

**Caracterização da resistência a anti-helmínticos de isolados de
Haemonchus contortus e *Trichostrongylus colubriformis* oriundos de
ovinos.**

Fabiana Alves de Almeida

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Microorganismos.

*Prof. Adj. Alessandro Francisco Talamini do Amarante
Orientador*

BOTUCATU – SP
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Caracterização da resistência a anti-helmínticos de isolados de
Haemonchus contortus e *Trichostrongylus colubriformis* oriundos de
ovinos.**

Fabiana Alves de Almeida

Zootecnista

Prof. Adj. Alessandro Francisco Talamini do Amarante

Orientador

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração
Biologia de Parasitas e Microorganismos.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *Selma Maria de Jesus*

Almeida, Fabiana Alves.

Caracterização da resistência a anti-helmínticos de isolados de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* oriundos de ovinos / Fabiana Alves de Almeida. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2009.

Orientador: Alessandro Francisco Talamini do Amarante

Assunto CAPES: 21300000

1. Ovino - Parasito - Estudos experimentais 2. Parasitologia veterinária

CDD 636.089657

Palavras-chave: Albendazol; Ivermectina; Levamisol; Moxidectina; Resistência anti-helmíntica

DEDICO

Aos meus pais, José dos Santos Almeida e Zelita Alves de Almeida

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por esta graça alcançada, por ter me dado saúde e força para a realização deste trabalho.

Agradeço a minha família, meus pais José S. de Almeida e Zelita A. de Almeida, e aos meus irmãos Fernando J. de Almeida e Fabrício J. de Almeida, obrigada por acreditarem em mim até mesmo quando eu não acredito, pelo apoio e amor que me dedicam, não posso de deixar de lembrar dos meus sobrinhos Gabriel P. de Almeida e Pedro P. de Almeida, pela alegria que me transmitem e pela felicidade que trouxeram em minha vida, amo todos vocês.

Agradeço ao Prof. Adj. Alessandro F. T. do Amarante, primeiramente pela chance de ter realizado o meu estágio curricular sobre a sua supervisão, o que abriu as portas para o mestrado, e depois, pela orientação na realização deste trabalho.

Agradeço a Profa. Adj. Maria Conceição Z. Seno, que foi de fundamental importância na minha escolha de seguir no meio acadêmico, me ensinou os primeiros passos na condução de experimento, e elaboração de projetos e artigos. Obrigada por poder contar com a Sra. em mais esta etapa importante da minha vida.

Agradeço a Profa. Dra. Raquel A. R. Oliveira, por ter me orientado na realização do meu estágio curricular e por tudo que me ensinou. Obrigada pelo carinho com que me recebeu, pela sua amizade e por ter aceitado fazer parte desta banca.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa que me foi concedida.

Agradeço aos pós-graduandos do Laboratório de Helminologia Veterinária, Bruna Silva, Daniel Cardia, Camila de Carvalho, César Basseto e ao Graduando Samir Kadri, pelo auxílio nas atividades laboratoriais, pelo ótimo ambiente de trabalho e pelo companheirismo. Aproveito também para agradecer as alunas de Iniciação Científica, Keila C. O. D. Garcia e Michelle C. dos Santos, por terem auxiliado na realização do experimento e aos funcionários do Departamento de Parasitologia, especialmente Nilza Magnoni e Valdir Paniguel, por terem me recebido com carinho e pelo respeito que me dedicaram.

Não posso deixar de agradecer as minhas amigas e companheiras de república, Cecília S. de Castro e Gabriela de Mello, agradeço pela família que formamos, e por fazerem da nossa casa o meu porto seguro em Botucatu. Agradeço também as minhas amigas de hoje e sempre, Fernanda C. Basso, Juliana S. de Alexandre, Francine Vercese, Bruna R. Laurindo e Hellen

Buzzolo, agradeço pela amizade, conselhos, força e carinho, mostrando que a amizade que fizemos na faculdade é eterna, e a Maurícia B. da Silva pela amizade verdadeira que construímos, pelo apoio e conselhos.

Agradeço finalmente a todos que aqui não foram citados, mas que de alguma forma estiveram envolvidos na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO.....	3
CAPÍTULO 1.....	4
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	5
Resistência anti-helmíntica em nematóides de ovinos.....	5
Resistência anti-helmíntica em nematóides de bovinos.....	8
Mecanismo de ação dos anti-helmínticos.....	9
Mecanismo de resistência anti-helmíntica.....	11
Tratamentos alternativos a fim de diminuir a resistência anti-helmíntica.....	14
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
CAPÍTULO 2.....	24
Resistance of isolates of <i>Haemonchus contortus</i> and <i>Trichostrongylus colubriformis</i> to six anthelmintics.....	25
Abstract.....	25
1. Introduction.....	26
2. Material and Methods.....	27
2.1. Experimental description.....	27
2.2. Evaluation for the presence of eggs inside the uteri of adult females of <i>H. contortus</i> and <i>T. colubriformis</i>	29
2.3. Isolates evaluated and acquisition of infective larvae (L3).....	29
2.4. Statistical analysis.....	30
3. Results.....	31
4. Discussion.....	32
Acknowledgements.....	35
References.....	36
ANEXO.....	42

SUMÁRIO DE TABELAS

Capítulo 2	Página
<p>Table 1- Mean nematode fecal egg count (FEC), fecal egg count reduction (FECR) and mean percentage of third stage larvae (L3) of the <i>Haemonchus contortus</i> and <i>Trichostrongylus colubriformis</i> after treatment of lambs with albendazole, levamisole, moxidectin, ivermectin, closantel or trichlorfon.....</p>	39
<p>Table 2- Worm burden 14 days after treatment of lambs with albendazole, levamisole, moxidectin, ivermectin, trichlorfon or closantel. Control and treated groups with 6 animals each.....</p>	40
<p>Table 3- Average number (\pmstandard error mean) of eggs in the uteri of females of <i>Haemonchus contortus</i> and <i>Trichostrongylus colubriformis</i>, recovered 14 days after treatment of sheep with albendazole, levamisole, ivermectin, moxidectin, trichlorfon or closantel.....</p>	41

RESUMO

O estudo teve por objetivo determinar o grau de eficácia da levamisol, albendazol, ivermectina, moxidectina, closantel e triclorfon em isolados de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*. Quarenta e dois cordeiros da raça Santa Inês, com três meses de idade, foram infectados artificialmente com 4000 larvas infectantes (L3) de *H. contortus* e 4000 L3 de *T. colubriformis*. Os animais foram separados em sete grupos, com seis animais cada, os quais receberam os seguintes tratamentos: Grupo 1 – controle, sem tratamento; Grupo 2 - moxidectina injetável (0,2 mg/kg de peso vivo (PV), Cydectin[®], Fort Dodge), Grupo 3 - closantel via oral (10 mg/kg de PV, Zuletel[®], Laboratório Microsules) Grupo 4 – triclorfon via oral (100 mg/kg de PV, Neguvon[®], Bayer); Grupo 5 – fosfato de levamisol injetável (4,7 mg/kg de PV, Ripercol[®], Fort Dodge), Grupo 6 - albendazol via oral (5,0 mg/kg de PV, Valbazen[®], Pfizer) e o Grupo 7- tratado com ivermectina injetável (0,2 mg/kg de PV, Ivomec[®], Merial). A via de administração e a dosagem empregada foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Amostras de fezes foram coletadas no dia do tratamento, três, sete, 10 e 14 dias após, para a realização de contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e cultura de fezes para obtenção e posterior identificação das L3. Os animais foram sacrificados 14 dias após o tratamento para obtenção e quantificação dos vermes presentes no abomaso e no intestino delgado. A eficácia dos tratamentos foi calculada a partir da média aritmética do OPG ou número total de vermes encontrados nos grupos tratados em comparação com os valores do grupo controle. As reduções percentuais das cargas parasitárias de *H. contortus* foram de 17% para o albendazol, 10% para o levamisol, 45% para moxidectina, 20% para ivermectina, 23% para o closantel e 73% para o triclorfon e para *T. colubriformis* a redução foi de 19% para o albendazol, 28% para a ivermectina, 82% para a moxidectina e 0% para o levamisol, closantel e triclorfon. A redução percentual de ovos por grama de fezes (R-OPG) não foi eficaz para a detecção da resistência, os dados demonstram que o *H. contortus* foi resistente a todos os anti-helmínticos, o mesmo não foi encontrado no isolado de *T. colubriformis* que se mostrou susceptível ao closantel, levamisol, moxidectina e ivermectina. Comparado ao grupo controle, as fêmeas de *T. colubriformis* apresentaram redução significativa ($P < 0,05$) no número médio de ovos no útero após 14 dias do tratamento com albendazol, triclorfon, levamisol e moxidectina. Não foi observada redução significativa do número de ovos no útero das fêmeas de *H. contortus* dos grupos tratados em

relação ao grupo controle. Os isolados de *H. contortus* e *T. colubriformis* estudados se mostraram resistentes a todos os anti-helmínticos testados.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the efficacy of levamisole, albendazole, ivermectin, moxidectin, closantel and trichlorfon, against *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* isolates. Forty-two lambs of the Santa Ines breed, at three months of age, were simultaneously artificially infected with 4000 infective *H. contortus* larvae (L3) and 4000 *T. colubriformis* L3. The animals were divided into seven groups with six animals each that received one of the following treatments: Group 1 - control, no treatment; Group 2 - moxidectin (0.2 mg/kg body weight (BW), Cydectin[®], Fort Dodge); Group 3 - closantel (10 mg/kg BW, 10% Zuletel[®], Microsules Laboratories); Group 4 - trichlorfon (100 mg/kg BW, Neguvon[®], Bayer); Group 5 - levamisole phosphate (4.7 mg/kg BW, Ripercol[®], Fort Dodge); Group 6 - albendazole (5.0 mg/kg BW, Valbazen[®], Pfizer); and Group 7 - treated with ivermectin (0.2 mg/kg BW, Ivomec[®], Merial). Fecal samples were collected 3, 7, 10 and 14 days after treatment and processed for nematode fecal egg counts (FEC) and fecal cultures for the production and subsequent identification of L3. The animals were sacrificed 14 days after treatment for collection and quantification of the worms in the abomasum and small intestine. The efficacy of the treatments was calculated from the arithmetic mean of the FEC or worm burden of the treated groups, compared with the values of the control group. The percentage reductions in *H. contortus* worm burdens were 17% for albendazole, 10% for levamisole, 45% for moxidectin, 20% for ivermectina, 23% for closantel and 73% for trichlorfon. Reductions for *T. colubriformis* were 19% for albendazole, 28% for ivermectin, 82% for moxidectin and 0% for levamisole, closantel and trichlorfon. The fecal examination was not effective for the detection of resistance to *T. colubriformis*, since *T. colubriformis* L3 were not detected in most of the fecal cultures after treatment with closantel, levamisole, moxidectin or ivermectin. *H. contortus* L3 were found in fecal cultures of all groups and in all collections. As compared to the control group, females of *T. colubriformis* demonstrated a significant reduction ($P < 0.05$) in the average number of eggs in their uterus at 14 days after treatment with albendazole, trichlorfon, levamisole or moxidectin. In contrast, anthelmintic treatments had no significant effect on *H. contortus* fecundity. In

conclusion, the isolates of *H. contortus* and *T. colubriformis* studied were resistant to all anthelmintics tested.

