

CAPÍTULO 11

Protocolos básicos de laboratório para a realização de metodologias fenotípicas e genotípicas

*Marcelo Beltrão Molento
Simone Cristina Méo Niciura
Ana Carolina de Souza Chagas*

11.1 Regras básicas de higiene e biossegurança a serem seguidas em laboratório

Medidas de biossegurança são princípios preventivos destinados a proteger a saúde humana contra os riscos derivados de atividades em laboratório e evitar acidentes e a contaminação do ambiente de trabalho.

As regras básicas aqui indicadas consistem num conjunto de práticas, a seguir detalhadas, que devem ser obedecidas rotineiramente:

- Localizar as instalações dos elementos de segurança da área de trabalho, tais como: saídas de emergência, extintor de incêndio, lava-olhos, local para descarte de lixo tóxico, etc.
- Não fazer uso de comida, bebida, fumo e maquiagem no laboratório.
- Não guardar alimentos no balcão ou nas geladeiras do laboratório.
- Utilizar vestimentas apropriadas para a realização dos trabalhos e manter os cabelos sempre recolhidos. Usar guarda-pó de algodão, de mangas compridas, e sapatos fechados. Não utilizar acessórios, como brincos, colares, pulseiras e anéis.

- Manter limpo o ambiente.
- Lavar as mãos cuidadosamente, depois de qualquer manipulação e antes de se retirar do laboratório. Antes de sair, deixar o guarda-pó no laboratório.
- Utilizar luvas apropriadas para evitar contato com substâncias químicas ou material biológico. Não tocar em objetos (telefones, lapiseiras, portas, cadernos, etc.) se as luvas estiverem contaminadas.
- Proteger os olhos e o rosto de respingos ou de impactos, usando óculos de proteção, com barras laterais faciais.

Usar máscaras descartáveis se existir risco de produção de aerossóis ou pó durante operações com substâncias altamente tóxicas ou biopatogênicas.

- Embalar, em papel, todo material de vidro que tenha se quebrado; em seguida, colocar essa embalagem dentro de uma sacola de plástico, a qual, por sua vez, deve ser colocada dentro de uma caixa resistente.

Descartar líquidos inflamáveis, tóxicos, corrosivos e material biológico apenas nos locais adequados, de acordo com indicações do setor de gestão de resíduos.

11.2 Técnica de identificação e contagem de ovos de helmintos por grama de fezes (OPG)

A contagem de OPG consiste na coleta de fezes (de seis a oito cíbalas) diretamente da ampola retal do animal, com o auxílio de um saco de plástico fino. Em seguida, deve-se acondicionar as amostras em uma caixa de isopor repleta de gelo e encaminhar ao laboratório. O exame de contagem de OPG deve ser feito até, no máximo, 4 dias depois da coleta das fezes. Até o momento da realização do exame, as amostras devem ser refrigeradas



em geladeira, a 4 °C (jamais congeladas), dentro de sacos de plástico bem lacrados e devidamente identificados.

Há uma outra opção de conservação do material que dispensa a refrigeração, sem a necessidade, então, de manter a amostra em isopor com gelo ou em geladeira. Consiste em armazenar, a vácuo, as fezes guardadas em sacos de plástico. Ou seja, retirar todo o ar do saco, para retardar o desenvolvimento do ovo.

Princípio: método de flutuação associado à contagem de ovos, usando a câmara McMaster. Exame microscópico quantitativo e qualitativo (GORDON; WHITLOCK, 1939).

Material: solução hipersaturada de cloreto de sódio ou açúcar (veja descrição abaixo), câmara McMaster, bastão de vidro, copo graduado para a solução, frasco simples, pipeta Pasteur, peneira de plástico pequena, e 6 g a 8 g de fezes frescas.

Método

- Colocar 4 g de fezes em um frasco e acrescentar 26 mL de solução hipersaturada. Essa concentração dá um fator de conversão de 1:25.
- Triturar as fezes com o auxílio de um bastão de vidro, desfazendo os grumos.
Homogeneizar e passar a mistura, através de uma peneira simples, para um novo frasco.
Homogeneizar a solução em 'X' e, com a pipeta Pasteur, retirar uma amostra e com ela preencher uma célula da câmara. Repetir a operação para a outra célula.
- Aguardar 5 minutos para a flutuação dos ovos e observar ao microscópio, com aumento de 10x e 20x.

- Contar todos os ovos contidos nas duas células, incluindo aqueles retidos nas linhas

Câmara McMaster: a câmara McMaster apresenta duas células de contagem, tendo, cada uma, altura de 0,15 cm e área de 1,0 cm². O volume de líquido encontrado em cada célula é obtido pela fórmula: área x profundidade = volume. O número de ovos contados nas duas células da câmara McMaster deve ser multiplicado por 25. Essa medida visa aumentar o grau de confiabilidade da técnica. Para alcançar maior precisão, o executor pode contar duas câmaras McMaster (quatro células) e multiplicar a soma final por 12.

Significado da contagem de ovos por grama de fezes (OPG): a contagem de ovos (Figura 1) é apenas um dos indicadores de infecção, mas não basta, por si só, para indicar o grau de infecção do hospedeiro. Também é preciso levar em consideração outros fatores, como: a manifestação de sinais clínicos pelos animais, a variação entre as amostras, o efeito densidade-dependente, o estado nutricional do animal e até mesmo a consistência das fezes. É importante fazer a correlação entre o dados da OPG e a proporção de larvas (gênero ou espécie) encontradas na coprocultura (item 11.3). Deve-se contar os ovos da família Trichostrongylidae, de *Strongyloides* spp. (ovos larvados), de *Moniezia* spp. e os oocistos de *Eimeria* spp. (Figura 2). Vale ressaltar que os ovos degenerados não devem ser considerados

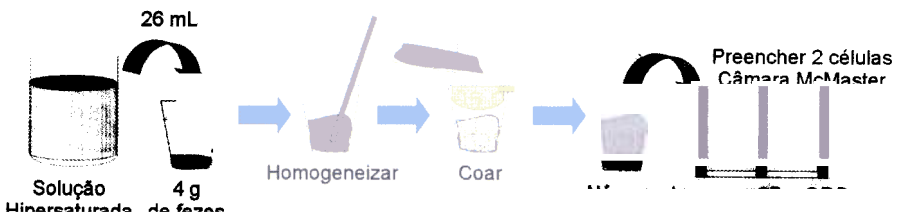


Figura 1. Esquema do procedimento de contagem de ovos por grama de fezes (OPG).

Ilustração: Simone Cristina Mota Miliute

- Adicionar água para umidificar a mistura, com acúmulo de 1 cm de água no fundo do frasco. A mistura deve se apresentar mais ou menos aerada.
- Cobrir o frasco com uma placa de Petri ou com a própria tampa do frasco, mas deixando-a solta; e adicionar um fio largo de algodão ou barbante para permitir a aeração. Colocar o frasco em estufa B.O.D. por 7 dias, em temperatura de aproximadamente 28 °C e umidade acima de 60%. O cultivo poderá ocorrer em temperatura ambiente acima de 18 °C, durante 10 a 15 dias. É comum a presença de fungos, que não prejudicam o desenvolvimento das larvas.
- Avaliar a umidade a cada 2 dias e, caso necessário, borrifar água até a superfície adquirir um aspecto brilhante.
- Retirar o frasco da B.O.D. após 7 dias e enchê-lo completamente com água morna, ou diretamente retirada da torneira se estiver em região de clima quente, para estimular a migração das larvas pela técnica de baermanização.
- Colocar um fio de algodão fino (ou palito de fósforo) no canto da boca do frasco e uma placa de Petri sobre esse, e virar o conjunto.
- Adicionar água na placa de Petri até 0,5 cm, para que as larvas migrem para a área da placa. Transcorridas de 6 a 8 horas, aspirar o material, com pipeta Pasteur.
- Colocar a suspensão em tubo de ensaio e depois proceder à quantificação e à identificação das larvas quanto ao seu gênero ou espécie (Figura 3 e Tabela 1), usando chave específica, conforme descrição de Ueno e Gonçalves (1998), ou detalhamento mais recente de Van Wyk et al. (2004). Esse processo é facilitado com a adição de uma gota da solução a uma lâmina de vidro e uma gota de lugol em aumento de 10x e 20x.

- As publicações científicas requerem que sejam identificadas de 50 a 100 larvas por amostra de pool de grupos experimentais (tratamento).
- As larvas obtidas após a coprocultura podem ser armazenadas em água ou em álcool 70 °GL, em microtubos de 1,5 mL, a 4 °C, ou podem ser congeladas a -20 °C ou -80 °C para a realização de estudos futuros, como testes moleculares. O material permanece viável por até 2 anos. Caso seja necessária a avaliação posterior das larvas para a identificação dos gêneros de helmintos, recomenda-se o acondicionamento em água, a 4 °C, por 30 a 90 dias.

