade, em 61 rebanhos, localizadas em Rondônia, Tocantins, Pará, Maranhão, Alagoas, Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, para realização de coproculturas. *Cooperia* apresentou prevalência de 100% nas cinco regiões brasileiras. Na Região Norte, *Haemonchus* sp. apresentou prevalência de 92,3%, e nas demais regiões a prevalência foi 100%. *Oesophagostomum* sp. apresentou prevalência igual/superior a 50% em todas as regiões do país. Nas Regiões Nordeste e Norte, *Trichostrongylus* sp. apresentou prevalência igual/superior a 50%, nas demais regiões não atingiu 17% de prevalência. Em relação à distribuição percentual de gênero, *Cooperia* sp. foi predominante no país, e o gênero *Haemonchus* sp. obteve maior percentual médio (21,4%) na Região Sul, sendo observado maior número de rebanhos (67,2%) com presença de três gêneros de NGIs, seguida pela presença de dois gêneros, *Cooperia* e *Haemonchus*, abrangendo 27,9% das propriedades, destacando a predominância destes gêneros neste estudo. *Cooperia* sp. é o NGI com maior prevalência e intensidade nas coproculturas, seguido de *Haemonchus* sp., sendo estes os gêneros predominantes no país.

Palavras-chave: *Cooperia*; coprocultura; *Haemonchus*; prevalência

INTRODUÇÃO

A bovinocultura é uma importante atividade econômica no Brasil, com um efetivo bovino de 218 milhões de cabeças. Entre 2006 e 2017 foram registrados nove estados com crescimento da população bovina, seis deles pertencentes à Região Norte (IBGE, 2017). Um de seus principais entraves, por retardar o crescimento e desenvolvimento dos animais (Nicolau et al., 2002), diminuir a produção de vacas leiteiras (RAVINET, 2016), causar distúrbios gastrintestinais, (SOUZA, 2013), perdas produtivas, é o parasitismo por nematódeos gastrintestinais (NGIs) e a resistência a anti-helmínticos (BORGES et al., 2013), considerados fatores limitantes na produção (AMARANTE, 2016). As perdas econômicas no país são estimadas em \$ 7,11 bilhões/ano causadas pelas helmintoses gastrintestinais (GRISI et al., 2014).

Para o controle eficaz do parasitismo é necessário o conhecimento de fatores relacionados ao hospedeiro, parasita e ambiente, pois estes podem influenciar a distribuição e a intensidade da infecção parasitária (FURLONG et al., 1985; LIMA, 2000). Neste contexto,

1 estudos epidemiológicos dos parasitas são ferramentas essenciais para a identificação das
2 espécies de helmintos, bem como para avaliar as suas prevalências e o grau de infecção nos
3 animais para assim serem adotadas medidas eficientes de profilaxia e prevenção
4 (AMARANTE, 2011).

5 Estudos anteriores demonstraram que os principais gêneros de NGIs em bovinos no
6 Brasil são *Cooperia* sp., *Haemonchus* sp., *Oesophagostomum* sp., *Ostertagia* sp.,
7 *Trichostrongylus* sp. e *Bunostomum* sp. (GUIMARÃES et al., 2000; BORGES et al., 2001;
8 ARAÚJO & LIMA, 2005; BRICARELLO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; CATTO et
9 al., 2009; SANTOS et al., 2010; COSTA et al., 2011; BORGES et al., 2013; LOPES et al.,
10 2013; FELIPPELLI et al., 2014; NEVES et al., 2014; SAKAMOTO et al., 2014; PACHECO,
11 2015; CEZARO et al., 2016; HECKLER et al., 2016). Porém, a abrangência destes estudos é
12 pontual, limitada a algumas poucas regiões geográficas do país e, Schmidt et al. (2017)
13 mencionam a escassez de informações atualizadas em relação à epidemiologia das
14 helmintoses em bovinos no Brasil, e que em muitas regiões, os estudos são exíguos ou
15 mesmo inexistentes.

16 Embora estudos epidemiológicos sejam fundamentais para a elaboração das estratégias
17 de controle parasitário, há ainda a necessidade de pesquisas recentes, principalmente nos
18 estados de Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul onde estão localizados
19 45,2% dos rebanhos do país, e na Região Norte do país, onde está ocorrendo crescimento do
20 efetivo bovino, principalmente no estado do Pará, com 9,4% do rebanho nacional de bovinos
21 (IBGE, 2016).

22 Nos bovinos criados a campo, há variação na riqueza, intensidade e prevalência de
23 parasitas o que determina os efeitos patológicos causados pelas infecções por NGIs, sofrendo
24 influência, também, da categoria e/ou estado nutricional do hospedeiro (FONSECA, 2006),
25 sendo essas informações essenciais no estabelecimento de um programa de controle das
26 verminoses intestinais (BRESCHIANI et al., 2001).

27 Desta forma, este estudo fornece a prevalência, a distribuição de gêneros e riqueza
28 parasitária das infecções por NGIs em bovinos de corte em todas as regiões geográficas
29 brasileiras.

31 MATERIAL E MÉTODOS

32 Foram colhidas amostras de fezes de bovinos de corte em 61 rebanhos (Tabela 1 e
33 Figura 1), de janeiro a abril, período em que foi registrado na Região Norte do país

1 temperatura média de 26,5°C e pluviosidade média de 270,8 mm, na Região do Nordeste
 2 26,5°C e pluviosidade média de 103,3 mm, no Centro-Oeste a temperatura média foi de
 3 24,8°C e com 200,8 mm de pluviosidade média, no Sudeste foram registradas temperatura
 4 média de 24,3°C e pluviosidade média de 119,3 mm e, no Sul, temperatura média de 21,8°C e
 5 160,1 mm de pluviosidade média (INMET, 2015), sendo o clima caracterizado
 6 predominantemente como tropical e subtropical. As amostras foram colhidas
 7 preferencialmente os estados com maior efetivo bovino brasileiro (IBGE, 2016), sendo as
 8 fazendas selecionadas de acordo com a disponibilidade de animais, e autorização do
 9 pecuarista.

10

11 Tabela 1. Distribuição das fazendas selecionadas, com suas coordenadas, para amostragem
 12 nos estados das regiões do Brasil.

Município	Coordenada
Rondônia	10°26'20"S 62°27'59"O
Tocantins	7°11'27"S 48°12'25"O
Tocantins	11°59'34"S 48°58'15"O
Pará	5°22'08"S 49°07'04"O
Pará	3°12'10"S 52°12'21"O
Pará	3°12'10"S 52°12'21"O
Pará	8°01'44"S 50°01'51"O
Pará	8°01'44"S 50°01'51"O
Maranhão	3°40'01"S 45°22' 48"O
Alagoas	9°39'57"S 35°44'06"O
Mato Grosso	15°19'26"S 57°13'40"O
Mato Grosso	15°13'33"S 59°20'06"O
Mato Grosso	12°32'42"S 55°42'39"O
Mato Grosso	12°32'42"S 55°42'39"O
Mato Grosso	12°32'42"S 55°42'39"O
Mato Grosso	11°22'40"S 58°44'27"O
Mato Grosso	11°22'40"S 58°44'27"O
Goiás	17°52'51"S 51°42'50"O
Goiás	15°83'43"S 48°02'33"O
Mato Grosso do Sul	22°06'32"S 56°31'15"O
Mato Grosso do Sul	19°31'51"S 54°02'38"O
Mato Grosso do Sul	20°14'27"S 56°22'40"O
Mato Grosso do Sul	20°14'27"S 56°22'40"O
Mato Grosso do Sul	21°42'50"S 52°25'19"O
Mato Grosso do Sul	20°28'15"S 55°47'13"O
Mato Grosso do Sul	20°28'53"S 54°36'58"O

Mato Grosso do Sul	20°28'53"S 54°36'58"O
Mato Grosso do Sul	20°22'01"S 51°25'08"O
Minas Gerais	18°58'08"S 49°27'54"O
Minas Gerais	18°50'20"S 50°07'15"O
Minas Gerais	21°41'20"S 43°20'40"O
Minas Gerais	21°41'20"S 43°20'40"O
Minas Gerais	21°41'20"S 43°20'40"O
Minas Gerais	18°50'20"S 50°07'15"O
São Paulo	22°07'33"S 51°23'20"O
São Paulo	22°07'33"S 51°23'20"O
São Paulo	22°18'54"S 49°03'39"O
São Paulo	22°18'54"S 49°03'39"O
São Paulo	22°00'14"S 50°23'06"O
São Paulo	21°15'18"S 48°19'19"O
São Paulo	21°59'56"S 49°27'25"O
São Paulo	22°30'36"S 47°46'40"O
Paraná	25°05'42"S 50°09'43"O
Paraná	23°18'36"S 51°09'46"O
Paraná	25°35'02"S 49°38'09"O
Paraná	23°26'13"S 50°14'52"O
Paraná	22°42'32"S 52°37'01"O
Paraná	25°25'47"S 49°16'19"O
Rio Grande do Sul	30°01'58"S 51°13'48"O
Rio Grande do Sul	29°40'44"S 51°03'10"O
Rio Grande do Sul	29°45'18"S 57°05'16"O
Rio Grande do Sul	29°41'02"S 53°48'25"O
Rio Grande do Sul	29°41'02"S 53°48'25"O
Rio Grande do Sul	28°30'39"S 55°13'40"O
Rio Grande do Sul	30°30'43"S 53°29'27"O
Rio Grande do Sul	30°30'43"S 53°29'27"O



1

2 **Figura 1.** Mapa do Brasil ilustrando a distribuição das fazendas selecionadas para
 3 amostragem nos estados das regiões do Brasil.

4

5 Em cada propriedade foram selecionados aleatoriamente 100 animais, machos, da
 6 categoria recria, sendo incluídos no estudo apenas animais sem nenhum tratamento com anti-
 7 helmíntico nos 90 dias antecedentes a coleta, evitando assim, período residual, por não ter
 8 sido realizada contagem prévia de ovos nas fezes (OPG).

9

10 As fezes foram coletadas individualmente dos animais selecionados, armazenadas em
 11 caixas térmicas com gelo e encaminhadas para o laboratório localizado na Faculdade de
 12 Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, onde as
 13 coproculturas foram realizadas utilizando um pool com 10-15 g de fezes de cada animal
 14 (ROBERTS & O'SULLIVAN, 1950), sendo as amostras de fezes da mesma propriedade
 15 homogêneas e incorporadas à vermiculita.

