



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANDERSON EDUARDO CORREIA MEDEIROS

**Diagnóstico coproparasitológico e avaliação da resistência anti-helmíntica da
helminiose gastrintestinal em pequenos ruminantes**

RECIFE
2024

ANDERSON EDUARDO CORREIA MEDEIROS

**Diagnóstico coproparasitológico e avaliação da resistência anti-helmíntica da
helmintose gastrintestinal em pequenos ruminantes**

Monografia apresentada à coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

**RECIFE
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Bibliotecário(a): Suely Manzi – CRB-4 809

M488d Medeiros, Anderson Eduardo Correia.
Diagnóstico coproparasitológico e avaliação da
resistência anti-helmíntica da helmintose gastrointestinal
em pequenos ruminantes / Anderson Eduardo Correia
Medeiros. – Recife, 2024.
51 f.; il.

Orientador(a): Leucio Câmara Alves.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado
em Ciências Biológicas, Recife, BR-PE, 2024.

Inclui referências.

1. Anti-helmínticos - Pernambuco. 2. *Haemonchus
contortus*. 3. Sistema gastrointestinal - Doenças. 4.
Parasitologia veterinária 5. Nematóides. I. Alves, Leucio
Câmara, orient. II. Título

CDD 574

ANDERSON EDUARDO CORREIA MEDEIROS

**Diagnóstico coproparasitológico e avaliação da resistência anti-helmíntica da
helmintose gastrointestinal em pequenos ruminantes**

Monografia apresentada à coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 30 de Setembro de 2024.

Banca Examinadora

Orientador: _____

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves (UFRPE)

Examinador: _____

Prof^a Dr^a Gílcia Aparecida de Carvalho (UFRPE)

Examinador: _____

Dr^a Maria Fernanda Melo Monteiro (Externa)

RECIFE-PE
2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por toda força e auxílio, o que me fez superar cada dificuldade durante toda essa etapa, tão importante da minha vida.

Aos meus pais, Jacqueline Correia Aguiar e Anderson José Medeiros, por todo amor, carinho, cuidado e por sempre me incentivarem e me apoiarem em cada passo e decisão, vocês foram fundamentais nesse processo e por eu ter chegado até aqui.

A minha avó, Célia Maria Medeiros, pelo carinho, apoio e por sempre torcer por mim e me ouvir falar das alegrias e aflições durante toda a graduação.

Agradeço ao meu orientador, professor Leucio Câmara Alves, por toda paciência, dedicação e ensinamentos passados a mim antes e durante a realização deste trabalho, sua orientação foi de extrema importância.

A Carina Lucena Mendes Marques, pela sua orientação durante o PIBIC, por todo apoio, incentivo e paciência de me ensinar o que sei hoje de biologia molecular, sendo fundamental para a realização desta pesquisa, sempre serei grato por tudo.

A professora Renata Pimentel Bandeira de Melo, expresse minha gratidão por toda contribuição neste trabalho.

Agradeço a todos do Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP-UFRPE) que contribuíram para minha formação tanto acadêmica quanto pessoal e que colaboraram de diversas formas no desenvolvimento dessa pesquisa.

A equipe do Laboratório de Viroses da UFRPE, pela disponibilidade e colaboração nas coletas de material.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida durante o período do PIBIC.

A banca examinadora, por terem aceitado o convite e avaliar este trabalho visando melhorá-lo.

Aos amigos que fiz e que estão comigo desde o início me apoiando e fazendo tudo parecer mais fácil, agradeço de forma especial, aos amigos do grupo mano, pessoas que conheci durante a graduação e que se tornaram especiais na minha vida, compartilhando ótimos momentos juntos.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), por proporcionar um ambiente que garante o aprendizado e o crescimento pessoal e profissional, me apresentando o quão diverso e importante é a biologia.

A todos, meu muito obrigado.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

As helmintoses gastrintestinais em pequenos ruminantes, especialmente as ocasionadas por nematódeos são frequentes, sendo necessário o tratamento com anti-helmínticos. Alguns fatores como manejo, tratamento inadequado e subdosagem, podem levar ao desenvolvimento de resistência anti-helmíntica (RA), representando um problema global. A classe de benzimidazóis (BZ) é uma das mais utilizadas no tratamento de helmintoses e conseqüentemente uma das que mais apresenta problemas envolvendo resistência. Um dos parasitos mais associados à RA em pequenos ruminantes é *Haemonchus contortus* que causa sérios problemas no rebanho podendo levar o animal a óbito. Com isso, o objetivo deste estudo foi realizar o diagnóstico coproparasitológico de pequenos ruminantes e detectar marcadores moleculares associados à resistência a BZs em populações de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes do estado de Pernambuco. Foi realizada coleta de fezes de 73 caprinos e três ovinos, provenientes de três propriedades e analisadas pela técnica parasitológica de FLOTAC para obtenção do ovos por grama de fezes (OPG). Além disso, o conteúdo do abomaso de 40 ovinos foi coletado para pesquisa do helminto adulto. Foi realizado um pool das fezes por propriedade e realizada coprocultura para obtenção das larvas infectantes de terceiro estágio (L3). Os helmintos adultos e as L3 foram submetidos à extração de DNA e à reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação e confirmação da espécie. O perfil de resistência destes parasitos foi determinado através de amplificação por PCR para o gene da beta-tubulina relacionado à RA, seguida de sequenciamento. Como resultado, no FLOTAC a média geral foi de 1.797 ovos tipo Strongyloidea. Nas coproculturas, L3 de *Haemonchus* sp. foram as mais encontradas seguida de *Trichostrongylus* spp. Na coleta de conteúdo do abomaso 15/40 (37,5%) dos animais apresentaram o nematódeo. O resultado da PCR das L3 e dos helmintos adultos confirmou a presença de *H. contortus*. Entretanto, não foram encontradas mutações pontuais associadas a BZs nos códons que já se tem relatos em *H. contortus*. O conhecimento da resistência anti-helmíntica em nematódeos presentes em pequenos ruminantes é essencial para mitigar o desenvolvimento e a disseminação de isolados resistentes em Pernambuco.

Palavras-chave: Anti-helmínticos; *Haemonchus*; PCR; OPG;

ABSTRACT

Gastrointestinal helminthiasis in small ruminants, especially those caused by nematodes, are frequent and require treatment with anthelmintics. Some factors such as management, inadequate treatment and underdosage can lead to the development of anthelmintic resistance (AR), representing a global problem. The benzimidazole (BZ) class is one of the most widely used in the treatment of helminthiasis and consequently one of the most common with resistance problems. One of the parasites most associated with AR in small ruminants is *Haemonchus contortus*, which causes serious problems in the herd and can lead to the death of the animal. Therefore, the aim of this study was to perform the coproparasitological diagnosis of small ruminants and detect molecular markers associated with resistance to BZs in populations of gastrointestinal nematodes of small ruminants in the state of Pernambuco. Feces were collected from 73 goats and three sheep from three farms and analyzed using the FLOTAC parasitological technique to obtain eggs per gram of feces (EPG). In addition, the abomasum content of 40 sheep was collected for adult helminth screening. A pool of feces was collected per farm and stool culture was performed to obtain infective third-stage larvae (L3). Adult helminths and L3 were subjected to DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) for species identification and confirmation. The resistance profile of these parasites was determined by PCR amplification for the beta-tubulin gene related to AR, followed by sequencing. As a result, in FLOTAC the overall average was 1,797 Strongyloidea eggs. In stool cultures, L3 of *Haemonchus* sp. were the most frequently found, followed by *Trichostrongylus* spp. In the collection of abomasal contents, 15/40 (37,5%) of the animals presented the nematode. The PCR result of L3 and adult helminths confirmed the presence of *H. contortus*. However, no point mutations associated with BZs were found in the codons that have already been reported in *H. contortus*. Knowledge of anthelmintic resistance in nematodes present in small ruminants is essential to mitigate the development and dissemination of resistant isolates in Pernambuco.

Keywords: Anthelmintics; *Haemonchus*; PCR; EPG;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Haemonchus contortus</i> fêmea.....	19
Figura 2 - Bolsa copuladora do macho de <i>H. contortus</i>	20
Figura 3 - Ciclo biológico de <i>Haemonchus</i> sp.....	21
Figura 4 - Coinfecções entre os parasitos gastrintestinais nas amostras fecais analisadas pelo método de FLOTAC provenientes dos municípios de Abreu e Lima, Gravatá e Cachoeirinha.....	33
Figura 5 - Produtos de amplificação da região ITS-2 do rDNA de <i>Haemonchus contortus</i> . Linhas: M: marcador de peso molecular de 100pb; 1;2;3;4;5;6;7: <i>Haemonchus</i> sp. adulto; 8: Larvas L3; 9;10;11;12;13;14;15;16: <i>Haemonchus</i> sp. adulto; 17: Sugestivo de <i>Trichostrongylus</i> spp. adulto ; 18: Controle positivo- <i>H. contortus</i> adulto; 19: Controle negativo.....	35
Figura 6 - Análise da qualidade dos picos da sequência de DNA através do software BioEdit.....	36
Figura 7 - Sequências alinhadas através do ClustalW no software BioEdit, sequências obtidas do GenBank, a sequência Hc1 representando a amostra de Gravatá e Hc2 de Recife, as marcações indicam as posições em que os códons 167 (CAT), 198 (GAA) e 200 (TTC/TAC) estão na sequência.....	36
Figura 8 - Sequências alinhadas através do ClustalW no software BioEdit, as sequências M76493.1 e MK382833.1 foram obtidas do GenBank, a primeira apresenta no códon 167 marcado em vermelho, já os retângulos, os códons 198 e 200 respectivamente.....	37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Resultado do exame coproparasitológico e média de ovos por grama de fezes (OPG) para ovos tipo Strongyloidea em pequenos ruminantes dos municípios de Gravatá, Abreu e Lima e Cachoeirinha..... 32
- Tabela 2 - Frequência absoluta e relativa de parasitos gastrintestinais nas amostras analisadas provenientes dos municípios de Abreu e Lima, Gravatá e Cachoeirinha.... 32
- Tabela 3 - Porcentagem de larva de terceiro estágio (L3) de acordo com gênero nas coproculturas das diferentes propriedades..... 34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Panorama da caprinovinocultura no Brasil.....	14
2.2 Helmintoses em pequenos ruminantes.....	14
2.3 Diagnóstico coproparasitológico de helmintoses.....	16
2.4 Gênero <i>Haemonchus</i>	18
2.4.1 <i>Haemonchus contortus</i>	18
2.5 Ciclo biológico do <i>H. contortus</i>	20
2.6 Manifestação clínica da Hemoncose.....	21
2.7 Anti-helmínticos e seu mecanismo de ação.....	22
2.8 Resistência anti-helmíntica e diagnóstico.....	23
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos Específicos.....	27
4 METODOLOGIA.....	28
4.1 Área de estudo e aspectos éticos.....	28
4.2 Diagnóstico parasitológico em pequenos ruminantes.....	28
4.2.1 Animais e coleta de material fecal.....	28
4.2.2 Obtenção de larvas de terceiro estágio.....	29
4.2.3 Coleta de helmintos adultos.....	29
4.3 Extração de DNA e caracterização molecular.....	29
4.4 Realização da Reação em cadeia da polimerase (PCR) para a região de interesse do gene da β -tubulina associado a RA.....	30
4.5 Purificação e quantificação do DNA.....	31
4.6 Sequenciamento das amostras e análise.....	31
5 RESULTADOS.....	32
6 DISCUSSÃO.....	38
7 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

As helmintoses em pequenos ruminantes é um dos principais problemas sanitários que impactam de forma negativa a produção animal em várias regiões do mundo (Amarante, 2011). Essas parasitoses comumente são ocasionadas por nematódeos gastrintestinais, principalmente dos gêneros *Haemonchus*, *Ostertagia* e *Trichostrongylus*, gerando impactos significativos no rebanho como perda de peso, queda no desempenho produtivo e reprodutivo e muitas vezes levam os animais ao óbito (El-Ashram; Suo, 2017). Desta forma é imprescindível a realização da dosificação anti-helmíntica.

