

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE *Haemonchus contortus* AO GRUPO DOS BENZIMIDAZÓIS EM OVINOS E CAPRINOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL

(Molecular diagnostic of *Haemonchus contortus* resistance to the benzimidazole group in sheep and goats in the state of Pernambuco, Brazil)

Rodolfo Luiz Godoy do Amaral^{1*}, Neurivan Ramos Guerra¹, Ivanise Maria de Santana¹, Yanise Chicoy-Ramirez², Amilcar Arenal², Marilene Maria de Lima³, Lêucio Câmara Alves¹, Marcelo Beltrão Molento⁴ e Maria Aparecida da Gloria Faustino¹

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos. Recife, PE, Brasil. CEP: 52.171-900. ²Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Camaguey. Circunvalacion Norte km 5. Camaguey, Cuba. 74650. ³Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade de Serra Talhada, UFRPE. Avenida: Gregório Ferraz Nogueira, s/n. Serra Talhada, PE, Brasil. CEP: 56.909-535. ⁴Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, UFPR. Rua dos Funcionários, 1540. Curitiba, PR, Brasil. CEP: 80.035-050.

*Autor para correspondência: godoyrodolfo@hotmail.com

Editora: Julia Arantes Galvão

RESUMO - Ovinos e caprinos sofrem grande prejuízo clínico provocados pela alta prevalência de parasitos gastrintestinais, principalmente pelo nematoda *Haemonchus contortus*. Este parasito causa alta morbidade e mortalidade, entretanto, o uso indiscriminado de fármacos para seu controle tem provocado a seleção de populações resistentes. O diagnóstico molecular da resistência ao grupo dos benzimidazóis (BZs) é muito importante para indicar estratégias substitutivas de manejo e controle. O objetivo deste estudo foi determinar pela primeira vez, a presença da mutação na posição F200Y do isotipo 1 do gene da beta-tubulina, em sete populações de *H. contortus* de ovinos e caprinos no estado de Pernambuco, Brasil. Amostras de DNA foram extraídas de 20 machos adultos, obtidos de animais naturalmente parasitados, em propriedades de Recife, Sairé, Camocim de São Félix, Gameleira, Moreno, Bonito e Serra Talhada. Os iniciadores *forward*: 5' AAT GCT ACC CTT TCC GTC CAT C 3' e *reverse*: 5' CAA AAC CGG GCA TGA AGA AG 3' foram utilizados para a pesquisa da principal mutação no gene da beta-tubulina, para determinar a resistência ao grupo dos BZs. Os iniciadores NC1/ITS-2, *forward*: 5' ACG TCT GGT TCA GGG TTG TT 3' e *reverse*: 5' TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT 3' foram usados para a confirmação de *H. contortus*. Um questionário foi utilizado para obtenção de informações sobre práticas de manejo, incluindo a frequência de uso dos BZs. As sequencias NC1/ITS-2 confirmaram a presença de *H. contortus* em todas as populações. A mutação F200Y responsável pela resistência (TTC/TAC) de *H. contortus* ao BZ, foi encontrada na amostra proveniente de Sairé, sendo que a proporção do códon TTC variou entre 55.6 a 85.7%. Relativo ao questionário, todos os produtores revelaram ausência de quarentena para os animais recém-adquiridos; alta frequência de aplicação de anti-helmínticos (60 em 60 dias); tratamento de todo o rebanho; estimativa visual do peso dos animais para cálculo da dosagem do medicamento; e alta rotação de anti-helmínticos. Foi relatado ainda, a carência de assistência técnica especializada, sem exame rotineiro de fezes nos animais. Muito embora, todos estes fatores possam ser fundamentais para aumentar a pressão de seleção parasitária, não foi possível determinar qual deles poderia representar um ou mais fatores de risco, devido ao grande número de variáveis e o baixo número de respondentes. Esta é sem dúvida uma grande dificuldade para correlacionar os dados fenotípicos de eficácia (ex. TRCOF), com os marcadores genotípicos (ex. PCR) de resistência em helmintos. Foram incluídos os

Recebido em 28/01/2021

Aprovado em 08/09/2021



fatores de risco relatados por criadores de Pernambuco e sua influência nos processos de seleção anti-helmíntica, assim como estratégias para mitigar esta situação. Os dados apresentados são o primeiro registro molecular da mutação F200Y que confere resistência ao grupo dos BZs em pequenos ruminantes no estado de Pernambuco, Brasil.