15

16 As culturas fecais foram mantidas em temperatura ambiente por 10 dias, sendo
 17 observadas periodicamente durante o período, e umidificadas quando necessário (VAN WYK
 et al., 2004). As larvas de terceiro estágio foram então quantificadas e identificadas, com

1 utilização de lugol para facilitar o processo, a nível de gênero de acordo com os critérios
 2 taxonômicos descritos por Van Wyk e Mayhew (2013). Os indicadores de infecção para
 3 prevalência, percentual de gênero e riqueza parasitária, foram calculados segundo Bush et al.
 4 (1997).

6 RESULTADOS

7 Nas coproculturas, foram observadas larvas dos gêneros *Cooperia*, *Haemonchus*,
 8 *Oesophagostomum* e *Trichostrongylus*, em todas as regiões, porém em diferentes proporções.
 9 Em todas as regiões do país, no período do estudo, o gênero *Cooperia* apresentou prevalência
 10 de 100% nos rebanhos avaliados, sendo *Haemonchus* sp. o segundo parasito de maior
 11 prevalência no território brasileiro. *Oesophagostomum* sp. apresentou prevalência igual ou
 12 superior a 50% em todas as regiões do país, exceto na Região Norte. Nas Regiões Nordeste e
 13 Norte, *Trichostrongylus* sp. alcançou prevalência igual e superior a 50%, sendo no sul a
 14 menor prevalência (7,1%) (Tabela 2).

16 **Tabela 2.** Prevalência de estrongilídeos gastrintestinais, classificados genericamente, oriundos
 17 de bovinos de corte no território brasileiro.

Gêneros	Regiões				
	Norte (%)	Nordeste (%)	Centro-Oeste (%)	Sudeste (%)	Sul (%)
<i>Cooperia</i> sp.	100	100	100	100	100
<i>Haemonchus</i> sp.	92,3	100	100	100	100
<i>Oesophagostomum</i> sp.	7,7	50	66,7	71,4	57,1
<i>Trichostrongylus</i> sp.	61,5	50	16,7	14,3	7,1

18
 19 Em relação à distribuição percentual de cada gênero nas coproculturas em cada rebanho,
 20 *Cooperia* sp. apresentou percentual médio de 85,2% na Região Norte, dentre as 13
 21 propriedades avaliadas, e apenas na Região Sul este percentual médio ficou abaixo dos 80%
 22 (Tabela 3), evidenciando que este foi o gênero dominante nas coproculturas de bovinos
 23 naturalmente infectados em diferentes regiões do Brasil. Na Região Sul, foi observado o
 24 maior percentual médio de *Haemonchus* sp. (21,4%), enquanto na Região Norte foi observado
 25 o menor índice (8%). *Trichostrongylus* sp. e *Oesophagostomum* sp. apresentaram baixo
 26 percentual de larvas recuperadas nas coproculturas durante o período avaliado.(Tabela 3).

1 **Tabela 3.** Percentual de gêneros de estrongilídeos gastrintestinais encontrados em
 2 coproculturas de bovinos de corte nas regiões brasileiras.

Município	Larvas de acordo com o gênero (%)			
	<i>Cooperia</i> sp.	<i>Haemonchus</i> sp.	<i>Trichostrongylus</i> sp.	<i>Oesophagostomum</i> sp.
NORTE				
Média	85,2	7,4	7,3	0,2
NORDESTE				
Média	82	15,5	2	0,5
CENTRO-OESTE				
Média	81,1	17	0,4	1,5
SUDESTE				
Média	80,9	16,4	0,3	2,4
SUL				
Média	76,8	21,4	0,1	1,8

3

4 Na Tabela 4 é apresentada a riqueza parasitária encontrada em rebanhos de bovinos de
 5 corte identificada neste estudo, sendo observado maior número de rebanhos (67,2%) com
 6 presença de três gêneros de NGIs, seguida pela presença de dois gêneros, *Cooperia* e
 7 *Haemonchus*, abrangendo 17 (27,9%) das propriedades, destacando a prevalência destes
 8 gêneros neste estudo.

9

10 **Tabela 4.** Riqueza parasitária de helmintos gastrintestinais encontrados em rebanhos de
 11 bovinos de corte no Brasil.

Número de gêneros	Número de rebanhos(%)
1	0
2	17 (27,9%)
3	41 (67,2%)
4	3 (4,9%)

12

13

1 DISCUSSÃO

2 Os principais gêneros de parasitas encontrados foram *Cooperia*, *Haemonchus*,
3 *Oesophagostomum* e *Trichostrongylus*. Esses achados corroboram com os de outros estudos
4 envolvendo resultados de coprocultura em várias regiões brasileiras (LIMA, 1998;
5 GUIMARÃES et al., 2000; NICOLAU et al., 2002; ARAÚJO & LIMA, 2005; BRICARELLO
6 et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; CATTO et al., 2009; COSTA et al., 2011; BORGES et
7 al., 2013; LOPES et al., 2013; NEVES et al., 2014; PACHECO, 2015; CEZARO et al., 2016;
8 HECKLER et al., 2016).

9 As informações apresentadas no Nordeste no território brasileiro, em que foi obtida alta
10 prevalência para os gêneros *Cooperia* sp. e *Haemonchus* sp., reintegram dados apresentados
11 por Girão et al. (1985), em necropsia de bovinos no Piauí, em que observaram prevalência de
12 100% para *C. punctata*, percentuais acima de 90% para *Haemonchus* spp., além de
13 frequências elevadas para *Trichostrongylus* spp. e *Oesophagostomum radiatum*.

14 Os percentuais de gêneros obtidos para a Região Centro-Oeste neste estudo ratificam
15 com estudos no Mato Grosso do Sul por Borges et al. (2015), que obtiveram prevalência de
16 100% para *Cooperia* sp. e *H. placei*, diferindo do encontrado por Heckler et al. (2016), que
17 observaram *Haemonchus* sp. com percentuais médios inferiores a 75%, e percentuais abaixo
18 de 25% e 15% para os gêneros *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp.

19 *Oesophagostomum* sp. é o segundo mais prevalente no estado de São Paulo (LANDIM
20 et al., 2001), e no estado de Mato Grosso do Sul (MELO e RIBEIRO, 1977), sendo neste
21 estudo, o terceiro parasito mais prevalente para as Regiões Sudeste (71,4%), Centro-Oeste
22 (66,7%), Sul (57,1%) e Nordeste (50%), nas propriedades estudadas.

23 Os resultados de prevalência obtidos na Região Sudeste estão de acordo com o
24 apresentado por Cezaro et al. (2016) no estado de São Paulo e Costa et al. (2011) no estado de
25 Minas Gerais, em que observaram maior percentual de distribuição nas coproculturas por
26 *Cooperia* sp., seguido de *Haemonchus* sp, *Oesophagostomum* sp e *Trichostrongylus* sp.

27 Borges et al. (2001) avaliaram no estado de São Paulo a prevalência e intensidade
28 parasitária da fauna helmíntica em bovinos e encontraram em necropsia uma maior
29 intensidade de infecção por *Cooperia* sp. (77,91%) em relação a *Haemonchus* sp. (18,50%), e
30 uma prevalência elevada de *O. radiatum* (73,81%), foi comprovado também, uma baixa
31 infecção e prevalência por *Trichostrongylus* sp., esses dados corroboram com as informações
32 apresentadas neste trabalho para a Região Sudeste.

1 Araújo e Lima (2005) com necropsia de animais traçadores em Minas Gerais durante
2 um ano encontraram que *Cooperia* foi o gênero com maior prevalência e intensidade
3 parasitária no experimento, sendo de fevereiro a maio recuperados maior número de adultos
4 de *Cooperia* sp., seguido de *Haemonchus* spp., e em comparação aos outros meses do ano,
5 *Trichostrongylus* e *Oesophagostomum* tiveram número médio de helmintos recuperados
6 inferior ao restante do ano. Comparando com os resultados das coproculturas de bezerros, os
7 autores relatam que *Cooperia* apresentou aumento gradativo, seguido de *Haemonchus*,
8 enquanto *Oesophagostomum* esteve presente em baixo nível em fevereiro, e larvas de
9 *Trichostrongylus* foram recuperadas em baixo número durante todo o ano, assim podendo ser
10 observado que a prevalência e percentual de helmintos podem estar relacionados aos meses de
11 coleta das fezes adotados, que se deu de janeiro a abril.

12 Em relação à Região Sudeste e Sul, corroborando com os resultados obtidos, Lima
13 (1998) em pesquisa em Minas Gerais e Rossi (2005) no Paraná, apresentaram resultados
14 semelhantes de gêneros mais prevalentes como sendo *Cooperia* sp. e *Haemonchus* sp., e de
15 *Ostertagia*, e *Bunostomum* totalizando menos de 1%, podendo ser uma justificativa da
16 ausência nesta pesquisa.

17 Em experimento no Rio Grande do Sul realizado por Cezar et al. (2010), avaliando ação
18 anti-helmíntica de lactonas macrocíclicas em nematódeos de bovinos, recuperaram nas
19 coproculturas realizadas anteriormente aos tratamentos, maior número de larvas dos gêneros
20 *Cooperia* e *Haemonchus*, seguido de *Trichostrongylus*, com baixa recuperação de larvas de
21 *Ostertagia* e *Oesophagostomum*, diferindo dos resultados encontrados neste, em que o
22 número de larvas recuperadas de *Trichostrongylus* nas coproculturas foi inferior ao de
23 *Oesophagostomum* na Região Sul, além de não ter sido observadas larvas de *Ostertagia* sp.

24 Os resultados apontam o gênero *Cooperia* sp. como predominante no território
25 brasileiro, sendo o parasita responsável por retardar o crescimento e a produtividade dos
26 bovinos, (HERLICH, 1965; ARMOR et al., 1987; ELSENER et al., 2001; STROMBERG et
27 al., 2012) além de seu potencial patogênico, este NGI aparece como altamente resistente a
28 lactonas macrocíclicas (COLES, 2004; POMROY, 2006; GASBARRE et al., 2009;
29 STROMBERG et al., 2012, FELIPPELLI et al., 2014), e ainda sensível à benzimidazóis,
30 sendo importante identificar os NGIs presentes no rebanho, para estabelecer uma estratégia de
31 controle eficiente para o sucesso na pecuária de corte.