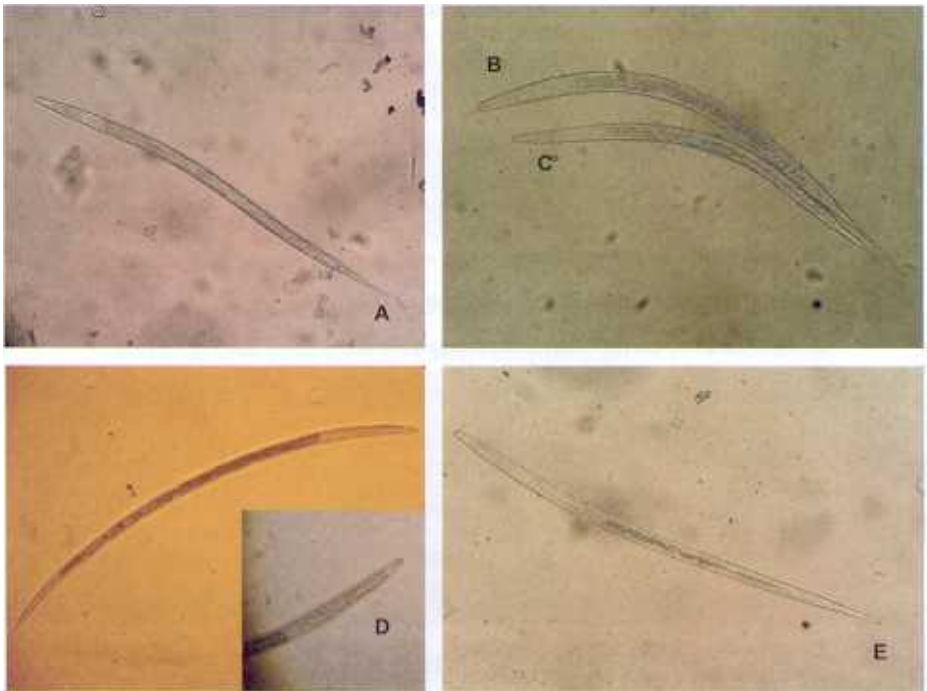


Tabela 1. Chave de identificação de larvas de nematodas gastrintestinais e pulmonares que afetam pequenos ruminantes.

Nº	Descrição ⁽¹⁾ (X: +/- 30 µm)	Identificação ⁽²⁾
1	Bainha da cauda ausente ou não obtusa	2
	Bainha da cauda proeminente	9
2	Bainha da cauda ausente ou não obtusa	
	Esôfago sem bulbo	3
	Esôfago rãbitiforme (bulbo duplo)	4
3	Bainha da cauda ausente ou não obtusa	
	Esôfago < 30% do comprimento total da larva	5
	Esôfago > 40% do comprimento da larva	6
4	Helminto se cora sob solução de iodo, ganhando uma cor mais ou menos uniforme, marrom-escura. Esôfago < 40% do comprimento do helminto e rãbitiforme (bulbo duplo); larva grossa, com extremidades retangulares e cauda longa, que sugere uma bainha; ponta da cabeça abrupta, desnivelada e plana	Nematoda de vida livre
5	Esôfago < 30% do corpo da larva; bainha da cauda invisível e < 0,5x; larva pequena e letárgica, com protuberância na cabeça; cauda termina suave, com ponta arredondada	<i>Dictyocaulus filaria</i>
6	Esôfago > 40% do corpo da larva	
	Comprimento do corpo < 500 µm; diâmetro < 0,7x	7
	Comprimento do corpo < 520 µm; diâmetro > 1,0x	8
7	Comprimento do corpo < 500 µm; diâmetro < 0,7x	L ₁ de Protostrongilídeo
	Ponta da cauda muito afinada, sem espinho	<i>Protostrongylus</i> sp.
	Ponta da cauda muito afinada, com espinho	<i>Muellerius</i> sp.
	Ponta da cauda arredondada, sem espinho	<i>Neostrongylus</i> sp.
	Ponta da cauda arredondada, com espinho	<i>Cystocaulus</i> sp.
8	Bainha da cauda ausente; esôfago 40% do total do comprimento da larva e sem o bulbo; diâmetro da larva > 1,0x; cabeça em forma de bala; cauda robusta, como se a bainha estivesse quebrada ou perdida. Examinar com cuidado, para conferir, com precisão, se a larva apresenta bainha	<i>Strongyloides</i>

Tabela 1. Continuação.

Nº	Descrição ⁽¹⁾ (X: +/- 30 µm)	Identificação ⁽²⁾
9	Bainha da cauda > 0,5x e proeminente; esôfago < 30% do total da larva; larva fresca, muito ativa sob a luz	
	Larva cora de maneira mais ou menos uniforme, tomando a cor marrom, sob solução de iodo	10
	A larva cora sob solução de iodo, tomando as cores marrom-clara na porção anterior e marrom-escura na porção posterior	11
10	Toda a larva se cora uniformemente, tomando a cor marrom-escura, sob solução de iodo; esôfago com um bulbo proeminente caudal (proeminente em larva viva e ativa, mas difícil de se ver em larva corada); cabeça em forma de bala	
	Bainha da cauda 3,5x, com filamento 40% da bainha da cauda; larva muito pequena	<i>Bunostomum</i> sp.
	Bainha da cauda 4,5x, com filamento 50% da bainha da cauda; larva muito pequena	<i>Gaigeria</i> sp.
11	A larva cora, tomando as cores marrom-clara na cabeça e marrom-escura na cauda; esôfago sem bulbo	
	Bainha da cauda sem filamento	12
	Bainha da cauda com filamento	15
12	Comprimento da bainha da cauda 1,0x a 1,5x; cabeça pouco achatada (tampa de caneta); sem filamento	
	Cauda da larva suave, observada quando desembainhada	13
	Cauda da larva desembainhada, serrilhada, desigual	14
13	Cauda da larva suave; bainha da cauda sem filamento	
	Bainha da cauda 1,0x; cabeça sem ombro	<i>Trichostrongylus axei</i>
	Bainha da cauda 1,2x; cabeça com ombro	<i>Ostertagia circumcincta</i>
14	Cauda da larva com pequena protuberância digital; bainha da cauda sem filamento; cabeça sem ombros; 16 células intestinais	
	Bainha da cauda 1,0x; sem filamento; cauda da larva terminando abruptamente	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>
	Bainha da cauda 1,7x; cauda da larva terminando abruptamente	<i>Trichostrongylus falculatus</i>

Tabela 1. Continuação.

Nº	Descrição ⁽¹⁾ (X: +/- 30 µm)	Identificação ⁽²⁾
15	Bainha da cauda com filamento; larva se cora, sob solução de iodo, ganhando as cores marrom-clara na cabeça e marrom-escuro na cauda; 16 células intestinais	
	Cabeça da larva com duas estruturas refratáveis	16
	Cabeça da larva sem a estrutura refratável	17
16	Cabeça em forma de bala, com laterais inclinadas e com dois pontos de refração ⁽³⁾ ; bainha da cauda com 20% de filamento	
	Bainha da cauda 1,5x; filamento 20%	<i>Cooperia</i> sp. (ex.: <i>C. curticei</i>)
	Bainha da cauda 2,5x; filamento 20%	<i>Cooperia oncophora</i>
17	Larva com cabeça e sem pontos de refração; bainha da cauda 2,0x	
	Dezesseis ou mais células intestinais	18
	Oito células intestinais	19
18	Larva com 16 células intestinais (ou mais); bainha da cauda 2,0x	
	Comprimento da bainha da cauda 2,0x, com filamento ± 15% do comprimento da bainha da cauda; cabeça em forma aproximada de bala e afina abruptamente até um certo ponto (lados relativamente achatados)	<i>Haemonchus</i>
	Comprimento da bainha da cauda 4,0x, cabeça larga e plana; filamento longo (aproximadamente 25% do comprimento da cauda); 28 a 32 células intestinais (forma retangular) em larva fresca	<i>Chabertia</i>
	Comprimento da bainha da cauda 5,0 a 5,5x; cabeça larga e plana (lados paralelos); 18 a 22 células intestinais (forma triangular em larva fresca); filamento longo (aproximadamente 50% do comprimento da cauda)	<i>Oesophagostomum</i> (ex.: <i>Oe. columbianum</i> , <i>Oe. venulosum</i>)
19	Oito células intestinais; larva muito grande; cabeça em forma de bala, um pouco plana anteriormente; cauda com uma projeção tipo digital (claramente visível em larva desembainhada)	<i>Nematodius</i>
	Bainha da cauda 9,0x; filamento com aproximadamente 50% a 60% da cauda da larva com projeção digital, entre duas projeções menores	<i>Nematodius</i> <i>spathiger</i>

Continua..