INTRODUÇÃO

Os pequenos ruminantes, principalmente os ovinos, vêm conquistando grande espaço na produção animal em várias regiões do mundo (VELOSO *et al.*, 2004). Entretanto, o parasitismo por nematóides gastrintestinais tem causado redução na produtividade destes animais (COOP e KYRIAZAKIS, 2001). O parasitismo nem sempre causa doença, isto porque os hospedeiros ou a maioria deles possuem mecanismos imunológicos que os possibilitam manter a população de endoparasitas sob controle. Quando isso ocorre, pode-se afirmar que a relação hospedeiro-parasita encontra-se em equilíbrio (AMARANTE, 2001).

Segundo este mesmo autor, essa relação pode ser alterada por diversos fatores como condições climáticas desfavoráveis e o estado fisiológico dos animais. Na maioria das vezes o desequilíbrio é causado pela ação do produtor, ao adotar medidas de manejo inadequadas ou ao utilizar incorretamente os anti-helmínticos. Um problema sério é a criação intensiva dos animais, em áreas de alta produção de forragem, e conseqüentemente com lotações elevadas, o que provoca aumento da contaminação ambiental com os estágios de vida livre dos parasitas.

No Estado de São Paulo, *Haemonchus contortus* é o principal parasita que acomete os ovinos, seguido por *Trichostrongylus colubriformis* (AMARANTE e BARBOSA, 1995; AMARANTE *et al.*, 1997; AMARANTE *et al.*, 2004). Os parasitas do gênero *Haemonchus* habitam o abomaso dos ruminantes: são hematófagos e em conseqüência causam anemia nos animais, a qual eventualmente pode resultar em mortalidade (SEQUEIRA e AMARANTE, 2002). Já os nematóides da espécie *T. colubriformis* habitam o intestino delgado dos ruminantes, produzem túneis na mucosa intestinal e deformam as vilosidades reduzindo a área de absorção de nutrientes e líquidos, podendo ocasionar diarreia e perda de peso nos animais (URQUHART *et al.*, 1998).

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A utilização profilática de anti-helmínticos tem se intensificado a fim de diminuir as perdas econômicas causadas pelos nematóides. Porém, constata-se elevada taxa de re-infecção dos animais mantidos a pasto, o que leva a utilização contínua de tratamentos, impondo uma alta pressão de seleção de parasitas resistentes (CHARLES *et al.*, 1989; SANGSTER, 2001; TAYLOR *et al.*, 2002; SARGISON *et al.*, 2007). Além disso, a introdução de animais portadores de isolados resistentes no rebanho e a resistência cruzada entre drogas com o mesmo mecanismo de ação também se constituem em problema a ser considerado (CUNHA FILHO e YAMAMURA, 1999).

Os produtores encontram no mercado uma variedade de anti-helmínticos, a maioria desenvolvida a partir da década de 60. No entanto, existem apenas três grupos de anti-helmínticos de amplo espectro, os benzimidazóis, imidazotiazóis e lactonas macrocíclicas e dois grupos de pequeno espectro, salicilanilidas/fenóis substituídos e organofosforados, os dois últimos utilizados especialmente contra *Haemonchus* spp. (AMARANTE, 2007).

Resistência anti-helmíntica em nematóides de ovinos

Nos ruminantes a maioria dos casos de resistência anti-helmíntica é verificada nos nematóides de ovinos e caprinos, isto se deve ao uso constante e muitas vezes indiscriminado dos anti-hemínticos, sem critério quanto à época de tratamento.

A resistência parasitária tem causado grande impacto na produção de ovinos, em países como a África do Sul, Austrália e Nova Zelândia. Vários produtores tradicionais estão desativando seus criatórios devido à escassez de alternativas para o combate das infecções parasitárias e a baixa produtividade dos rebanhos (VAN WYK *et al.*, 1997a). Este fato tem ocorrido também em criações aqui na América do Sul.

O primeiro relato de resistência a anti-helmínticos utilizados contra nematóides gastrintestinais de ovinos envolveu o tiabendazol (DRUDGE *et al.*, 1964). Este problema disseminou-se pelo mundo inteiro, com vários relatos de resistência aos principais princípios ativos utilizados. Gopal *et al.* (1999) fizeram o primeiro relato de resistência a ivermectina de um isolado de *T. colubriformis* na Nova Zelândia. Neste mesmo país West *et al.*, (2004) encontraram em caprinos *Trichostrongylus* spp. and *Teladorsagia* spp. resistentes ao oxfendazol, levamisol e moxidectina. Alka *et al.* (2004) confirmaram a resistência a ivermectina de um isolado de *T.*

colubriformis na Índia. Já Le Jambre *et al.* (2005), na Austrália, relataram o primeiro caso de resistência de um isolado de *T. colubriformis* a moxidectina.

Na França Chartier *et al.* (1998) encontraram resistência ao fenbendazol em 83% das fazendas estudadas, sendo encontrados os gêneros *Teladorsagia*, *Trichostrongylus* e *Cooperia* na coprocultura. Ainda na França, Palcy *et al.* (2008) relataram o primeiro caso de resistência de *Trichostrongylus axei* ao fenbendazol. O primeiro relato em ovinos de resistência as lactonas macrocíclicas em mais de uma espécie de parasita ao mesmo tempo foi relatado por Vickers *et al.* (2001), neste estudo os autores encontraram *Ostertagia circumcincta* e *H. contortus* resistentes a ivermectina e a moxidectina.

A resistência anti-helmíntica múltipla em caprinos foi detectada por Miller e Craig (1996), em um isolado de *H. contortus* resistente a ivermectina, alcançando um percentual de eficácia de -179%, 1% e 23% para a ivermectina, fenbendazol e levamisol, respectivamente. Na Escócia, Bartley *et al.* (2004) estudaram a campo dois isolados de *Teladorsagia circumcincta*, um obtido da fazenda A e outro da fazenda B, encontrando resistência múltipla nos dois isolados. No isolado da fazenda A, a eficácia do fenbendazole, ivermectina, levamisol e as associações de fenbendazol + ivermectina, fenbendazol + levamisol e fenbendazol + levamisol + ivermectina foi de 59%, 60%, 88%, 94%, 93% e 92%, respectivamente e no da fazenda B, a eficácia foi de 51% para o levamisol e 72% para a ivermectina. No ano seguinte os mesmos autores (Bartley *et al.*, 2005) relataram a resistência múltipla aos mesmos anti-helmínticos anteriores em estádios imaturos dos mesmos isolados, demonstrando que a resistência anti-helmíntica parece ocorrer nos estádios iniciais de desenvolvimento do parasita. Neste mesmo país, Sargison *et al.* (2007) encontraram resistência ao levamisol, benzimidazol e ivermectina em quatro rebanhos estudados. Na África do Sul, Van Wyk *et al.* (1997b) detectaram resistência de *H. contortus* ao triclorfon encontrando 78,6% de eficácia.

Um dos primeiros casos de resistência no Brasil foi relatado no Estado do Rio Grande do Sul (SANTOS e FRANCO, 1967). Neste mesmo Estado, Amaral (1985) encontrou populações de *H. contortus* resistente ao benzimidazol, levamisol e rafoxanida. Em trabalho posterior realizado em 26 municípios do mesmo Estado, Echevarria *et al.* (1996) encontraram resistência ao albendazol, levamisol, a combinação albendazol + levamisol, a ivermectina e ao closantel em 90, 84, 73, 13 e 20% das fazendas estudadas, respectivamente. Os gêneros *Ostertagia*, *Haemonchus* e *Trichostrongylus* se mostraram resistentes ao benzimidazol, levamisol, a combinação destes e a

ivermectina, e populações de *H. contortus* foram resistentes ao closantel. Cunha Filho e Yamamura (1999) realizaram também um trabalho na região Sul do país, onde verificaram a presença de 100% de parasitas resistentes a ivermectina e 20% a moxidectina, nos 10 rebanhos estudados.

No Estado de Santa Catarina, Ramos *et al.* (2002) constataram resistência anti-helmíntica múltipla, com 77% dos rebanhos portadores de parasitas com resistência a ivermectina, 65% ao albendazol, 13% ao closantel, e 15% ao levamisol. Já Rosalinsk-Moraes *et al.* (2007), em um estudo realizado neste mesmo Estado, encontraram resistência a ivermectina em 100% dos rebanhos ovinos e em 66,7%, resistência a moxidectina. Segundo os autores a rápida expansão da resistência anti-helmíntica na região foi atribuída em parte pela negligência de apoio técnico aos criadores, e as condições climáticas que possibilitam constantemente o desenvolvimento dos estágios imaturos de parasitas, conseqüentemente a infecção durante todo o ano.

No Paraná, Thomaz-Soccol *et al.* (2004) encontraram resistência em todas as fazendas testadas: 88,1% apresentaram parasitas resistentes aos bezimidazóis, 78,6% a ivermectina, 56,4% ao closantel, 38,7% ao closantel + oxfendazol, 38% ao levamisol e 23,6% a moxidectina, sendo *Haemonchus* o gênero mais prevalente. Em Sobral, Estado do Ceará, Vieira *et al.* (1992) relataram a existência de um isolado de *H. contortus* resistente a ivermectina e ao netobimim. Neste mesmo Estado, Melo *et al.* (2003) relataram a presença de populações de nematóides resistentes ao oxfendazol, levamisol e ivermectina, com eficácia de 88%, 41% e 59%, respectivamente em ovinos e 87,5; 75 e 37,5% em caprinos. O gênero prevalente nas duas espécies de animais foi *Haemonchus* seguido de *Trichostrongylus* e *Oesophagostomum*.

Melo *et al.* (2004) aplicaram um questionário em propriedades rurais do médio e alto Jaguaribe no Estado do Ceará, nos anos de 2001 e 2003, e constataram um aumento na resistência anti-helmíntica nas propriedades de 67% em 2001 para 83% em 2003. Em 100% das propriedades o gênero *Haemonchus* foi o mais prevalente dos parasitos resistentes. Segundo os autores este aumento na resistência deve ter ocorrido devido à ação de vários promotores de resistência, entre eles, o espectro e eficiência da droga, frequência de aplicação, dosagem e tipo de manejo aplicado.

Amarante *et al.* (1992) constataram resistência múltipla, ao oxfendazol, levamisol e ivermectina na maioria das propriedades estudadas no Estado de São Paulo, sendo *Trichostrongylus* resistente ao levamisol e *Haemonchus* a todos os anti-helmínticos testados.