32

33

1 **CONCLUSÃO**

2 Em bovinos de corte no Brasil, *Cooperia* sp. apresenta maior prevalência e intensidade
3 nas coproculturas, seguido de *Haemonchus* sp., no período avaliado.

4

5 **AGRADECIMENTOS**

6 Os autores agradecem a Fundect (59/300.407/2015) por conceder a Bolsa de doutorado,
7 ao CNPq (47936/2013-6) por conceder Bolsa de Doutorado Sanduíche e ao Instituto de
8 Parasitologia e Medicina Veterinária Tropical da Universidade Livre de Berlim pela parceria.

9 O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
10 Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

11 A aprovação ética: "Todas as diretrizes internacionais, nacionais e/ou institucionais
12 aplicáveis para o cuidado e uso de animais foram seguidos." (processo nº 760/2016).

1 REFERÊNCIAS

- 2 Amarante AFT. Why is it important to correctly identify *Haemonchus* species? Rev Bras
3 Parasitol Vet 2011; 20(4): 263-268.
- 4 Amarante AFT. Sustainable control of parasitic gastroenteritis in ruminants. [online] Vet
5 Zootec 2016: 33-35. Available from: [fmvz.unesp.br/rvz-](http://fmvz.unesp.br/rvz-old/index.php/rvz/article/download/1253/776)
6 [old/index.php/rvz/article/download/1253/776](http://fmvz.unesp.br/rvz-old/index.php/rvz/article/download/1253/776)
- 7 Araújo RN, Lima WS. Infecções helmínticas em um rebanho leiteiro na região Campos das
8 Vertentes de Minas Gerais. Arq Bras Med Vet Zootec 2005; supl.2, 57: 186-193.
- 9 Armour J, Bairden K, Holmes PH, Parkins JJ, Ploeger H, Salman SK, McWilliam PN,
10 Pathophysiological and parasitological studies on *Cooperia oncophora* infections in calves.
11 Res Vet Sci 1987; 42(3): 373–381.
- 12 Borges FA, Almeida GD, Heckler RP, Lemes RT, Onizuka MKV, Borges DGL. Anthelmintic
13 resistance impact on tropical beef cattle productivity: effect on weight gain of weaned calves.
14 Trop Anim Health Prod 2013; 45: 723–727.
- 15 Borges FA, Borges DGL, Heckler RP, Neves JPL, Lopes FG, Onizuka MKV. Multispecies
16 resistance of cattle gastrointestinal nematodes to long-acting avermectin formulations in Mato
17 Grosso do Sul. Vet Parasitol 2015; 212: 299-302.
- 18 Borges FA, Silveira DM, Graminha EBN, Castagnolli KC, Soares VE, Nascimento AA, et al.
19 Fauna helmintológica de bovinos da região de Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil.
20 Semina: Ciênc Agrár 2001; 22: 49-53.
- 21 Bresciani KDS, Nascimento AA, Costa AJ, Amarante AFT, Perri SHV, Lima LGF.
22 Frequência e intensidade parasitária de helmintos gastrintestinais em bovinos abatidos em
23 frigorífico da região noroeste do Estado de São Paulo, SP, Brasil. Semina: Ciênc Agrár 2001;
24 22: 93-97.
- 25 Bricarello PA, Zaros LG, Coutinho LL, Rocha RA, Kooyman FNJ, Vries E, et al. Field study
26 on nematode resistance in Nelore-breed cattle. Vet Parasitol 2007; 148: 272-278.
- 27 Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. Parasitology meets ecology on its own terms:
28 Margolis et al. revisited. J Parasitol 1997; 83(4): 575-583.
- 29 Catto JB, Bianchin I, Santurio JM, Feijó GLD, Kichel AN, Silva JM. Sistema de pastejo,
30 rotenona e controle de parasitas: efeito sobre o ganho de peso e níveis de parasitismo em
31 bovinos cruzados. Rev Bras Parasitol Vet 2009; 18(4): 37-43.

- 1 Cezar AS, Vogel FSF, Sangioni LA, Antonello AM, Camillo G, Toscan G, et al. Ação anti-
2 helmíntica de diferentes formulações de lactonas macrocíclicas em cepas resistentes de
3 nematódeos de bovinos. *Pesqui Vet Bras* 2010; 30: 523-528.
- 4 Cezaro MC, Tvarijonaviciute A, Tecles F, Céron JJ, Eckersall DP, Ferreira JCP, et al.
5 Changes in biochemical analytes in calves infected by nematode parasites in field conditions.
6 *Vet Parasitol* 2016; 219: 1-6.
- 7 Costa MSVLF, Araújo RN, Costa AJLF, Simões RF, Lima WS. Anthelmintic resistance in a
8 dairy cattle farm in the State of Minas Gerais. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20(2): 115-120.
- 9 Coles GC. Resistance in cattle worms. *Vet Rec* 2004; 155(10): 312.
- 10 Elsener J, Villeneuve A, DesCoteaux L. Evaluation of a strategic deworming program in dairy
11 heifers in Quebec based on the use of moxidectin, an endectocide with long persistency. *Can*
12 *Vet J* 2001; 42: 38-44.
- 13 Felippelli G, Lopes WZ, Cruz BC, Teixeira WFP, Maciel WG, Fávero FC, et al. Nematode
14 resistance to ivermectin (630 and 700µg/kg) in cattle from the Southeast and South of Brazil.
15 *Parasitol Int* 2014; 63: 835-840.
- 16 Fonseca AH. Helmintoses gastro-intestinais dos ruminantes. Material didático: Universidade
17 Federal Rural do Rio de Janeiro [online]. 2006. Available from:
18 [http://www.adivaldofonseca.vet.br/Helmintoses/Ruminantes/Helmintoses%20gastrintestinais](http://www.adivaldofonseca.vet.br/Helmintoses/Ruminantes/Helmintoses%20gastrintestinais%20dos%20ruminantes.pdf)
19 [%20dos%20ruminantes.pdf](http://www.adivaldofonseca.vet.br/Helmintoses/Ruminantes/Helmintoses%20gastrintestinais%20dos%20ruminantes.pdf)
- 20 Furlong J, Abreu HGL, Verneque RS. Parasitoses dos bovinos na região da Zona da Mata de
21 Minas Gerais I. Comportamento estacional de nematódeos gastrintestinais. *Pesq Agropec Bras*
22 1985; 20(1): 143-153.
- 23 Gasbarre LC. The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of
24 anthelmintics in a commercial cattle population in the US. Faculty Publications from the
25 Harold W. Manter Laboratory of Parasitology, 2009; 625.
- 26 Girão ES, Girão RN, Medeiros LP. Prevalência, intensidade de infecção e variação estacional
27 de helmintos em bovinos no estado do Piauí. *Pesq Agropec Bras* 1985; 20(8): 889-897.
- 28 Grisi L, Leite RC, Martins JR, Barros AT, Andreotti R, Cançado PH, et al. Reassessment of
29 the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2014;
30 23(2):150-156.
- 31 Guimarães MP, Ribeiro MFB, Facuri-Filho EJ, Lima WS. Strategic control of gastrointestinal
32 nematodes in dairy calves in florestal, Minas Gerais, Brazil. *Vet Res Commun* 2000; 24(1):
33 31-38.

- 1 Heckler RP, Borges DG, Vieira MC, Conde MH, Green M, Amorim ML, et al. New approach
2 for the strategic control of gastrointestinal nematodes in grazed beef cattle during the growing
3 phase in central Brazil. *Vet parasitol* 2016; 221: 123-129.
- 4 Herlich H. The effects of the intestinal worms *Cooperia pectinata* and *Cooperia oncophora*
5 on experimentally infected calves. *Am J Vet Res* 1965; 26: 1032-1036.
- 6 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário (IBGE) - São Paulo
7 [online]. 2017. Available from: [https://www.ibge.gov.br/estatisticas-](https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-%20agropecuario.html?=&t=resultados)
8 [novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-](https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-%20agropecuario.html?=&t=resultados)
9 [%20agropecuario.html?=&t=resultados](https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-%20agropecuario.html?=&t=resultados)
- 10 Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) [online] 2016 - Informações Técnicas.
11 Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/>
- 12 Landim VJC, Costa AJ, Costa GHN, Rocha UF, Barbosa OF, Moraes FR. Parasitic nematodes
13 in weaned calves from the northeast region of São Paulo state, Brazil. *Ars Vet* 2001; 17(1):
14 42-50.
- 15 Lima, WS. Seasonal infection pattern of gastrointestinal nematodes of beef cattle in Minas
16 Gerais state-Brazil. *Vet Parasitol* 1998; 74(2-4): 203-214.
- 17 Lima WS. Controle das helmintoses dos bovinos. In: Bressan M. Práticas de manejo sanitário
18 em bovinos de leite. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite; 2000, p.65.
- 19 Lopes WDZ, Santos TR, Sakamoto CAM, Lima RCA, Valarelli RL, Paiva P, et al. Persistent
20 efficacy of 3.5% doramectin compared to 3.15% ivermectin against gastrointestinal
21 nematodes in experimentally-infected cattle in Brazil. *Res Vet Sci* 2013; 94: 290-294.
- 22 Melo HJH, Ribeiro HS. Helmintos parasitas dos animais domésticos no Estado do Mato
23 Grosso. *Arq Bras Med Vet Zootec* 1977; 29(2): 161-164.
- 24 Neves JHD, Carvalho N, Rinaldi L, Cringoli G, Amarante AFT. Diagnosis of anthelmintic
25 resistance in cattle in Brazil: a comparison of different methodologies. *Vet Parasitol* 2014;
26 206: 216-226.
- 27 Nicolau CVJ, Amarante AFT, Rocha GP, Godoy WAC. Relação entre desempenho e
28 infecções por nematódeos gastrintestinais em bovinos Nelore em crescimento. *Arq Bras Med*
29 *Vet Zootec* [online]. 2002; 54(4). Available from:
30 http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352002000400004
- 31 Oliveira MC, Alencar MM, Chagas AC, Giglioti R, Oliveira HN. Gastrointestinal nematode
32 infection in beef cattle of different genetic groups in Brazil. *Vet Parasitol* 2009; 166(3-4):
33 249-54.