Tabela 1. Continuação.

Nº	Descrição ⁽¹⁾ (X: +/- 30 µm)	Identificação ⁽²⁾
	Bainha da cauda 9,0x; filamento com aproximadamente 50% da cauda da larva em forma de "V" (vista lateral) ou tricúspide	<i>Nematodirus filicollis</i>
19	Bainha da cauda 6,0x; cauda da larva afina com dois nós dorsais	<i>Nematodirus battus</i>

⁽¹⁾ Cabeça: refere-se à porção cranial da larva. Bainha da cauda: extensão da bainha, após a cauda da larva. Lembrete: as L₃ de vários gêneros de nematodas de pequenos ruminantes parecem ter a cabeça plana quando a larva está parcial ou totalmente desembainhada, mesmo quando a cabeça, na forma de bala, está intacta.⁽²⁾ Mesmo listando algumas espécies, as L₃ podem ser identificadas somente quanto ao gênero.

⁽³⁾ Nota do tradutor: a expressão "corpos ovais refringentes" é consagrada e é uma tradução livre de "refractile spots", referente às estruturas craniais brilhantes de *Cooperia*. Entretanto, a expressão utilizada neste livro é "ponto de refração" (mudança de direção de ondas de luz depois de passarem para outro meio), por descrever a ação da incidência da luz na estrutura do parasita (FERREIRA, 2010; LUFT, 2005).

Fonte: Van Wyk et al. (2004).

11.4 Teste de redução de contagem de ovos nas fezes (TRCOF) para a determinação da eficácia de anti-helmínticos em pequenos ruminantes

Objetivo: determinar a eficácia de um produto anti-helmíntico em uma população parasitária, por meio da comparação de dados de redução de contagem de ovos nas fezes entre os animais de um grupo controle e de um grupo tratado (MÉO-NICIURA et al., 2009).

Para a realização do teste, devem ser utilizados grupos de 7 a 10 (até 15) animais por anti-helmíntico a ser avaliado. Exemplo: para que sejam avaliados cinco distintos anti-helmínticos e o grupo controle (seis grupos experimentais), seria necessário contar com, no mínimo, 42 ovinos. A realização do teste está condicionada a uma exigência: é necessário que os animais não tenham sido tratados, num intervalo de 90 dias, com moxidectina 10%; e, num intervalo de 90 a 110 dias, com macrolactonas de longa ação (ex.: ivermectina 3,15%); e, num intervalo de 30 dias, com os demais anti-helmínticos.

Pré-experimento: a colheita de fezes deve ser feita ao acaso, para cada categoria animal (cordeiros, borregos, ovelhas e machos reprodutores). Conforme forem os resultados de contagem da OPG, para que o TRCOF seja aplicado na propriedade, 80% dos animais por categoria devem apresentar OPG igual ou superior a 200. Em caso de alta frequência de OPG igual a zero (mais de 20%), ou de aplicação recente de anti-helmíntico, o teste deve ser feito, em época do ano mais adequada epidemiologicamente, ou após o término do período do efeito residual do tratamento.

Nesse teste, pode ser usado qualquer animal desmamado, a partir de 2 meses de idade, independentemente da raça, do sexo ou da categoria. Como exigência, os animais devem apresentar escore de condição corporal entre 1,75 e 3,75 e grau Famacha de 1 (mucosa ocular muito vermelha) a 4 (mucosa ocular rosa-pálido).

Realização do teste de redução de contagem de ovos nas fezes (TRCOF): para a realização do TRCOF, os animais devem ser distribuídos da forma mais homogênea possível nos grupos experimentais (mesmo número de animais das diferentes raças, categorias, sexos, idades, escores de condição corporal e OPG).

As doses e as vias de aplicação dos anti-helmínticos devem seguir a recomendação do fabricante, e os animais devem ser pesados para, com base nesse peso, poder ser calculada a dose precisa a lhes ser administrada. Os produtos devem estar no prazo de validade e armazenados adequadamente. Deve-se dar preferência a produtos de marca idônea e de qualidade reconhecida. Para os tratamentos parenterais, a aplicação deve ser por via subcutânea. Devem ser tomados cuidados para garantir a desinfecção do local. Para os tratamentos pela via oral, deve-se submeter os animais a jejum alimentar, por 12 a 24 horas, mas sem restrição de água. O dia da aplicação dos anti-helmínticos é considerado o dia zero (D0) do teste. Nesse dia, os animais devem continuar recebendo o mesmo manejo.

Avaliação dos resultados: quando vários grupos químicos de anti-helmínticos são avaliados, deve ser feita uma nova coleta de fezes de todos os animais utilizados no TRCOF, depois de transcorridos 14 dias (D14)

dos tratamentos para contagem de OPG e realização de coprocultura. Para a coprocultura, as fezes dos animais com OPG positivo de cada tratamento devem ser agrupadas e cultivadas por grupo experimental. A coprocultura também deve ser realizada quando todos os animais do grupo experimental apresentarem OPG igual ou próximo de zero.

O cálculo da eficácia de cada anti-helmíntico em relação ao controle pode ser feito com o auxílio do programa RESO 2.0 modificado (Figura 4) (WURSTHORN; MARTIN, 1990). Ou, então, pode-se usar a seguinte fórmula:

$$\%Eficácia_{\text{vermifugo}} = \left(\frac{\text{médiaOPG}_{\text{controle}} - \text{médiaOPG}_{\text{vermifugo}}}{\text{médiaOPG}_{\text{controle}}} \right) \times 100$$

De acordo com o resultado da eficácia, os anti-helmínticos são classificados (ZAJAC; CONBOY, 2006) como:

- a) % *Eficácia*_{vermifugo} maior que 90%: medicação eficiente.
- b) % *Eficácia*_{vermifugo} entre 80% e 90%: medicação com baixa eficiência ou suspeita.
- c) % *Eficácia*_{vermifugo} inferior a 80%: medicação ineficiente.

Exemplo: após a contagem de OPG de 10 animais submetidos ao tratamento com um anti-helmíntico (3450, 2500, 1250, 1050, 950, 750, 250, 150, 100 e 0) e de 10 animais submetidos ao grupo controle (3950, 2500, 2400, 2250, 1150, 950, 600, 400, 200 e 150), calcula-se a média de OPG para cada grupo. Assim, a *médiaOPG*_{vermifugo} foi de 1.045, e a *médiaOPG*_{controle} foi de 1.455. A seguir, procede-se ao cálculo da eficácia: $[(1455-1045)/1455] \times 100$, que resultou na % *Eficácia*_{vermifugo} de 28%. Como esse valor é inferior a 80%, o anti-helmíntico foi considerado ineficiente para o tratamento dos animais do rebanho em estudo.

Os resultados de eficácia devem ser utilizados para monitorar e orientar a escolha do produto anti-helmíntico mais adequado e eficaz para utilização naquele local.

Produtos	Pre-teste	Controle	Trat 1	Trat 2	Trat 3			
Amostragem	0	8	8	8	8	0	0	0
Média Ant.		1875	381	25	100			
Variancia (FEC)		982143	72813	1429	2143			
% Redução			80	99	95			
Variancia (Reduc)			0,10	0,32	0,06			
Int. Conf. superior 95%			89	100	97	0	0	0
Int. Conf. inferior 95%			61	96	91	0	0	0

Eficácia dos Produtos: Resistant Susceptible Low Resist

Figura 4. Planilha do programa RESO 2.0 utilizando a plataforma Microsoft Office Excel para o cálculo da eficácia de anti-helmínticos. A pasta de cálculo utiliza o mesmo princípio definido na fórmula acima, proposta por Coles et al. (1992). Entretanto, a interpretação da eficácia depende de alguns fatores, como a média dos dados do OPG e o intervalo de confiança.

11.5 Protocolo de recuperação de parasitas adultos

a) Definição de populações parasitárias: sensível e resistente

Para garantir maior segurança e melhor reconhecimento no momento da publicação científica, o pesquisador deverá trabalhar com um isolado de origem e histórico farmacológicos conhecidos. Nesse caso, é necessário um protocolo de tratamento anterior, cuja determinação tem de ser feita pelo OPG ou, então, por teste controlado da necropsia dos animais. Os dados de eficácia de determinada droga serão comparados entre isolados, visando a pesquisas a longo prazo e ao reconhecimento desses isolados como sensíveis (eficácia acima de 95%) e/ou resistentes (eficácia abaixo de 80%) a um ou mais produtos específicos.