Há três maiores classes de anti-helmínticos mais comumente utilizados no tratamento de helmintoses em pequenos ruminantes, com utilização frequente os Benzimidazóis (BZs), Imidazotiazóis e Lactonas Macroclínicas (LMs) (Kotze; Prichard, 2016).

Contudo, a subdosagem, tratamento inadequado, constituição genética do parasito, são considerados fatores predisponentes para o desenvolvimento de resistência anti-helmíntica (RA), que consiste na capacidade de um organismo sobreviver a diferentes doses de um medicamento, que antes não permitiria o seu desenvolvimento (Fissiha; Kinde, 2021; Kotze; Prichard, 2016).

Este fenômeno já foi relatado em diversas classes de anti-helmínticos, sendo considerado um problema global em várias espécies, particularmente em pequenos ruminantes, representando uma séria ameaça à produção animal (Kaplan, 2004; Potârniche, *et al.* 2021; Sczesny-Moraes *et al.*, 2010). No Brasil há relatos da RA instalada em todas as regiões do país (McKenna, 2010; Papadopoulos *et al.*, 2012; Torres-Acosta *et al.*, 2012).

Sobre o surgimento de RA, o principal mecanismo molecular associado à resistência aos BZs envolve mutações do tipo polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) no gene da β -tubulina, que codifica uma proteína estrutural vital para o desenvolvimento do parasito (Samson-Himmelstjerna, 2006; Silvestre; Cabaret, 2002).

Já a resistência a Imidazotiazóis, tem sido associada principalmente a receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) que é o alvo do fármaco, o gene *Hco-acr-8* codifica uma subunidade α que compõem a estrutura desses receptores,

alguns isolados resistentes apresentam o transcrito truncado deste gene (*Hco-acr-8b*), que codifica proteínas incompletas ou não funcionais, afetando o funcionamento normal dos receptores e sua afinidade com o fármaco (Barrère *et al.*, 2012; Fauvin *et al.*, 2010).

A resistência à LMs está mais associada a alterações em transportadores como glicoproteína-P e canais de cloro mediados pelo glutamato (GluCl), também tem sido associada a alterações alélicas no isotipo 1 do gene da β -tubulina, o *locus* chave envolvido na resistência aos BZs (Mottier; Prichard, 2008).

O diagnóstico de resistência pode ser realizado através do teste de redução na contagem de ovos nas fezes (TRCOF), teste de eclosão de ovos (TEO), teste de desenvolvimento larvar (TDL) e técnicas moleculares para diagnosticar RA (Fortes; Molento, 2013).

Com alta sensibilidade e especificidade, a maioria dos testes moleculares baseiam-se na análise de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism* - Polimorfismo de um único nucleotídeo) no gene alvo associado à resistência (β -tubulina), especialmente na análise de mutações nos códons 167, 198 e 200, sendo capazes de identificar alterações genéticas caracterizadas por modificações nas sequências de DNA dos helmintos que condicionam a resistência tanto aos BZs como às LMs (Silvestre; Humbert, 2000; Silvestre, Cabaret, 2002; Mottier; Prichard, 2008; Rufener *et al.*, 2009).

Tendo em vista, o impacto na produção e saúde animal, e considerando a escassez de estudos na literatura o objetivo deste estudo foi realizar o diagnóstico coproparasitológico e detecção de marcadores moleculares associados à resistência a Benzimidazóis (BZs) em populações de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes do estado de Pernambuco.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama da caprinovinocultura no Brasil

O Brasil possui uma tradição bem estabelecida na criação de caprinos e ovinos, essas atividades apresentam uma importância social por serem responsáveis pela sustentação econômica e até mesmo nutricional de muitas famílias da zona rural (Monteiro; Brisola; Filho, 2021).

Esses animais se destacam por serem rústicos adaptados e se aclimatar a condições climáticas adversas, além da capacidade de converter e aproveitar melhor as fibras presentes nos vegetais para obtenção de energia, sendo importante se atentar a manutenção da homeostase e controle do estresse animal, já que pode haver diminuição do crescimento e problemas reprodutivos (Amaral, 2021; Nascimento *et al.*, 2022; Santos; Cabral, 2021).

Sendo assim, o desempenho da caprinovinocultura no território brasileiro varia dependendo da região, de características dos sistemas de produção, estabilidade na relação de criadores e frigoríficos, bem como os distribuidores comerciais. As atividades que mais se destacam entre os criadores são a de cria, recria e engorda, produção de leite, carne, lã e pele (Monteiro; Brisola; Filho, 2021).

Em questões estatísticas, a região nordeste se destaca na caprinocultura apresentando um efetivo de 12,373 milhões de caprinos em 2023, registrando um crescimento de mais de 38% em relação ao número de cabeças quando comparado a 2019, sendo o estado da Bahia com a maior quantidade com 3,955 milhões de cabeças e em seguida Pernambuco com 3,364 milhões sendo o município de Floresta no sertão, o maior produtor (IBGE, 2023).

A maior população de ovinos do Brasil também se encontra no nordeste que teve um efetivo de 15,521 milhões, sendo Bahia o maior produtor com 5 milhões de cabeças, seguido por Pernambuco com 3,674 milhões. Já a região sul foi a segunda região com maior população de ovinos, com larga participação do Rio Grande do Sul com 3,361 milhões de cabeças (IBGE, 2023).

2.2 Helmintoses em pequenos ruminantes

As helmintoses gastrintestinais em pequenos ruminantes é um dos principais problemas sanitários em diversas regiões, podendo ocorrer infecções por diversas

espécies das classes nematoda, trematoda e cestoda, como por exemplo, parasitos do gênero *Haemonchus*, *Fasciola* e *Moniezia*, respectivamente (Amarante, 2014).

Sendo os nematódeos mais comuns associados a essas infecções, as espécies da família Trichostrongylidae, que constitui um grupo bastante diversificado (Wyrobisz; Kowal; Nosal, 2015). Entre os gêneros de nematódeos gastrintestinais que causam grandes perdas à indústria agropecuária estão *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus* e *Cooperia* (El-Ashram; Suo, 2017). De forma geral, o ciclo biológico desses parasitos, é direto com uma fase pré-parasitária, com larvas de vida livre no ambiente e, uma fase parasitária no hospedeiro (Martins, 2019).

Dentre essas, *Haemonchus contortus* é a principal espécie e mais prevalente, que parasita caprinos e ovinos em regiões com clima tropical e subtropical, o que inclui o Brasil e a região nordeste (Lima *et al.*, 2010).

Os animais infectados normalmente apresentam uma queda no desempenho produtivo, diminuindo a ingestão de alimentos e absorção de nutrientes, podendo levar a altas taxas de mortalidade principalmente em animais jovens, o que diminui a rentabilidade da atividade pecuária de forma significativa (Grisi *et al.*, 2014).

Dentre as manifestações clínicas, podem ser observadas, anormalidades hematológicas e bioquímicas como hipoproteinemia, diarreia, perda de ferro e consequentemente anemia, em casos mais graves levando o animal a óbito (Fausto *et al.*, 2014; Kalule *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2017).

Em regiões onde os animais são bem nutridos e são frequentemente expostos a esses helmintos, ingerindo uma pequena quantidade de larvas infectantes diariamente pode se estabelecer uma imunidade protetora, o que se considera uma relação de equilíbrio entre o hospedeiro e o parasito (Amarante, 2014).

Alguns aspectos epidemiológicos, são levados em consideração para o aumento dessas infecções, como idade, produção leiteira, período de parto, sistema de produção, superlotação de animais na propriedade, nutrição e clima da região já que o mesmo é uma condição importante na dinâmica da infecção (Hoste *et al.*, 2002; Riet-Correa; Simões; Riet-Correa, 2013; Torres-Acosta; Hoste, 2008).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado através de diversas técnicas parasitológicas de fezes, sendo mais aplicadas as que se baseiam na contagem de ovos por grama de fezes (OPG) (Molento *et al.*, 2004). Além disso, a principal forma de identificar as larvas infectantes desses nematódeos gastrintestinais é a partir da coprocultura, auxiliando no diagnóstico, sendo realizada devido a grande

semelhança morfológica entre os ovos da superfamília Trichostrongyloidea (Cain *et al.*, 2024).

Sendo também, possível correlacionar dados clínico-laboratoriais, como o método FAMACHA que avalia a coloração da mucosa ocular, e a contagem de ovos fecais para detectar a infecção parasitária (Marques *et al.*, 2018). Além disso, técnicas sorológicas na busca de anticorpos anti-parasitos também podem ser utilizadas no diagnóstico (Gómez-Mendieta *et al.*, 2024).

Contudo, além de diagnosticar se faz necessário visar técnicas para o controle destas infecções, além do uso de anti-helmínticos, como pastoreio rotacionado, manejo do rebanho, seleção genética, nutrição adequada e o controle biológico onde se utiliza espécies prejudiciais aos parasitos de forma direta ou indireta, destacando como exemplo a espécie de besouro *Digitonthophagus gazella*, entretanto, esse método ainda apresenta alguns empecilhos no que se refere a custo benefício e aplicabilidade (Cezar *et al.*, 2008).

2.3 Diagnóstico coproparasitológico de helmintoses

O diagnóstico coproparasitológico pode ser realizado a partir de diversas técnicas que podem ser utilizadas na rotina laboratorial, sendo a mais simples delas, o exame direto, uma técnica qualitativa que consiste em solubilizar uma pequena quantidade de fezes com água em lâmina e analisar em microscópio óptico, apesar da praticidade, apresenta desvantagens como baixa sensibilidade e especificidade (Ferreira, 2012).