Palavras-chave: biotecnologia; helmintos; PCR; pequenos ruminantes; resistência anti-helmíntica.

ABSTRACT - Sheep and goats suffer heavy losses due to the high prevalence of gastrointestinal nematodes, mainly from the nematode *Haemonchus contortus*. The parasite causes high morbidity and mortality, even though, the indiscriminate use of chemicals to control *H. contortus* has favored the selection of multidrug resistance parasites. Molecular diagnosis of resistance to the benzimidazole (BZs) group is important to indicate substitute strategies of control. The aim of this study was to determine the presence of the mutation at position F200Y of the beta-tubulin gene in seven populations of *H. contortus* from sheep and goats' farms from the state of Pernambuco, Brazil. Twenty adult *H. contortus* male worms were recovered for DNA extraction from naturally infected animals, from farms from Recife, Sairé, Camocim de São Félix, Gameleira, Moreno, Bonito, and Serra Talhada. The primers forward: 5' AAT GCT TCC ACC CTT GTC CAT C 3', and reverse: 5' CAA CAA CGG GCA TGA AGA AG 3' were used to search for the main codon (F200Y) of the beta-tubulin gene to determine BZ resistance. The NC1/ITS-2 forward: 5' ACG TCT GGT TCA GGG GTT TT 3' and reverse: 5' TTA TCT GTT TTT CCT GCC CT 3' primers were used for confirming *H. contortus* species. A questionnaire was applied to obtain information on management practices, including the frequency of BZs use. The sequences from the NC1/ITS-2 confirmed the presence of *H. contortus* from all samples. The F200Y mutation responsible for BZ resistance (TTC/TAC) in *H. contortus* was found only in the samples from Sairé, as the TTC codon varied from 55.6 to 85.7%. In relation to the questionnaire, producers revealed the absence of quarantine for newly arrived animals; high drug treatment frequency (60-days interval); treatment of the whole flock; the visual estimation of the weight of the animals for dose determination; and high drug rotation. It was also mentioned the lack of veterinary assistance with no use of fecal exams. Even though, all these factors may be essential to increase parasite selection pressure, it was not possible to determine which of those showed a higher risk due to the high number of variables and the small number of participants. This is without any doubt one of the great difficulties to correlate phenotypic drug efficacy data (ex. FECRT) and genotypic-related (ex. PCR) resistance markers in helminths. We have included some risk factors reported by the farmers from Pernambuco and their influences in the process of drug selection, as well as a few strategies to mitigate this situation. The present report constitutes the first record of a molecular diagnosis of the mutation F200Y that confers resistance to the BZ group in ruminants in the state of Pernambuco, Brazil.

Keywords - biotechnology; helminths; PCR; small ruminants; anthelmintic resistance.

INTRODUÇÃO

Helmintos gastrintestinais são um dos principais problemas sanitários em pequenos ruminantes, em diversas regiões do mundo. A ampla prevalência destes parasitos é o principal fator que contribui para um quadro clínico grave, sendo principalmente causado pelo nematoda *Haemonchus* spp. Este helminto é o mais patogênico em regiões tropicais e subtropicais, com enorme variabilidade genética e diferenças morfológicas nas três espécies conhecidas; incluindo *Haemonchus contortus* (mais prevalente), *H. placei* e *H. similis* (Brasil et al., 2012). A haemoncose pode levar à

diminuição na produção de carne e leite, podendo ser observadas altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente em animais jovens. Desta forma, *H. contortus* representa uma ameaça à produção animal, impondo sérios riscos ao bem-estar dos animais (Ahid *et al.*, 2008; Molento, 2011; Miller *et al.*, 2012).

A importância das parasitoses como um problema sanitário mundial está relacionada principalmente pela dificuldade do seu controle, em função da rápida queda na eficácia dos fármacos em consequência do seu uso supressivo (Silva *et al.*, 2018). A resistência anti-helmíntica em nematodas de pequenos ruminantes para os três grupos de drogas mais comumente utilizados; benzimidazóis (BZs), imidotiazóis (LEV) e lactonas macrocíclicas (LM), vem sendo relatada frequentemente em diversos países da América do Sul (Molento *et al.*, 2011; Torres-Acosta *et al.*, 2012; Ramos, 2018), África do Sul (van Wyk *et al.*, 1999), Austrália (Love e Coles, 2002), Nova Zelândia (McKenna, 2010) e também na Europa (Papadopoulos *et al.*, 2012). O mecanismo da resistência dos BZs ocorre pela falta de ligação do produto na beta-tubulina, que inibe a ação do mesmo (Koetze e Prichard, 2016). Assim, o controle eficiente dos parasitos e o diagnóstico precoce da resistência aos BZs, especialmente em *H. contortus*, deve ser preconizado (Kaplan, 2020).