Sugere-se fazer intercâmbio de isolados entre instituições, tanto para compartilhar o custo de manutenção dos isolados entre as instituições envolvidas, quanto para uma eventual colaboração interinstitucional. O pro-

cedimento de identificação do isolado por meio do sacrifício de animais doadores deve ser protocolado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Ceua) da unidade, do departamento ou da instituição.

b) Protocolo in vivo pré-abate para a escolha do isolado parasitário

Deve-se selecionar um animal para ser infectado artificialmente com L_3 provenientes de animais de campo. É importante que o isolado de campo tenha sido identificado por meio de TRCOF. As larvas devem ter no máximo 30 dias de colhidas da coprocultura. Pode-se trabalhar com um animal doador com infecção natural, caso a contagem de OPG seja realmente muito alta (> 5 mil ovos). Sugere-se que a OPG seja realizada com 4 g e 26 mL de solução hipersaturada, que o observador conte com duas câmaras McMaster (quatro divisões) e que faça um fator de conversão de 1:12, conforme orienta o item 11.2. O objetivo é oferecer maior confiabilidade à quantificação de ovos. Na segunda opção (infecção natural), corre-se o risco de o animal apresentar infecção múltipla, o que pode dificultar a limpeza do isolado, por se desconhecer a taxa de infecção. Mesmo assim, deve-se utilizar a chave de identificação (Tabela 1), onde se pode identificar as características morfológicas dos nematoides (VAN WYK et al., 2004).

O animal receptor deverá ser mantido em baia de concreto, separado de outros animais, e dispor de alimento e água à vontade. No caso de uma infecção artificial, o animal deverá receber uma quantidade suficiente de L_3 para que exista uma boa taxa de estabelecimento parasitário, sem que isso traga prejuízo clínico ao animal. Normalmente, utilizam-se 5 mil (de 2 mil a 10 mil) L_3 para uma infecção segura e suficiente.

Deve-se monitorar o início da eliminação de ovos por meio do OPG, que deverá ocorrer próximo do final da terceira semana pós-infecção. Caso se confirme a infecção monoespecífica (uma espécie de parasita), inicia-se o processamento das amostras, para a obtenção de larvas e a preservação de ovos e de larvas em nitrogênio líquido, para futuras passagens e ensaios in vitro. A coleta de larvas pode continuar por algumas semanas, tendo as-

segurada a quantidade de larvas. Uma vez obtido material biológico suficiente do gênero desejado, o animal deverá ser necropsiado, para a obtenção de parasitas adultos e de uma quantidade suficiente de DNA e RNA para a execução dos testes moleculares descritos neste manual.

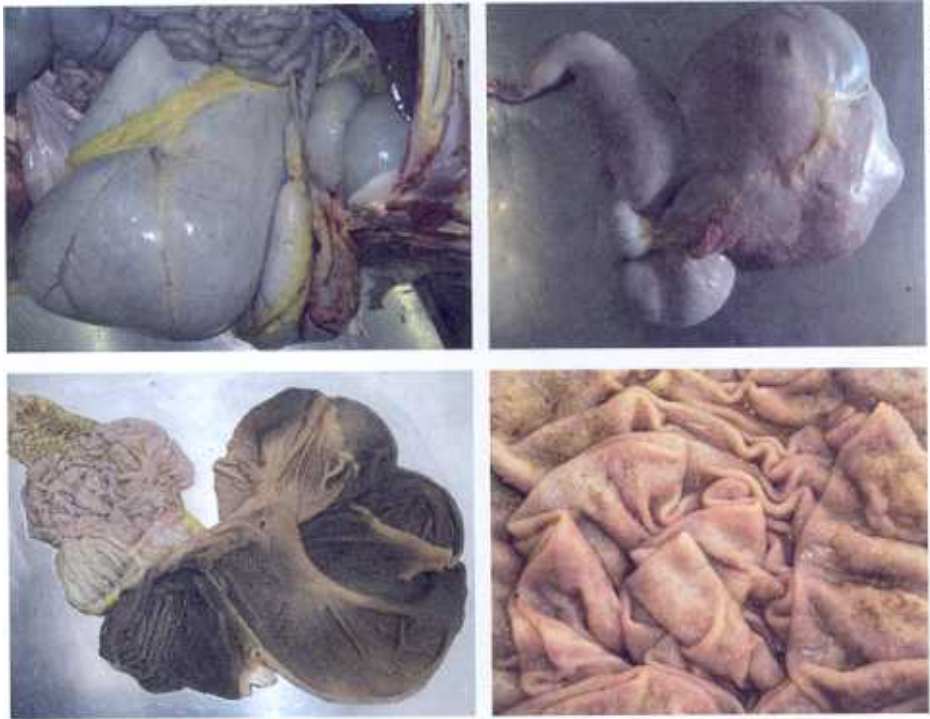
c) Técnica de necropsia parasitológica

A necropsia parasitológica, depois de feita a infecção artificial e controlada, tem por objetivo suprir material biológico de uma só vez, e, assim, reduzir o tempo que o animal permanece infectado e em sofrimento, fornecendo larvas.

A técnica consiste nos seguintes procedimentos:

- Deixar o animal em jejum por 12 horas, para uma melhor visualização dos parasitas, e realizar o abate.
- Abrir a cavidade abdominal ou torácica com cuidado, para evitar a ruptura e a perda de material.
- Identificar o órgão a ser retirado (ex.: abomaso: *Haemonchus* sp.; intestino delgado: *Cooperia* sp.; pulmão: *Dictyocaulus* sp.; e fígado: *Fasciola hepatica*).
- Isolar cada órgão com nó duplo, para evitar que o conteúdo se misture, e os parasitas se desloquem para outros órgãos.
- Fazer a identificação nas caixas, nas sacolas e nos frascos.
- Acondicionar em sacos de plástico (Figura 5).
- Encaminhar ao laboratório, para processamento imediato, evitando, assim, a degradação dos parasitas.

O abomaso deve ser aberto na sua curvatura maior, e o seu conteúdo deve ser colocado em um recipiente (balde) graduado. O órgão deve ser lavado em água corrente, com baixa pressão acima do frasco, para facilitar a coleta do conteúdo. Em seguida, colocar o conteúdo decantado em



Fotos: Renatto Souza

Figura 5. Órgãos de ovinos separados para o processamento. Observar a identificação de cada órgão, além da origem do animal e do histórico das larvas.

bandeja com água morna, para a recuperação dos espécimes, usando, para isso, uma pinça ou uma espátula (Figura 6). Parasitas adultos vivos podem ser utilizados em testes in vitro.

O intestino delgado ou o grosso deve ser aberto com o auxílio de um enterótomo (ou tesoura de gesso), acima do frasco, e sua parede deve ser raspada para a retirada dos parasitas aí aderidos. Seguir o procedimento já descrito para a obtenção dos espécimes adultos. Se houver muitos dejetos, passar o conteúdo por peneira com abertura de 1.000 µm, onde os parasitas ficarão retidos.

No caso do pulmão, proceder à abertura com o auxílio de uma tesoura, iniciando pela abertura dos brônquios (de todos, se possível), até alcançar a extremidade distal. O órgão deve ser, então, submerso em água



Foto: Marcelo Bucarão Moventio

Figura 6. Parasitas adultos de *Haemonchus contortus* no abomaso de ovino.

morna, em bandeja com 10 cm a 15 cm de profundidade. O órgão deve ser pressionado para que se encha de água, facilitando, assim, a migração dos parasitas adultos. O órgão deve ser inspecionado depois de decorridas 2 horas, quando, então, deve-se proceder à decantação da solução retida na bandeja. Para identificar formas imaturas na parede do órgão, é necessário que ele seja digerido. Já o fígado deve ser aberto com cortes largos; em seguida, deve-se fazer pressão sobre ele, para que saiam as formas adultas de *Fasciola hepatica*.

Se forem utilizados parasitas adultos em ensaios *in vitro*, será necessário que o órgão seja mantido dentro de isopor, contendo água morna, após a retirada do material de dentro do animal, até que o material seja entregue ao laboratório.

Para obter uma nova cultura, ou seja, uma cultura pura do parasita, devem ser colhidas fêmeas adultas, e que apresentem grande quantidade de ovos, após o abate do animal, para a extração dos ovos (Figura 7). As fêmeas devem ser colocadas em água destilada e cortadas em três partes, para que sejam extraídos os ovos. Esses ovos devem ser misturados com fezes autoclavadas e, em seguida, devem ser levados para a cultura, para a obtenção de larvas, para uma futura infecção.