Técnicas de sedimentação como de Hoffmann, Pons e Janer é utilizado na detecção de ovos, larvas e cistos de protozoários, sendo indicada principalmente para ovos pesados como cestódeos do gênero *Fasciola*, nessa técnica as estruturas parasitárias são sedimentadas em água, sendo conhecida como técnica de sedimentação espontânea, pois não há necessidade de centrifugação (Hoffmann *et al.*, 1934; Molento *et al.*, 2021).

Algumas técnicas de flutuação também podem ser utilizadas, como por exemplo, a técnica de Willis-Mollay, um método qualitativo que se baseia na flutuação dos ovos de alguns helmintos, que se aderem a lamínula no topo do recipiente em que está a amostra fecal com solução saturada, não sendo tão recomendada para cistos de protozoários, porque estes se retraem (Ferreira, 2012). Por outro lado, há também técnicas de flutuação que necessitam da utilização da

centrífuga durante a realização, como as técnicas de centrífugo-flutuação de Faust *et al.* e Stoll (Molento *et al.*, 2021).

A contagem de ovos por grama de fezes (OPG) é um método quantitativo que sua utilização além de quantificar os ovos presentes na amostra, permite o monitoramento da eficácia dos anti-helmínticos (Molento *et al.*, 2021). A técnica mais utilizada para OPG é o método com a câmara de McMaster proposto por Gordon e Whitlock (1939), utilizada comumente antes e/ou após o tratamento.

Entretanto, novas técnicas mais sensíveis foram desenvolvidas como o FLOTAC, que são uma série de técnicas multivalentes para análise copromicroscópica qualitativa e quantitativa de ovos e larvas de helmintos, cistos e oocistos de protozoários, essas técnicas são baseadas na flotação centrífuga de uma suspensão da amostra fecal. A unidade de referência são as duas câmaras de flotação, com um volume total de 10 ml correspondendo a um grama de fezes, apresentando uma sensibilidade de um OPG, já utilizando a técnica dual FLOTAC, em que se faz uso de duas soluções de flotação diferentes em paralelo da mesma amostra, a unidade de referência é a câmara única (5 ml; 0,5 g de fezes), a sensibilidade da dual FLOTAC é de dois OPG (Cringoli *et al.*, 2010).

Apesar das técnicas FLOTAC apresentarem uma alta acurácia e sensibilidade, por outro lado, essas técnicas apresentam algumas desvantagens, por exigir um certo nível de estrutura laboratorial como uma centrífuga de bancada com rotor para placas de microtitulação (Cringoli *et al.*, 2010).

Em vista disso, Cringoli *et al.* (2017) desenvolveu uma extensão do FLOTAC, que foi a técnica de Mini-FLOTAC, apresentando uma sensibilidade de cinco ovos por grama de fezes, sendo considerado mais útil no processamento de grandes números de amostras e para aplicações veterinárias diretamente nas propriedades, além disso, foi desenvolvido o Fill-FLOTAC, um aparelho que otimiza as etapas iniciais como coleta e pesagem das amostras fecais, homogeneização, filtragem e preenchimento das câmaras, não requerendo o uso de uma centrífuga.

Embora existam diversas técnicas para diagnóstico, alguns ovos de parasitos apresentam uma grande semelhança morfológica, como os ovos da superfamília Strongyloidea (Henriques *et al.*, 2021). Roberts e O'Sullivan (1950), para solucionar este problema desenvolveram a técnica de coprocultura, que propõe o desenvolvimento das larvas até seu terceiro estágio (L3), que leva em torno de sete a 10 dias, e em seguida uma alíquota da amostra é utilizada para identificação das

L3 desses nematódeos, realizada a partir das características morfológicas das larvas (Ueno; Gonçalves, 1998).

2.4 Gênero *Haemonchus*

O gênero *Haemonchus* é um dos mais conhecidos por sua prevalência nas infecções parasitárias e patogenicidade, no qual, apresenta doze espécies (Amarante, 2011). O índice mais elevado de infecções por *Haemonchus* sp. está diretamente relacionado à sua alta prolificidade, já que a fêmea pode eliminar cerca de 10.000 ovos por dia, alinhado a isso, esse nematódeo apresenta uma capacidade de sobrevivência a variações sazonais, que depende de diversos fatores como temperatura, umidade do ar e precipitação, além de variações regionais e o tipo de manejo realizado pode colaborar no aumento desse índice (Nunes, 2012; Prichard, 2001).

Comumente, são utilizadas algumas características morfológicas para identificação a partir de larvas de terceiro estágio como comprimento total do corpo, quantidade e formato de células intestinais, formato de cabeça, formato da cauda e presença e comprimento do filamento da cauda com bainha (Knoll *et al.*, 2021).

Além disso, algumas características dos machos, como cristas cuticulares, pontas das espículas, bolsa copulatória, entre outras, são consideradas para definição do gênero (Hoberg; Lichtenfels; Gibbons, 2004). Já em relação às fêmeas, características como forma e tamanho relativo colaboraram para determinar o grau de parentesco, a cauda de forma cônica seria uma suposta sinapomorfia, enquanto uma cauda alongada e afilada é considerada uma condição plesiomórfica, típica da maioria das espécies de *Haemonchus* (Hoberg; Lichtenfels; Gibbons, 2004).

2.4.1 *Haemonchus contortus*

Dentre o gênero, se destaca *Haemonchus contortus* como sendo um dos principais nematódeos parasitos de pequenos ruminantes, altamente patogênico encontrado em regiões tropicais e subtropicais, de hábito hematófago que tem como sítio de parasitismo o abomaso de pequenos ruminantes (Besier *et al.*, 2016; Kalule *et al.*, 2023).

Em relação a classificação taxonômica deste parasito, é visto da seguinte forma:

- Filo Nematelminthes
- Classe Secernentea

- Ordem Strongylida
- Superfamília Trichostrongyloidea
- Família Trichostrongylidae
- Gênero *Haemonchus*
- Espécie *Haemonchus contortus* (Rudolf, 1803)

H. contortus é caracterizado pelas dimensões dos parasitos adultos variando de 10-20 mm de comprimento em machos, enquanto as fêmeas medem de 18-30 mm de comprimento (Das *et al.*, 2023; Gareh *et al.*, 2021).

Alguns parâmetros são utilizados na observação da morfologia desta espécie, como as fêmeas adultas que apresentam uma aparência cilíndrica vermelha semelhante a um poste de barbeiro devido aos ovários e úteros brancos que se entrelaçam em torno do intestino preenchido por sangue, esse aspecto é associado ao comportamento hematófago desse parasito, ademais, outras características são utilizadas como parâmetro sendo elas: comprimento das papilas cervicais, número de cristas e morfologia do retalho vulvar (Das *et al.*, 2023; Gareh *et al.*, 2021).

Figura 1 - *Haemonchus contortus* fêmea



Fonte: Sheep Veterinary Society (2024).

Enquanto a morfologia dos machos adultos é levado em consideração além do comprimento corporal, as cristas cuticulares, o comprimento das papilas cervicais, espícula, gubernáculo e comprimento das farpas, sendo visto na extremidade posterior uma bolsa copulatória com dois lobos laterais protuberantes em conjunto com um pequeno lobo dorsal que apresenta um raio dorsal em forma de Y (Das *et al.*, 2023; Lichtenfels; Pilitt, 2000).

Figura 2 - Bolsa copuladora do macho de *H. contortus*

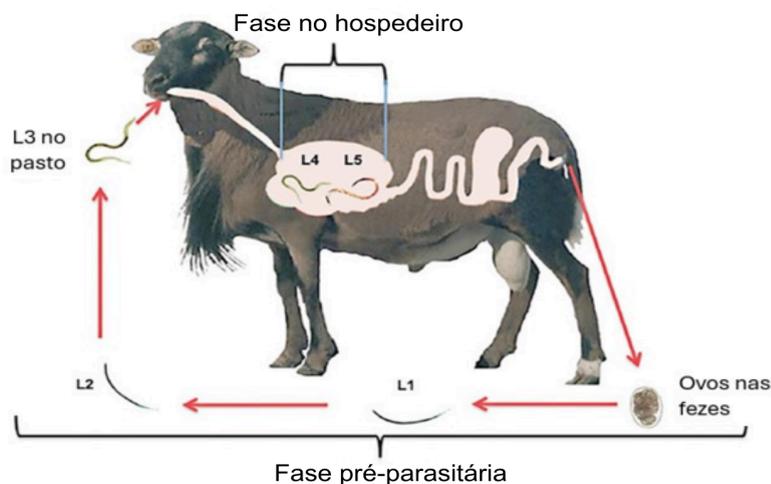
Fonte: Hosseinnezhad (2021).

2.5 Ciclo biológico do *H. contortus*

Assim como em outras espécies pertencentes a família Trichostrongylidae, *H. contortus* tem seu ciclo biológico com uma fase no hospedeiro e uma fase de vida livre (Amarante, 2014). O ciclo desse helminto (Figura 3) se inicia a partir do momento que os ovos saem junto com as fezes e encontram as condições favoráveis, a larva (L1) irá eclodir e se alimentar de organismos em decomposição, que após um certo período de desenvolvimento ocorrerá uma muda na cutícula se tornando L2 que em torno de sete dias se tornará L3 abandonando o bolo fecal, não se alimentando no ambiente (Osório *et al.*, 2020).

Sendo a L3, a larva infectante que é apta a infectar os hospedeiros, ela será dispersada pela pastagem através da ocorrência de chuvas, e ao ser ingerida por pequenos ruminantes, no rúmen as larvas perdem a bainha e deslocam-se para o sítio de parasitismo, o abomaso, local que irão sofrer outra muda se tornando L4 apresentando uma cápsula bucal com estilete que garante a fixação das mesmas na mucosa do abomaso, realizando a hematofagia e posteriormente sofrendo outra muda se tornando jovens adultos (L5) e posteriormente adultos sexualmente maduros (Amarante, 2014; El-Ashram; Suo, 2017).

Figura 3 - Ciclo biológico de *Haemonchus* sp.



Fonte: Adaptado de Bautista-Garfias (2022).

Válido ressaltar, que há uma variação sazonal na presença de larvas infectantes no pasto no decorrer do ano, já que fatores como clima e vegetação tem grande influência no desenvolvimento e na sobrevivência das mesmas, em locais que há constante ocorrência de chuvas, os animais ficam mais suscetíveis à contaminação por esse parasito, entretanto, em regiões com período prolongado de seca, as larvas podem se desenvolver nas margens de açudes, locais que os animais vão em busca de água, sendo uma fonte para a infecção, além disso, as larvas podem entrar no estado de hipobiose, cessando o desenvolvimento nesse período até que as condições climáticas voltem a ser favoráveis para o parasito (Amarante, 2014).