Vários métodos *in vivo*, *in vitro* e moleculares vêm sendo descritos nas últimas décadas, para o diagnóstico da resistência em várias espécies de nematodas (Fortes e Molento, 2013). Entretanto, mesmo tendo avançado com técnicas e equipamentos de última geração para os BZs, esses testes estão sendo utilizados mais especificamente em *Haemonchus* spp., *Cooperia* spp. em ruminantes e em ciatostomíneos, que são os parasitos mais prevalentes de equinos (Roeber *et al.*, 2013; Ishii *et al.*, 2017). Diversas pesquisas em populações de *H. contortus* resistente e sensível aos BZs, indicam a ocorrência de diferenças específicas no DNA genômico destas populações (Roos *et al.*, 1990). Estas alterações podem ser utilizadas como marcadores para a detecção de resistência, envolvendo mutações em três códons (F167Y, E198A e F200Y) no isotipo 1 do gene da beta-tubulina em *H. contortus* (Barrère *et al.*, 2013). O polimorfismo na posição 200 é o mais estudado e resulta da substituição de T por A, ou de uma fenilalanina por uma tirosina.

A presença da resistência aos BZs em nível de campo, já foi relatada em diferentes regiões do estado de Pernambuco (Charles *et al.*, 1989; Barreto e Silva, 1999; Pompeu e Padilha, 1999; Lima *et al.*, 2010). Entretanto, os relatos apresentados acima utilizaram unicamente o teste de redução da contagem de ovos de parasitos por grama de fezes (TRCOF). Neste caso, o uso do diagnóstico molecular baseado na técnica de reação em

cadeia da polimerase (PCR), poderia acelerar a descoberta de genes que conferem a resistência, sendo um teste mais rápido e com alto grau de repetibilidade e especificidade (Brasil et al., 2012), possibilitando melhorias nos programas de controle parasitário de caprinos e ovinos. O objetivo deste estudo foi determinar a frequência da mutação F200Y no gene da beta-tubulina, em populações de *H. contortus* de ovinos e caprinos no estado de Pernambuco, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos metodológicos para este projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEUA/UFRPE com a licença nº 024/2013. Amostras de parasitos adultos de *H. contortus* foram obtidas no momento do abate em frigorífico de dois animais naturalmente parasitados, em cada uma das sete propriedades localizadas em: Sairé (08°19'39" S, 35°42'20" O/bioma: Agreste), Recife (08°03'14"S34°52'51" O/bioma: Mata Atlântica), Bonito (08°28'12"S 35°43'44" O/bioma: Agreste), Moreno (08°07'07"S 35°05'32" O/bioma: Mata Atlântica), Gameleira (08°35'02"S 35°23'13" O/bioma: Mata Atlântica Sul), Camocim de São Félix (08°21'31"S 35°45'43" O/bioma: Agreste), Serra Talhada (7°59'9"S 38°17'45" O/bioma: Sertão). As propriedades em Recife e Bonito apresentavam caprinos e nas demais apenas ovinos. Excluindo-se Serra Talhada, um questionário adaptado de Niciura et al. (2009), foi aplicado, sendo composto por questões fechadas, para obtenção de informações sobre as práticas de manejo das propriedades e o histórico do uso de antiparasitários nos animais.

Os espécimes de helmintos foram estocados em tubos Eppendorf com PBS a 4°C e enviados ao Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da UFRPE, sendo identificados e sexados. Formou-se uma amostra de 20 indivíduos adultos machos de *H. contortus* de cada propriedade, os quais foram seccionados com auxílio de bisturi e macerados, procedendo-se à extração de DNA por meio do kit comercial Promega (Reliaprep gDNA Tissue) segundo informações do fabricante. A escolha de parasitos machos foi para isolar somente o DNA dos indivíduos, diferentemente das fêmeas que contém ovos e que podem demonstrar diferenças de frequência genética.