- 1 Pacheco TM. Avaliação do desempenho e características relacionadas ao grau de infecção por
2 helmintos de bovinos da raça nelore [Dissertação]. Dracena: Universidade Estadual Paulista.
3 Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena; 2015.
- 4 Pomroy WE. Anthelmintic resistance in New Zealand: a perspective on recent findings and
5 options for the future. *N Z Vet J* 2006; 54(6): 265–270.
- 6 Ravinet N, Chartier C, Bareille N, Lehebel A, Ponnau A, Brisseau N, et al. Unexpected
7 Decrease in Milk Production after Fenbendazole Treatment of Dairy Cows during Early
8 Grazing Season. *PloS One* 2016; 11(1): 95-109.
- 9 Roberts FHS, O’Sullivan PJ. Methods for egg counts and larvae cultures for strongyles
10 infecting tract of cattle. *Aust J Agric Res* 1950; 1: 99-192.
- 11 Rossi E. Comportamento populacional de helmintos gastrintestinais em bovinos de corte na
12 região norte do estado do Paraná [Dissertação]. Paraná: Universidade Estadual de Londrina;
13 2005.
- 14 Sakamoto CAM, Lopes WDZ, Buzzulini C, Cruz BC, Felippelli G, Teixeira WF, et al.
15 Evaluation of clinical safety and anthelmintic efficacy of aurixazole administered orally at 24
16 mg/kg in cattle. *Res Vet Sci* 2014; 96: 493-500.
- 17 Santos TR, Lopes WDZ, Buzulini C, Borges FA, Sakamoto CAM, Lima RCA, et al. Helminth
18 fauna of bovines from the Central Western, Minas Gerais, Brazil. *Cienc Rural* 2010; 40(4):
19 934-938.
- 20 Schmidt EMS, Cezaro MC, Oliveira RM, Providelo GA, Aristizabal VH, Garcia HDM, et al.
21 Epidemiologia dos endoparasitas em bovinos: Uma visão do Brasil e do mundo. *Vet Zootec*
22 2017; 24(4): 662-679.
- 23 Souza MF. Recuperação de larvas infectantes, carga parasitária e desempenho de cordeiros
24 terminados em pastagens com distintos hábitos de crescimento. Dissertação (Mestrado) -
25 Faculdade de Agronomia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul,
26 107p., 2013.
- 27 Stromberg BE, Gasbarre LC, Waite A, Bechtol DT, Brown MS, Robinson NA, et al. *Cooperia*
28 *punctata*: effect on cattle productivity?. *Vet Parasitol* 2012; 183: 284-291. Disponível em:
29 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21821358>>.
- 30 Van Wyk JA, Cabaret J, Michael LM. Morphological identification of nematode larvae of
31 small ruminants and cattle simplified. *Vet Parasitol* 2004; 119: 277-306.

- 1 Van Wyk JA, Mayhew E. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae
- 2 of small ruminants and cattle: A practical lab guide. Onderstepoort J Vet Res 2013; 80(1): 1-
- 3 14.
- 4

1 **CAPITULO II**
2 **A ser submetido à Veterinary Parasitology**

3
4
5 ***Haemonchus* sp. em bovinos de corte no Brasil: composição de espécies e**
6 **frequência gênica de resistência a benzimidazóis**

7
8 **Highlights**

- 9 - Há ocorrência de infecções naturais por *H. contortus* em bovinos de corte no Brasil.
10 - A frequência de SNPs (F167Y, E198A e F200Y) associados à resistência aos BZDs
11 no isotipo 1 do gene β -tubulina é baixa em *Haemonchus* spp.
12 - Resistência aos BZDs está em um estágio inicial, mas já disseminada em bovinos de
13 corte no Brasil.

14
15 **Resumo**

16 O objetivo do presente estudo foi determinar a presença de *Haemonchus contortus* e
17 *Haemonchus placei* em bovinos de corte e a frequência de polimorfismos de nucleotídeo
18 único (SNPs) associados à resistência a benzimidazóis (BZDs¹). Para isso, foram coletadas
19 amostras fecais de 61 rebanhos de bovinos de corte em 12 estados brasileiros. Larvas de
20 terceiro estágio foram cultivadas para a identificação morfológica e extração de DNA.
21 Reações em cadeia pela polimerase (PCR) foram realizadas para a análise do isotipo 1 do
22 gene da β -tubulina e os produtos obtidos foram sequenciados para confirmar a presença de *H.*
23 *placei* e *H. contortus*. Para cada população de campo, ensaios de pirosequenciamento
24 quantificando a frequência dos polimorfismos nos códons F167Y, E198A e F200Y no isotipo
25 1 do gene da β -tubulina foram realizados. Os resultados da morfometria de 2.345 larvas
26 revelaram que *H. placei* esteve presente em todas as amostras fecais, enquanto *H. contortus*
27 poderia estar em 20,3% dos rebanhos. Em contrapartida, a análise do isotipo 1 do gene da β -
28 tubulina confirmou 100% de prevalência para *H. placei* e 23,7% para *H. contortus*, o que é
29 um pouco maior do que nos resultados morfológicos. Ensaios de pirosequenciamento
30 demonstraram, pela primeira vez em rebanhos de bovinos do Brasil, SNPs² associados à
31 resistência aos BZDs nos três códons (F167Y, E198A e F200Y) no isotipo 1 do gene da β -

¹ BZDs - Benzimidazóis

² SNPs- Polimorfismos de nucleotídeo único

1 tubulina de populações de campo de *H. placei*. Frequências variando de 15% a 30%, de SNPs
2 associados aos alelos de resistência aos BZDs foram observadas em 11,4% das populações de
3 *Haemonchus* sp.e 57% desses SNPs foram observados mais frequentemente no códon E198A.
4 Este estudo confirma a presença de *H. contortus* nos principais estados produtores de bovinos
5 de corte no Brasil e demonstra o status dos genótipos associados à resistência aos BZDs em
6 populações de *Haemonchus* spp. no campo.

7
8 **Palavras-chave:** *Haemonchus contortus*, *Haemonchus placei*, larvas, pirosequenciamento, β -
9 tubulina

10 11 **1. Introdução**

12
13 *Haemonchus* sp. está entre os mais importantes nematódeos gastrintestinais de
14 ruminantes no Brasil (Amarante et al., 2017), evidenciado por sua alta prevalência e
15 patogenicidade, causando, por exemplo, redução severa na produtividade de bovinos (Borges
16 et al., 2013).

17 A especificidade parasitária de *Haemonchus* spp. em ruminantes domésticos não é
18 absoluta, o que contrasta com o conceito tradicional de que *Haemonchus contortus* (Rudolphi,
19 1803; Cobb, 1898) seja classificado como um parasita de ovinos e caprinos, e *Haemonchus*
20 *placei* (Place, 1893) e *Haemonchus similis* (Travassos, 1914) sejam parasitas de bovinos,
21 sendo esta última espécie de menor prevalência e intensidade (Santos et al., 2010).

22 As espécies de *Haemonchus* possuem características morfológicas distintas que
23 permitem a identificação de adultos ou larvas infectantes; sendo este último um método
24 simples e econômico para classificação de helmintos liberados nas fezes do hospedeiro. O
25 comprimento total médio e o comprimento médio da cauda das larvas infectantes de *H. placei*
26 (784 μ m e 119 μ m, respectivamente) são maiores que as de *H. contortus* (681.7 μ m e 82.55
27 μ m, respectivamente) (Keith, 1953, Santiago, 1968; van Wyk et al., 2004; Santos et al.,
28 2014b).

29 Há relatos de infecções mistas naturais com *H. placei* e *H. contortus* em bovinos
30 criados a pasto em todo o mundo (Roberts e Bremmer, 1955; Santiago, 1968; Borba, 1988;
31 Lichtenfels et al., 1994; Achi et al., 2003; Hoberg et al., 2004; Gasbarre et al., 2009; Chaudhry
32 et al., 2015) e no Brasil (Amarante et al., 1997; Brasil et al., 2012). A adaptação do
33 hospedeiro e patogenicidade foram confirmadas em infecções experimentais em bovinos

1 (Basseto et al., 2011; Fávero et al., 2016ab). Além das infecções mistas, há evidências de
2 campo de hibridização entre estas duas espécies, *H. contortus* e *H. placei*, em pequenos
3 ruminantes, podendo ser uma forma de transmissão de mutações de resistência anti-helmíntica
4 (Chaudhry et al., 2015).

5 *Haemonchus* spp. em bovinos no Brasil são altamente resistentes a lactonas
6 macrocíclicas (Soutello et al., 2007; Souza et al., 2008; Borges et al., 2013; Borges et al.,
7 2015) enquanto o nível de resistência aos benzimidazóis (BZD) ainda é muito baixo (Soutello
8 et al., 2007; Souza et al., 2008, Brasil et al., 2012; Neves et al., 2014). No entanto, a situação
9 da resistência a BZ no Brasil pode estar subestimada, uma vez que estudos anteriores foram
10 baseados em metodologias menos sensíveis de avaliação fenotípica.

11 A identificação de alelos associados à resistência ao BZD no isotipo 1 da β -tubulina no
12 DNA extraído de pools de larvas de nematódeos pode ser realizada usando a técnica
13 qualitativa de PCR convencional ou PCR quantitativo em tempo real ou pirosequenciamento,
14 sendo estas técnicas sensíveis e confiáveis para avaliar a presença (e frequência) de alelos
15 associados à resistência ao BZD em populações de *Haemonchus* spp. no campo (von Samson-
16 Himmelstjerna et al., 2009, Ademola et al., 2015, Redman et al., 2015, Chaudhry et al., 2016).

17 Em comparação com outros anti-helmínticos, os mecanismos de resistência a BZDs
18 são atualmente os mais bem caracterizados com três polimorfismos de nucleotídeo único
19 (SNPs) descrito como responsável pela resistência em nematódeos gastrintestinais (von
20 Samson-Himmelstjerna et al. 2007, Kotze et al., 2014). Estes SNPs levam a modificações
21 estruturais na β -tubulina que diminuem a afinidade aos BZDs (Ghisi et al., 2007). O primeiro
22 SNP identificado ocorre na posição 200 do gene da β -tubulina do isotipo 1 em que os
23 *Haemonchus* suscetíveis são TTC e os resistente são TAC (Kwa et al., 1995). Similarmente,
24 no códon 167, um polimorfismo TTC / TAC (Silvestre e Cabaret, 2002) e no codon 198
25 (Ghisi et al., 2007) um polimorfismo de GAA para GCA foi associado com a resistência ao
26 BZD.