Buzzulini *et al.* (2007) conduziram um estudo em um rebanho ovino na região de Jaboticabal, São Paulo, onde detectaram resistência a moxidectina com a redução de ovos por grama de fezes (R-OPG) de 70,5%, sete dias após o tratamento. Já o tratamento com a associação de albendazol, levamisol e ivermectina mostrou 99,4% de eficácia.

Resistência anti-helmíntica em nematóides de bovinos

Os principais nematóides gastrintestinais de bovinos são: *Haemonchus placei*, *Haemonchus similis*, *Ostertagia ostertagi* e *T. axei*; parasitas do abomaso. No intestino delgado, temos *Cooperia*, spp, *Bunostomum phlebotomum*, *Strongyloides papillosus* e *Nematodirus* spp. No intestino grosso encontram-se *Oesophagostomum radiatum* e *Trichuris* spp (SEQUEIRA e AMARANTE, 2002).

A resistência anti-helmíntica em nematóides de bovinos é pouco descrita na literatura comparada a da ovinocultura, mas isto não quer dizer que ela não exista, ou que os parasitas dos bovinos possuam menor biodiversidade genética para expressar resistência. O diferencial está na quantidade de tratamento que os bovinos são submetidos em relação aos constantes tratamentos aplicados nos ovinos (CONDI, 2008).

Na Nova Zelândia Loveridge *et al.* (2003), ao testar a eficácia da abamectina e eprinomectina em formulação tópica, encontraram resistência envolvendo *Cooperia oncophora* e uma provável resistência de *Trichostrongylus longispicularis*. Neste mesmo país Mason e Mckay (2006) observaram, em cinco propriedades estudadas, resistência às mesmas drogas citadas anteriormente, com um percentual de redução de 86% para ivermectina (pour-on) e de 88% para a eprinomectina (pour-on), 14 dias após o tratamento, com resistência de *C. oncophora* a ambos os fármacos, e uma possível resistência emergente de *Ostertagia* spp. a ivermectina.

Na região central da Argentina, Anziani *et al.* (2004) relataram o primeiro caso de resistência simultânea de *Haemonchus* spp. as avermectinas (ivermectinas) e aos benzimidazóis (ricobendazole). Suarez e Cristel (2007) estudaram rebanhos bovinos da província de Buenos Aires e encontraram 60% dos 25 rebanhos estudados com parasitas do gênero *Cooperia* resistentes a ivermectina.

No Brasil estudo realizado na região noroeste do Estado de São Paulo indicou a presença de *Haemonchus* spp. e *Cooperia* spp. com resistência, especialmente a ivermectina, em 92% das propriedades de bovinos avaliadas, ao contrário da moxidectina que se mostrou eficaz após o

tratamento nas mesmas propriedades estudadas (SOUTELLO *et al.*, 2007). Já Condi *et al.* (2009) fizeram o primeiro relato, envolvendo necropsia de bovinos, de *C. punctata*, *C. pectinata*, *O. radiatum* e *Trichuris* spp. com resistência à moxidectina.

Portanto, a resistência anti-helmíntica é atualmente um problema sério que acarreta grandes dificuldades para o tratamento de animais acometidos e para o estabelecimento de medidas profiláticas da verminose em ovinos e bovinos.

Mecanismo de ação dos anti-helmínticos

Embora existam métodos alternativos para o controle dos parasitas, o controle baseado em drogas químicas tem sido o mais utilizado, portanto o mais importante. Entender o mecanismo de ação dos anti-helmínticos é primordial para o uso eficiente da droga no controle parasitário.

Benzimidazóis

Os microtúbulos desempenham um importante papel em células eucariontes, como absorção e secreção celular, ancoragem em locais específicos dos receptores da membrana, tais como a sinapse em células nervosas, mitoses e meioses, arquitetura celular, e outros (CALVISTON e HOLZBAUR, 2006). Os microtúbulos são polímeros dinâmicos que apresentam adição do dímero da α - β - tubulina num extremo da cadeia (crescimento final) e a perda do dímero da α - β - tubulina no outro extremo (perda final), este processo é denominado *treadmilling* (PRICHARD, 2008).

A ação dos benzimidazóis ocorre na ligação no crescimento final do microtúbulo, evitando desta forma que novos dímeros da α - β - tubulina se adicionem. Se isto ocorrer ao mesmo tempo em que o microtúbulo está perdendo o dímero no outro extremo, ocasiona-se o encurtamento e o desaparecimento do microtúbulo, dificultando as funções essenciais da célula (PRICHARD, 2008). Desta forma de acordo com Herdy (2000), os benzimidazóis causam uma degeneração seletiva de microtúbulos citoplasmáticos, em células intestinais e tegumentares de larvas e helmintos adultos. Em consequência ocorre diminuição na assimilação e metabolização da glicose, o que leva à diminuição de ATP, com depleção de energia, a qual resulta em imobilização e morte dos vermes.

Lactonas macrocíclicas

Os nematóides parecem possuir ligantes de canais de cloro que não são encontrados nos vertebrados, tais como canais de glutamato, serotonina, ou dopamina, como também o ácido γ -amino butírico (GABA), este último também é encontrado nos mamíferos. Outra diferença entre nematóides e mamíferos é que nos nematóides o GABA é um transmissor inibitório na junção neuromuscular e também está presente em outros neurônios (RICHMOND e JORGENSEN, 1999), e nos nematóides, os receptores GABA são encontrados sobre as células musculares. Os grupos mais importantes de compostos que agem nos canais ligantes de cloro são as lactonas macrocíclicas, sendo a ivermectina e moxidectina as mais estudadas (PRICHARD, 2008). As lactonas macrocíclicas parecem atuar abrindo irreversivelmente os canais de cloro mediados por substâncias ligantes como glutamato e/ou ácido γ -amino butírico, causando hiperpolarização e paralisia da célula (WOLSTENHOLME e ROGERS, 2005). Nos nematóides as lactonas macrocíclicas agem no sistema nervoso e na musculatura, aumentando a inibição da neurotransmissão o que causa a paralisia e morte dos nematóides (SANGSTER, *et al.*, 2005).

Imidazotiazóis

Os imidazotiazóis agem sobre os receptores nicotínicos, que funcionam como canais de cátions mediados por acetilcolina (FLEMING *et al.*, 1997). A atividade dos imidazotiazóis leva a inanição do verme e conseqüentemente a sua morte, pois a ação destes compostos sobre os receptores musculares nicotínicos da acetilcolina causa paralisia espasmódica nos nematóides (SANGSTER, *et al.*, 2005).

Amino-acetonitrile derivatives (AAD)

Uma nova classe de drogas amino-acetonitrile derivatives (AAD), recentemente lançada na Nova Zelândia (HOSKING, *et al.*, 2009), também parece agir nos receptores nicotínicos, mas está claro que estes agem em um receptor diferente dos imidazotiazóis, pois estudos demonstraram que os nematóides possuem muitos destes receptores, mais até que os vertebrados. As AADs provavelmente agem em um grupo distinto de receptores nicotínicos presentes em *Caenorhabditis elegans* e em *H. contortus* (KAMINSKY *et al.*, 2008).

Salicilanilidas/fenóis substituídos e organofosforados

O modo de ação dos salicilanilidas/fenóis substituídos ainda não está claro, mas acredita-se que agem tanto no metabolismo como na via neuromuscular dos vermes (FAIRWEATHER e BORAY, 1999). Já os organofosforados são inibidores da enzima acetilcolinesterase e interferem na neurotransmissão nas terminações nervosas (sinapses) colinérgicas. Após uma fibra colinérgica transmitir a mensagem, por meio da acetilcolina, a enzima acetilcolinesterase é indispensável na região sináptica para “retirar” o mediador e permitir a passagem de novo estímulo quando ele for novamente liberado. Os organofosforados agem como substrato competidor pela enzima acetilcolinesterase ligando-se a ela de forma irreversível. A falta da enzima nas terminações colinérgicas aumenta os níveis de acetilcolina e leva o verme à morte pela disfunção do sistema nervoso (BALDANI, *et al.*, 1999).

Mecanismo de resistência anti-helmíntica

Segundo Prichard (2008), entender os mecanismos e a genética da resistência anti-helmíntica é importante no sentido de evitar a resistência, diminuir a velocidade de propagação de parasitas resistentes, retardar o desenvolvimento da resistência em novas drogas anti-helmínticas e combinar adequadamente os anti-helmínticos disponíveis.

Os mecanismos de resistência podem ser específicos ou inespecíficos. Os mecanismos específicos estão associados à ação do anti-helmíntico, já os inespecíficos se referem a alterações no receptor da droga ou na modulação da concentração do fármaco (WOLSTENHOLME *et al.*, 2004). As modificações genéticas (mutação, transferência e/ou amplificação gênica) que conferem resistência, se traduzem em diferentes modificações bioquímico-moleculares que são a base farmacológica da diminuição do efeito do fármaco na célula ou no organismo resistente (LANUSSE, 2006).

Benzimidazóis

Existem evidências genéticas e bioquímicas do envolvimento de alterações na β tubulina, com a resistência aos benzimidazóis. Dois genes, os isotipos 1 e 2 estariam relacionados com a resistência. Uma mutação no gene do isotipo 1 seria a causa específica de resistência aos benzimidazóis. Esta mutação causa a substituição da fenilalanina pela tirosina no códon 200 da proteína do isotipo 1 (SAMSON-HILMMELSTJERNA *et al.*, 2007). Assim o verme susceptível

possui o aminoácido fenilalanina neste códon, já o verme resistente exibiria a tirosina. Mudanças nos códons 167 e 198 também podem estar envolvidas no mecanismo de resistência aos benzimidazóis. Estas mudanças no códon da β tubulina podem variar entre espécies de parasitas e possivelmente entre isolados (GHISI *et al.*, 2007). O mais comum *single nucleotide polymorphism* (SNP) relacionado com a resistência aos benzimidazóis em *H. contortus* é a mudança no códon 200 na β tubulina (WOLSTENHOLME *et al.*, 2004). Esta mudança causa uma redução na afinidade de ligação da droga com a proteína recombinante (LUBEGA e PRICHARD, 1991).

Existem também evidências do mecanismo de transporte envolvendo a P-glicoproteína (Pgp), ou outros transportadores ABC, com a resistência aos benzimidazóis (KERBOEUF *et al.*, 2003; BLACKHALL *et al.*, 2008). Os transportadores ABC possuem um maior envolvimento nos mecanismos de resistência das lactonas macrocíclicas (PRICHARD e ROULET, 2007).

Lactonas macrocíclicas

A Pgp faz parte do grupo dos ABC transportadores, que são responsáveis pelo efluxo celular, possibilitando que a droga seja expelida de dentro da célula. A Pgp previne a acumulação intracelular e os efeitos citotóxicos da droga (LANUSSE *et al.*, 2008).