As amostras de DNA foram analisadas no Laboratório de Parasitologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná, UFPR, de acordo com Ishii et al. (2017), para a identificação das mutações e de acordo com Brasil et al. (2012) para a identificação da espécie de parasito. Primeiramente, foi realizada a PCR com o objetivo de amplificar fragmentos de genes que codificaram o isotipo 1 da beta-tubulina com a sequência do códon 200, utilizando os primers *forward*: 5' AAT GCT ACC CTT TCC GTC

CAT C 3' e *reverse*: 5' CAA AAC CGG GCA TGA AGA AG 3'. Realizou-se também uma PCR para identificação de *H. contortus* dos parasitos coletados, utilizando a sequência NC1/ITS-2 forward: 5' ACG TCT GGT TCA GGG TTG TT 3' e *reverse* 5' TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT 3'. As duas reações de amplificação foram conduzidas no volume final de 88 µl (3 µl da amostra de DNA, 3 (F) + 3 (R) µl de primers, 10 µl de tampão, 3 µl de MgCl₂, 20 µl de dNTP, 1 µl de Taq Polimerase e 45 µl de água ultrapura). Foi utilizado o protocolo de amplificação, onde a 1ª etapa foi de 94°C por 2', a 2ª etapa com 94°C por 30"; 50°C por 30" e 72°C por 01', a 3ª etapa foi de 72°C por 5' em termociclador Veriti Life, com 35 ciclos.

Uma amostra de 20 µl de cada reação foi analisada em gel de agarose 0,8% e visualizada sob luz UV. Os produtos de PCR foram purificados com o kit comercial PureLink Quick Gel Extraction (Invitrogen, USA) e sequenciados por eletroforese capilar (Método de Sanger) utilizando a plataforma ABI3130 (Life Technologies, USA). A qualidade das sequencias foi avaliada com o programa MEGA X e os produtos foram alinhados e comparados com amostras do GenBank (Bethesda, USA). A frequência da mutação genética na posição 200 foi analisada, estimando o tamanho dos picos no cromatograma (um pico ou dois picos), determinado seu percentual com o QSVanalyser (<http://dna-leeds.co.uk/qsv/>) (ver Material Suplementar).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da PCR para a região NC1/ITS-2, confirmou a identificação de *H. contortus* nas amostras (Figura 1). Em todos os rebanhos, foi evidenciado o isolamento da isoforma 1 do gene da beta-tubulina (Figuras 2 e 3), coletadas de caprinos e ovinos. Após o sequenciamento, foi identificado que somente em parasitos de ovinos do município de Sairé ocorreu a mutação no códon 200 da beta-tubulina (Figura 4). Desta forma, estes dados constituem-se no primeiro registro de diagnóstico molecular da resistência em ruminantes em Pernambuco, Brasil. Muito embora os trabalhos anteriores tenham utilizado somente o teste fenotípico de redução de ovos de parasitos para determinar a resistência do *H. contortus* aos BZs em pequenos ruminantes (Charles et al., 1989; Lima et al. 2010), nossos dados confirmam a presença da resistência genética com a mutação F200Y. Nunes et al. (2013) também obtiveram resultado semelhante, confirmando a presença do DNA responsável pela resistência aos BZs em isolados de *H. contortus* em ovinos, em São José do Rio Preto, São Paulo. A dificuldade no diagnóstico molecular associado à resistência para determinada droga é ter a certeza de que a mutação encontrada seja exclusivamente responsável pelo referido mecanismo desta espécie parasitária em particular. Esse desafio pode ser exemplificado pela existência de

mais de um ponto de mutação (F167Y, E198A e F200Y) na resistência aos BZs em *H. contortus*, assim como em outros helmintos (*Parascaris* sp., ciatostomíneos, *Cooperia* spp.), podendo ser causada ainda por outros fármacos, como as LM (Coles et al., 2006; Mottier and Prichard, 2008; Niciura et al., 2012; Ishii et al., 2017).