27 O sucesso no controle de *Haemonchus* spp. está diretamente relacionado ao
28 diagnóstico efetivo da etiologia e do status de resistência ao anti-helmíntico (Santos et al.
29 (2014a). Para isto, é essencial quantificar a frequência de SNPs associados à resistência ao
30 BZD no isotipo 1 da β -tubulina de populações de *Haemonchus* spp. em bovinos no Brasil.
31 Isso permite estabelecer um diagnóstico precoce da resistência por meio da aplicação de
32 ferramentas de diagnóstico sensíveis e específicas. Até o momento, há poucas pesquisas
33 extensivas quantificando a frequência de diferentes SNPs associado à resistência aos BZDs no

isotipo 1 da β -tubulina de *Haemonchus* spp. em bovinos. Estudos que identifiquem infecções naturais em bovinos por *Haemonchus* spp. no Brasil contribuem para o conhecimento da etiologia dos nematódeos gastrintestinais e seu impacto na resistência anti-helmíntica. Por isso, pesquisamos a presença de *H. placei* e *H. contortus* em bovinos de corte brasileiros e a frequência de SNPs associados a resistência à BZDs no isotipo 1 da β -tubulina nesses parasitas.

2. Material e métodos

2.1. Populações de campo de *Haemonchus* spp. em bovinos de corte no Brasil

Amostras fecais de bovinos de corte foram coletadas no período de janeiro a abril, em 61 rebanhos localizadas em diferentes regiões do Brasil (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição das fazendas selecionadas, com suas coordenadas, para amostragem nos estados das regiões do Brasil.

Município	Coordenada
Rondônia	10°26'20"S 62°27'59"O
Tocantins	7°11'27"S 48°12'25"O
Tocantins	11°59'34"S 48°58'15"O
Pará	5°22'08"S 49°07'04"O
Pará	3°12'10"S 52°12'21"O
Pará	3°12'10"S 52°12'21"O
Pará	8°01'44"S 50°01'51"O
Pará	8°01'44"S 50°01'51"O
Maranhão	3°40'01"S 45°22' 48"O
Alagoas	9°39'57"S 35°44'06"O
Mato Grosso	15°19'26"S 57°13'40"O
Mato Grosso	15°13'33"S 59°20'06"O
Mato Grosso	12°32'42"S 55°42'39"O
Mato Grosso	12°32'42"S 55°42'39"O
Mato Grosso	12°32'42"S 55°42'39"O
Mato Grosso	11°22'40"S 58°44'27"O
Mato Grosso	11°22'40"S 58°44'27"O
Goiás	17°52'51"S 51°42'50"O
Goiás	15°83'43"S 48°02'33"O
Mato Grosso do Sul	22°06'32"S 56°31'15"O
Mato Grosso do Sul	19°31'51"S 54°02'38"O
Mato Grosso do Sul	20°14'27"S 56°22'40"O
Mato Grosso do Sul	20°14'27"S 56°22'40"O

Mato Grosso do Sul	21°42'50"S 52°25'19"O
Mato Grosso do Sul	20°28'15"S 55°47'13"O
Mato Grosso do Sul	20°28'53"S 54°36'58"O
Mato Grosso do Sul	20°28'53"S 54°36'58"O
Mato Grosso do Sul	20°22'01"S 51°25'08"O
Minas Gerais	18°58'08"S 49°27'54"O
Minas Gerais	18°50'20"S 50°07'15"O
Minas Gerais	21°41'20"S 43°20'40"O
Minas Gerais	21°41'20"S 43°20'40"O
Minas Gerais	21°41'20"S 43°20'40"O
Minas Gerais	18°50'20"S 50°07'15"O
São Paulo	22°07'33"S 51°23'20"O
São Paulo	22°07'33"S 51°23'20"O
São Paulo	22°18'54"S 49°03'39"O
São Paulo	22°18'54"S 49°03'39"O
São Paulo	22°00'14"S 50°23'06"O
São Paulo	21°15'18"S 48°19'19"O
São Paulo	21°59'56"S 49°27'25"O
São Paulo	22°30'36"S 47°46'40"O
Paraná	25°05'42"S 50°09'43"O
Paraná	23°18'36"S 51°09'46"O
Paraná	25°35'02"S 49°38'09"O
Paraná	23°26'13"S 50°14'52"O
Paraná	22°42'32"S 52°37'01"O
Paraná	25°25'47"S 49°16'19"O
Rio Grande do Sul	30°01'58"S 51°13'48"O
Rio Grande do Sul	29°40'44"S 51°03'10"O
Rio Grande do Sul	29°45'18"S 57°05'16"O
Rio Grande do Sul	29°41'02"S 53°48'25"O
Rio Grande do Sul	29°41'02"S 53°48'25"O
Rio Grande do Sul	28°30'39"S 55°13'40"O
Rio Grande do Sul	30°30'43"S 53°29'27"O
Rio Grande do Sul	30°30'43"S 53°29'27"O

1

2 O critério para a seleção das áreas de estudo foi o efetivo bovino brasileiro (IBGE,
3 2016) e dentro de cada estado brasileiro, sendo as fazendas selecionadas seguindo um padrão
4 de 100 animais machos, da categoria recria. Apenas os animais sem tratamento anti-
5 helmíntico nos 90 dias anteriores ao estudo foram incluídos.

6 Amostras fecais foram coletadas individualmente de 100 bezerros em cada rebanho,
7 armazenadas em caixas térmicas contendo gelo e enviadas para o laboratório onde as
8 coproculturas foram realizadas utilizando um pool com 10-15 g de fezes de cada animal
9 (Roberts e O'Sullivan, 1950) mantidas por dez dias. As larvas de terceiro estágio foram então
10 quantificadas, identificadas ao nível de gênero (Keith, 1953) e alíquotas de 1.000 larvas foram
11 armazenadas em formol a 2% para identificação morfológica das espécies de *Haemonchus*

(van Wyk et al., 2004), enquanto o restante das larvas foi lavado em água destilada e armazenados a -20°C para análises moleculares.

2.2. Identificação morfológica de espécies de *Haemonchus*

Como o número de larvas de *Haemonchus* spp. no pool foi menor que 100, todas as larvas obtidas foram mensuradas. As larvas do gênero *Haemonchus* foram identificadas e discriminadas de outros nematódeos de acordo com a distância entre a extremidade posterior da larva e a extremidade da cauda usando ocular micrométrica (Zeiss®) (van Wyk et al., 2004). O critério para identificação morfológica das espécies de *H. placei* foram: um comprimento mínimo de 80 μm (van Wyk et al., 2004) e máximo de 119 μm (Keith, 1953; van Wyk et al., 2004); para *H. contortus* o comprimento mínimo foi 57,15 μm e máximo de 82,55 μm (Santos et al., 2014b); e para *H. similis* o comprimento mínimo foi 56,5 μm e o máximo comprimento foi 58,1 μm (Santiago, 1968).

Como as faixas de comprimento das larvas estavam sobrepostas, a seguinte função foi usada para finalmente identificar as larvas no nível da espécie: $L.I.=SE(CC>82,55;"HP";SE(E(CC\geq 80;CC\leq 82,55);"HPouHC";SE(E(CC>58,1;CC<80);"HC";SE(E(CC\geq 57,15;CC\leq 58,1);"HCouHS";SE(CC<57,15;"HS"))))$), onde: L.I.: larva infectante; CC: Comprimento da cauda (distância entre a extremidade posterior da larva e a extremidade da cauda); HP: *H. placei*; HC: *H. contortus*; HS: *H. similis*; HPouHC: *H. placei* ou *H. contortus*; HCouHS: *H. contortus* ou *H. similis*.

Quando a medida da cauda larval estava no intervalo de sobreposição para *H. placei* e *H. contortus*, entre 80 μm e 82,55 μm , a função destacava como hipótese para uma das duas espécies, ficando sob investigação no estudo do pool armazenado para análise molecular.

2.3. Extração de DNA genômico

Do pool de larvas obtido nas coproculturas em cada rebanho, foi extraído o DNA genômico usando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) de acordo com as instruções do fabricante e armazenado a -20°C até o momento do transporte para Freie Universität Berlin, na Alemanha, em temperatura ambiente durante 24 horas, retornando ao congelamento a -20°C até o processamento.

2.4. Identificação de *Haemonchus contortus* e *Haemonchus placei*

1 Para diagnosticar a presença das espécies de *H. placei* e *H. contortus* nas amostras,
 2 reações de PCR foram usadas para amplificação de 386 pb de fragmento do isotipo 1 do gene
 3 da β -tubulina em *Haemonchus* spp. usando o primer Haem_BetatubulinHRM-For 5'-CTG
 4 GAT CTG GAA TIG GCA CTT-3' e o primer Haem_BetatubulinHRM-Rev 5'-AAG CAG
 5 ATA TCA TAC AGR GCT TCG TT-3'. Cada reação continha 0.2 μ M do primer iniciador e
 6 0.36 μ M de primer reversor e 40 μ g de cada amostra de DNA genômico em 25 μ L 1 \times
 7 GoTaq® qPCR Master Mix (Promega). Depois da desnaturação inicial a 95 °C por 2 min,
 8 ocorreu amplificação durante 45 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, anelamento a 62 °C
 9 por 30 s e extensão a 72 °C por 30 s. Controles positivos e negativos foram incluídos em cada
 10 PCR e os produtos foram evidenciados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

11 Os produtos de PCR foram purificados usando o DNA Clean & ConcentratorTm-5 Kit
 12 (Zymo Research) e submetidos ao sequenciamento Sanger, na direção for, no LGC Genomics
 13 (Berlin, Germany). As sequências de DNA foram comparadas usando BLASTn (Altschul et
 14 al., 1990) e múltiplas sequências foram alinhadas e comparadas usando MUSCLE (Edgar,
 15 2004) com auxílio do programa MEGA version 6 (Tamura et al., 2013).

16

17 **2.5. Ensaios de pirosequenciamento para determinação de frequências alélicas de β -** 18 **tubulina**

19 Para cada amostra de DNA, o isotipo 1 do gene β -tubulina de *Haemonchus* spp. foi
 20 amplificado do DNA genômico por PCR; primer HcPy2PCR-For 5'-GAC GCA TTC ACT
 21 TGG AGG AG-3' usado em conjunto com o primer biotilado HcPy2PCR-Rev 5'-Biotin-
 22 CAT AGG TTG GAT TTG TGA GTT-3' (von Samson-Himmelstjerna et al., 2009). PCR e
 23 pirosequenciamento foram realizados essencialmente como descrito por Ademola et al.
 24 (2015). Após desnaturação inicial a 98 °C por 30 s, 40 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10
 25 s, anelamento a 56 °C por 30 s e uma extensão a 72 °C por 30 s foram conduzidas.
 26 Finalmente, um único passo de alongamento a 72 °C por 5 min. Controles positivos e
 27 negativos foram incluídos em cada PCR e os produtos foram analisados por eletroforese em
 28 gel de agarose a 1,5%.