2.6 Manifestação clínica da Hemoncose

A hemoncose é uma doença causada por nematódeos do gênero *Haemonchus*, sendo *H. contortus* a espécie mais prevalente em infecções que impactam negativamente a saúde animal, apresentando sinais clínicos como perda de apetite e proteínas, crescimento atrofiado, baixa fertilidade, perda de ferro ocasionando anemia, podendo resultar na morte do animal. Alguns fatores como número de larvas infecciosas ingeridas, imunidade, idade e estado nutricional do hospedeiro são importantes para o estabelecimento do parasito e da doença (Kalule *et al.*, 2023; Naeem; Iqbal; Roohi, 2020).

Essa doença pode ser categorizada de três formas: crônica, aguda e hiperaguda. A forma crônica ou subclínica está ligada a baixa ingestão de larvas e geralmente ocorre em ambientes que não são propícios para o desenvolvimento das larvas como em zonas menos sazonais e com maior pluviosidade em que tratamentos eventuais não remove completamente a carga de *H. contortus* (Besier *et al.*, 2016; Flay; Hill; Muguero, 2022).

Já na hemoncose aguda há a ingestão de 2.000 a 20.000 larvas por animal ocasionando uma anemia menos grave que se desenvolve num período mais longo de tempo, comparado a forma hiperaguda (Flay; Hill; Muguero, 2022). A indicação mais evidente da anemia é a palidez da mucosa conjuntiva que varia do normal vermelho-rosa para o branco em casos mais graves, os animais tendem a ficar letárgicos, além disso, a hipoproteinemia causada pela perda de sangue pode levar a formação de edema submandibular (Besier *et al.*, 2016). Enquanto a hemoncose hiperaguda ocorre, durante um curto espaço de tempo levando a morte súbita do hospedeiro, sem sinais clínicos prévios (Flay; Hill; Muguero, 2022).

2.7 Anti-helmínticos e seu mecanismo de ação

A utilização de anti-helmínticos segue sendo ainda a principal forma de tratamento de infecções parasitárias, sendo as três classes de amplo espectro mais utilizadas, os benzimidazóis, imidazotiazóis e lactonas macrocíclicas, com diferentes mecanismos de ação (Coles *et al.*, 2006).

Na classe de anti-helmínticos benzimidazóis se encontram o tiabendazol, febendazol, albendazol e oxfendazol (Spinosa; Górnjak; Bernardi, 2017). O primeiro anti-helmíntico de amplo espectro desenvolvido dessa classe foi o tiabendazol em 1961, sendo seguro e altamente eficaz contra uma ampla gama de parasitos de ruminantes como nematódeos e alguns trematódeos e artrópodes (Gordon, 1961).

O mecanismo de ação dos benzimidazóis ocorre sobre a tubulina, uma proteína estrutural dos microtúbulos, essa proteína é um heterodímero composto por duas subunidades a α -tubulina e β -tubulina, o fármaco irá atuar ligando se a subunidade β -tubulina alterando a conformação estrutural e interrompendo a união das duas subunidades, havendo modificações na formação dos microtúbulos e consequentemente evitando que processos como divisão mitótica e transporte de nutrientes ocorram, impedindo o desenvolvimento do parasito (Spinosa; Górnjak; Bernardi, 2017).

Os imidazotiazóis começaram a ser comercializados em 1965, sendo essa classe constituída por tetramisol e levamisol (Spinosa; Górnaiak; Bernardi, 2017). O mecanismo de ação dos imidazotiazóis consiste em penetrar no parasito através da cutícula, atuando sobre os receptores nicotínicos sinápticos e extra sinápticos das membranas musculares, encontrando a junção neuromuscular dos nematódeos, induzindo a abertura dos canais iônicos que vai resultar em despolarização da membrana e consequentemente paralisia no parasito (Martin, 1997).

Em relação às Lactonas Macrocíclicas (LMs), foi introduzida no início da década de 1980 apresentando uma boa eficácia contra nematódeos (Campbell *et al.*, 1983). Essa classe atua se ligando a canais de cloro mediados por glutamato (GluCl) presentes nos parasitos, a partir daí, entram nas células, resultando em uma hiperpolarização das células neuromusculares e consequentemente paralisia, levando o parasito à morte (Blackhall; Prichard; Beech, 2008; Osório *et al.*, 2020).

2.8 Resistência anti-helmíntica e diagnóstico

A resistência anti-helmíntica (RA) é compreendida como um aumento da habilidade das cepas dos parasitos em resistir a mecanismo de ação de determinada molécula que seria letal para os mesmos (Kotze; Prichard, 2016).

Esse processo, é considerado presente quando uma proporção maior de parasitos de uma população perde a sensibilidade à doses de um determinado anti-helmíntico, essa característica é herdada a partir de trocas gênicas causadas pelo cruzamento dos parasitos que sobreviveram à exposição ao fármaco (Fissiha; Kinde, 2021).

Segundo Maurizio e colaboradores (2023) a RA se dá principalmente pelo uso indiscriminado e inadequado dos anti-helmínticos, como subdosagem, aplicação frequente e excessiva no controle de infecções por nematódeos gastrintestinais, o que leva a uma seleção de populações resistentes.

Os principais mecanismos de resistência normalmente são aumento do metabolismo do medicamento, a mudança na localização dos receptores o que reduz a ligação do fármaco e sua eficácia, regulação positiva de mecanismos de efluxo celular, a diminuição da quantidade de receptores pela expressão reduzida ou outra via de regulação negativa e mutações em genes dos parasitos (Fissiha; Kinde, 2021; Francis; Slapeta, 2023).

Em pequenos ruminantes, a maior parte dos relatos de resistência aos anti-helmínticos provém de regiões onde *H. contortus* é endêmico sendo um dos principais nematódeos do abomaso de caprinos e ovinos (Melo *et al.*, 1998). A grande disseminação deste parasito no mundo acompanhado do desenvolvimento de RA foi registrada em algumas regiões como o sul da Ásia, Austrália, Leste Europeu como Bósnia e Romênia, China, algumas áreas da África do Sul e Brasil (Echevarria *et al.*, 1996; Kapo *et al.*, 2024; Parvin *et al.*, 2022; Potârniche *et al.*, 2024; Tuerhong *et al.*, 2024; Waller *et al.*, 1995).

O primeiro relato no Brasil de resistência anti-helmíntica em nematódeos foi em ovinos no Rio Grande do Sul, no qual o *H. contortus* apresentou resistência ao tiabendazol (Dos Santos; Gonçalves, 1967). Na região Nordeste, nematódeos gastrintestinais resistentes a anti-helmínticos, incluindo o *H. contortus*, foram inicialmente detectados no Ceará por Vieira *et al.* (1989). Além disso, há relatos recentes de RA na Paraíba (Silva *et al.*, 2018), Maranhão (Soares *et al.*, 2023) e Pernambuco (De Castro *et al.*, 2021).

Nas últimas décadas o uso acentuado de parasiticidas das classes de benzimidazóis, dos imidazotiazóis e das lactonas macrocíclicas (avermectinas e milbemicinas) vem apresentando a forma mais prejudicial de controle por estarem selecionando os parasitos resistentes, já sendo relatados casos de resistência anti helmíntica múltipla estabelecida (Basseto *et al.*, 2024; Fortes; Molento, 2013).

Na literatura há a descrição de diferentes mutações associadas a resistência a benzimidazóis, que são mutações nos códons 167, 198 e 200 do isotipo 1 do gene da β -tubulina, sendo estes, apontados como principais polimorfismos de nucleotídeo único associados à resistência aos BZs (Kotze; Prichard, 2016; Amaral *et al.*, 2021).

Ademais, a resistência aos benzimidazóis envolve uma mutação da tirosina para fenilalanina nos códons 167 e 200 no gene da β -tubulina (Silvestre; Cabaret, 2002). A presença do aminoácido fenilalanina ou tirosina na posição 200 do gene da β -tubulina, caracteriza a cepa sensível e resistente aos benzimidazóis, respectivamente (Elard *et al.*, 1999).

Já sobre os imidazotiazóis, o gene *Hco-acr-8* que codifica a subunidade α que compõe o receptor de acetilcolina onde o fármaco vai se ligar, em alguns isolados resistentes de *H. contortus*, foi observado o transcrito truncado deste gene (*Hco-acr-8b*), que codifica proteínas incompletas ou não funcionais, diminuindo a afinidade da droga, além disto, já foi demonstrado a existência de uma deleção de

63 pb de dentro do exon 3b deste gene, o que sugere um marcador molecular para detectar RA para esta classe (Barrère *et al.*, 2012; Fauvin *et al.*, 2010).

Com relação às LMs, o mecanismo de resistência parece ser complexo, associado a várias mutações em diferentes *loci*. Estudos sugerem que a resistência a essa classe, pode envolver alterações em transportadores de drogas, como a glicoproteína-P (P-glycoprotein- P-gp) e canais de cloro controlados pelo glutamato (GluCl) (Wolstenholme; Rogers, 2005; Xu *et al.*, 1998). Sendo visto também, os polimorfismos L256F e A169V no gene que codifica a subunidade α do canal GluCl, também já foram associados à resistência à ivermectina e à moxidectina em *H. contortus* (Blackhall; Prichard; Beech, 2008).

No Brasil, o aumento de relatos de RA em diferentes regiões (Cezar *et al.*, 2010; Sczesny-Moraes *et al.*, 2010; Veríssimo *et al.*, 2012), incluindo o Nordeste (De Castro *et al.*, 2021) evidenciam a gravidade desse problema e sugerem disseminação da RA no país. No entanto, ainda são escassos os estudos que têm como foco o perfil de RA em nematódeos de pequenos ruminantes no estado de Pernambuco, sendo apenas no ano de 2021 que o primeiro dado de diagnóstico molecular de RA de pequenos ruminantes no estado de Pernambuco foi divulgado, que consistiu numa mutação no códon 200 da β -tubulina em ovinos (Amaral *et al.*, 2021).

Para o diagnóstico da RA há alguns métodos, sendo testes *in vivo* como o teste de redução da contagem de ovos fecais (TRCOF) que compara a contagem de ovos antes do tratamento com o anti-helmíntico e após o tratamento, entretanto, a sensibilidade deste teste depende de um bom planejamento e execução, se fazendo necessário a contagem prévia de ovos e realização da coprocultura para selecionar os animais, sendo importante que estes não tenham sido vermifugados a mais de 30 dias, importante também determinar a população predominante de parasitos, permitindo uma interpretação do resultado de forma adequada (Fortes; Molento, 2013; Molento *et al.*, 2021).

Há também uma variedade de testes *in vitro* como o teste de eclosão de ovos (TEO) que observa a porcentagem de ovos eclodidos em determinadas concentrações do fármaco, o teste de desenvolvimento larvar (TDL) que mede a ação do medicamento sobre as mudas das larvas até se tornarem infectantes (L3), além dessas, cada vez mais se vem investindo em técnicas moleculares para diagnosticar casos de RA (Fortes; Molento, 2013; Kotze; Prichard, 2016).