Foto: Rodrigo Gigliotti

Figura 7. Ovos viáveis no sistema reprodutivo de *Cooperia* sp. Os ovos podem ser utilizados para nova infecção e obtenção de cultura pura.

d) Manutenção de isolado em ambiente controlado

Para aumentar a resistência de uma população parasitária, deve-se proceder a novas passagens pelo hospedeiro. Esse processo consiste em realizar a série infecção 1 – tratamento 1 – infecção 2 – tratamento 2, com ovos e/ou larvas sobreviventes do processo anterior. É imprescindível que os animais não estejam contaminados por infecção anterior, que manifestem imunidade etária ou que estejam sob efeito de tratamento anteriormente administrado. Nesse caso, o sacrifício dos animais só será realizado se existir interesse em manter amostras pontuais do estado genético da população parasitária, a fim de se determinar o grau de perda do polimorfismo em reação à pressão química.

e) Conservação dos helmintos

Depois de os parasitas terem sido retirados do órgão, eles poderão ser mantidos em água DEPC ultrapura (veja descrição abaixo) ou em álcool a 70%. A conservação de parasitas em álcool absoluto deve ser por no máximo 30 dias, para evitar grande perda de integridade das células.

Água DEPC (*Diethylpyrocarbonate*)

DEPC é um forte, embora incompleto, inibidor de RNAses por modificação covalente. A água e as demais soluções devem ser tratadas com 0,1% DEPC. É comumente usado na concentração de 0,1%, para inativar RNAses em frascos e plásticos, ou para criar soluções sem RNAses. Para produzir o DEPC, é preciso seguir as seguintes instruções:

- Adicionar 0,1 mL de DEPC em 100 mL da solução que será tratada, e agitar vigorosamente, até dissolver o DEPC.
- Deixar a solução em repouso por 12 horas, em temperatura de 37 °C.

Autoclavar por 15 minutos, para remover qualquer traço de DEPC.

Observações: antes de preparar Tris buffer tratado com DEPC, é preciso saber que o DEPC reage primeiro com aminas, e, assim, não pode ser usado diretamente para tratar o buffer. O DEPC é altamente instável na presença do Tris buffer e se decompõe rapidamente em etanol e CO₂. Assim, para preparar Tris, deve-se, antes de tudo, tratar a água com DEPC; depois, dissolver Tris, e, assim, preparar apropriadamente o buffer. Os resíduos de DEPC devem ser obrigatoriamente eliminados/inativados da solução ou do frasco, autoclavando ou aquecendo a 100 °C, por 15 minutos.

11.6 Protocolo de recuperação de ovos de nematoides gastrintestinais

- Coletar fezes do reto de animais infectados que apresentem OPG > 2 mil ovos (item 11.2).

Coletar uma porção das fezes, macerar e acrescentar água morna (± 40 °C).

- Filtrar o material fecal em quatro peneiras, com as seguintes reticulações: 1 mm, 105 μm , 55 μm e 25 μm . Os ovos passam pelas três primeiras peneiras (coletar o líquido que passa) e ficam retidos na última peneira.
- Lavar a peneira de 25 μm com água destilada, com o auxílio de uma pisseta, para retirar os ovos que aí ficaram retidos.
- Colocar o conteúdo em um béquer e, posteriormente, transferi-lo para tubos Falcon.
- Colocar os tubos Falcon em centrífuga, por 5 minutos, a 3.000 rpm (1.100 g).
- Após a centrifugação, descartar o sobrenadante e completar com solução salina saturada, para permitir a suspensão dos ovos.
- Centrifugar por 5 minutos, a 3.000 rpm.
- Despejar o sobrenadante na peneira de 25 μm e lavar os ovos com água destilada. Se a suspensão ficar suja, repetir a centrifugação com solução salina saturada.
- Despejar o conteúdo da peneira em um cálice de decantação; deixar por cerca de 30 minutos, à temperatura ambiente, desde que não seja inferior a 22 °C, ou colocar em estufa B.O.D., em temperatura de aproximadamente 25 °C (Figura 8).

11.7 Produção de meio nutritivo com *Escherichia coli* para o teste de desenvolvimento larvar – TDL (Larval Development Assay – LDA)

a) Preparação de *E. coli* strain W (ATCC 9637) (Sigma E9637, frasco de 10 g)

- Colocar 75 mg (ou 0,075 g) em 500 mL de água destilada e autoclavar por 1 hora, a 100 °C.

Obs.: Utilizar somente 250 mL; os outros 250 mL devem ser colocados em 5 tubos Falcon, de 50 mL, e devem ser congelados.



Figura 8. Passagem do material fecal em peneiras (A), centrifugação (B), sedimentação (C) e preparação dos ovos recuperados em placas de 24 poços (D) para leitura do teste de eclodibilidade e desenvolvimento larvar em microscópio invertido (E, F).



b) Salina normal

- Preparar 0,9 g NaCl em 100 mL de água destilada.

c) Preparação do extrato fermentativo (Yeast extract, frasco 500 g, qualquer marca)

- Colocar 1 g do extrato fermentativo em 90 mL de salina normal.
- Adicionar 10 mL de solução balanceada de Earle's (Sigma E3024).

d) Anfotericina B (Sigma A9528, frasco 50 mg)

Adicionar 5 mL de água destilada em frasco que contenha 50 mg de anfotericina B.

Retirar 50 μ L do frasco + 950 μ L de água Milli Q. Em seguida, retirar 350 μ L dessa mistura e adicionar 6.650 μ L de água destilada (congelar os outros 650 μ L que sobraem).

e) Meio nutritivo final

E. coli: 70% = 250 mL

Extrato fermentativo: 28% = 100 mL

Anfotericina B: 2% = 7 mL

- Colocar os 357 mL em um béquer, com barra magnética sob agitação.
- Distribuir em tubos eppendorf de 1,5 mL e congelar.

11.8 Produção de *Escherichia coli* com FITC para o teste de inibição da alimentação (Larval Feeding Inhibition Assay – LFIA)

Dependo da quantidade de testes que se pretende realizar, as soluções poderão ser produzidas em vários volumes, a saber:

a) Produção do tampão bicarbonato

Componente	Quantidade	ou	Quantidade
Água destilada	500 mL		250 mL
NaCl	750 mg		375 mg
Na ₂ CO ₃	980 mg		490 mg
NaHCO ₃	1,33 g		0,665 g

b) Preparação de salina-tampão fosfato (PBS pH 7,2)

Componente	Quantidade
Água Milli Q	q.s.p. 500 mL
KH ₂ PO ₄	1,2935 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	4,247 g
NaCl	4.25 g

- Se necessário, adicionar NaOH, até corrigir o pH, de 7,0 para 7,2.

c) Preparação de *E. coli* – strain W (ATCC 9637), Sigma E9637, frasco de 10 g (estocar em freezer)

Componente	Quantidade	ou	Quantidade
Tampão bicarbonato	20 mL		10 mL
<i>E. coli</i> liofilizada	0,045 g		0,0225 g



d) Preparar FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer – Celite F1628, frasco de 1 g) e marcar a *E. coli*

Componente	Quantidade	ou	Quantidade	ou	Quantidade
Tampão	90 mL		9 mL		900 μ L
FITC	0,1 g		0,01 g		0,001 g

- Adicionar 20 mL da *E. coli* preparada e incubar por 2 horas, de 20 °C a 24 °C (ou 2 mL de *E. coli* preparada em 9 mL de FITC com tampão bicarbonato, ou 200 mL da *E. coli* em 900 μ L do FITC com tampão bicarbonato).

e) Finalização

- Após 2 horas de incubação, centrifugar a *E. coli* marcada a 13.000 rpm, por 2 minutos.
- Remover o sobrenadante de cada tubo e adicionar o mesmo volume de PBS.
- Centrifugar novamente e remover, mais duas vezes, o sobrenadante; acrescentar o mesmo volume de PBS e estocar em freezer.