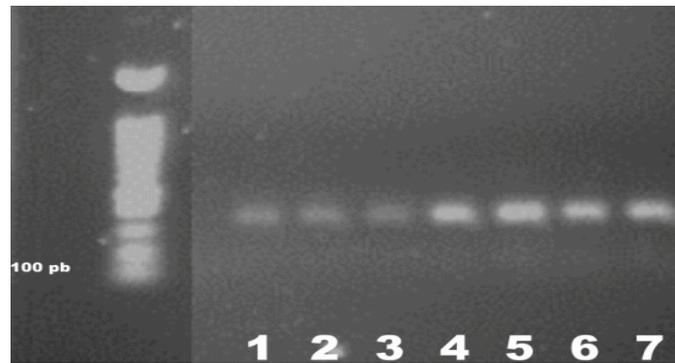


Figura 1 – Eletroforese do produto de PCR das amostras de DNA para sequencia NC1/ITS2 confirmando a presença de *Haemonchus contortus* nos rebanhos de 1: Asiré, 2: Recife, 3: Bonito, 4: Moreno, 5: Cameleara, 6: Camocán de São Félix e 7: Serra Talada, de Pernambuco.

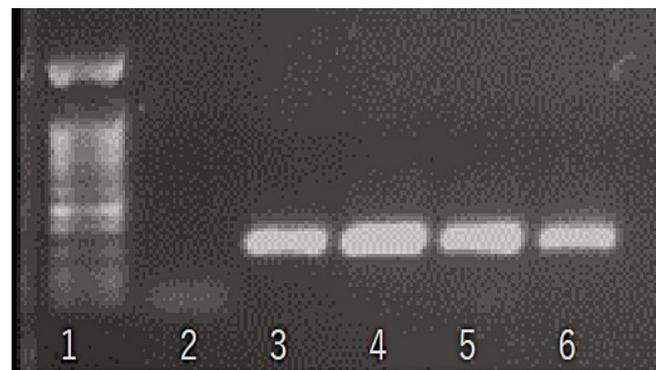


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% do produto de PCR com aproximadamente 120 pares de base, resultante da amplificação do fragmento do isotipo 1 da beta-tubulina de *Haemonchus contortus* de rebanhos de Pernambuco, Brasil.

Legenda: 1: Marcador molecular, 2: Controle negativo, 3: Sairé, 4: Recife, 5: Bonito e 6: Moreno.

Niciura et al. (2009), afirmaram que a alta frequência nos tratamentos anti-helmínticos favoreceu a instalação da resistência em 30 propriedades no estado de São Paulo. As demais propriedades em Pernambuco usavam intervalos de 5 meses, sem definir o critério técnico para a adoção dessa estratégia.



Figura 5 – Fatores de risco encontrados no Brasil e relatados por criadores do estado de Pernambuco e a descrição dos processos de seleção para a resistência anti-helmíntica e a possibilidade de reverter esta situação com estratégias de controle de curto, médio e longo prazo.

Em somente uma propriedade de ovinos e uma de caprinos, os animais eram tratados quando apresentavam sinais clínicos (anemia e apatia). Vieira et al. (2014), consideram esta medida uma excelente alternativa para minimizar a resistência aos anti-helmínticos, uma vez que resulta na manutenção de animais com parasitos adultos e que não recebem tratamento químico, deixando uma parcela da população em refúgio (van Wyk et al., 1999). Niciura et al. (2012), também observaram que o tratamento de todos os animais do rebanho, aumentou a frequência do genótipo para resistência (F200Y), em comparação com o uso da avaliação seletiva com o método Famacha. Nas outras 4 fazendas em Pernambuco, os produtores dosificavam todos os animais do rebanho.

A estimativa do peso dos animais em Pernambuco era feita de forma visual, para cálculo da dosagem do medicamento. Da mesma forma, Niciura et al. (2012), demonstraram que a estimativa visual do peso, foi a prática com maior fator de risco para o desenvolvimento da resistência, por facilitar a sobre-dose e causar maior pressão de seleção na população de parasitos (Chartier et al., 1998; Costa et al., 2011). Estes autores, também observaram que nos rebanhos pesquisados, não se realizava rotação de pastagem após o tratamento (Figura 5), contribuindo assim, para um elevado desafio

parasitário no hospedeiro após o efeito da medicação e alta contaminação ambiental com formas de vida livre (Heck *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2009). Entretanto, a estratégia de alternância de pasto imediatamente após o tratamento dos animais, pode ser um fator determinante para a transferência de parasitos resistentes para a área nova, que sobreviveram ao tratamento, resultando em alta pressão de seleção de populações resistentes (Molento *et al.*, 2004).