As técnicas moleculares podem ser utilizadas com grande precisão no diagnóstico da RA (Fortes; Molento, 2013), apresentando, em geral, alta sensibilidade e especificidade, mesmo em baixa concentração do DNA alvo, e têm um potencial para identificação das espécies dos parasitos (Sangster *et al.*, 2002).

Os testes moleculares para detecção de RA, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o sequenciamento, são baseados na análise de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) no gene alvo associados à resistência, que apesar de serem consideradas técnicas caras, elas possibilitam um diagnóstico precoce da resistência (Samson-Himmelstjerna, 2006). A utilização de técnicas de PCR além da convencional, como qPCR (PCR em tempo real), PCR- alelo específico, por exemplo, vem sendo cada vez mais empregadas em busca de um resultado mais preciso e rápido no diagnóstico de resistência, e na investigação de novas mutações (Parvin *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2014).

No entanto, o conhecimento sobre os mecanismos de resistência aos medicamentos ainda é limitado, sendo necessários mais estudos para elucidação e, assim, determinação dos marcadores genéticos específicos para a RA (Fortes; Molento, 2013). Desta forma, o processo de resistência está relacionado a alterações genéticas herdáveis dos helmintos, modificando com isso a ação dos fármacos (Lima, 2010). Portanto, as técnicas moleculares são capazes de identificar essas alterações genéticas caracterizadas por modificações nas sequências de DNA dos helmintos (Sangster *et al.*, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar o diagnóstico coproparasitológico e detecção de marcadores moleculares associados à resistência a Benzimidazóis (BZs) em populações de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes do estado de Pernambuco.

3.2 Objetivos Específicos

- Diagnosticar a presença de parasitos gastrintestinais de pequenos ruminantes em propriedades da Região Metropolitana do Recife e do Agreste do estado de Pernambuco;
- Identificar os gêneros de nematódeos gastrintestinais obtidos através de coprocultura;
- Identificar morfológicamente helmintos obtidos de abomaso;
- Identificar molecularmente helmintos adultos e larvas de terceiro estágio de *Haemonchus contortus*;
- Investigar a presença de polimorfismos responsáveis pela resistência a benzimidazóis em populações de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes do estado de Pernambuco;

4 METODOLOGIA

4.1 Área de estudo e aspectos éticos

O estudo foi desenvolvido em três propriedades de diferentes municípios do estado de Pernambuco, a saber: Abreu e Lima, Gravatá e Cachoeirinha. As propriedades seguiam o sistema de produção semi-intensivo.

Os espécimes adultos de *Haemonchus contortus* foram obtidos no Departamento de Zootecnia da UFRPE, Recife.

Os proprietários das propriedades visitadas foram informados sobre o objetivo da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) após a autorização foi realizada a coleta de material biológico. Foram coletadas algumas informações sobre o rebanho, após consentimento do proprietário.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco, com número de licença 2558200922 (CEUA-UFRPE).

4.2 Diagnóstico parasitológico em pequenos ruminantes

4.2.1 Animais e coleta de material fecal

Para inclusão no experimento, os caprinos e ovinos, independente da raça, de ambos os sexos e idades variadas, foram selecionados por conveniência não-probabilística.

Foram coletadas 76 amostras de fezes, destas 73 de caprinos e três de ovinos, sendo 39 em Gravatá, 15 em Cachoeirinha e 22 em Abreu e Lima, nesta última foram 19 amostras de caprinos e três amostras de ovinos. A coleta de material fecal foi realizada diretamente da ampola retal dos pequenos ruminantes, sendo utilizadas luvas de látex ou plástica no procedimento. As amostras devidamente identificadas, foram imediatamente acondicionadas em caixa isotérmica e transportadas para o Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LDP - DMV - UFRPE) para ser realizado o processamento.

Para o diagnóstico, foram utilizados de cinco a 10 gramas de fezes de cada caprino e ovino, que foram processadas utilizando como solução de flutuação cloreto de sódio, através da técnica copromicroscópica FLOTAC, que se baseia na flotação centrífuga de uma suspensão da amostra fecal (Cringoli *et al.*, 2010).

As coletas nas propriedades de Gravatá e Cachoeirinha foram realizadas no mês de março, período seco e quente. Em Abreu e Lima, as amostras foram coletadas em meados de maio, início da estação chuvosa.

4.2.2 Obtenção de larvas de terceiro estágio

Após as amostras serem analisadas confirmando a presença de ovos das superfamílias Trichostrongyloidea e Strongyloidea, foi realizada coprocultura para identificação e contagem das larvas infectantes (L3), baseado na técnica de Roberts O'Sullivan (1950). Válido ressaltar que foi feito um pool das fezes por propriedade. As larvas L3 foram identificadas em microscópio óptico (Ueno; Gonçalves, 1998), sendo contada até 100 larvas para observar a espécie mais frequente na amostra.

4.2.3 Coleta de helmintos adultos

Os helmintos adultos foram obtidos por ocasião da obtenção do abomaso de animais, previamente experimentais no Departamento de Zootecnia da UFRPE, Recife. O conteúdo foi acondicionado em potes plásticos identificados e transportados para o Laboratório de Doenças Parasitárias.

Para primeira coleta de helmintos adultos, foi realizada uma visita numa propriedade de criação de caprinos em Gravatá-PE, a mesma em que houve coleta de fezes, em que alguns animais apresentavam manifestações clínicas de infecção parasitária, e no momento havia um animal que veio a óbito, sendo encaminhado para necropsia no Laboratório de Patologia do Departamento de Medicina Veterinária-UFRPE. Posteriormente, foram coletados conteúdo abomasal de 40 ovinos abatidos no Departamento de Zootecnia da UFRPE- Recife, para fins de pesquisa.

Em seguida, o conteúdo abomasal coletado foi misturado com água corrente e filtrado em peneira granulométrica com abertura de 150µm, e observado minuciosamente em placas de Petri com o auxílio do estereoscópio. Os nematódeos macroscopicamente identificados como *Haemonchus* sp. foram coletados utilizando uma pinça e armazenados em tubos com álcool a 70% para posterior extração de DNA. A identificação da espécie foi confirmada através de biologia molecular utilizando *primers* específicos para amplificação por PCR da região ITS-2 (Jabar *et al.*, 2023).

4.3 Extração de DNA e caracterização molecular

Previamente foi realizada a padronização da técnica de extração de DNA, partindo de um *pool* de três a seis helmintos adultos. Inicialmente, foram realizadas três pré-lavagens da amostra para retirada do álcool, utilizando 200 microlitros de tampão fosfato salino (PBS) na concentração de 1x, centrifugando a 13.300 rpm por um minuto entre cada lavagem.

Para as larvas obtidas da coprocultura, também foram realizadas lavagens com PBS, e centrifugação a 3500 rpm por dois minutos, após a terceira lavagem o PBS foi retirado, e seguiu-se a extração de DNA pelo protocolo do Kit NucleoSpin® Tissue. Após o término da extração, o DNA foi armazenado em microtubos e refrigerado a -20°C até a posterior realização da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para confirmação da espécie *H. contortus*, tanto para as larvas quanto para os adultos, através da PCR foram utilizados os *primers* específicos Hcl- forward: 5'CTC GTC TGG TTC AGG GTT 3' e Hcl- reverse: 5' GTA ACC TCG CTG AGC TCA 3', específicos para a região ITS-2 (Internal Transcribed Spacer 2) do DNA ribossomal, com 295 pares de base (pb) de comprimento. A PCR foi realizada a 94°C por cinco minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C durante 45 segundos e seguido de uma etapa de extensão final a 72 °C por três minutos (Jabar *et al.*, 2023).

Posteriormente, o resultado da PCR foi analisado através da eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão tris-acetato-EDTA (TAE). Cinco microlitros de cada amostra adicionados de 0,5 microlitro do corante blue green (LGC Biotecnologia) foram adicionados ao gel. O tempo de corrida foi programado para 1 hora a 100V, ao término do qual o resultado foi visibilizado através de um transiluminador sob luz ultravioleta (UV).

4.4 Realização da Reação em cadeia da polimerase (PCR) para a região de interesse do gene da β -tubulina associado a RA

Para amplificação da região de interesse do isotipo 1 do gene da β -tubulina através da PCR foram utilizados os *primers* 167F: 5' GGA GGC ACT GGA TCT GGA AT 3' e 200R: 5' GTG GTT GAG ATC TCC ATA GGT TG 3', que amplificam a região em que os códons 167, 198 e 200 associados à resistência estão presentes (Hinney *et al.*, 2023). A PCR foi padronizada a 94°C por dois minutos, seguido por 30 ciclos

de 94°C por 35 segundos, 58°C por 35 segundos e 72°C durante 40 segundos e uma etapa de extensão final a 72°C por cinco minutos.

Após isso, o resultado da PCR foi analisado através de eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão tris-acetato-EDTA (TAE). Quarenta e cinco microlitros de cada amostra adicionados a três microlitros do corante blue green (LGC Biotecnologia) foram adicionados ao gel. O tempo de corrida foi programado para 1 hora a 100V, ao término do qual o resultado foi visibilizado através de um transiluminador sob luz ultravioleta (UV).

4.5 Purificação e quantificação do DNA

Para essa etapa, os poços do gel de agarose em que continha cada amostra foram recortados com o auxílio de uma lâmina de bisturi, os fragmentos foram pesados e depositados em microtubos para seguida realização da purificação de DNA a partir do protocolo do Kit PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification da Invitrogen™, para géis de agarose $\leq 2\%$, com padronizações na etapa 3 em que foi adicionado 700 microlitros do Buffer W1, e na etapa sete que foi adicionado 20 microlitros do Buffer de Eluição (E1) visando uma maior concentração de DNA purificado.

Em seguida foi realizada a quantificação de DNA presente nas amostras através do NanoDrop One Microvolume (Thermo Scientific ®) e avaliadas quanto à sua pureza.

4.6 Sequenciamento das amostras e análise

Duas amostras de DNA de helmintos machos adultos, cada uma referente a cada local (Recife-PE e Gravatá-PE), foram encaminhadas para o sequenciamento do DNA pelo Método de Sanger, no Laboratório Multiusuário do Departamento de Genética (UFPE). A sequência utilizada foi a do isotipo 1 do gene da β -tubulina que abriga as três regiões de mutações mais comuns, nas posições dos códons 167, 198 e 200, associadas à resistência aos BZs.

A análise da qualidade das sequências (eletroferograma) foi realizada através do software BioEdit versão 7.2, neste mesmo programa foi feita a sequência consenso para ambas as amostras, seguido de confirmação identidade através da ferramenta Nucleotide Blast - NCBI, alinhando as sequências obtidas com as já depositadas no banco de dados GenBank - NCBI, após isso, as sequências foram

examinadas verificando se haviam mutações nas três regiões que comumente apresenta SNP.

5 RESULTADOS

O presente estudo envolveu a Região Metropolitana do Recife e o Agreste do estado de Pernambuco, havendo coletas de amostras em ambas as regiões.