Mudanças genéticas nos transportadores ABC parecem estar associadas com a resistência as lactonas macrocíclicas. Segundo Pouliot *et al.* (1997), a ivermectina é um excelente substrato para o mecanismo de efluxo realizado pela P-gp dos mamíferos. A partir deste fato os parasitologistas iniciaram investigações buscando saber se os parasitas resistentes a ivermectina usavam mecanismo similar para protegê-los da ação das lactonas macrocíclicas (PRICHARD, 2007), o que foi demonstrado por Xu *et al.* (1998), que encontraram um isolado de *H. contortus* selecionado para ivermectina que possuía uma alta expressão de Pgp A, comparado com um isolado parental não selecionado. A Pgp A é uma P-glicoproteína encontrada em *H. contortus*.

Prichard e Roulet (2007) relataram que tratamentos com ivermectina e moxidectina selecionam para um aumento consecutivo da expressão de cinco P-glicoproteínas (Pgp A, B, C, D e E) em vermes adultos de *H. contortus*. O aumento consecutivo da expressão poderia ser resultado de mutações na seqüência regulatória dos genes da Pgp, que são freqüentemente localizados na região promotora ou introns (PRICHARD, 2008).

Alguns pesquisadores têm estudado o uso de agentes moduladores da Pgp, que juntamente com a administração das lactonas macrocíclicas, tem resultado no aumento na eficácia da droga.

Borges *et al.* (2005) co-administraram ivermectina com verapamil, em ovinos infectados com *H. contortus*, a eficácia da ivermectina sozinha foi de 0% (14 dias após tratamento) e a co-administração resultou em 74,7% de redução na contagem de ovos nas fezes.

Recentemente foi demonstrado em *H. contortus* e *Onchocerca volvulus* que as lactonas macrocíclicas também realizam uma substituição no códon 200 da β tubulina (200Tirosina e 167Tirosina), estas mudanças são conhecidas por causar resistência aos benzimidazóis (MOTTIER e PRICHARD, 2008). É interessante notar que a resistência a ivermectina tem sido usualmente relatada em áreas onde a resistência aos benzimidazóis já foi observada (PRICHARD, 2008). O fato dos benzimidazóis selecionarem as mesmas Pgps que as lactonas macrocíclicas e estas, assim como os benzimidazóis, agirem sobre as β tubulinas, possuem importantes implicações na escolha da classe anti-helmíntica que será usada individualmente, de forma combinada ou em esquemas de rotação de drogas, para o controle dos nematóides (PRICHARD, 2008).

Imidazotiazóis

Pouco se conhece sobre os mecanismos de resistência dos anti-helmínticos que agem nos receptores nicotínicos da acetilcolina. Segundo Prichard (2008) mudanças nos receptores nicotínicos parecem estar envolvidas na resistência ao levamisol, morantel e pirantel. Robertson *et al.* (1999) encontraram em um isolado de *Oesophagostomum dentatum* sensível ao levamisol os subtipos de receptores G25, G35, G40 e o G45 e no isolado resistente só não foi encontrado o subtipo G35. Observações no nematódeo *C. elegans* demonstrou haver mais de 11 genes envolvidos na resistência ao levamisol, três destes genes são: unc-38, unc-29 e lev-1 (ROBERTSON *et al.*, 1999).

Amino-acetonitrile derivatives (AAD)

A resistência as ADDs, estudada em laboratório em um isolado de *H. contortus*, foi associada com a perda de expressão de dois subtipos dos receptores nicotínicos da acetilcolina (KAMINSKY *et al.*, 2008). Esta perda de expressão em dois subtipos dos receptores nicotínicos da acetilcolina, não foi detectado em nem uma outra droga que possui modo de ação similar (PRICHARD, 2008).

Organofosforados

A resistência aos organofosforados é freqüentemente descrita em insetos, isto devido ao seu constante uso por parte dos produtores no controle das pragas em lavouras. Segundo Bracco *et al.* (1997), a resistência aos organofosforados ocorre por um aumento da atividade ou produção de esterases inespecíficas e por uma diminuição da sensibilidade da acetilcolinesterase ou a ambos.

Tratamentos alternativos a fim de diminuir a resistência anti-helmíntica

Sabe-se que existem raças de ovinos com maior resistência ao parasitismo por nematóides gastrintestinais, e que dentro de uma mesma raça existem animais susceptíveis e resistentes (AMARANTE e AMARANTE, 2003). Levando em consideração estes fatos, torna-se primordial a criação de animais resistentes ao parasitismo, pois desta forma diminuir-se-ia a contaminação da pastagem, a infecção dos animais por nematóides gastrintestinais e conseqüentemente a necessidade de tratamentos com anti-helmínticos.

Outra alternativa é o pastejo alternado entre diferentes espécies de animais, como ovinos e bovinos. Em um experimento realizado no município de Ilha Solteira-SP, Fernandes *et al.* (2004) utilizaram o pastejo alternado de bovinos e ovinos, e conseguiram um efeito benéfico significativo no controle da verminose ovina. As condições ambientais, como clima, devem ser levadas em consideração ao adotar este tipo de manejo, pois em um estudo realizado no município de Tupi Paulista-SP, Rocha *et al.* (2008), não obtiveram o mesmo efeito positivo do pastejo alternado.

O manejo nutricional adequado também é eficaz ao propiciar aumento da resistência dos animais e conseqüentemente propiciar redução na dependência de tratamentos com anti-helmínticos. Estudos demonstraram que animais que receberam um aporte nutricional, como aumento do teor de proteína na ração, se tornaram imunologicamente mais preparados a enfrentar o parasitismo por nematóides gastrintestinais, adquirindo maior resistência aos parasitas (HOUDIJK *et al.*, 2000; BRICARELLO *et al.*, 2005).

Muitos pesquisadores têm estudado também o uso de extratos de plantas, óleos essenciais e homeopatia, para o controle dos parasitas (CHAGAS *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2008). Está em pesquisa o uso de vacinas, principalmente contra *H. contortus* (SMITH, 2007). Os resultados têm sido animadores, mas a utilização comercial tem esbarrado na produção em larga escala da vacina.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A resistência anti-helmíntica de nematóides gastrintestinais, como foi visto, é uma realidade mundial. Por isso torna-se importante investigar e entender os mecanismos de resistência, além da caracterização anti-helmíntica de isolados de nematóides, a fim de se conhecer o grau de resistência dos nematóides gastrintestinais frente aos anti-helmínticos mais utilizados. Vale ressaltar que a partir do momento que se emprega o tratamento com drogas químicas, população de parasitas resistentes são selecionadas. O que se busca com estes estudos é retardar o aparecimento da resistência e o prolongamento do uso do anti-helmíntico no campo. E o primordial é que os resultados destes estudos cheguem até o produtor.

Métodos alternativos, como a criação de raças resistentes, o manejo nutricional adequado e o pastejo alternado entre espécies de animais, devem ser empregados na criação de ruminantes, desta forma é possível que a produção animal se torne menos dependente do uso de anti-helmínticos para o controle dos parasitas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- ALKA; GOPAL, R.M.; SANDHU, K.S.; SIDHU, P.K. Efficacy of abamectin against ivermectina-resistant strain of *Trichostrongylus colubriformis*. **Vet. Parasitol**, v. 121, p. 277-283, 2004.
- AMARAL, N.K. Animal parasitism in Brazil. In: WORLD ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 11, 1985, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: WAAVP, 1985.
- AMARANTE, A. F. T. **Controle de parasitas de ovinos: curso teórico-prático**. Botucatu, Julho de 2007, 36p.
- AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A.; ROCHA, R.A.; GENNARI, S.M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Vet. Parasitol**, v. 120, p. 91-106, 2004.
- AMARANTE, A.F.T., AMARANTE, M.R.V. Breeding sheep for resistance to nematode infections. **J. Anim. Vet. Adv.**, v. 2, p. 147-161, 2003.
- AMARANTE, A.F.T. Controle de endoparasitoses dos ovinos. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba. **Anais...**São Paulo: FEALQ, 2001, p.461-473.

¹ ABNT (NBR 6023/2002)

- AMARANTE, A.F.T.; BAGNOLA Jr, J.; AMARANTE, M.R.V.; BARBOSA, M.A. Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 73, p. 89–104, 1997.
- AMARANTE, A.F.T.; BARBOSA, M.A. Seasonal variations in populations of infective larvae on pasture and nematode faecal egg output in sheep. **Vet. Zootec.**, v. 7, p.127–133, 1995.
- AMARANTE, A.F.T.; BARBOSA, M.A.; OLIVEIRA, M.A.G.; CARMELLO, M.J.; PADOVANI, C.R. Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e levamizol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 29, p. 31-38, 1992.
- ANZIANI, D.J.; SUAREZ, V.; GUGLIELMONE, A.A.; WARNKE, O.; GRANDE, H.; COLES, G.C. Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. **Vet. Parasitol.**, v. 122, p. 303-306, 2004.
- BALDANI, L.A.; SOUSA, R.V.; MIGUEL, A.G. Farmacologia dos principais antiparasitários de uso na medicina veterinária. In: Boletim Técnico Universidade Federal de Lavras - UFLA. Lavras, 1999, 40p.
- BARTLEY, D.J.; JACKSON, E.; SARGISON, N.; JACKSON, F. Further characterization of a triple resistant field isolate of *Teladorsagia* from a Scottish lowland sheep farm. **Vet. Parasitol.**, v. 134, p. 261-266, 2005.
- BARTLEY, D.J.; JACKSON, E.; JACKSON, F.; SARGISON, N. Characterization of two triple resistant field isolates of *Teladorsagia* from Scottish lowland sheep farm. **Vet. Parasitol.**, v. 123, p. 189-199, 2004.
- BLACKHALL, W.J.; PRICHARD, R.K.; BEECH, R.N. P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to bezimidazoles. **Vet. Parasitol.**, v. 152, p. 101-107, 2008.
- BORGES, F.; SILVA, H.; BUZZOLINI, C.; SOARES, V.; COSTA, A.; MOLENTO, M. Use of Verapamil to increase anthelmintic efficacy of ivermectin against drug-selected atrain of *Haemonchus contortus*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE WORLD ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 20., 2005, Christchurch. **Anais...**Christchurch: WAAVP, 2005. p.74
- BRACCO, J.E.; DALBON, M.; MARINOTTI, O.; BARATA, J.M.S. Resistência a inseticidas organofosforados e carbamatos em população de *Culex quinquefasciatus*. **Rev. Saúde Pública**, v. 31, p. 182-183, 1997.