11.9 Preparação de soluções-estoques para as metodologias genóticas

a) Tris-HCl 1 M pH 7,5

Componente	[Final]	Quantidade
Água Milli-Q		800 mL
Tris base	1 M	121 g

- Ajustar o pH para 7,5 com HCl concentrado (cerca de 60 mL), adicionar água até completar 1 L e autoclavar.

b) EDTA 0,5 M pH 8,0

Componente	[Final]	Quantidade
Água Milli-Q	-	700 mL
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,5 M	186,1 g

Ajustar o pH para 8,0 com NaOH 10 M (cerca de 50 mL), completar com água até 1 L e autoclavar.

c) SDS 20%

Componente	[Final]	Quantidade
Água Milli-Q	-	100 mL
SDS	20%	20 g

d) NaCl 5 M

Água Milli-Q	-	500 mL
NaCl	5 M	146,1 g

e) Cloreto de cálcio 1 M

Componente	[Final]	Quantidade
Água Milli-Q	-	100 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	1 M	14,702 g

f) Proteinase K 20 mg/mL

Componente	[Inicial]	[Final]	Quantidade
Água Milli-Q	-	-	2,35 mL
Tris-HCl pH 7,5	1 M	10 mM	50 µL
Cloreto de cálcio	1 M	20 mM	100 µL
Glicerol	100%	50%	2,5 mL
Proteinase K	100 mg	20 mg/mL	0,1 mg

- Aliquotar e armazenar a -20 °C. Sugere-se seguir protocolo do fabricante, se houver.



g) Loading (tampão de carregamento ou de corrida)

Solução A

Componente	[Final]	Quantidade
Água Milli-Q		mL
Azul de bromofenol (corre mais)	1%	
Xilenocianol (corre menos)	%	

Solução para uso (armazenar a 4 °C)

Componente	[Final]	Quantidade
Água Milli-Q		450 µL
Solução A	0,25%	250 µ
Glicerol	30%	300 µL

h) TBE 10x

Componente	[Final]	Quantidade	Componente	[Final]	Quantidade
Água Milli-Q		900 mL	Água Milli-Q		960 mL
Tris base	89 mM	108 g	Tris base	89 mM	108 g
Ácido bórico	89 mM	55 g	Ácido bórico	89 mM	55 g
EDTA	28 mM	8,3 g	EDTA 0,5 M pH 8,0	20 mM	40 mL

- Completar para .000 mL com água Milli-Q e autoclavar.

i) TBE 1x

Componente	[Final]	Quantidade
Água Milli-Q		900 mL
TBE 10x	X	

REFERÊNCIAS

- ALONSO-DÍAZ, M. A.; TORRES-ACOSTA, J. F.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; AGUILAR-CABALLERO, A. J.; HOSTE, H. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniferous plant extracts. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 153, p. 313-319, 2008.
- ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, M. A.; GARCÍA, J. P.; BARTLEY, D.; JACKSON, F.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A. The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. **Experimental Parasitology**, New York, v. 110, p. 56-61, 2005.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Ed.). **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, 2003. 4410 p.
- BAHUAUD, D.; MARTINEZ-ORTIZ DE MONTELLANO, C.; CHAUVEAU, S.; PREVOT, F.; TORRES-ACOSTA, F.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. **Parasitology**, London, GB, v. 132, p. 545-554, 2006.
- BARGER, I. A. Helminth parasites and animal production. In: SYMONS, L. E.; DONALD, A. D.; DINEEN, J. K. (Ed.). **Biology and control of endoparasites**. Sidney: Academic Press, 1982. p. 133-155.
- BAXTER, G. D.; BARKER, S. C. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick, *Boophilus microplus*: characterization and role in organophosphate resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 28, p. 581-589, 1998.
- BENNETT, S. Solexa Ltda. **Pharmacogenomics**, Kansas, v. 5, p. 433-438, 2004.
- BEECH, R. N.; PRICHARD, R. K.; SCOTT, M. E. Genetic variability of the β -tubulin genes in benzimidazole-susceptible and resistant strains of *Haemonchus contortus*. **Genetics**, Austin, TX, v. 139, p. 103-110, 1994.
- BLACKHALL, W. J.; PRICHARD, R. K.; BEECH, R. N. P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 152, p. 101-107, 2008.
- BORGES, M.; DE NOLLIN, S. Ultrastructural changes in *Ascaris suum* intestine after mebendazole treatment *in vivo*. **Journal of Parasitology**, Laurence, v. 60, p. 110-122, 1975.
- BORGSTEEDE, F. H. M.; COUWENBERG, T. Changes in LC₅₀ in an *in vitro* egg development assay during the patent period of *Haemonchus contortus* in sheep. **Research Veterinary Science**, Oxford, v. 42, p. 413-414, 1987.
- BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, Amsterdam, NL, v. 2, p. 177-186, 1999.
- BRUNET, S.; HOSTE, H. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 54, p. 7481-7487, 2006.

- BRUNET, S.; JACKSON, F.; HOSTE, H. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 38, p. 783-790, 2008.
- CEZAR, A. S.; CATTO, J. B.; BIANCHIN, I. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 2083-2091, 2008.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 162, p.156-159, 1987.
- COLES, G. C. Anthelmintic resistance looking to the future: a UK perspective. **Research Veterinary Science**, Oxford, v. 78, n. 2, p. 99-108, 2005.
- COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. 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. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 44, p. 35-44, 1992.
- COLES, G. C.; JACKSON, F.; POMROY, W. E.; PRICHARD, R. K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M. A.; VERCRUYSSSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 136, p. 167-185, 2006.
- CRAVEN, J.; BJORN, H.; BARNES, E. H.; HENRIKSEN, S. A.; NANSEN, P. A comparison of in vitro tests and a faecal egg count reduction test in detecting anthelmintic resistance in horse strongyles. **Veterinary Parasitology**, Veterinary Parasitology, v. 85, n. 1, p. 49-59, 1999.
- CUNHA, E. A.; SANTOS, L. E.; BUENO, M. S.; VERÍSSIMO, C. J. **Produção de ovinos para corte**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 2007. 141 p.
- D'ASSONVILLE J. A.; JANOVSKY, E.; VERSLEY A. *In vitro* screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 61, p. 73-80, 1996.
- DEMELE, J.; KUTTLER, U.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Adaptation and evaluation of three different in vitro tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 170, p. 61-70, 2010.
- DÍEZ-BANOS, P.; PEDREIRA, J.; SANCHEZ-ANDRADE, R.; FRANCISCO, I.; SUAREZ, J. L.; DIAZ, P.; PANADERO, R.; ARIAS, M.; PAINCEIRA, A.; PAZ-SILVA, A.; MORRONDO, P. Field evaluation for anthelmintic-resistant ovine gastrointestinal nematodes by *in vitro* and *in vivo* assays. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 94, p. 925-928, 2008.
- EID, J.; FEHR, A.; GRAY, J.; LUONG, K.; LYLE, J.; OTTO, G.; PELUSO, P.; RANK, D.; BAYBAYAN, P.; BETTMAN, B.; BIBILLO, A.; BJORNSON, K.; CHAUDHURI, B.; CHRISTIANS, F.; CICERO, R.; CLARK, S.; DALAL, R.; deWINTER, A.; DIXON, J.; FOQUET, M.; GAERTNER, A.; HARDENBOL, P.; HEINER, C.; HESTER, K.; HOLDEN, D.; KEARNS, G.; KONG, X.; KUSE, R.; LACROIX, Y.; LIN, S.; LUNDQUIST, P.; MA, C.; MARKS, P.; MAXHAM, M.; MURPHY, D.; PARK, I.; PHAM, T.; PHILLIPS, M.; ROY, J.;