Após o devido processamento, foi observado que em 100% (76/76) das amostras fecais houve presença de ovos da superfamília Strongyloidea no exame parasitológico das amostras das propriedades de Gravatá, Cachoeirinha e Abreu e Lima, apresentando uma média geral de 1.797 ovos (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultado do exame coproparasitológico e média de ovos por grama de fezes (OPG) para ovos tipo Strongyloidea em pequenos ruminantes dos municípios de Gravatá, Abreu e Lima e Cachoeirinha.

Propriedades	Nº de Amostras	Frequência de ovos (%)	Média de OPG
Gravatá	39	100%	1.627
Abreu e Lima	22	100%	1.807
Cachoeirinha	15	100%	1.958
Total	76	100%	1.797

As amostras analisadas apresentaram outros parasitos gastrintestinais além de ovos do tipo Strongyloidea, sendo encontrado também ovos de *Strongyloides* sp., ovos do cestódeo *Moniezia* e oocistos do coccídeo *Eimeria*, como apresentado na Tabela 2.

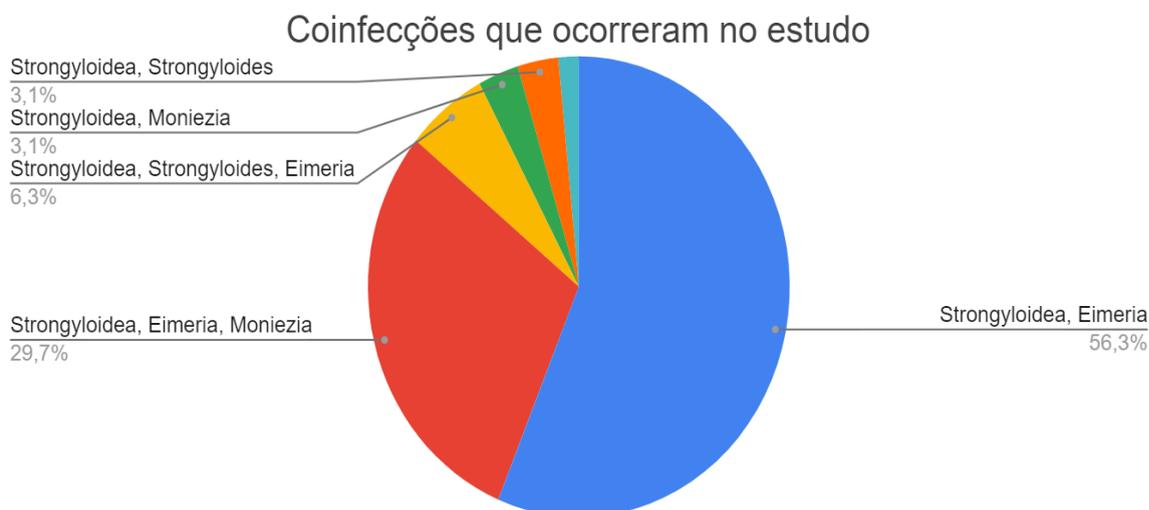
Tabela 2 - Frequência absoluta e relativa de parasitos gastrintestinais nas amostras analisadas provenientes dos municípios de Abreu e Lima, Gravatá e Cachoeirinha.

Parasitos gastrintestinais	Frequência absoluta	Frequência relativa
Ovos do tipo Strongyloidea	76/76	100%
Oocistos de <i>Eimeria</i> sp.	59/76	78%
Ovos de <i>Moniezia</i> sp.	22/76	29%
Ovos de <i>Strongyloides</i> sp.	7/76	9,2%

Houve coinfeções em 84,2% (64/76) das amostras. Sendo oocistos de *Eimeria* spp. o segundo grupo de parasito mais encontrado nas amostras e consequentemente a coinfeção ovos tipo Strongyloidea e oocistos de *Eimeria* spp. foi a mais frequente, presente em 36 amostras.

Dentre as coinfeções, ovos tipo Strongyloidea e oocistos de *Eimeria* spp. foi visto em 56,3% (36/64) das amostras, além de ser visto coinfeções por até três agentes como a segunda maior coinfeção observada, sendo de ovos tipo Strongyloidea, oocistos de *Eimeria* spp. e o cestódeo *Moniezia*, com uma taxa de 29,7% (19/64), como demonstrado na Figura 4.

Figura 4 - Coinfeções entre os parasitos gastrintestinais nas amostras fecais analisadas pelo método de FLOTAC provenientes dos municípios de Abreu e Lima, Gravatá e Cachoeirinha.



Como resultado das coproculturas do presente estudo (Tabela 3), foi observado que na propriedade de Gravatá, a maioria das L3 foram identificadas como *Haemonchus* sp., com uma menor proporção de *Trichostrongylus* spp. Já na coprocultura da propriedade de Cachoeirinha, foi observado resultado semelhante, contudo, foi observado também a presença de L3 de *Strongyloides* sp. Na propriedade de Abreu e Lima, as L3 foram majoritariamente de *Haemonchus* sp., e em menores proporções, larvas de *Trichostrongylus* spp., *Strongyloides* sp. e *Cooperia* spp.

Tabela 3 - Porcentagem de larva de terceiro estágio (L3) de acordo com gênero nas coproculturas das diferentes propriedades.

Propriedades	<i>Haemonchus</i>	<i>Trichostrongylus</i>	<i>Strongyloides</i>	<i>Cooperia</i>
	(%)	(%)	(%)	(%)
Gravatá	95%	5%	-	-
Cachoeirinha	88%	10%	2%	-
Abreu e Lima	77%	14%	4%	5%

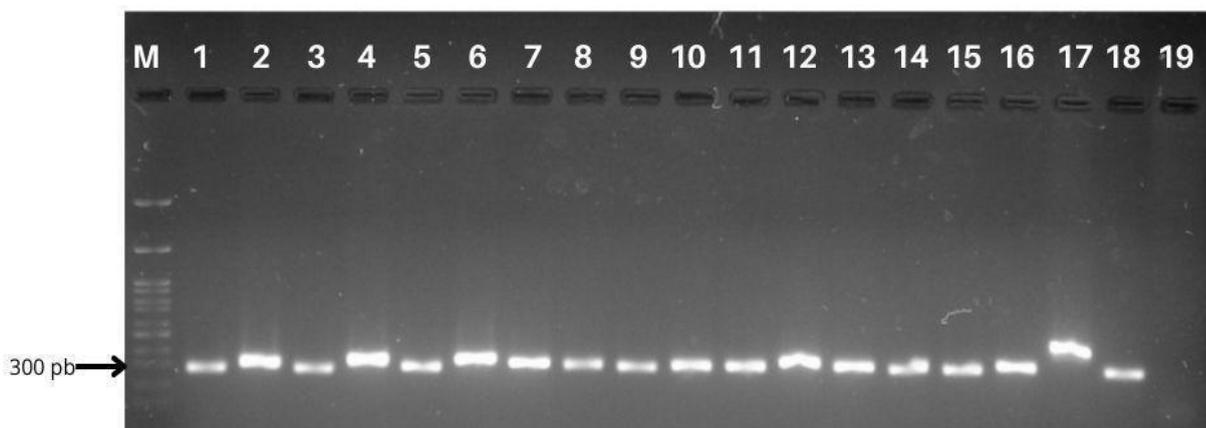
A confirmação da identidade de L3 de *Haemonchus contortus* a partir de biologia molecular, resultou na espécie mais frequente neste estudo.

Da coleta de abomaso em caprino realizada em Gravatá, inicialmente, foi encontrado uma grande quantidade de helmintos no abomaso, sendo que estes, apresentavam características morfológicas de *Haemonchus* sp. como bolsa copulatória com dois lobos proeminentes na porção terminal do macho e, no caso das fêmeas, os ovários que envolvem o intestino com sangue conferindo a aparência espiralada característica (Das *et al.*, 2023).

A identificação molecular dos helmintos adultos obtidos foi realizada, confirmando a presença de *H. contortus*. Na eletroforese, foi encontrado o padrão de banda em torno de 295 pb, como descrito por Jabar *et al.* (2023) demonstrado na Figura 3, linha 18. Essa amostra passou a ser utilizada como controle positivo para futuras PCRs que vieram a ser realizadas durante o estudo.

No conteúdo de abomaso coletado em Recife, 37,5% (15/40) apresentavam *H. contortus* nas 15 amostras positivas de adultos, em todas foi observado o padrão de banda de 295 pb (Figura 5).

Figura 5 - Produtos de amplificação da região ITS-2 do rDNA de *Haemonchus contortus*. Linhas: M: marcador de peso molecular de 100pb; 1;2;3;4;5;6;7: *Haemonchus* sp. adulto; 8: Larvas L3; 9;10;11;12;13;14;15;16: *Haemonchus* sp. adulto; 17: Sugestivo de *Trichostrongylus* spp. adulto ; 18: Controle positivo- *H. contortus* adulto; 19: Controle negativo.

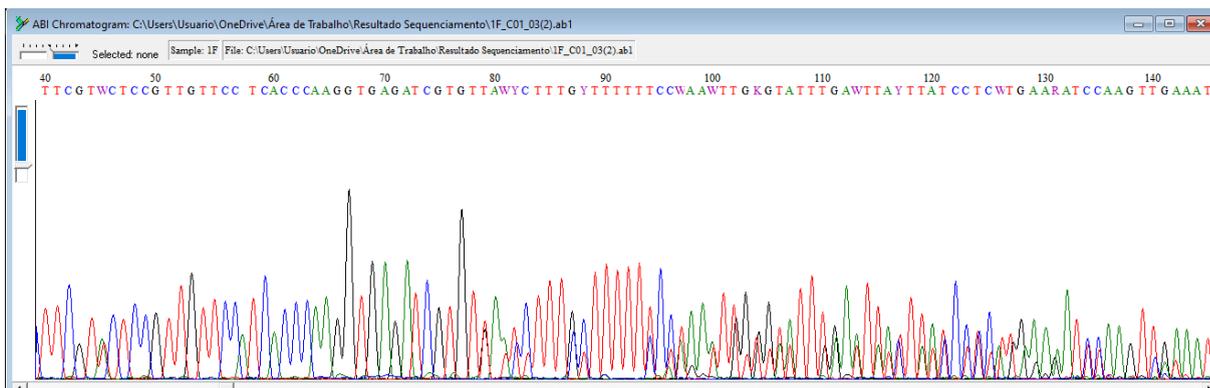


Na Figura 5, é visto que na amostra 17 apresentou padrão de banda diferente o que seria sugestivo de *Trichostrongylus* spp. pois foi encontrado no conteúdo do abomaso alguns espécimes com características diferentes de *Haemonchus*, e apesar do *primer* utilizado ser específico para *H. contortus*, a região ITS-2 do rDNA demonstrou ser um confiável marcador genético para identificação de nematódeos da ordem Strongylida (Arbabi *et al.*, 2020), sendo necessário uma futura melhor avaliação.