29 Os produtos dessas PCRs foram submetidos a ensaios de pirosequenciamento para
 30 determinar a frequência gênica dos SNPs. Os ensaios de pirosequenciamento foram realizados
 31 utilizando o PyroMark Q24 MD System (QIAGEN) de acordo com o protocolo do fabricante
 32 e os reagentes de PyroMark Gold Q24 (QIAGEN) com primers sequenciadores HcPyIso1_167
 33 (5'-ATA GAA TTA TGG CTT CGT-3') e HcPyIso1_198_200 (5'-GGT AGA GAA CAC

NORTE							
Pará	9	225	225 (100%)	0	0	0	0
Rondônia	1	47	46 (97,9%)	0	0	1 (2,1%)	0
Tocantins	2	30	30 (100%)	0	0	0	0
NORDESTE							
Maranhão	1	61	61 (100%)	0	0	0	0
Alagoas	1	25	22 (88%)	3 (12%)	0	0	0
CENTRO-OESTE							
Mato Grosso	7	160	156 (97,5%)	2 (1,25%)	0	0	2 (1,25%)
Mato Grosso do Sul	9	376	376 (100%)	0	0	0	0
Goiás	2	116	116 (100%)	0	0	0	0
SUDESTE							
Minas Gerais	5	171	166 (97%)	2 (1,2%)	0	0	3 (1,8%)
São Paulo	8	398	396 (99,5%)	0	0	0	2 (0,5%)
SUL							
Paraná	6	341	310 (90,9%)	14 (4,1%)	0	7 (2%)	10 (3%)
Rio Grande do Sul	8	395	379 (96%)	12 (3%)	0	1 (0,2%)	3 (0,8%)
TOTAL	59	2345	2,283 (97,3%)	33 (1,4%)	0	9 (0,4%)	20 (0,85%)

1

2 A análise morfométrica de 2.283 L3 classificadas como *H. placei* apresentaram um
3 comprimento médio da distância entre a extremidade posterior das larvas e a extremidade da
4 cauda da bainha de 96.78 µm, variando entre 85 e 112.5µm.

5

6 3.2. Identificação molecular das espécies de *Haemonchus*

7 A análise do isotipo 1 do gene β -tubulina de 59 populações confirmou a prevalência de
8 *H. placei* em todas as fazendas avaliadas (100%), enquanto a presença de *H. contortus* foi
9 observada em 14 (23,7%) rebanhos, sendo que, apenas quatro estavam nas mesmas
10 propriedades onde havia larvas com morfometrias compatíveis para esta espécie (Tabela 2).

11

12

1 **Tabela 2.** Espécies de *Haemonchus* identificadas por meio do sequenciamento do DNA
 2 genômico do pool de larvas obtidas em coproculturas de fezes de bovinos de corte em
 3 diferentes regiões do Brasil.

Região/estado	Número de rebanhos	Rebanhos positivos para espécies pesquisadas por sequenciamento	
		<i>H. placei</i>	<i>H. contortus</i>
NORTE			
Pará	10	10 (100%)	5(50%)
Rondônia	1	1 (100%)	1 (100%)
Tocantins	2	2 (100%)	0
NORDESTE			
Maranhão	1	1 (100%)	0
Alagoas	1	1 (100%)	0
CENTRO-OESTE			
Mato Grosso	7	7 (100%)	3 (42,9%)
Mato Grosso do Sul	8	8 (100%)	1 (12,5%)
Goiás	2	2 (100%)	0
SUDESTE			
Minas Gerais	6	6 (100%)	1 (16,7%)
São Paulo	8	8 (100%)	1 (12,5%)
SUL			
Paraná	6	6 (100%)	1 (16,7%)
Rio Grande do Sul	7	7 (100%)	1 (14,3%)
TOTAL	59	59 (100%)	14 (23,7%)

4

5 **3.3. Ensaios de pirosequenciamento para determinação da frequência de alelos de β -** 6 **tubulina**

7 Em alguns rebanhos, foram observadas altas frequências de alelos associados à
 8 resistência aos BZDs no isotipo 1 da β -tubulina em um dos três códons (F167Y, E198A e
 9 F200Y). Nas duas populações com infecção mista por *H. placei* e *H. contortus* (amostra 36 e
 10 54), uma tinha no códon 200 TAC frequência de 17% e a outra no códon 198 GCA frequência
 11 de 19% (Tabela 3). Em três populações resistentes a BZD contendo exclusivamente *H. placei*,
 12 foram observadas frequências no códon 198 GCA entre 15% e 21%, enquanto outras duas
 13 dessas populações apresentaram frequências TAC entre 26-30% no códon 167 e 200,
 14 simultaneamente (Tabela 3).

15

1 **Tabela 3.** Frequências de SNPs de alelos resistentes nos códons F167Y, E198A e F200Y no
 2 isotipo 1 da β -tubulina no pool de larvas de *Haemonchus* spp. de bovinos de corte de
 3 diferentes regiões do Brasil.

Identificação da amostra	HP ou HP/HC	Região/estado	Códon 167	Códon 198	Códon 200
19	HP	NORTE/Pará	1	21	4
25	HP	NORTE/Pará	1	15	5
40	HP	NORTE/Pará	30	6	29
54	HP/HC	NORTE/Pará	2	19	6
16	HP	CENTRO-OESTE/Mato Grosso do Sul	1	17	3
36	HP/HC	SUL/Rio Grande do Sul	10	7	17
39	HP	SUL/Rio Grande do Sul	27	6	26

4 HP: população exclusivamente com *H. placei*. HP/HC: população com ambos *H. placei* e *H.*
 5 *contortus*
 6

7 Dos sete rebanhos com populações de *Haemonchus* sp. resistentes a BZD, apenas duas
 8 apresentaram infecções mistas com *H. contortus* (Tabela 3) e, de acordo com o teste exato de
 9 Fisher, a presença de *H. contortus* em bovinos em uma propriedade não foi um fator de risco
 10 ($p=1,0$) para resistência ao BZD. Além disso, não houve diferença significativa entre as
 11 regiões geográficas (Tabela 4).

12 Baixas frequências de SNPs associados à resistência aos BZDs no isotipo 1 da β -
 13 tubulina foram detectadas em todas as 61 populações avaliadas neste estudo, entretanto,
 14 considerando o critério para frequência de SNPs $\geq 15\%$ para classificação de uma população
 15 como resistente, 7 (11,4%) das 61 populações foram classificadas como resistentes (Tabela 4).
 16

17 **Tabela 4.** Número total de fazendas com populações de *Haemonchus* spp. apresentando SNP
 18 maiores ou iguais (R) ou menores (S) que 15% para os códons F167Y, E198A e F200Y no
 19 isotipo 1 do gene da β -tubulina, de acordo com as regiões geográficas do Brasil.

Região/estado	Número de rebanhos	Códon					
		167		198		200	
		R	S	R	S	R	S
NORTE							
Pará	10	1	9	3	7	1	9
Rondônia	1	0	1	0	1	0	1
Tocantins	2	0	2	0	2	0	2
TOTAL	13	1	12	3	10	1	12
NORDESTE							
Maranhão	1	0	1	0	1	0	1
Alagoas	1	0	1	0	1	0	1
TOTAL	2	0	2	0	2	0	2

CENTRO-OESTE							
Mato Grosso	7	0	7	0	6	0	6
Mato Grosso do Sul	9	0	9	1	8	0	9
Goiás	2	0	2	0	2	0	2
TOTAL	18	0	18	1	16	0	17
SUDESTE							
Minas Gerais	6	0	6	0	5	0	5
São Paulo	8	0	8	0	8	0	8
TOTAL	14	0	14	0	13	0	13
SUL							
Paraná	6	0	6	0	5	0	5
Rio Grande do Sul	8	1	7	0	8	2	6
TOTAL	14	1	13	0	13	2	11
TOTAL	61	2	59	4	54	3	55

1

2 **4. Discussão**

3

4 Este estudo representa um levantamento da ocorrência de *Haemonchus* spp. em
5 bovinos de corte nas regiões do Brasil e também os SNPs associados à resistência à BZD no
6 isotipo 1 da β -tubulina para as espécies. Os achados confirmam a infecção natural de bovinos
7 por *H. contortus*, embora em baixa quantia.

8 O comprimento médio da extensão da cauda da bainha de larvas infectantes de *H.*
9 *placei* neste estudo foi semelhante ao descrito por Santos et al. (2014): 96,66 μ m (intervalo de
10 82,55 a 117,48 μ m) e menor que a média 102 μ m (intervalo de 80 a 119 μ m) descrito por van
11 Wyk et al. (2004).

12 A identificação de espécies de *Haemonchus* spp. por morfometria tradicional baseado
13 em L3, tem vantagem devido à praticidade, rapidez e facilidade de obtenção das amostras,
14 mas é baseado em diferenças sutis (Amarante et al., 2017)., e, portanto, uma limitação
15 importante desta técnica é a sobreposição nas medidas das espécies de *H. placei* e *H.*
16 *contortus* (Corticelli e Lai, 1964; van Wyk et al., 2004; Santos et al., 2014b), como pode-se
17 observar em alguns resultados inconclusivos. O comprimento da extensão da cauda da bainha
18 foi encontrado em 1,4% dos *Haemonchus* spp. , sendo as larvas apenas sugestivas da espécie
19 *H. contortus*, pois essas faixas se enquadram em intervalos já observados por outros autores
20 para a espécie de *H. placei*. (Niec, 1968; Van Wyk et al., 2004; Santos et al., 2014b; Silva,
21 2014).

1 Mesmo sem diagnóstico preciso de *H. contortus* por morfometria, o sequenciamento
2 do produto de PCR do isotipo 1 do gene β -tubulina permitiu a identificação dessa espécie em
3 23,7% dos rebanhos examinados, indicando maior sensibilidade da abordagem molecular para
4 métodos baseados no uso de genes do RNA ribossômico (Zarlenga et al., 1994, Santos et al.,
5 2014). Por outro lado, apenas quatro das doze amostras com suspeita de presença de *H.*
6 *contortus* com base na análise morfométrica foram confirmadas pela análise molecular,
7 indicando também uma maior especificidade. Este resultado confirma que a identificação de
8 espécies é mais preciso com a utilização de análise molecular.