A troca de anti-helmínticos ocorreu após cada vermifugação (1/ovinos), quando não se obtinha efeito visual do produto (2/ovinos) ou sem critérios (1/ovinos, 2/caprinos). Foi respondido que em nenhuma das propriedades se utilizou a combinação de drogas. Em todas as propriedades, o penúltimo anti-helmíntico foi do grupo das LMs, sendo este também o último em três das propriedades de ovinos e uma de caprino, confirmando o uso frequente (>80%) de LMs em pequenos ruminantes naquele estado. Em uma criação ovina e em uma de caprinos, o último produto foi do grupo dos BZs. Estudos demonstraram que a rotação de anti-helmínticos após um único tratamento, aumentou o risco de alta resistência quando comparado à rotação do anti-helmíntico com base em teste de eficácia ou na observação visual da falta de eficácia, verificando-se o mesmo em fazendas que não usavam combinações de medicamentos (Niciura *et al.*, 2012). No presente estudo, em nenhuma propriedade foi relatada a presença de assistência técnica e nunca foi realizado exame de fezes nos animais ou teste de eficácia de produtos anti-helmínticos. Na Figura 5, incluímos uma série de fatores de risco para a seleção de parasitos resistentes e uma lista de possíveis tomadas de atitude que podem mitigar este processo, incluindo o teste de eficácia de produtos, a pesagem dos animais e a redução na rotação de fármacos.

Muito embora seria interessante correlacionar os dados da PCR e do questionário epidemiológico, realizando uma análise de *odds ratio* (OR) para associar ou não os fatores de riscos com a presença da resistência ao grupo dos BZs, este cálculo não foi possível devido ao grande número de variáveis e o baixo número de respondentes neste trabalho. Esta é sem dúvida, uma grande dificuldade para correlacionar os dados fenotípicos de eficácia dos produtos (ex. TRCOF), com os marcadores genotípicos (ex. PCR) de resistência em helmintos (Yilmaz *et al.*, 2017) no mundo todo. Suarez e Cristel (2014) estudaram os fatores de risco em 50 fazendas de bovinos, utilizando dados do teste de eficácia de produtos, com 26 fazendas positivas para a resistência e um questionário descritivo das atividades de cada propriedade. Os autores determinaram um OR = 7.7 para o número de tratamentos anuais com LMs e BZs. Esta informação é

semelhante ao encontrado no presente artigo, o que reforça as observações para a seleção de parasitos resistentes nas propriedades estudadas (Figura 5).

Como descrito acima, apenas na cidade de Sairé foi determinada a mutação F200Y do isotipo 1 da beta-tubulina, caracterizando o polimorfismo TTC. Este fato pode ter ocorrido devido a introdução de animais infectados com parasitos já resistentes e ao alto número de tratamentos com a rotação de princípios ativos nesta população. Convém ressaltar que nesta propriedade, a atividade foi iniciada há dois anos e que o tratamento anti-helmíntico acontecia a cada seis meses com a troca de produtos a cada tratamento, sendo que nos dois últimos tratamentos foi utilizada uma LM, seguido por um medicamento do grupo dos BZs. Estes fatos, somados às outras práticas inadequadas de manejo, podem ter propiciado a rápida manifestação da resistência.

O presente diagnóstico molecular da resistência em *H. contortus* ao grupo dos BZs em ovinos e caprinos no Estado de Pernambuco, apresenta grande relevância científica para a região Nordeste do Brasil, que concentra o maior rebanho de caprinos e ovinos do país. Os dados obtidos neste trabalho, são subsídios para estudos futuros com mais propriedades e populações do parasito, para caracterizar a resistência aos BZs em todo o estado de Pernambuco e em outras regiões com clima ou biomas semelhantes.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo são inéditos e confirmam a presença da mutação TTC na posição 200 do isotipo 1 da beta-tubulina, que confere a resistência aos BZs em *H. contortus* de pequenos ruminantes no estado de Pernambuco. Este fato pode ter sido favorecido por práticas de manejo inadequadas, como a introdução de animais infectados e o uso indiscriminado de produtos químicos para o controle de helmintos gastrintestinais.