Após o resultado da PCR de identificação a nível de espécie, o resultado da PCR para região de interesse do isotipo 1 do gene da β -tubulina, na eletroforese foi visto que todos amplificaram para esta região, após isso foram selecionadas duas amostras, sendo uma utilizada como controle positivo obtido em Gravatá com *Haemonchus* machos adultos, e a segunda amostra foi selecionada de um dos 15 animais de Recife, também de *Haemonchus* machos adultos.

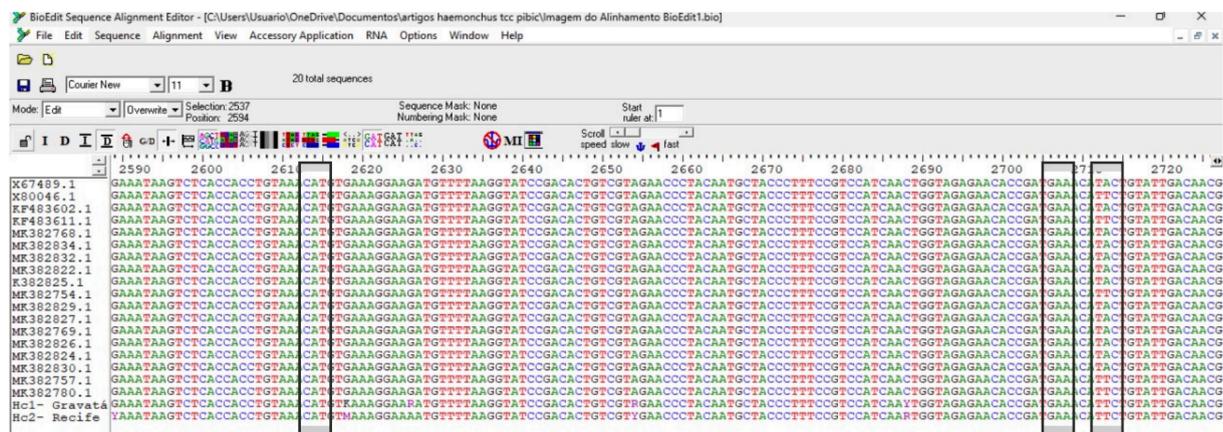
Após o resultado do sequenciamento, a qualidade das sequências foi avaliada a partir dos picos do eletroferograma, através do software BioEdit, como demonstra a Figura 6.

Figura 6 - Análise da qualidade dos picos da sequência de DNA através do software BioEdit.



Os códons 167, 198 e 200, onde já se tem descrito na literatura a presença de polimorfismos de nucleotídeo único, também foram avaliados, contudo, não foram encontradas as mutações já descritas (Kotze; Prichard, 2016), em nenhum dos códons associados a resistência a BZs.

Figura 7 - Sequências alinhadas através do ClustalW no software BioEdit, sequências obtidas do GenBank, a sequência Hc1 representando a amostra de Gravatá e Hc2 de Recife, as marcações indicam as posições em que os códons 167 (CAT), 198 (GAA) e 200 (TTC/TAC) estão na sequência.

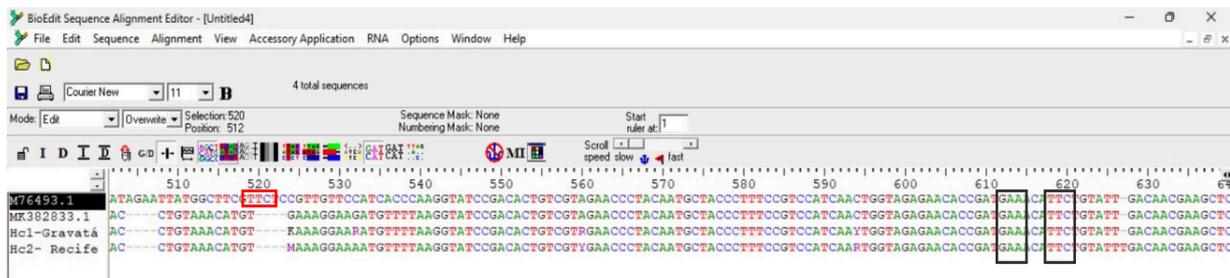


Como demonstrado na Figura 7, nas sequências Hc1 e Hc2 foi visto no códon 167 a trinca CAT, a partir do BLAST - NCBI, foram obtidas 18 sequências que apresentaram uma alta semelhança de identidade para região do isotipo 1 do gene da β -tubulina em *H. contortus*, já depositadas no GenBank - NCBI e utilizadas na análise das sequências. Já nos códons 198 e 200 foram visualizadas as trincas GAA e TTC, respectivamente, não encontrando o SNP que provoca resistência a BZs .

Na Figura 8, a sequência M76493.1 apresenta no códon 167 a trinca TTC como já descrito na literatura (Silvestre; Cabaret, 2002), o que pode nos indicar uma variabilidade genética nesta região do gene, não estando presente em todas

populações de helmintos. Essa sequência foi utilizada a nível de comparação na análise.

Figura 8 - Sequências alinhadas através do ClustalW no software BioEdit, as sequências M76493.1 e MK382833.1 foram obtidas do GenBank, a primeira apresenta no códon 167 marcado em vermelho, já os retângulos, os códons 198 e 200 respectivamente.



6 DISCUSSÃO

O presente estudo encontrou uma alta frequência (100%) de animais infectados por parasitos gastrintestinais em amostras coletadas e analisadas tanto nas amostras coletadas no período de seca quanto no início da estação chuvosa.

No período mais seco e quente, 100% das amostras foram positivas para presença de ovos do tipo Strongyloidea, resultado semelhante foi encontrado por Oliveira *et al.* (2018) no Ceará em que 94,4% das propriedades estudadas foi observado ovos da superfamília Strongyloidea no período seco.

As amostras coletadas no início da estação chuvosa, todas também foram positivas para ovos da superfamília Strongyloidea, o que corrobora com o estudo executado no Maranhão com caprinos e ovinos por Castro *et al.*, 2023, que no período chuvoso houve alta prevalência de ovos dessa superfamília no OPG, sendo também observado no Ceará por Oliveira *et al.* (2018).

O que essa alta carga parasitária de ovos do tipo Strongyloidea encontrada nas três propriedades pode indicar é que há uma alta adaptação desses parasitos a mudanças sazonais climáticas, já que em diferentes períodos houve uma alta carga parasitária nos animais das propriedades, sendo válido ressaltar, que alguns fatores climáticos como temperatura e umidade agem diretamente na taxa de sucesso e velocidade do desenvolvimento desses helmintos (O'Connor; Walkden-Brown; Kahn, 2006).

Algo válido a se observar é que nas três propriedades do estudo se segue o sistema de criação semi-intensiva que consiste em soltar os animais no pasto pela manhã, e à tarde serem direcionados ao aprisco novamente, sendo suas principais vantagens o melhor controle zootécnico e sanitário do rebanho e a diminuição da contaminação por parasitos (Senar, 2019). Apesar disso, já é relatado que esse sistema pode ser considerado um potencial fator de risco para algumas infecções em criação de ruminantes (Rauff-Adedotun *et al.*, 2023).

Um aspecto que poderia ser considerado para um controle sustentável das parasitoses seria realizar diagnósticos laboratoriais de rotina antes das vermifugações no rebanho (Potârniche *et al.*, 2024).

Outro resultado visto no presente estudo, é a presença de coinfeções nos mesmos animais. Oocistos de *Eimeria* spp. foi o segundo grupo de parasito mais encontrado nas amostras, a ocorrência deste coccídeo muitas vezes é frequente,

como num estudo feito no estado de Pernambuco, que 77,8% (322/414) das amostras fecais de caprinos foram positivas para *Eimeria* spp. (Macedo *et al.*, 2020).

A coinfeção de ovos da superfamília Strongyloidea e oocistos de *Eimeria* spp. foi a mais observada neste estudo, resultado semelhante foi encontrado em Santa Catarina por Cardoso e colaboradores (2012), que a coinfeção supracitada foi a mais prevalente, assim como, a terceira coinfeção foi com nematódeos da ordem Strongylida, coccídios e o cestódeo *Moniezia*. Determinar a carga de coinfeção é importante para compreender os potenciais impactos dos parasitos, que limitam uma melhor produção animal (Airs *et al.*, 2023).

A partir da identificação morfológica das L3 foi observado que parasitos dos gêneros *Haemonchus* sp. e *Trichostrongylus* spp. foram os mais prevalentes em todas propriedades, o que corrobora com outro estudo em Pernambuco (Lima *et al.*, 2010), no Ceará (Oliveira *et al.*, 2018) e também no Rio Grande do Sul (Martins *et al.*, 2022). Demonstrando uma alta adaptação desses helmintos e expansão geográfica no território brasileiro, o que impacta diretamente a caprinovinocultura.

Ademais, infecções por esses parasitos impactam negativamente no desempenho e na saúde animal, já que a hemoncose é caracterizada principalmente por uma anemia grave podendo levar o animal a óbito em alguns casos sem sinais clínicos prévios, afetando também a produção (Flay; Hill; Muguero, 2022).

A identificação molecular tanto das L3 recuperadas a partir da coprocultura quanto de helmintos adultos obtidos de abomaso, confirmaram a presença da espécie *Haemonchus contortus*, na área estudada, sendo condizente que a mesma é a mais frequente em pequenos ruminantes (Amarante *et al.*, 2017; Besier *et al.*, 2016).

A importância na utilização das técnicas moleculares, não só para identificação a nível de espécie, mas também no diagnóstico de RA vem se tornando cada vez mais comum, através da reação em cadeia da polimerase (PCR convencional), PCR em tempo real (qPCR), PCR- Alelo Específico, sequenciamento (Fortes; Molento, 2013; Parvin *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2014). Sendo estas, já empregadas na detecção de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP- *Single Nucleotide Polymorphism*) associados a RA.

No presente estudo, a realização da PCR para amplificação do fragmento do isotipo 1 do gene da β -tubulina e posterior sequenciamento que foi indispensável

para avaliação do perfil molecular de resistência a benzimidazóis em *H. contortus* garantindo a identificação dos códons onde os SNPs já são relatados.

Segundo Fortes e Molento (2013) as mutações nos códons 167, 198 e 200 no isotipo 1 do gene da β -tubulina são as posições onde os principais SNPs relacionados a resistência a BZs estão em nematódeos tricostrongilídeos, como o *H. contortus*, com isso, essas mutações podem ser utilizadas como marcadores para detecção de resistência. Neste trabalho, a posição dos códons 198 e 200 foram identificados a partir da sequência presente no estudo feito por Hinney e colaboradores (2023).