- BRICARELLO, P.A.; AMARANTE, A.F.T.; ROCHA, R.A.; CABRAL FILHO, S.L.; HUNTLEY, J.F.; HOUDIJK, J.G.M.; ABDALLA, A.L.; GENNARI, S.M. Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. **Vet. Parasitol.**, v. 134, p. 99-109, 2005.
- BUZZULINI, C.; SOBRINHO, A.G.S.; COSTA, A.J., SANTOS, T.R.; BORGES, F.A.; SOARES, V. E. Eficácia anti-helmíntica comparativa da associação albendazole, levamisole e ivermectina à moxidectina em ovinos. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 42, p. 891-895, 2007.
- CALVISTON, J.P.; HOLZBAUR, E.L. Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. **Trends Cell. Biol.**, v. 16, p. 530-537, 2006.
- CHAGAS, A.C.S.; VIEIRA, L.S.; FREITAS, A.R.; ARAÚJO, M.R.A.; ARAÚJO-FILHO, J.A.; ARAGUÃO, W.R.; NAVARRO, A.M.C. Anthelmintic efficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and the homeopathic product Fator Vermes[®] in Morada Nova sheep. **Vet. Parasitol.**, v. 151, p. 68-73, 2008.
- CHARLES, T.P.; POMPEU, J.; MIRANDA, D.B. Efficacy of three broad-spectrum anthelmintics against gastrointestinal nematode infections of goats. **Vet. Parasitol.**, v. 34, p. 71-75, 1989.
- CHARTIER, C.; PORS, I.; HUBERT, J.; ROCHETEAU, D.; BENOIT, C.; BERNARD, N. Prevalence of anthelmintic resistant nematodes in sheep and goats in Western France. **Small Rumin. Res.**, v. 29, p. 33-41, 1998.
- CONDI, G.K.; SOUTELLO, R.G.V.; AMARANTE, A.F.T. Moxidectin-resistant nematodes in cattle in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 161, p. 213-217, 2009.
- CONDI, G.K. **Nematódeos gastrintestinais de bovinos de corte com resistência a moxidectina.** 2008. 42p. Dissertação (mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.
- COOP, R.L.; KYRIAZAKIS, I. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. **Trends Parasitol.**, v.17, p. 325-330, 2001.
- COSTA, C.T.C.; OLIVEIRA, L.M.B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; VIEIRA, L. S.; BEVILAQUA, C.M.L. Atividade anti-helmíntica de *Cocos nucifera* L. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SEGUNDO SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 15, 2008, Curitiba. **Anais...Paraná: CBPV, 2008. 1CD-ROM**

- CUNHA FILHO, L.F.C.; YAMAMURA, M.H. Resistência a anti-helmínticos em ovinos da região de Tamarana, Paraná, Brasil. **Unopar Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, Londrina, v. 1, p. 31-39, out. 1999.
- DRUDGE, J.H.; SZANTO, J.; WYATT, Z.N. Field studies on parasite control in sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. **Am. J. Vet. Res.**, v. 25, p.1512-1518, 1964.
- ECHEVARRIA, F.; BORBA, M.F.S.; PINHEIRO, A.C.; WALLER, P.J.; HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. **Vet. Parasitol**, v. 62, p. 199-206, 1996.
- FAIRWEATHER, I.; BORAY, J.C. Fasciolicides: Efficacy, actions, resistance and its management. **Vet. J.**, v. 158, p. 81-112, 1999.
- FERNANDES, L.H.; ZOCOLLER-SENO, M.C.; AMARANTE, A.F.T.; SOUZA, H.; BELLUZO, C.E.C. Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 56, n. 6, p. 733-740, 2004.
- FLEMING, J.T.; SQUIRE, M.D.; BARNES, T.M.; TORNOE, C.; MATSUDA, K.; AHNN, J.; FIRE, A.; et al., *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes lev-1, unc-29 e unc-38 encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. **J. Neurosci.**, v. 17, p. 5843-5857, 1997.
- GHISI, M.; KAMINSK, R.; MASER, P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. **Vet. Parasitol.**, v. 144, p. 313-320, 2007.
- GOPAL, R.M.; POMROY, W.E.; WEST, D.M. Resistance of field isolates of *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* to ivermectina **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 781-786, 1999.
- HERDY, R. Alopecia associada ao albendazol: relato de um caso. **Nac. Bras. Dermatol.**, , v. 75, p. 715-719, 2000.
- HOSKING, B.C.; DOBSON, D.P.; STEIN, P.A.; KAMINSKY, R.; BAPST, B.; MOSIMANN, D.; MASON, P.C.; SEEWALD, W.; STREHLAU, G.; SAGER, H. Dose confirmation studies for monepantel, an amino-acetonitrile derivative, against fourth stage gastro-intestinal nematode larvae infecting sheep. **Vet. Parasitol.**, v. 160, p. 251-157, 2009

- HOUDIJK, J.G.M., KYRIAZAKIS, I., JACKSON, F., HUNTLEY, J.F., COOP, R.L. Can in the increased intake of metabolisable protein affect the periparturient relaxation in immunity against *Teladorsagia circumcincta* in sheep? **Vet. Parasitol.**, v. 91, p. 43–62, 2000.
- KAMINSKY, R.; DUCRAY, P.; JUNG, M.; CLOVER, R.; RUFENER, L.; BOUVIER, J.; WEBER, S.S. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. **Nature**, v. 452, p. 176-180, 2008.
- KERBOEUF, D.; BLACKHALL, W.; KAMINSKY, R.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.V. P-glycoprotein in helminthes: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 3, p. 332-346, 2003.
- LANUSSE, C.E.; BALLENT, M.; LIFSCHITZ, A. Modulation of cellular drug efflux: impact on antiparasitic therapy. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SEGUNDO SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 15, 2008, Curitiba. **Anais...Paraná: CBPV, 2008. 1CD-ROM**
- LANUSSE, C.E. Bases farmacológicas de la resistencia antihelmintica. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 14, 2006, Ribeirão Preto. **Anais...São Paulo: CBPV, 2006, p. 168-169.**
- LE JAMBRE, L.F.; GEOGHEGAN, J.; LYNDAL-MURPHY, M. Characterization of moxidectin resistant *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. **Vet. Parasitol.**, v. 128, p. 83-90, 2005.
- LOVERIDGE, B.; MCARTHUR, M.; MCKENNA, P.B.; MARIADASS, B. Probable multigenic resistance to macrocyclic lactone anthelmintics in cattle in New Zealand. **N. Z. Vet. J.**, v. 51, n. 3, p. 139-141, 2003.
- LUBEGA, G.M.; PRICHARD, R.K. Interaction of benzimidazole anthelmintics with *Haemonchus contortus* tubulin – binding-affinity and anthelmintic efficacy. **Exp. Parasitol.**, v. 73, p. 203-213, 1991.
- MARTIN, R.J.; ROBERTSON, A.P. Mode of action of levamisole and pyrantel, anthelmintic resistance, E153 and Q57. **Parasitology**, v. 134, p. 1093-1104, 2007.
- MASON, P.C.; MACKAY, C.H. Field studies investigating anthelmintic resistance in young cattle on five farms in New Zealand. **N. Z. Vet. J.**, v. 54, n. 6, p. 318-322, 2006.

- MELO, A.C.F.L.; RONDON, F.C.M.; REIS, I.F.; BEVILAQUA, C.M.L. Desenvolvimento da resistência ao oxfendazol em propriedades rurais de ovinos na região do baixo e médio Jaguaribe, Ceará, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, n. 4, p. 137-141, 2004.
- MELO, A.C.F.L.; REIS, I.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; VIEIRA, L.S.; ECHEVARRIA, F.A. M.; MELO, L.M. Nematódeos resistentes a anti-helmínticos em rebanhos de ovinos e caprinos do Estado do Ceará, Brasil. **Ciênc. Rural**, v. 33, n. 2, p. 339-344, 2003.
- MILLER, D.K.; CRAIG, T.M. Use of anthelmintic combinations against multiple resistant *Haemonchus contortus* in Angora goats. **Small Rumin. Res.**, v.19, p.281-283, 1996.
- MOTTIER, M.L.; PRICHARD, R.K. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. **Pharmacogenet Genomics.**, v. 18, p. 129-140, 2008.
- PALCY, C.; SILVESTRE, A.; SAUVE, C.; CORTET, J.; CABARET, J. Benzimidazole resistance in *Trichostrongylus axei* in sheep: Long-term monitoring of affected sheep and genotypic evaluation of the parasite. **Vet. J.** (2008), doi:10.1016/j.tvjl.2008.09.012. POULIOT, J.F.; L'HEUREUX, F.; LIU, Z.; PRICHARD, R.K.; GEORGES, E. Ivermectin: Reversal of P-glycoprotein-associated multidrug resistance by ivermectin. **Biochem. Pharmacol.**, v. 53, p. 17-25, 1997.
- PRICHARD, R.K. Mechanisms of anthelmintic resistance: Implications for the future of parasite control. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SEGUNDO SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 15, 2008, Curitiba. **Anais...Paraná: CBPV, 2008. 1CD-ROM**
- PRICHARD, R.K. Ivermectin resistance and overview of the Consortium for Anthelmintic Resistance SNPs. **Expert Opin. Drug Discov.**, v. 2, p. S41-S52, 2007.
- PRICHARD, R.K.; ROULET, A. ABC transporters and β tubulina in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. **Parasitology**, v. 134, p. 1123-1132, 2007.
- RAMOS, C.I.; BELLATO, V.; AVILA, V.S. Gastrointestinal parasites resistance in sheep to some anthelmintics in Santa Catarina State, Brasil. **Ciênc. Rural**, v. 32, n. 3, p. 473-477, 2002.
- RICHMOND, J.E.; JORGENSEN, E.M. One GABA and two acetylcholine receptors function at the *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction. **Nat. Neurosci.**, v. 2, p. 791-797, 1999.
- ROBERTSON, A.P.; BJORN, H.E.; MARTIN, R.J. Resistance to lavamisole resolved at the single-channel level. **FASEB J.**, v. 13, p. 749-760, 1999.

- ROCHA, R.A.; BRESCIANI, K.D.S.; BARROS, T.F.M.; FERNANDES, L.H.; SILVA, M.B.; AMARANTE, A.F.T. Sheep and cattle grazing alternately: Nematode parasitism and pasture decontamination. **Small Rumin. Res.**, v. 75, p. 135-143, 2008.
- ROSALINSK-MORAIS, F.; MORRETO, L.H.; BRESOLIN, W.S.; GABRIELLI, I.; KAUFER, L.; ZANCHET, I.K.; SONAGLIO, F.; THOMAZ-SOCCOL, V. Resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos da região da associação dos municípios do Alto Irani (AMAI) oeste de Santa Catarina. **Ciênc. Anim. Bras.**, v. 8, n. 3, p. 559-565, 2007.
- SAMSON-HILMMELSTJERNA, G.; BLACKHALL, W.J.; McCARTHY, J.S.; SKUCE, P.J. Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes. **Parasitology**, v. 134, p. 1077-1086, 2007.
- SANGSTER, N.C.; SONG, J.; DEMELER, J. Resistance as a tool for discovering and understanding targets in parasite neuromusculature. **Parasitology**, v.131, p.179-190, 2005.
- SANGSTER, N.C. Managing parasiticide resistance. **Vet. Parasitol.**, v.98, p.89-109, 2001.
- SANTOS, V.T.; FRANCO, E.B.O. O aparecimento de *Haemonchus* resistente ao radical benzimidazole em Uruguaiana. In: LATIN AMERICAN CONGRES OF PARASITOLOGY, 1, 1967, Santiago. **Anais...** Santiago: p. 105-106.
- SARGINSON, N.D.; JACKSON, F.; BARTLEY, D.J.; WILSON, D.J.; STENHOUSE, L.J.; PENNY, C.D. Observations on the emergence of multiple anthelmintic resistance in sheep flocks in the south-east of Scotland. **Vet. Parasitol.**, v. 145, p. 65-76, 2007.
- SEQUEIRA, T.C.G.O.; AMARANTE, A.F.T. **Parasitologia Animal, Animais de Produção**. EPUB, Rio de Janeiro, 2002. 158 p.
- SMITH, W.D. Attempts to detect synergy between vaccination and anthelmintic against a drug resistant isolate of *Haemonchus contortus*. **Vet. Parasitol.**, v.148, p. 356-359, 2007.
- SOUTELLO, R.G.V.; ZOCOLLER-SENO, M.C.; AMARANTE, A.F.T. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 148, p. 360-364, 2007.
- SUAREZ, V. H.; CRISTEL, S. L. Anthelmintic resistance in cattle nematode in the western Patagonian Region of Argentina. **Vet. Parasitol.**, v. 144, p. 111-117, 2007.
- TAYLOR, M.A., HUNT, K.R., GOODYEAR, K.L. Anthelmintic resistance detection methods. **Vet. Parasitol.**, v. 103, p. 183-194, 2002.

- THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F.P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E.A.; MILCZEWSKI, V.; MOCELIN, G.; SILVA, M.C.P. Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 47, n. 1, p. 41-47, 2004.
- URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. **Parasitologia Veterinária**. 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1998. 161p.
- VAN WYK, J.A.; MALAN, F.S.; BATH, G.F. Rampant anthelmintic resistance in sheep in South Africa - what are the options? Workshop Managing anthelmintic resistance in endoparasites. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE WORLD ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 16, 1997, Sun City. **Anais...** Sun City: WAAVP, 1997a, p. 51-63.
- VAN WYK, J.A., MALAN, F.S., RANGLES, J.L. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? **Vet. Parasitol.**, v. 70, p. 111-122, 1997b.
- VELOSO, C.F.M.; HELDER, L.; KIMURA, E.A.; AZEVEDO, C.R.; ENOKI, D.R.; FRANÇA, L.D.; MCMANUS, C.M.; ARLETE DELL'PORTO, A.D.; SANTANA, A.P. Efeitos da suplementação protéica no controle da verminose e nas características de carcaça de ovinos Santa Inês. **Ciênc. Anim. Bras.**, v. 5, n. 3, p. 131-139, jul./set. 2004.
- VICKERS, M.; VENNING, M.; MCKENNA, P.B.; MARIADAS, B. Resistance to macrocyclic lactone anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* in sheep in New Zealand. **N. Z. Vet. J.**, v. 49, n. 3, p. 101-105, 2001.
- VIEIRA, L.S.; BERNE, M.E.A.; CAVALCANTE, A.C.R.; COSTA, C.A.F. *Haemonchus contortus* resistance to ivermectin and netobimin in Brazilian sheep. **Vet. Parasitol.**, v. 45, p. 111-116, 1992.
- WEST, D.M., POMROY, W.E., LEATHWICK, D.M. Multiple resistance in *Trichostrongylus* and *Teladorsagia* (*Ostertagia*) in goats to oxfendazole, levamisole and moxidectin, and inefficacy of trichlorphon. **N. Z. Vet. J.** 52, 298-299, 2004.
- WOLSTENHOLME, A.J.; ROGERS, A.T. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. **Parasitology**, v. 131, p. S85-S96, 2005.

WOLSTENHOLME, A.J.; FAIRWEATHER, I.; PRICHARD, R.; SAMSONHIMMELSTJERNA, G.V.; SANGSTER, N.C. Drug resistance in veterinary helminthes. **Trends Parasitol.**, v.20, p.469-476, 2004.

XU, M.; MOLENTO, M.; BLACKHALL, W.J.; RIBEIRO, P.; BEECH, R.; PRICHARD, R.K. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 91, p. 327-335, 1998.

CAPÍTULO 2²

² Neste capítulo consta o artigo “Resistance of isolates of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* to six anthelmintics” que foi enviado a revista *Veterinary Parasitology* para publicação.

Resistance of isolates of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* to six anthelmintics

F. A. Almeida, K. C. O. D. Garcia, A. F. T. Amarante*

UNESP - Universidade Estadual Paulista, Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências, Caixa Postal 510, Botucatu, SP, CEP 18618-000, Brazil.

* Corresponding author. Tel: +55 14 3811 6239; fax: +55 14 3815 3744.

E-mail: amarante@ibb.unesp.br

Abstract

The objective of this study was to determine the efficacy of levamisole, albendazole, ivermectin, moxidectin, closantel and trichlorfon, against *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* isolates. Forty-two lambs of the Santa Ines breed, at three months of age, were simultaneously artificially infected with 4000 infective *H. contortus* larvae (L3) and 4000 *T. colubriformis* L3. The animals were divided into seven groups with six animals each that received one of the following treatments: Group 1 - control, no treatment; Group 2 - moxidectin (0.2 mg/kg body weight (BW), Cydectin[®], Fort Dodge); Group 3 - closantel (10 mg/kg BW, Zuletel[®] Oral); Group 4 - trichlorfon (100 mg/kg BW, Neguvon[®], Bayer); Group 5 – levamisole phosphate (4.7 mg/kg BW, Ripercol[®], Fort Dodge); Group 6 - albendazole (5.0 mg/kg BW, Valbazen[®], Pfizer); and Group 7 - treated with ivermectin (0.2 mg/kg BW, Ivomec[®], Merial). Fecal samples from each animal were collected on the treatment day and again at 3, 7, 10 and 14 days later, and were processed for nematode fecal egg counts (FEC) and fecal cultures for the production and subsequent identification of L3. The animals were sacrificed 14 days after

treatment for collection and quantification of the worms in the abomasum and small intestine. The efficacy of the treatments was calculated from the arithmetic mean of the FEC or worm burden of the treated groups, compared with the values of the control group. The percentage reductions in *H. contortus* worm burdens were 17% for albendazole, 10% for levamisole, 45% for moxidectin, 20% for ivermectin, 23% for closantel and 73% for trichlorfon. Reductions for *T. colubriformis* were 19% for albendazole, 28% for ivermectin, 82% for moxidectin and 0% for levamisole, closantel and trichlorfon. The fecal examination was not effective for the detection of resistance to *T. colubriformis*, since *T. colubriformis* L3 were not detected in most of the fecal cultures after treatment with closantel, levamisole, moxidectin or ivermectin. *H. contortus* L3 were found in fecal cultures of all groups and in all collections. As compared to the control group, females of *T. colubriformis* demonstrated a significant reduction ($P < 0.05$) in the average number of eggs in their uterus at 14 days after treatment with albendazole, trichlorfon, levamisole or moxidectin. In contrast, anthelmintic treatments had no significant effect on *H. contortus* fecundity. In conclusion, the isolates of *H. contortus* and *T. colubriformis* studied were resistant to all anthelmintics tested.

Keywords: Anthelmintic resistance; albendazole; closantel; ivermectin; levamisole; moxidectin; trichlorfon

1. Introduction

The emergence of nematode populations with multiple resistance to anthelmintics has reduced the options for the chemical prophylaxis of gastrointestinal nematode infections in sheep. Some authors have characterized the degree of resistance of nematode isolates to different classes of anthelmintics. Bartley et al. (2004; 2005) described the resistance to ivermectin, levamisole

and febendazole of two isolates of *Teladorsagia circumcincta* from sheep at two farms in Scotland. Le Jambre et al. (2005) characterized the resistance to moxidectin in *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* in Australia.

These resistant isolates are useful in studies aimed at understanding the genetic and biochemical mechanisms related to the survival of parasites exposed to drugs. James and Davey (2009) demonstrated that an increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectina resistance in *Caenorhabditis elegans*. Other authors have also used resistant isolates of nematodes in their investigations on the mechanisms involved in anthelmintic resistance (Robertson et al., 1999; Neuve, et al., 2007). In order for such studies to be carried out, it is essential to characterize the degree of resistance of such nematode isolates to anthelmintics.

In this study, the degree of resistance of *H. contortus* and *T. colubriformis* to six anthelmintics was characterized by a controlled efficacy test (worm burden determination after necropsy) and fecal egg count reduction test (FECRT). The nematodes studied were originally isolated from sheep, naturally infected with gastrointestinal nematodes, and raised in São Paulo State, Brazil.

2. Material and Methods

2.1. Experimental description

Forty two Santa Ines lambs, aged three months, were kept indoors and used in this experiment. After weaning, with approximately 60 days of age, the animals were treated with albendazole (15 mg/kg body weight (BW), Valbazen[®], Pfizer) and levamisole (10 mg/kg BW, Ripercol[®], Fort Dodge), orally, for three consecutive days, to remove any natural infection by nematodes. After this treatment, fecal samples were collected, weekly, directly from the rectum of the animals, for fecal examination to confirm their worm-free status.

The worm-free lambs received 4000 infective larvae (L3) of *H. contortus* and 4000 L3 of *T. colubriformis*, on the same day, orally. Twenty-six days after infection, nematode fecal egg counts (FEC) were carried out and the lambs allocated to groups using stratified random assignment, based on FEC. The groups were: Group 1 - untreated control; Group 2 - treated with injectable moxidectin (0.2 mg/kg BW, Cydectin[®], Fort Dodge, Brazil); Group 3 - treated orally with closantel (10 mg/kg BW, Zuletel[®], Microsules Laboratories, Uruguay); Group 4 - treated orally with trichlorfon (100 mg/kg BW, Neguvon[®], Bayer, Brazil); Group 5 - treated with injectable levamisole phosphate (4.7 mg/kg BW, Ripercol[®], Fort Dodge, Brazil); Group 6 - treated orally with albendazole (5.0 mg/kg BW, Valbazen[®], Pfizer, Brazil); and Group 7 - treated with injectable ivermectin (0.2 mg/kg of BW, Ivomec[®], Merial, Brazil). Animals were treated with each anthelmintic, according to the manufacturer's instructions.

Fecal samples from each animal were collected on the treatment day and again at 3, 7, 10 and 14 days later. Samples were individually processed for FEC by a modified McMaster technique, where each egg counted represented 100 eggs/g (Ueno and Gonçalves, 1998). Composite fecal cultures were prepared for obtaining and identifying third stage larvae for each group (Ueno and Gonçalves, 1998).

At 14 days after treatment, all animals from the 7 groups were sacrificed for removal of the abomasum and small intestine. Material collection for parasitological analyses and the quantification and identification of nematode species was carried out according to the descriptions of Ueno and Gonçalves (1998). Samples with 10% of the abomasum and small intestine content were preserved in 5% formaldehyde and stored in identified containers. The abomasum and small intestine were digested in saline solution for 4 hours. A 10% sample of the intestinal digested material and the total digestion of abomasum were collected and also preserved in formaldehyde.