9 Portanto, esses resultados confirmam a ocorrência de infecções naturais por *H.*
10 *contortus* em bovinos no Brasil. Esta infecção ocorreu em quatro das cinco regiões
11 geográficas avaliadas e, apesar de não ter sido considerado um fator de risco para a presença
12 de SNPs associados à resistência aos BZDs no isotipo 1 da β -tubulina neste estudo, pode ser
13 considerado um agravante fator para o aumento da resistência anti-helmíntica em bovinos,
14 considerando a hibridação genética entre espécies de parasitas nematódeos como suposto por
15 Chaudhry et al. (2015), e demonstrado em condição de campo em ovinos no Brasil (Almeida
16 et al., 2018). Outra consequência relevante da infecção por *H. contortus* em bovinos é a
17 patogenicidade, considerando que em bovinos infectados experimentalmente por *H. placei* ou
18 *H. contortus* apesar de alterações clínicas semelhantes, as lesões anatomohistopatológicas
19 foram mais expressivas em animais infectados com *H. contortus* (Fávero et al., 2016b).

20 Os ensaios de pirosequenciamento visando os códons F167Y, E198A e F200Y no
21 isotipo 1 no gene β -tubulina em *Haemonchus* spp. revelaram que a resistência ao BZD está em
22 um estágio inicial, porém já ocorrendo em várias regiões, em bovinos de corte no Brasil. Este
23 foi o primeiro estudo extenso realizado com amostras de todas as regiões geográficas do
24 Brasil e confirma resultados anteriores sobre a eficácia anti-helmíntica da caracterização
25 fenotípica realizada até o momento no Brasil. Estes demonstraram que os BZDs ainda são os
26 fármacos mais eficazes e apenas foram relatados alguns casos de resistência em bovinos.
27 (Soutello et al., 2007; Souza et al., 2008, Brasil et al., 2012; Neves et al., 2014, Ramos et al.,
28 2016). No entanto, o fato de que altas frequências de alelos associados à resistência ao BZD
29 na β -tubulina foram encontradas em 11,4% das populações de *H. placei* neste estudo é
30 preocupante, uma vez que esse resultado é muito maior do que o anteriormente descrito para
31 esta espécie no Brasil, em que observaram no códon F167Y frequência de 2,5% de SNPs
32 associados à resistência (Brasil et al., 2012).

1 Encontramos uma alta frequência ($\geq 15\%$) de SNPs nos três códons (F167Y, E198A e
2 F200Y) observado em algumas populações (11,4%) de *H. placei* ocorrendo em números
3 decrescentes nos respectivos SNPs nos códons E198A, F200Y e F167Y. Este resultado difere
4 daqueles obtidos por Chaudhry et al. (2014), que encontraram polimorfismo apenas no códon
5 P200Y em *H. placei* nos Estados Unidos, bem como do obtido por Brasil et al. (2012) e que
6 encontraram uma população de *H. placei* de bovinos no Brasil, com polimorfismo apenas no
7 F167Y.

8 Como encontrado por outros autores (von Samson- Himmelstjerna et al., 2009;
9 Demeler et al., 2013; Chaudhry et al., 2014; Encalada-Mena et al., 2014; Santos et al., 2014a;
10 Peña-Espinoza et al., 2014; Ademola et al., 2015; Chaudhry et al., 2016; Esteban-Ballesteros
11 et al., 2017), neste estudo também não houve mutações de alelos de resistência ocorrendo
12 simultaneamente nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina.

13 Em conclusão, confirmamos a presença de *H. contortus* por sequenciamento e também
14 que a resistência aos BZDs está em um estágio inicial, mas já está presente em rebanho de
15 bovinos de corte no Brasil, com a presença de resistência aos BZDs no isotipo 1 da β -tubulina
16 associada aos polimorfismos F167Y, E198A e F200Y em *H. placei*.

18 **Agradecimentos**

19 O estudo foi financiado pela Fundect, Brasil (59/300.407/2015), com apoio da
20 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de
21 Financiamento 001e CNPq, Brasil (47936/2013-6) e por meio de fundos internos da Freie
22 Universität Berlin.

24 **Referências**

- 25 Achi, Y.L., Zinsstag, J., Yao, K., Yeo, N., Dorchies, P., Jacquet, P., 2003. Host specificity of
26 *Haemonchus* spp. for domestic ruminants in the savanna in northern Ivory Coast. Vet.
27 Parasitol. 116, 151-158.
- 28 Ademola, I.O., Krücken, J., Ramünke, S., Demeler, J., von Samson-Himmelstjerna, G., 2015.
29 Absence of detectable benzimidazole-resistance associated alleles in *Haemonchus*
30 *placei* in cattle in Nigeria revealed by pyrosequencing of β -tubulin isotype 1. Parasitol.
31 Res. 114, 1997-2001.
- 32 Almeida, F.A., Bassetto, C.C., Amarante, M.R.V., Albuquerque, A.C.A., Starling, R.Z.C.,
33 Amarante, A.F.T.D., 2018. Helminth infections and hybridization between

- 1 *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* in sheep from Santana do Livramento,
2 Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. [Epub ahead of print]
- 3 Altschul, S.F, Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment
4 search tool. J Mol Biol. 215(3), 403-410.
- 5 Amarante, A.F.T., Bagnola, J., Amarante, M.R.V., Barbosa, M.A., 1997. Host specificity of
6 sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil. Vet. Parasitol. 73, 89-104.
- 7 Amarante, M.R.V., Santos, M.C., Bassetto, C.C., Amarante, A.F.T., 2017. PCR primers for
8 straightforward differentiation of *Haemonchus contortus*, *Haemonchus placei* and their
9 hybrids. J. Helminthol. 1-5.
- 10 Bassetto, C.C., Silva, B.F., Newlands, G.F.J., Smith, W.D., Amarante, A.F.T., 2011.
11 Protection of calves against *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* after
12 immunization with gut membrane proteins from *H. contortus*. Parasite Immunol. 33,
13 377-381.
- 14 Borba, M.F.S., 1988. Caracterização de espécies de *Haemonchus* Cobb, 1898 adquiridas por
15 cordeiros traçadores em sistemas de pastoreio misto e simples de ovinos e bovinos.
16 52p, Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade
17 Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- 18 Borges, F.A., Almeida, G.D., Heckler, R.P., Lemes, R.T., Onizuka, M.K.V., Borges, D.G.L.,
19 2013. Anthelmintic resistance impact on tropical beef cattle productivity: effect on
20 weight gain of weaned calves. Trop. Anim. Health Prod. 45, 723–727.
- 21 Borges, F.A., Borges, D.G.L., Heckler, R.P., Neves, J.P.L., Lopes, F.G., Onizuka, M.K.V.,
22 2015. Multispecies resistance of cattle gastrointestinal nematodes to long-acting
23 avermectin formulations in Mato Grosso do Sul. Vet. Parasitol. 212, 299-302.
- 24 Brasil, B.S.A.F., Nunes, R.L., Bastianetto, E., Drummond, M.G., Carvalho, D.C., Leite, R.C.,
25 Molento, M.B., Oliveira, D.A.A., 2012. Genetic diversity patterns of *Haemonchus*
26 *placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in
27 Brazil. Int. J. Parasitol. 42, 469-479.
- 28 Bremner, K.C., 1955. Cytological studies on the specific distinctness of the ovine and bovine
29 strains of the nematode *Haemonchus contortus* (Rudolphi) Cobb (Nematoda:
30 Trichostrongylidae). Aust. J. Zool. 3, 312–323.
- 31 Chaudhry, U., Miller, M., Yazwinski, T., Kaplan, R., Gilleard, J., 2014. The presence of
32 benzimidazole resistance mutations in *Haemonchus placei* from US cattle. Vet.
33 Parasitol. 204, 411-415.

- 1 Chaudhry, U., Redman, E.M., Abbas, M., Muthusamy, R., Ashraf, K., Gilleard, J.S., 2015.
2 Genetic evidence for hybridisation between *Haemonchus contortus* and *Haemonchus*
3 *placei* in natural field populations and its implications for interspecies transmission of
4 anthelmintic resistance. *Int. J. Parasitol.* 45, 149-159.
- 5 Chaudhry, U., Redman, E.M., Ashraf, K., Shabbir, M.Z., Rashid, M.I., Ashraf, S., Gilleard,
6 J.S., 2016. Microsatellite marker analysis of *Haemonchus contortus* populations from
7 Pakistan suggests that frequent benzimidazole drug treatment does not result in a
8 reduction of overall genetic diversity. *Parasites & Vectors.* 9, 349.
- 9 Cobb, N.A., 1898. Extract from MS report on the parasites of stock. *Agric.Gaz. N. S. W.* 9,
10 296-321.
- 11 Corticelli, B., Lai, M., 1964. La diagnosi di tipo d'infestazione nella strongilosi gastrointestinale
12 del bovino in Sardegna con le larve infestive. *Vet. Italiana* 15, 190–213.
- 13 Demeler, J., Ramünke, S., Wolken, S., Ianiello, D., Rinaldi, L., Gahutu, J.B., Cringoli, G., von
14 Samson-Himmelstjerna, G., Krücken, J., 2013. Discrimination of gastrointestinal
15 nematode eggs from crude fecal egg preparations by inhibitor-resistant conventional
16 and real-time PCR. *PLoS One.* 8, e61285.
- 17 Edgar, R.C., 2004. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high
18 throughput. *Nucleic Acids Res.*, 32(5), 1792-1797.
- 19 Encalada-Mena, L., Tuyub-Solis, H., Ramirez-Vargas, G.,Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-
20 Marcelino, L., López-Arellano, M.E., 2014. Phenotypic and genotypic characterisation
21 of *Haemonchus* spp. and other gastrointestinal nematodes resistant to benzimidazole in
22 infected calves from the tropical regions of Campeche State, Mexico. *Vet. Parasitol.*,
23 205, 246-254.
- 24 Esteban-Ballesteros, M., Rojo-Vázquez, F.A., Skuce, P.J., Melville, L., González-Lanza, C.,
25 Martínez-Valladares, M., 2017. Quantification of resistant alleles in the β -tubulin gene
26 of field strains of gastrointestinal nematodes and their relation with the faecal egg
27 count reduction test. *Vet. Res.* 13, 71.
- 28 Fávero, F.C., Buzzulini, C., Cruz, B.C., Felippelli, G., Maciel, W.G., Salatta, B., Teixeira,
29 W.F.P., Soares, V.E., Oliveira, G.P., Lopes, W.D.Z., Costa, A.J., 2016 (a).
30 Experimental infection of calves with *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus*:
31 Assessment of parasitological parameters. *Vet. Parasitol.* 217, 25-28.
- 32 Fávero, F.C., Buzzulini, C., Cruz, B.C., Felippelli, G., Maciel, W.G., Salatta, B., Siniscalchi,
33 D., Lopes, W.D.Z., Teixeira, W.F.P., Soares, V.E., Oliveira, G.P., Costa, A.J., 2016