Agradecimentos: Os autores gostariam de agradecer aos anônimos produtores rurais por sua colaboração e incentivo à ciência. Os Dr. Y. Chicoy e A. Arenal obtiveram bolsa CAPES/MES Cuba, na chamada 02/2014, conferida ao Dr. M.B. Molento, UFPR.

REFERÊNCIAS

Ahid, S.M.M.; Suassuna, A.C.D., Maia, M.B. et al. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da região Oeste do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, p.212-218, 2008.

Barrère, V.; Keller, K.; von Samson-Himmelstjerna, G.; Prichard, R. K. Efficiency of a genetic test to detect benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* nematodes in sheep farms in Quebec, Canada. **Parasitology International**, v.62 (5), p.464-470. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.06.001>.

Barreto, M.A.; Silva, J.S. Avaliação da resistência de nematódeos gastrintestinais em rebanhos caprinos do Estado da Bahia: resultados preliminares. *Anais 9º Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, Salvador, BA. 160p. 1999.

Brasil, B.S.A.F.; Nunes, R.L.; Bastianetto, E. et al. Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v.42, p.469-479, 2012.

Charles, T.P.; Pompeu, J.; Miranda, D.B. Efficacy of three broad-spectrum anthelmintics against gastrointestinal nematode infections of goats. **Veterinary Parasitology**, v.34, p.71-75, 1989.

Chatier, C.; Pors, I.; Hubert, J. et al. Prevalence of anthelmintic resistant nematodes in sheep and goats in Western France. **Small Ruminant Research**, v.29, p.33-41, 1998.

Coles, G.C.; Jackson F.; Pomroy W. et al. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.136, p.167-185, 2006.

Costa, K.M.F.M.; Ahid, S.M.M.; Vieira, L.S. et al. Efeitos do tratamento com closantel e ivermectina na carga parasitária, no perfil hematológico e bioquímico sérico e no grau Famacha de ovinos infectados com nematódeos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, V.31, p.1075-1082, 2011.

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

Kaplan, R.M. Biology, Epidemiology, Diagnosis, and Management of Anthelmintic Resistance in Gastrointestinal Nematodes of Livestock. **Veterinary Clinics of Food Animals**, v.36, p.17-30, 2020.

Koetze, A.C.; Prichard, R.K. Anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*: history, mechanisms and diagnosis. **Advances in Parasitology**, v.93, p.397-428, 2016.

Heck, I.; Leandro, A.S.; Leite, C.T.; Gindri, J.K.; Souza, M.B.M.; Depner, R.; Molento, M.B. Climatological effects on parasitic infection in calves and the presence of larvae in a pasture rotation management in Santa Maria, RS, Brazil. **Ciência Rural**, v.35, (6) p.1461-1464, 2005.

Ishii, J.B.; Arenal, A.; Felix, A. et al. Diagnosis of resistance alleles in codon 167 of the beta-tubulin (*Cya-tbb-1*) gene from third-stage larvae of horse cyathostomins. **Research in Veterinary Science**, v.115, p.92-95, 2017.

Lima, M.M.; Farias, M.P.O.; Romeiro, E.T. et al. Eficácia da moxidectina, ivermectina e albendazole contra helmintos gastrintestinais em propriedades de criação caprina e ovina no estado de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v.11 p.94-100, 2010.

Loves, J.C.; Coles G.C. Anthelmintic resistance in sheep worms in New South Wales, Australia. **Veterinary Record**, v.150, p.87, 2002.

Mckenna, P.B. Update on the prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v.58, p.172-173, 2010.

Melo, A.C.F.L.; Bevilaqua C.M.L.; Reis I.F. Resistência aos anti-helmíntico benzimidazóis em nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes do semiárido nordestino brasileiro. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, p.294-300, 2009.

Miller, C.M.; Waghorn, T.S.; Leathwick, D.M. et al. The production cost of anthelmintic resistance in lambs. **Veterinary Parasitology**, v.186, p.376-381, 2012.

Molento, M.B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13(S1), p.82-85, 2004.

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

Molento, M.B.; Fortes F.S.; Pondelek D.A.S. et al. Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. **Veterinary Parasitology**, v.180, p.126-132, 2011.

Molento M.B.; van Wyk J.A.; Coles G.C. Sustainable worm management. **Veterinary Record**, v.155, p.95-96, 2004.