- SEBRA, R.; SHEN, G.; SORENSON, J.; TOMANEY, A.; TRAVERS, K.; TRULSON, M.; VIECELI, J.; WEGENER, J.; WU, D.; YANG, A.; ZACCARIN, D.; ZHAO, P.; ZHONG, F.; KORLACH, J.; TURNER, S. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. **Science**, Washington, DC, v. 323, p. 133-138, 2009.
- ECHAVARRIA, F.; BORBA, M. F. S.; PINHEIRO, A. C.; WALLER, P. J.; HANSEN, J. W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 62, p. 199-206, 1996.
- ELLARD, L.; CABARET, J.; HUMBERT, J. F. PCR diagnosis of benzimidazole-susceptibility or resistance in natural populations of the small ruminant parasite, *Teladorsagia circumcincta*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 80, p. 231-237, 1999.
- ENG, J. K. L.; BLACKHALL, W. J.; OSEI-ATWENEBOANA, M. Y.; BOURGUINAT, C.; GALAZZO, D.; BEECH, R. N.; UNNASCH, T. R.; AWADZI, K.; LUBEGA, G. W.; PRICHARD, R. K. Ivermectin selection on β -tubulin: evidence in *Onchocerca volvulus* and *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 150, p. 229-235, 2006.
- ETO, M. Biochemical mechanisms of insecticidal activities. In: **Chemistry of Plant Protection**. Berlin, DE: Springer-Verlag, 1990. v. 6. p. 67-68.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Ottawa, CA, v. 8, p. 175-185, 1998.
- FERREIRA, A. B. de H. **Dicionário Aurélio da língua portuguesa**. 5a. ed. Curitiba: Positivo, 2010. 2.272 p.
- FERREIRA, M. E.; GATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores moleculares em el análisis genético**. Brasília, DF: Embrapa Cenargen, 1998. 220 p. (Embrapa Cernargen. Documento 20).
- FLOATE, K. D. Endectocide use in cattle and fecal residues: environmental effects in Canada. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, CA, v. 70, p. 1-10, 2006.
- FORBES, A. B.; CUTLER, K. L.; RICE, B. J. Sub-clinical parasitism in spring-born, beef suckler calves: epidemiology and impact on growth performance during the first grazing season. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 104, p. 339-344, 2002.
- FRIEDMAN, P.; PLATZER, E. Interaction of anthelmintic benzimidazoles with *Ascaris suum* embryonic tubulin. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, NL, v. 630, p. 271-278, 1980.
- GASSER, R. B.; BOTT, N. J.; CHILTON, N. B.; HUNT, P.; BEVERIDGE, I. Toward practical, DNA-based diagnostic methods for parasitic nematodes of livestock – bionomic and biotechnological implications. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 26, p. 325-334, 2008.
- GEORGHIOU, G. P. Overview of Insecticide Resistance. In: GREEN, M. B.; LEBARON, H. M.; MOBERG, W. K. (Ed.) **Managing Resistance to Agrochemicals: from fundamental research to practical strategies**. Washington, DC: American Chemical Society, 1990. p. 18-41. (ACS Series 421).
- GILL, J. H.; REDWIN, J. M.; VAN WYK, J. A.; LACEY, E. Avermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus* effects of ivermectin resistance. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 25, p. 463-470, 1995.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing.

Genome Research, Ottawa, CA, v. 8, p. 195-202, 1998.

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

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; BORJA, M. G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, n. 125, p. 8-10, 2002.

GROMBONI, J. G. G.; GAGLIARDI, T. R.; MELLO, S. S.; GIUSTI, J.; TURIM, E.; VERISSIMO, C. J.; MOLENTO, M. B.; MÉO-NICIURA, S. C. Identificação molecular do helminto *Haemonchus contortus* e de polimorfismo no gene da beta-tubulina In: JORNADA CIENTÍFICA - EMBRAPA SÃO CARLOS, 1., 2009, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2009.

GUERRERO, F. D.; DAVEY, R. B.; MILLER, R. J. Use of an allele-specific polymerase chain reaction assay to genotype pyrethroid resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanhan, v. 38, p. 44-50, 2001.

GUIMARÃES, P. E. M.; COSTA, M. C. R. SNPs: Satis diferenças de um código. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, n. 26, p. 24-27, 2002.

HACIA, J. G.; FAN, J. B.; RYDER, O.; JIN, L.; EDGEMON, K.; GHANDOUR, G.; MAYER, R. A.; SUN, B.; HSIE, L.; ROBBINS, C. M.; BRODY, L. C.; WANG, D.; LANDER, E. S.; LIPSHUTZ, R.; FODOR, S. P.; COLLINS, F. S. Determination of ancestral alleles for human single-nucleotide polymorphisms using highdensity oligonucleotide arrays. **Nature Genetics**, New York, v. 22, p. 164-7, 1999.

HAZELBY, C. A.; PROBERT, A. J.; ROWLANDS, D. A. T. Anthelmintic resistance in nematodes causing parasitic gastroenteritis of sheep in the UK. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy**, North Carolina, v. 17, p. 245-252, 1994.

HE, H.; CHEN, A. C.; DAVEY, R. B.; IVIE, G. W.; GEORGE, J. E. Identification of a point mutation in the para-sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 261, p. 558-561, 1999.

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

IHLER, C. F.; BJORN, H. Use of two *in vitro* methods for the detection of benzimidazole resistance in equine small strongyles (*Cyathostoma* spp.). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 65, p. 117-125, 1996.

JACKSON, F.; GREER, A. W.; HUNTLEY, J.; McANULTY, R. W.; BARTLEY, D. J.; STANLEY, A.; STENHOUSE, L.; STANKIEWICZ, M.; SYKES, A. R. Studies using *Teladorsagia circumcincta* in an *in vitro* direct challenge method using abomasal tissue explant. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 124, p. 73-89, 2004.

JAMES, C. E.; HUDSON, A. L.; DAVEY, M. W. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 25, p. 328-335, 2009.

JAMROZ, R. C.; GUERRERO, F. D.; KAMMLAH, D.; KUNZ, S. E. Role of the *kdr* and super-*kdr* sodium channel; mutations in pyrethroid resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 28, p. 1031-1037, 1998.

JAMROZ, R. C.; GUERRERO, F. D.; PRUETT, J. H.; OEHLER, D. D.; MILLER, R. J. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of southern cattle tick. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 46, p. 685-695, 2000.

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

KONIGOVA, A.; VARADY, M.; CORBA, J. Comparison of *in vitro* methods and faecal egg count reduction test for the detection of benzimidazole resistance in small strongyles of horses. **Veterinary Research Communication**, Amsterdam, NL, v. 27, p. 281-288, 2003.

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

KWA, M.; VEENSTRA, J.; ROOS, M. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in β tubulin isotype I. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 63, p. 299-303, 1994.

KWA, M.; VEENSTRA, J.; VAN DIJK, M.; ROOS, M. β tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Molecular Biology**, London, GB, v. 246, p. 500-510, 1995.

LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein tubulin in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazole. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 18, p. 885-936, 1988.

LACEY, E.; REDWIN, J. M.; GILL, J. H.; DEMARGHERITI, V. M.; WALLER, P. J. A larval development assay for the simultaneous detection of broad spectrum anthelmintic resistance. In: BORAY, J. C.; MARTIN, P. J.; ROUSH, R. T. (Ed.). **Resistance of Parasites to Antiparasitic Drugs**. Rahway: MSD AgeVet, 1990. p. 177-184.

LOPES, W. D. Z.; SANTOS, T. R.; SAKAMOTO, C. A. M.; LIMA, R. C. A.; SOARES, V. E.; BUZZULINI, C.; GARCIA, M. V.; COSTA, G. H. N.; OLIVERIA, G. P.; COSTA, A. J. Eficácia terapêutica e ação residual da doramectina 3,5%, comparativamente à ivermectina e à moxidectina 10% contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* parasitando bovinos experimentalmente infestados (teste de estábulo). **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, n. 6, p. 17-21, 2009.

LUFT, C. P. **Dicionário escolar Luft da língua portuguesa**. 2a. ed. São Paulo: Ática, 2005. 760 p.

MAEDA, M.; MURAYAMA, N.; ISHII, H.; URYU, N.; OTA, M.; TSUJI, K.; INOKO, H. A simple and rapid method for HLA-DQA1 genotyping by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 34, p. 290-298, 1989.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. A.; BERKA, J.; BRAVERMAN, M. S.; CHEN, Y. J.; CHEN, Z.; DEWELL, S. B.; DU, L.; FIERRO, J. M.; GOMES, X. V.; GODWIN, B. C.; HE, W.; HELGESEN, S.; HO, C. H.; IRZYK, G. P.; JANDO, S. C.; ALENQUER, M. L.; JARVIE, T. P.; JIRAGE, K. B.; KIM, J. B.; KNIGHT, J. R.; LANZA, J. R.; LEAMON, J. H.; LEFKOWITZ, S. M.; LEI, M.; LI, J.; LOHMAN, K. L.; LU, H.; MAKHIJANI, V. B.; McDADE, K. E.; MCKENNA, M. P.; MYERS, E. W.; NICKERSON, E.; NOBILE, J. R.; PLANT, R.; PUC, B. P.; RONAN, M. T.; ROTH, G. T.; SARKIS, G. J.; SIMONS, J. F.; SIMPSON, J. W.; SRINIVASAN, M.; TARTARO, K. R.; TOMASZ, A.; VOGT, K. A.; VOLKMER, G. A.; WANG, S. H.; WANG, Y.; WEINER, M. P.; YU, P.; BEGLEY, R. F.; ROTHBERG, J. M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, London, GB, v. 437, p. 376-380, 2005.

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

MARTÍNEZ M. I.; LUMARET, J. P. Las prácticas agropecuarias y sus consecuencias em la entomofauna y el entorno ambiental. **Folia Entomológica Mexicana**, México, v. 45, n. 1, p. 57-68, 2006.

MATTOS, M. J. T.; OLIVEIRA, M. J. T.; LUSTOSA, C. M. B. Influência do parasitismo por nematódeos sobre o perfil hematológico de caprinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, p. 133-135, 2005.