2.2. Evaluation for the presence of eggs inside the uteri of adult females of *H. contortus* and *T. colubriformis*.

The eggs in the uteri of females of *H. contortus* and *T. colubriformis* were quantified to evaluate the influence of anthelmintics on the fecundity of females. Twenty specimens of *T. colubriformis* were obtained from each animal and counting of eggs inside the uterus was performed using an optical microscope. For the enumeration of eggs of *H. contortus*, five females were analyzed per animal. In order to estimate the number of eggs/worm, each female was placed in a tube containing 1 ml of distilled water and fragmented with a Workcenter T10 basic disperser (IKA, Japan). The sample was homogenized in a vortex, and eggs were counted over a slide in an optical microscope in five drops of 10 μ l. The total number of eggs inside each *H. contortus* female was then estimated.

2.3. Isolates evaluated and acquisition of infective larvae (L3)

The infective larvae of *H. contortus* that were used in the experiment were from an isolate of the species, obtained in May 2006 from two sheep raised on a property located in Pratânia - Brazil (Silva et al., 2008). For the isolation of the species, the authors treated the animals with moxidectin (0.2 mg/kg, Cydectin[®], Fort Dodge), and found that seven days after treatment the animals had increased OPG with only *H. contortus* L3 produced in fecal cultures, indicating resistance of the isolate to moxidectin. The *H. contortus* isolate has been kept since that occasion in donor lambs artificially infected with the parasite.

The infective larvae of *T. colubriformis* were obtained from sheep reared in Botucatu - Brazil (Rocha et al., 2007). For the isolation of the species, the authors treated the sheep that were naturally infected with *H. contortus* and *T. colubriformis* with trichlorfon (100 mg/kg BW, Neguvon[®], Bayer). Only *T. colubriformis* larvae were produced in fecal cultures of these sheep,

which were used to infect donor lambs. Infective larvae, recovered from fecal cultures from these animals, were frozen in liquid nitrogen on 22 October, 2003 and thawed in January, 2004 and used to infect two donor animals used in another trial. In April, 2005 infective larvae from fresh fecal cultures were frozen again. In September, 2007 the larvae, that were frozen in April, 2005, were thawed and used to infect donor sheep. Since that occasion until the realization of the present trial, the isolate had been kept in two donor lambs.

The donors lambs infected with *T. colubriformis* or *H. contortus* were kept in separate pens and no cross-infection was observed. The infective larvae produced in fecal cultures were stored in distilled water for a maximum of 30 days to subsequent infection of experimental animals.

2.4. Statistical analysis

The statistical analysis was carried out using the RESO software as recommended by Coles et al. (1992). Fecal egg count reduction (FECR) was calculated through the following formula: $FECR (\%) = 100 (1 - \text{arithmetic mean FEC of the treated group} / \text{arithmetic mean FEC of the control group})$. Presence of anthelmintic resistance was confirmed by a FECR of lower than 95% and an inferior limit of the confidence interval of lower than 90%. The same calculation was used for the worm burden.

Significant differences between groups for eggs present in females of *T. colubriformis* and *H. contortus* were assessed by one-way analysis of variance using the statistical software, Minitab 11.21 (Minitab Inc., USA). Group means were compared using the Tukey test at $P < 0.05$.

3. Results

The values of the FECR and percentages of infective larvae of *H. contortus* and *T. colubriformis* observed after treatment with anthelmintics are shown in Table 1. Results for FECRT showed that none of the anthelmintics were effective. The anthelmintic that showed the greatest efficacy was trichlorfon, which presented 72% of FECR at seven days after treatment. The variation of the efficacy of albendazole was from 0 to 12%; levamisole from 0 to 11%; moxidectin from 14 to 58%; ivermectin from 0 to 5%; trichlorfon from 48 to 72% and closantel from 0 to 34%. *H. contortus* L3 were found in fecal cultures of all groups and in all collections, while *T. colubriformis* L3 were not detected in most of the fecal cultures after the treatment with closantel, levamisole, moxidectin or ivermectin (Table 1).

In the controlled efficacy test, the anthelmintic that showed the greatest efficacy (73%) against *H. contortus* was trichlorfon (Table 2). The efficacy of other anthelmintics was 17% for albendazole, 10% for levamisole, 45% for moxidectin, 20% for ivermectina and 23% for closantel. Moxidectin was the most effective against the *T. colubriformis*, with 82% of efficacy. The efficacies of the other anthelmintics were 28% and 19%, respectively, for ivermectin and albendazole and 0% for levamisole, closantel and trichlorfon.

Eggs were present inside the uteri of all females of *H. contortus* and there was no significant reduction in the number of eggs in the groups treated with anthelmintics, in comparison with the control group (Table 3). The highest mean number of eggs in females of *T. colubriformis* was found in the group treated with closantel, followed by control and ivermectin groups, with 20.8, 20.0 and 18.4 eggs, respectively (Table 3). Compared with the control group, the females from the groups treated with albendazole (17.8 eggs), trichlorfon (17.6 eggs), levamisole (16.6 eggs) and moxidectin (15.5 eggs) showed significant reductions ($P < 0.05$) in the mean numbers of eggs inside the uterus.

4. Discussion

A previous FECRT indicated (Amarante et al., 1992) the presence of *Haemonchus* spp. with resistance to ivermectin, levamisole and oxfendazol in the same sheep flock, where the isolate of *H. contortus* was obtained. As such, this study confirmed that the *Haemonchus* from that farm was ivermectin and levamisole resistant. Silva et al. (2008) isolated *H. contortus* of sheep from the same property, studied by Amarante et al. (1992), after treating two lambs with moxidectin. Therefore, the population of *H. contortus* studied in this trial descends from parasites that survived treatment with moxidectin.

For this reason, a higher degree of resistance to moxidectin was expected; however this drug showed a 45% efficacy, considered relatively high, i.e., approximately 55% of the parasites survived treatment. Waller et al. (1988) suggested that resistant parasites may have a decrease in fitness compared to susceptible parasites, when the drug is absent. In contrast, Maingi et al. (1990) reported that an isolate of *H. contortus*, susceptible to thiabendazole, showed a greater efficiency in the establishment, survival and reproduction rate, compared to a population that had a moderate level of resistance. Probably, the *H. contortus* population studied in the present trial was not homozygous for genes that confer resistance. Possibly, the heterozygous individuals showed reproductive advantage and generated a progeny that were susceptible to moxidectin.

The mechanism of macrocyclic lactone resistance may be complex. There is substantial and accumulative evidence that macrocyclic lactone select for changes in sequence and/or expression of some ABC transporters, such as P-glycoprotein (Pgp). Nematodes have a great diversity of ABC transporter genes in comparison with mammals. Furthermore, different macrocyclic lactone may select for different effects on ABC transporter genes (reviewed by Prichard and Roulet, 2007). Ivermectin and moxidectin treatments select for a constitutive or inducible over expression of at least five Pgp in adults of *H. contortus*. This constitutive over expression could be the result

of mutations in the regulatory sequences of the Pgp genes (Prichard and Roulet, 2007). It is possible that such physiological changes have a cost in terms of fitness of resistant parasites leading to the selection of genetically susceptible nematodes in the absence of the drug, which could explain the occurrence of moxidectin-susceptible *H. contortus* parasites in the isolate studied in the present trial.

Similarly to the present study, the field resistance of *H. contortus* to ivermectin (Vickers et al., 2001; Miller and Craig, 1996, Echevarria et al., 1996), moxidectin (Vickers et al., 2001, Echevarria et al., 1996), benzimidazoles, levamisole (Echevarria et al., 1996; Miller and Craig 1996) and closantel (Echevarria et al., 1996) has also been reported in other studies. Since trichlorfon is usually not used by farmers due to its high toxicity, this was the anthelmintic that showed the greatest efficacy (73%) against *H. contortus* isolate. Similarly, trichlorfon showed an efficacy of 78.6% against *H. contortus* in South Africa (Van Wyk et al., 1997).

T. colubriformis isolate was found to be as resistant to the anthelmintics tested as the *H. contortus* isolate. Resistance of *T. colubriformis* to ivermectin, based on the controlled efficacy test, has also been reported by Gopal et al. (1999) in New Zealand and Alka et al. (2004) in India. Le Jambre et al. (2005) found *T. colubriformis* resistant to moxidectin in Australia. This is the first report, based on the controlled efficacy test, to show resistance of *T. colubriformis* to macrocyclic lactones in Brazil. It is possible that this resistance of *T. colubriformis* is largely disseminated in sheep flocks around the country and has been overlooked due to the fact that this species occurs in mix-infected animals, together with *H. contortus*, a nematode that produces a much higher number of eggs and, consequently, a larger number of third stage larvae in fecal cultures. As expected, the narrow spectrum anthelmintics, closantel and trichlorfon, did not show effectiveness against *T. colubriformis*. These anthelmintics do not have a registered claim against *T. colubriformis* in sheep.

The low efficacy of albendazole and levamisole against *T. colubriformis* may have occurred partly due to their use at a low dosage in the present trial. However, Amarante et al. (1992) and Thomaz-Soccol et al. (2004) found resistance of *Trichostrongylus* spp. to levamisole using a higher dosage (7.5 mg/kg). Echevarria et al. (1996) also observed resistance of *Trichostrongylus* spp. to albendazole (3.8 mg/kg) and levamisole (5.8 mg/kg).

According to the present results, the females of *T. colubriformis* in groups treated with moxidectin, levamisole, albendazole and trichlorfon were less fecund in comparison with the control group. Condi et al. (2009), testing moxidectin; Jackson (1993), testing ivermectin; Tyrrel et al. (2002), testing ivermectin and moxidectin; and Scott et al. (1991), testing oxfendazol and ivermectin, also found a negative influence of anthelmintic treatment on fecundity in females of gastrointestinal nematodes.

The same was not observed in females of *H. contortus*, the average number of eggs in treated groups was similar to that found in the control group. Scott et al. (1991), in an isolate of *H. contortus* resistant to benzimidazole, ivermectin and salicylanides, found a negative influence of the anthelmintic on fertility of females at 24 to 72 hours after treatment with ivermectin, and at 48 to 168 hours after treatment with oxfendazole. Females of *H. contortus* evaluated in the present study were recuperated from the abomasum of animals at 14 days after treatment. At this time, it is possible that the anthelmintics had no further negative influence on *H. contortus* female fecundity.

The most commonly employed *in vivo* test for the diagnosis of nematode resistance is the FECRT, because the controlled test (determination of parasite worm burden after necropsy) is time consuming and very expensive. In this study, the controlled test showed the highest accuracy in detecting resistance, especially with regards to *T. colubriformis*. According the FECRT, *T. colubriformis* showed susceptibility to almost all anthelmintics, a result that proved to

be false according to the controlled test. This was evidenced primarily by the group treated with levamisole, where the FECRT showed that the worms were susceptible, while the controlled test proved the isolates to be highly resistant.