- 1 (b). Experimental infection of calves with *Haemonchus placei* or *Haemonchus*
2 *contortus*: Assessment of clinical, hematological and biochemical parameters and
3 histopathological characteristics of abomasums. *Exp. Parasitol.* 170, 125-134.
- 4 Fortes, F.S., Molento, M.B., 2013. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais
5 de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. *Pesqui. Vet. Bras.*
6 33, 1391-1402.
- 7 Furtado, L.F.V., Bello, A.C.P.P., Rabelo, E.M.L., 2016. Benzimidazole resistance in
8 helminths: From problem to diagnosis. *Acta Trop.* 162, 95-102.
- 9 Gasbarre, L.C., Smith, L.L., Hoberg, E., Pilitt, P.A., 2009. Further characterization of a cattle
10 nematode population with demonstrated resistance to current anthelmintics. *Vet.*
11 *Parasitol.* 166, 275-280.
- 12 Ghisi, M., Kaminsky, R., Mäser, P., 2007. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus*
13 *contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole
14 resistance in nematodes. *Vet. Parasitol.* 144, 313-320.
- 15 Hoberg, E., Lichtenfels, J., Gibbons, L., 2004. Phylogeny for species of *Haemonchus*
16 (Nematoda: Trichostrongyloidea): consideration of their evolutionary history and
17 global biogeography among Camelidae and Pecora (Artiodactyla). *J. Parasitol.* 90,
18 1085- 1102.
- 19 IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário. São Paulo, 2016.
- 20 Jacquiet, P., Cabaret, J., Thiam, E., Cheikh, D., 1998. Experimental and natural *Haemonchus*
21 spp. cross infections of domestic ruminants in Sahelian West Africa. *Ann. N. Y. Acad.*
22 *Sci.* 849, 465–469.
- 23 Kwa, M.S.G., Veenstra, J.G., Van Dijk, M., Roos, M.H., 1995. β -tubulin genes from the
24 parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis*
25 *elegans*. *J. Mol. Biol.* 246, 500-510.
- 26 Keith, R.K., 1953. The differentiation of the infective larvae of some common nematode.
27 *Aust. Vet. J.* 1, 223-235.
- 28 Kotze, A.C., Hunt, P.W., Skuce, P., von Samson-Himmelstjerna, G., Martin, R.J., Sager, H.,
29 Krücken, J., Hodgkinson, J., Lespine, A., Jex, A.R., Gilleard, J.S., Beech, R.N.,
30 Wolstenholme, A.J., Demeler, J., Robertson, A.P., Charvet, C.L., Neveu, C.,
31 Kaminsky, R., Rufener, L., Alberich, M., Menez, C., Prichard, R.K., 2014. Recent
32 advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of

- 1 anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions. Int J
2 Parasitol. 4(3), 164-184.
- 3 Lichtenfels, J.R., Pilitt, P.A., Hoberg, E.P., 1994. New morphological characters for
4 identifying individual specimens of *Haemonchus* sp. (Nematoda: Trichostrongyloidea)
5 and a key to species in ruminants of North America. J. Parasitol. 80, 107-119.
- 6 Neves, J.H., Carvalho, N., Rinaldi, L., Cringoli, G., Amarante, A.F.T., 2014. Diagnosis of
7 anthelmintic resistance in cattle in Brazil: a comparison of different methodologies.
8 Vet. Parasitol. 206, 216–226.
- 9 Niec, R., 1968. Cultivo e identificación de larvas infectantes de nematodes gastrointestinales
10 del bovino y ovino. INTA – Argentina.
- 11 Nunes, R.L., 2012. Análise genética de isolados do *Haemonchus* sp. de ruminantes
12 domésticos para identificação da resistência ao anti-helmíntico Benzimidazol. Tese,
13 70p. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 14 Nunes, R.L., Santos, L.L., Bastianetto, E., de Oliveira, D.A., Brasil, B.S., 2013. Frequency of
15 benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* populations isolated from buffalo,
16 goat and sheep herds. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 22 (4), 548–553.
- 17 Peña-Espinoza, M., Thamsborg, S.M., Demeler, J., Enemark, H.L., 2014. Field efficacy of
18 four anthelmintics and confirmation of drug-resistant nematodes by controlled efficacy
19 test and pyrosequencing on a sheep and goat farm in Denmark, Vet. Parasitol., 206,
20 208-215.
- 21 Place, F.E., 1893. Anaemic diarrhoea in young cattle. Vet. Rec. 5, 589.
- 22 Ramos, F., Portella, L.P., Rodrigues, F.S., Reginato, C.Z., Pötter, L., Cezar, A.S., Sangioni,
23 L.A., Vogel, F.S.F. 2016. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of beef
24 cattle in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 6(1),
25 93-101.
- 26 Redman, E., Whitelaw, F., Tait, A., Burgess, C., Bartley, Y., Skuce, P.J., Jackson, F.,
27 Gilleard, J.S., 2015. The emergence of resistance to the benzimidazole anthelmintics in
28 parasitic nematodes of Livestock is characterised by multiple independent hard and
29 soft selective sweeps. PLoS Negl Trop Dis 9(2), 1-24.
- 30 Riggs, N.L., 2001. Experimental cross-infections of *Haemonchus placei* (Place, 1893) in
31 sheep and cattle. Vet. Parasitol. 94, 191–197.
- 32 Roberts, F.H.S., Bremmer, K.C., 1955. The susceptibility of cattle to natural infestation of
33 nematode *Haemonchus contortus* (Rudolphi) Cobb 1898. Aust. Vet. J. 31, 133-134.

- 1 Roberts, F.H.S., O'Sullivan, P.J., 1950. Methods for egg counts and larvas cultures for
2 strongyles infecting tract of cattle. *Aust. J. Agric. Res.* 1, 99-192.
- 3 Rudolphi, C.A., 1803. Neue beobachtungen über die eingeweidewürmer. *Arch. Zool. Zoot.* 3,
4 1-32.
- 5 Santiago, M.A.M., 1968. *Haemonchus* Cobb, 1898 (Nematoda: Trichostrongyloidea)
6 contribuição ao estudo da morfologia, biologia e distribuição geográfica das espécies
7 parasitas de ovinos e bovinos, no Rio Grande do Sul. Tese (Livre-Docência),
8 Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- 9 Santos, J.M.L., Monteiro, J.P., Ribeiro, W.L.C., Macedo, I.T.F., Camurça-Vasconcelos,
10 A.L.F., Vieira, L.S., Bevilaqua, C.M.L., 2014 (a). Identification and quantification of
11 benzimidazole resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in
12 Northeastern Brazil. *Vet. Parasitol.* 199, 160-164.
- 13 Santos, M.C., Amarante, M.R.V., Silva, M.R.L., Amarante, A.F.T., 2014 (b). Differentiation
14 of *Haemonchus placei* from *Haemonchus contortus* by PCR and by morphometrics of
15 adult parasites and third stage larvae. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 23, 495-500.
- 16 Santos, T.R., Lopes, W.D.Z., Buzulini, C., Borges, F.A., Sakamoto, C.A.M., Lima, R.C.A.,
17 Oliveira, G.P., Costa, A.J., 2010. Helminth fauna of bovines from the Central Western,
18 Minas Gerais, Brazil. *Cienc. Rural.* 40, 934-938.
- 19 Silva, M.R.L., 2014. Diagnóstico morfológico e molecular de *Haemonchus* spp. em bovinos e
20 ovinos. Dissertação, Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista, Campus
21 de Botucatu.
- 22 Silvestre, A., Cabaret, J., 2002. Mutation in position 167 of isotype 1 beta-tubulin gene of
23 trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? *Mol. Biochem.*
24 *Parasitol.* 120, 297-300.
- 25 Soutello, R.G.V., Seno, M.C.Z., Amarante, A.F.T., 2007. Anthelmintic resistance in
26 northwestern São Paulo state. *Braz. Vet. Parasitol.* 148, 360-364.
- 27 Souza, A.P., Ramos, C.I., Bellato, V., Sartor, A.P., Schelbauer, C.A., 2008. Resistência de
28 helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense.
29 *Cienc. Rural* 38, 1363-1367.
- 30 Stevenson, L.A., Chilton, N.B., Gasser, R.B., 1995. Differentiation of *Haemonchus placei*
31 from *H. contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) by the ribosomal DNA second
32 internal transcribed spacer. *Int. J. Parasitol.* 25, 483-488.

- 1 Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular
2 Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.
- 3 Travassos, L.P., 1914. Trichostrongylinae brasileiras. *Bras. Med.* 28.
- 4 Van Wyk, J.A., Cabaret, J., Michael, L.M., 2004. Morphological identification of nematode
5 larvae of small ruminants and cattle simplified. *Vet. Parasitol.* 119, 277-306.
- 6 Von Samson-Himmelstjerna, G., 2006. Molecular diagnosis of anthelmintic resistance. *Vet.*
7 *Parasitol.*, 136(2), 99–107.
- 8 Von Samson-Himmelstjerna, G., Blackhall, W., Mccarthy, J.S., Skuce, P.J., 2007. Single
9 nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary
10 nematodes. *Parasitology.* 134, 1077-1086.
- 11 Von Samson-Himmelstjerna, G., Walsh, T.K., Donnan, A.A., Carrière, S., Jackson, F., Skuce,
12 P.J., Rohn, K., Wolstenholme, A.J., 2009. Molecular detection of benzimidazole
13 resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing.
14 *Parasitology.* 136, 349-358.