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

Niciura, S.C.M.; Veríssimo C.J.; Molento M.B. Determinação da Eficácia Anti-Helmíntica em Rebanhos Ovinos. In: Metodologia de Colheita de Amostras e de Informações de Manejo Zoossanitário. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. v.91, pp.29. 2009.

Niciura, S.C.M.; Veríssimo C.J.; Gromboni J.G.G. et al. F200Y polymorphism in the β -tubulin gene in field isolates of *Haemonchus contortus* and risk factors of sheep flock management practices related to anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v.190, p.608-612, 2012.

Niciura, S.C.M. Análise genômica da resistência ao monepantel e investigação epigenética em *Haemonchus contortus*. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, pp.12, 2018.

Nunes, R.L.; Santos L.L.; Bastianetto E. et al. Frequência da resistência ao benzimidazol em populações de *Haemonchus contortus* isoladas de rebanhos de bubalinos, caprinos e ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, p. 548-553, 2013.

Papadopoulos, E.; Gallidis E.; Ptochos, S. Anthelmintic resistance in sheep in Europe: a selected review. **Veterinary Parasitology**, v.189, p.85-88, 2012.

Pompeu, J.; Padilha T.N. Utilização de anti-helmíntico nas principais bacias leiteiras da mesorregião do Agreste do Estado de Pernambuco, Brasil. In: Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Recife, PE. p.23, 1999.

Ramos, F.; Portella, L.P.; Rodrigues, F.S. et al. Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep to monepantel treatment in central region of Rio Grande do Sul, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.38, p.48-52, 2018.

Roeber, F.; Jex, A.R.; Gasser, R.R. Next-generation molecular diagnostic tools for gastrointestinal nematodes of livestock, with an emphasis on small ruminants: A turning point? **Advances in Parasitology**, v.83, p.267-333, 2013.

Roos, M.H.; Boersema, J.H.; Borgsteed, F.H.M. et al. Molecular analysis of selection for benzimidazole resistance in sheep parasite *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.43, p.77-88, 1990.

Rosalinski-Moraes, F.; Fernandes F.G.; Munaretto, A. et al. Método FAMACHA, escore corporal e de diarreia como indicadores de tratamento anti-helmíntico seletivo de ovelhas em reprodução. **Bioscience Journal**, v.28, p.1015-1023, 2012.

Santos, J.M.L.; Monteiro, J.P.; Ribeiro, W.L.C. et al. 2017. High levels of benzimidazole resistance and β -tubulin isotype 1 SNP F167Y in *Haemonchus contortus* populations from Ceará State Brazil. **Small Ruminant Research**, v.146, p.48–52. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.11.023>.

Silva, F.F.; Bezerra, H.M.F.; Feitosa, T.F. et al. Nematode resistance to five anthelmintic classes in naturally infected sheep herds in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.27, p.423-429. 2018.

Silvestre, A.; Cabaret J. Mutation in position 167 of isotype 1 Beta-tubulina gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.120, p.297-300, 2002.

Suarez, V.H.; Cristel, S.L. Risk factors for anthelmintic resistance development in cattle gastrointestinal nematodes in Argentina. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.23(2), p.129-135, 2014.

Torres-Acosta, J.F.; Mendoza de Gives, P.; Aguilar-Cabalallero, A. et al. Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. **Veterinary Parasitology**, v.189, p.89-96, 2012.

von Samson-Himmelstjerna, G., Blackhall, W.J., McCarthy, J.S., Skuce, P.J. Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes. **Parasitology**, v.134, p.1077-1086). 2007.

van Wyk, J.A.; Stenson S.O.; van der Mrewe J.S. et al. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v.66, p.273–284, 1999.

Veríssimo C.J.; Niciura S.C.M.; Alberti A.L. et al. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.187, 209-216, 2012.

Vieira, V.D.; Feitosa T.F.; Vilela V.L.R. et al. Prevalence and risk factors associated with goat gastrointestinal helminthiasis in the Sertão region of Paraíba State, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v.46, p.355-361, 2014.

Yilmaz, E.; Ramunke, S.; Demeler, J.; Krucken, J. Comparison of constitutive and thiabendazole-induced expression of five cytochrome P450 genes in fourth-stage larvae of *Haemonchus contortus* isolates with different drug susceptibility identifies one gene with high constitutive expression in a multi-resistant isolate. **IJP: Drugs and Drug Resistance**, v.7, p.362-369, 2017.