The low efficiency in the detection of resistance by FECRT may be explained by the inability to evaluate the suppression in egg production after treatment, as observed in this study and by other authors (Condi et al., 2009; Tyrrel et al., 2002; Jackson, 1993). Since the animals were infected with both nematodes, *H. contortus* may also have masked the presence of L3 of *T. colubriformis* in fecal cultures; according to Ueno and Gonçalves (1998) the daily egg production by females of *H. contortus* is much greater than that of *T. colubriformis*, being 5000 and 200 eggs, respectively.

Understanding the mechanisms of anthelmintic resistance and characterization of isolates of parasites becomes essential for the correct use of the drugs. Other trials using higher doses of albendazole and levamisole, or the use of combinations of drugs are recommended to better assess the resistance of the isolates studied here and also to try to find efficacious formulations against resistant parasites.

The isolates studied here, named *H. contortus* Pratânia and *T. colubriformis* Botucatu, may constitute useful tools for the development of new anthelmintics and also for the understanding of the genetic, biochemical and physiological mechanisms involved in anthelmintic resistance.

Acknowledgements

The authors would like to thank the technical assistance of Raquel A. Rocha, Bruna F. Silva and Michelle C. Santos. Fabiana A. Almeida received financial support from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Keila C. O. D. Garcia from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and Alessandro F. T.

Amarante from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

References

- Alka, Gopal, R.M., Sandhu, K.S., Sidhu, P.K., 2004. Efficacy of abamectin against ivermectina-resistant strain of *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.* 121, 277-283.
- Amarante, A.F.T., Barbosa, M.A., Oliveira, M.A.G., Carmello, M.J., Padovani, C.R., 1992. Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e levamisol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 29, 31-38.
- Bartley, D.J., Jackson, E., Sargison, N., Jackson, F., 2005. Further characterization of a triple resistant field isolate of *Teladorsagia* from a Scottish lowland sheep farm. *Vet. Parasitol.* 134, 261-266.
- Bartley, D.J., Jackson, E., Jackson, F., Sargison, N., 2004. Characterization of two triple resistant field isolates of *Teladorsagia* from Scottish lowland sheep farm. *Vet. Parasitol.* 123, 189-199.
- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J., 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44, 35-44.
- Condi, G.K., Soutello, R.G.V., Amarante, A.F.T., 2009. Moxidectin-resistant nematodes in cattle in Brazil. *Vet. Parasitol.* 161, 213-217.
- Echevarria, F., Borba, M.F.S., Pinheiro, A.C., Waller, P.J., Hansen, J.W., 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. *Vet. Parasitol.* 62, 199-206.
- Gopal, R.M., Pomroy, W.E., West, D.M., 1999. Resistance of field isolates of *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* to ivermectina. *Int. J. Parasitol.* 29, 781-786.

- Jackson, F., 1993. Anthelmintic resistance – the state of play. *Brit. Vet. J.* 149, 123-138.
- James, C.E., Davey, M.W., 2009. Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. *Int. J. Parasitol.* 39, 213-220.
- Le Jambre, L.F., Geoghegan, J., Lyndal-Murphy, M., 2005. Characterization of moxidectin resistant *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 128, 83-90.
- Maingi, N., Scott, M.E., Prichard, R.K., 1990. Effects of selection pressure for thiabendazole resistance on fitness of *Haemonchus contortus* in sheep. *Parasitology.* 100, 327-335.
- Miller, D.K., Craig, T.M., 1996. Use of anthelmintic combinations against multiple resistant *Haemonchus contortus* in Angora goats. *Small Rumin. Res.* 19, 281-283.
- Neuve, C., Charvet, C., Fauvin, A., Cortet, J., Castagnone-Sereno, P., Cabaret, J., 2007. Identification of levamisole resistance markers in the parasitic nematode *Haemonchus contortus* using a cDNA – AFLP approach. *Parasitology.* 134, 1105-1110.
- Prichard, R.K., Roulet, A., 2007. ABC transporters and β -tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospect for marker development. *Parasitology.* 134, 1123-1132.
- Scott, E.W., Baxter, P., Armour, J., 1991. Fecundity of anthelmintic resistant adult *Haemonchus contortus* after exposure to ivermectin or benzimidazoles in vivo. *Res. Vet. Sci.* 500, 247-249.
- Robertson, A.P., Bjorn, H.E., Martin, R.J., 1999. Resistance to levamisole resolved at the single-channel level. *FASEB J.* 13, 749-760.
- Rocha, R.A., Bricarello, P.A., Rocha, G.P., Amarante, A.F.T., 2007. Recuperação de larvas de *Trichostrongylus colubriformis* em diferentes estratos de *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 16, 77-82.

- Silva, B.F., Amarante, M.R.V., Kadri, S.M., Carrijo-Mauad, J.R., Amarante, A.F.T., 2008. Vertical migration of *Haemonchus contortus* third stage larvae on *Brachiaria decumbens* grass. *Vet. Parasitol.* 158, 85-92.
- Thomaz-Soccol, V., Souza, F.P., Sotomaior, C., Castro, E.A., Milczewski, V., Mocelin, G., Silva, M.C.P., 2004. Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 47, 41-47.
- Tyrrell, K.L., Dobson, R.J., Stein, S.W., Walkden-Brown, S.W., 2002. The effects of ivermectin and moxidectin on egg viability and larval development of ivermectin-resistant *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 107, 85-93.
- Ueno, H., Gonçalves, P.C., 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4 ed. 143pp. Tokyo: Japan International Cooperation Agency.
- Van Wyk, J.A., Malan, F.S., Randles, J.L., 1997. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? *Vet. Parasitol.* 70, 111-122.
- Vickers, M., Venning, M., McKenna, P.B., Mariadas, B., 2001. Resistance to macrocyclic lactone anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* in sheep in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 49, 101-105.
- Waller, P.J., Dobson, R.J., Axelsen, A., 1988. Anthelmintic resistance in the field: Changes in resistance status of parasitic populations in response to anthelmintic treatment. *Aust. Vet. J.* 65, 12, 376-379.

Table 1

Mean nematode fecal egg count (FEC), fecal egg count reduction (FECR) and mean percentage of third stage larvae (L3) of the *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* after treatment of lambs with albendazole, levamisole, moxidectin, ivermectin, closantel or trichlorfon.

Groups	Days after treatment				
	0	3	7	10	14
Control (n=6)	6117	6733	7533	4225	9250
Albendazole (n=6)	5050	6267	6667	5667	8300
Levamisole (n=6)	7417	5983	7783	7667	10550
Moxidectin (n=6)	4100	4300	4033	3650	3867
Ivermectin (n=6)	4917	9100	7950	7717	8833
Trichlorfon (n=6)	7983	2117	2133	2183	2733
Closantel (n=6)	4517	6292	7067	4583	6067
FECR (%)					
Albendazole		7% (42, -50)	12% (57, -82)	0% (19, -122)	10% (44, -43)
Levamisole		11% (37, -26)	0% (41, -81)	0% (-8, -205)	0% (32, -92)
Moxidectin		36% (68, -29)	46% (69, 7)	14% (47, -41)	58% (79, 16)
Ivermectin		0% (40, -205)	0% (42, -92)	0% (-1, -232)	5% (48, -77)
Trichlorfon		69% (84, 40)	72% (82, 54)	48% (67, 19)	70% (84, 47)
Closantel		7% (57, -101)	6% (65, -151)	0% (59, -186)	34% (67, -32)
<i>Haemonchus contortus</i> L3					
Control	89%	91%	99%	90%	92%
Albendazole	60%	91%	100%	96%	96%
Levamisole	74%	91%	100%	100%	100%
Moxidectin	88%	96%	100%	99%	100%
Ivermectin	71%	100%	100%	100%	100%
Trichlorfon	85%	91%	87%	86%	99%
Closantel	86%	100%	100%	81%	97%
<i>Trichostrongylus colubriformis</i> L3					
Control	11%	9%	1%	10%	8%
Albendazole	40%	9%	0%	4%	4%
Levamisole	26%	9%	0%	0%	0%
Moxidectin	12%	4%	0%	1%	0%
Ivermectin	29%	0%	0%	0%	0%
Trichlorfon	15%	9%	13%	14%	1%
Closantel	14%	0%	0%	19%	3%

FECR (%) = 100 x (1 – treated group mean/control group mean). Upper confidence interval limit (95%) and lower confidence interval limit (95%) are in parenthesis.

Table 2

Worm burden 14 days after treatment of lambs with albendazole, levamisole, moxidectin, ivermectin, trichlorfon or closantel. Control and treated groups with 6 animals each.

Species	Group						
	Control	Albendazole	Levamisole	Moxidectin	Ivermectin	Trichlorfon	Closantel
<i>Haemonchus contortus</i>	1454	1099	1597	1101	1568	405	634
	1700	1388	1126	839	545	549	778
	1437	1037	1522	249	883	588	1395
	1626	1009	1684	1145	1867	691	1452
	1568	1777	1329	1195	1568	222	1333
	1816	1699	1385	769	1236	167	1798
	Mean \pm SEM	1600 \pm 59.5	1335 \pm 139	1441 \pm 83	883 \pm 145	1278 \pm 201	437 \pm 86
Efficacy		17% (34, -5)	10% (22, -4)	45% (61, 21)	20% (43, -12)	73% (82, 58)	23% (44, -6)
<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	1058	930	2560	180	1230	2330	30
	1360	1670	1940	10	20	1410	2500
	1230	900	1860	810	1570	2040	930
	1560	980	2350	220	1630	1640	2850
	1380	1350	1410	410	1280	1360	2660
	2250	1360	1510	0	620	1740	1770
	Mean \pm SEM	1473 \pm 170	1198 \pm 127	1938 \pm 185	272 \pm 124	1058 \pm 254	1753 \pm 153
Efficacy		19% (41, -13)	0% (4, -80)	82% (93, 50)	28% (59, -26)	0% (12, -61)	0% (32, -118)

Efficacy (%) = 100 x (1 – treated group mean/control group mean). Upper confidence interval limit (95%) and lower confidence interval limit (95%) are in parenthesis.

SEM = Standard error of the mean.

Table 3

Average number (\pm standard error mean) of eggs in the uteri of females of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*, recovered 14 days after treatment of sheep with albendazole, levamisole, ivermectin, moxidectin, trichlorfon or closantel.

Groups	Species	
	<i>Haemonchus contortus</i>	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>
Control	378.0 \pm 47.5 a	20.0 \pm 0.53 ab
Albendazole	404.7 \pm 44.3 a	17.8 \pm 0.35 cd
Levamisole	371.3 \pm 34.8 a	16.6 \pm 0.71 cd
Ivermectin	514.7 \pm 47.8 a	18.4 \pm 0.58 bc
Moxidectin	556.7 \pm 62.5 a	15.5 \pm 0.41 d
Trichlorfon	422.0 \pm 46.9 a	17.6 \pm 0.56 cd
Closantel	452.0 \pm 42.3 a	20.8 \pm 0.57 a

Means that share the same letter are not significantly different at $\alpha=5\%$, by Tukey test.

ANEXO