MEJÍA, M. E.; IGARTUA, B. F.; SCHMIDT, E. E.; CABARET, J. Multispecies and multiple anthelmintic resistance on cattle nematodes in a farm in Argentina: the beginning of high resistance? **Veterinary Research**, Paris, FR, v. 34, p. 461-467, 2003.

MELLO, S. S.; GAGLIARDI, T. R.; NICIURA, S. C. M. Avaliação de protocolos para extração de DNA de larvas individuais de helmintos. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICEP, 12., 2009, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Unicep, 2009.

MÉO-NICIURA, S. C.; VERISSIMO, C. J.; NOGUEIRA, A. H. C.; MUNARI, D. P.; CHAGAS, A. C. S.; ALBERTI, A. L. L.; RODRIGUES, C. F. C.; BARBOSA, C. M. P.; CHIEBAO, D. P.; CARDOSO, D.; SILVA, G. S.; PEREIRA, J. R.; KATIKI, L. M.; MARGATHO, L. F. F.; COSTA, R. L. D.; NARDON, R. F.; UENO, T. E. H.; CURCI, V. C. L. M.; MOLENTO, M. B. **Determinação da eficácia anti-helmíntica em rebanhos ovinos**: metodologia de colheita de amostras e de informações de manejo zoossanitário. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2009. (Documentos, 91).

MILLER, R. J.; DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E. Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanhan, v. 36, p. 536-538, 1999.

MILLER, R. J.; MARTINS, J. R.; DUCORNEZ, S.; BARRÉ, N.; SOLARI DA MONTE, M. A.; CUORE PASSEGI, U. D.; GEORGE, J. E. Use of a modified-Larval Packet Test (LPT) to measure amitraz susceptibility in *Boophilus microplus* in Brazil, New Caledonia, and Uruguay, and a comparison of the modified-LPT to a modified- Shaw technique for amitraz testing in *B. microplus*. In: INTERNATIONAL SEMINAR IN ANIMAL PARASITOLOGY. WORLD SITUATION OF PARASITE RESISTANCE IN VETERINARY MEDICINE, 5., 2003, Merida. **Anais...** Merida: Senasica-Inifap-Infarvet-Uady-FAO-Ampave, 2003. p. 118-123.

- MOLENTO, M. B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSSES, 1., 2004, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto: CBPV, 2004. 1 CD-Rom
- MOLENTO, M. B.; PRICHARD, R. K. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective arvae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, p. 117-121, 2001.
- MOTTIER, L.; LANUSSE, C. Bases moleculares de la resistencia a fármacos antihelmínticos. **Revista de Medicina Veterinária**, Montevideo, UY, v. 82, p. 74-85, 2001.
- PAOLINI, V.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. *In vitro* effects of three woody plant and sainfoin on third-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. **Parasitology**, London, GB, v. 129, p. 69-77, 2004.
- PONCE, J. D. M.; AGUSTINI, M. G.; KLOSTER, F. S.; MOLENTO, M. B. Estabelecimento de curva farmacológica de ivermectina em teste in vitro para nematódeos gastrintestinais de ovinos. In: SIMPÓSIO PARANAENSE DE OVINO CULTURA, 16., 2009, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR, 2009. v. 1. p. 65.
- PRICHARD, R. K. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 17, p. 445-452, 2001.
- PRICHARD, R. K. Mechanisms of anthelmintic resistance: implications for the future of parasite control. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 15., 2008, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR/UEL, 2008. p. 62-68. Disponível em: <http://www.cbpv.org.br/congressos/anais-palestras_e_resumos-xv_cbpv_issn_1981-1977.pdf>. Acesso em: 27 jan. 2010.
- RABEL, B.; MCGREGOR, R.; DOUCH, P. G. C. Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 24, p. 671-676, 1994.
- REGITANO, L. C. A.; NICIURA, S. C. M.; IBELLI, A. M. G.; GOUVEIA, J. J. **Protocolos de biologia molecular aplicada à produção animal**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. 66 p. Disponível em: <<http://www.cppse.embrapa.br/080servicos/070publicacaogratis/e-book/LivroProt Mol.pdf>>. Acesso em: 12 jul 2010.
- RESZKA, N.; RIJSEWIJK, F.; ZELNIK, V.; MOSKWA, B.; SZEWCZYK, K. *Haemonchus contortus*: Characterization of the baculovirus expressed form of aminopeptidase H11. **Experimental Parasitology**, New York, v. 117, p. 208-213, 2007.
- ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for egg counts and larval cultures for Strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 1, n. 1, p. 99-102, 1950.
- SAIKI, R. K.; BUGAWAN, T. L.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. **Nature**, London, GB, v. 324, p. 163-166, 1986.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. p. 1302.

- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SANGSTER, N. C. Pharmacology of anthelmintic resistance. **Parasitology**, Essex, v. 113, p. 201-216, 1996.
- SANGSTER, N. C. Managing parasiticide resistance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 98, p. 89-109, 2001.
- SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, p. 1135-45, 2008.
- SILVESTRE, A.; HUMBERT, J. F. A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites. **Experimental Parasitology**, New York, v. 95, p. 271-276, 2000.
- STONE, B. F. The genetics of resistance by ticks to acaricides. **Australian Veterinary Journal**, Victoria, v. 48, p. 345-350, 1972.
- STONE, B. F.; HAYDOCK, K. P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). **Bulletin of Entomological Research**, London, GB, v. 53, p. 563-578, 1962.
- TANG, K.; FU, D. J.; JULIEN, D.; BRAUN, A.; CANTOR, C. R.; KÖSTER, H. Chip-based genotyping by mass spectrometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 96, p. 10016-20, 1999.
- TAYLOR, M. A. A larval development test for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of sheep. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 49, p. 198-202, 1990.
- TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 103, p. 183-194, 2002.
- TAYLOR, M. A.; LEARMOUNT, J.; LUNN, E.; MORGAN, C.; CRAIG, B. H. Multiple resistance to anthelmintics in sheep nematodes and comparison of methods used for their detection. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, NL, v. 86, p. 67-70, 2009.
- THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. The International Hapmap Project. **Nature**, London, GB, v. 426, p. 789-796, 2003.
- 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*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, p. 41-47, 2004.
- UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4. ed. Tokio, JP: Japan International Cooperation, 1998. 143 p.
- VALOUEV, A.; ICHIKAWA, J.; TONTHAT, T.; STUART, J.; RANADE, S.; PECKHAM, H.; ZENG, K.; MALEK, J. A.; COSTA, G.; MCKERNAN, K.; SIDOW, A.; FIRE, A.; JOHNSON, S. M. A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. **Genome Research**, Ottawa, CA, v. 18, p. 1051-1063, 2008.

- VAN WYK, J. A.; CABARET, J.; MICHAEL, L.M. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 119, p. 277-306, 2004.
- VÁRADY, M.; BJØRN, H.; NANSEN, P. *In vitro* characterization of anthelmintic susceptibility of field isolates of the pig nodular worm *Oesophagostomum* spp., susceptible or resistant to various anthelmintics. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 733-740, 1996.
- VÁRADY, M.; CERNÁNSKA, D.; CORBA, J. Use of two *in vitro* methods for the detection of anthelmintic resistant nematode parasites on Slovak sheep farms. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 135, p. 325-331, 2006.
- VÁRADY, M.; CUDEKOVA, P.; CORBA, J. *In vitro* detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*: egg hatch test versus larval development test. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 149, p. 104-110, 2007.
- VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; COLES, G. C.; JACKSON, F. Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. **Parasitology Research**, Berlin, DE, v. 105, p. 825-834, 2009.
- WALLER, P. J.; PRICHARD, R. K. Drug resistance in nematodes. In: CAMPBELL, W. C.; REW, R. S. (Ed.). **Chemotherapy of Parasitic Disease**. New York: Plenum, 1986. p. 339-362.
- WILLIAMSON, M. S.; MARTINEZ-TORRES, D.; HICK, C. A.; DEVONSHIRE, A. L. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 252, p. 51-60, 1996.
- WOODS, D. J.; KNAUER, C. S. Discovery of veterinary antiparasitic agents in the 21st Century: A view from industry. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 40, p. 1177-1181, 2010.
- WURSTHORN, L.; MARTIN, P. **Reso**: faecal egg count reduction test (FECRT) Analysis Program. 2.01. Parkville: CSIRO Animal Health Research Laboratory, 1990.
- ZAJAC, A. M.; CONBOY, G. A. **Veterinary clinical parasitology**. 7. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2006. 320 p.