É observado na literatura que a frequência dos SNPs varia dependendo do local do estudo. Num estudo conduzido na China, as mutações E198A e F200Y foram detectadas, sendo a primeira a mais frequente, enquanto a F167Y não foi detectada (Tuerhong *et al.*, 2024). Em contrapartida, no Reino Unido, foi identificado que os SNPs F167Y e F200Y são os mais frequentes em populações de *H. contortus* (Redman *et al.*, 2015).

Já no Brasil, especificamente na região nordeste, o SNP F167Y foi o mais frequente, sendo visto em 69% dos nematódeos da população estudada, e 26,2% continham o F200Y, enquanto o E198A não foi encontrado (Araújo-Filho *et al.*, 2021). Resultado descrito também por Silvestre e Cabaret, (2002), em que as mutações nos códons 167 e 200 são consideradas as mais frequentes em populações de tricostrongilídeos no Brasil.

No presente trabalho, em ambas as sequências, foram encontradas as trincas GAA e TTC, para os códons 198 e 200, respectivamente, não havendo mutação, não sendo evidenciado o diagnóstico de resistência anti helmíntica, o que possa ser justificado pela rotação de princípios ativos de anti helmínticos utilizados entre cada vermifugação no local em que foram obtidos os helmintos adultos.

Contudo, apesar de não ter sido identificado o SNP F200Y, já se tem descrito a mutação F200Y em *H. contortus* em Pernambuco, em que há a troca de uma timina por adenina (TTC>TAC) mudando o aminoácido fenilalanina por tirosina, em que o parasito em questão, se torna resistente a BZs (Amaral *et al.*, 2021).

Em relação ao códon 167 foi observado a presença da trinca de nucleotídeos CAT, que codifica o aminoácido histidina, ao invés de TTC que codifica uma fenilalanina, como descrito na literatura. Além disso, já foi relatado também uma

mutação no códon 167 ocasionando a troca de uma fenilalanina por uma histidina em *H. contortus* (Prichard, 2001).

Válido ressaltar, que as duas sequências foram alinhadas com sequências depositadas no GenBank e também foi encontrado a mesma trinca em questão como demonstrado na Figura 7, contudo, não foram encontrados relatos na literatura quanto à presença desse polimorfismo e a relação com o desenvolvimento de resistência a BZs em *H. contortus*.

Ademais, a mutação F167Y (TTC>TAC) já foi descrita também em populações de ciatostomíneos, e neste mesmo estudo, foi observado em um único indivíduo uma mutação no códon 167 que codificava uma serina, mas que não foi determinada uma associação desta com a resistência a BZs (Hodgkinson *et al.*, 2008), o que demonstra, que ainda se faz necessários estudos que confirmem a relação entre alguns polimorfismos presentes no gene da β -tubulina e a resistência anti helmíntica e possíveis novas mutações que venham a surgir no futuro.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que, há uma alta taxa de infecção por nematódeos gastrintestinais nas propriedades examinadas, sendo *Haemonchus contortus* a espécie mais observada. Ademais, não foi encontrado o polimorfismo de um único nucleotídeo nos três códons associados a resistência a benzimidazóis, em nenhuma das amostras de helmintos adultos analisadas a partir do sequenciamento.

REFERÊNCIAS

AIRS, P. M. *et al.* Low-cost molecular methods to characterise gastrointestinal nematode co-infections of goats in Africa. **Parasites & Vectors**, v. 16, n. 1, p. 216, 2023, doi:10.1186/s13071-023-05816-y.

AMARAL, R. L. G. *et al.* Molecular diagnostic of *Haemonchus contortus* resistance to the benzimidazole group in sheep and goats in the state of Pernambuco, Brazil. **Archives of Veterinary Science**, v. 26, n. 3, p. 59-71, 2021.

AMARANTE, A. F. T. do. **Os parasitas de ovinos** [online]. São Paulo: Editora UNESP, 2014, 263 p. ISBN 978-85-68334-42-3.

AMARANTE, A. F. T. do. Why is it important to correctly identify *Haemonchus* species?. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 263–268, 2011.

AMARANTE, M.R.V.; SANTOS, M.C.; BASSETTO, C.C.; AMARANTE, A.F.T. PCR primers for straightforward differentiation of *Haemonchus contortus*, *Haemonchus placei* and their hybrids. **Journal of Helminthology**, v. 91, n. 6, p. 757-761, 2017. doi:10.1017/S0022149X16000882.

ANDRADE JÚNIOR, A. L. F. de. *et al.* Use of coccidiostat in mineral salt and study on ovine eimeriosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 16–21, 2012.

ARAÚJO-FILHO, J. V. de. *et al.* Phenotypic and genotypic approaches for detection of anthelmintic resistant sheep gastrointestinal nematodes from Brazilian northeast. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, n. 2, 2021.

ARBABI, M.; HOOSHYAR, H.; LOTFINIA, M.; BAKHSHI, M.A. Molecular detection of *Trichostrongylus* species through PCR followed by high resolution melt analysis of ITS-2 rDNA sequences. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 236, 2020.

BARRÈRE, V *et al.* Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the β -tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 344-349, 2012.

BASSETTO, C. C. *et al.* Revisiting anthelmintic resistance in sheep flocks from São Paulo State, Brazil. **International Journal for Parasitology. Drugs and drug resistance** v. 24, 2024. doi:10.1016/j.ijpddr.2024.100527.

BAUTISTA-GARFIAS, C.; AGUILAR-MARCELINO, L. Generalidades de las infecciones parasitarias por nematodos gastrointestinales (NGI) en ovinos y alternativas de control. In: **Potencialidades de la ovinocultura y los hongos comestibles (Pleurotus spp.) en la seguridad alimentaria y el desarrollo rural**. México: Laberinto Ediciones, 12 jun. 2022. p. 329-337. ISBN 978-607-99623-3-3.

BLACKHALL, W. J.; PRICHARD, R. K.; BEECH, R. N. P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 1-2, p. 101-107, 2008. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.12.001.

BESIER, R. B. *et al.* The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. **Advances in Parasitology**, v. 93, p. 95-143, 2016. doi:10.1016/bs.apar.2016.02.022.

CAIN, J. *et al.*, Rapid, automated quantification of *Haemonchus contortus* ova in sheep faecal samples. **International Journal for Parasitology**, v. 54, n. 1, p. 47-53, 2024.

CAMPBELL, W. C. *et al.* Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. **Science**, v. 221, p. 823-828, 1983.

CARDOSO, C. P. *et al.* Gastrointestinal parasites in goats from Monte Castelo, Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 148-150, abr. 2012.

CASTRO, R. L. P. *et al.* Seasonal variation of gastrointestinal parasitic infections in goats and sheep in São Luís, Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 24, 2023.

CEZAR, A. E.; CATTO, J. B.; BIANCHIN, I. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidades e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 2083-2091, 2008.

CEZAR, A. S. *et al.* Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 157-160, 2010.

COLES, G. C. *et al.* The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 3-4, p. 167-185, 2006. doi:10.1016/j.vetpar.2005.11.019.

CRINGOLI, G. *et al.* FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. **Nature Protocols**, v. 5, n. 3, p. 504-515, 2010.

CRINGOLI, G. *et al.* The Mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals. **Nature Protocols**, v. 12, n. 9, p. 1723-1732, 2017.

DAS, B. *et al.* Morphological and molecular characterization of *Haemonchus contortus* isolated from the small ruminants of south Gujarat, India. **Helminthologia**, v. 60, n. 2, p. 175-188, 2023. doi: 10.2478/helm-2023-0020.

DE CASTRO, E. M. S. *et al.* Resistência parasitária de nematódeos gastrintestinais de caprinos criados em região semiárida de Pernambuco, nordeste do Brasil.

Veterinária e Zootecnia, Botucatu, v. 28, p. 1–12, 2021. doi: 10.35172/rvz.2021.v28.523.

DOS SANTOS, V. T.; GONÇALVES, P. G. Verificação de estirpe resistente de *Haemonchus* resistentes ao thiabendazole no Rio Grande do Sul (Brasil). **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária**, v. 9, p. 201-209, 1967.

ECHEVARRIA, F. *et al.* The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 62, n. 3-4, p. 199–206, 1996. doi:10.1016/0304-4017(95)00906-x.

ELARD, 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**, v. 80, p. 231-237, 1999.

EL-ASHRAM, S.; SUO, X. Exploring the microbial community (microflora) associated with ovine *Haemonchus contortus* (macroflora) field strains. **Scientific Reports**, v. 7, 2017. doi:10.1038/s41598-017-00171-2.

FAUSTO, G. C. *et al.* Protein profile of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* and supplemented with selenium and copper. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 355, 2014, doi:10.1186/1756-3305-7-355.

FAUVIN, A. *et al.* cDNA-AFLP analysis in levamisole-resistant *Haemonchus contortus* reveals alternative splicing in a nicotinic acetylcholine receptor subunit. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 170, n. 2, p. 105–107, 2010. doi:10.1016/j.molbiopara.2009.11.

FERREIRA, M. U. **Parasitologia contemporânea**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

FISSIHA, W.; KINDE, M.Z. Anthelmintic Resistance and Its Mechanism: A Review. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 5403-5410, 2021. doi: 10.2147/IDR.S332378.

FLAY, K. J.; HILL, F. I.; MUGUIRO, D. H. A Review: *Haemonchus contortus* Infection in Pasture-Based Sheep Production Systems, with a Focus on the Pathogenesis of Anaemia and Changes in Haematological Parameters. **Animals**, v. 12, n. 10, 2022.

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, n. 12, p. 1391–402, 2013. doi: 10.1590/S0100-736X2013001200001.

FRANCIS E. K.; ŠLAPETA, J. Refugia or reservoir? Feral goats and their role in the maintenance and circulation of benzimidazole-resistant gastrointestinal nematodes on shared pastures. **Parasitology**, v. 150, n. 8, p. 672-682, 2023. doi:10.1017/S0031182023000380.

FRANCIS, E. K. *et al.* A mixed amplicon metabarcoding and sequencing approach for surveillance of drug resistance to levamisole and benzimidazole in *Haemonchus* spp. **International Journal for Parasitology**, v. 54, n. 1, p. 55-64, 2024. doi:10.1016/j.ijpara.2023.07.002.

GAREH, A. *et al.* Epidemiological, Morphological, and Morphometric Study on *Haemonchus* spp. Recovered From Goats in Egypt. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 2021. doi:10.3389/fvets.2021.705619.

GÓMEZ-MENDIETA, L. A. *et al.* Serology survey of *Ascaris suum* and *Trichinella spiralis* in rural pigs in Southwestern Mexico. **Veterinary Medicine and Science**, v. 10, n. 4, 2024. doi:10.1002/vms3.1474.

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

GORDON, H. Thiabendazole: a Highly Effective Anthelmintic for Sheep. **Nature** 191, p. 1409–1410, 1961. doi:10.1038/1911409a0.

GRISI, L. *et al.* Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.

HENRIQUES, R. F. *et al.* Profile of endoparasites in dairy cattle in the microregion of São João del-Rei, state of Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 73, n. 1, p. 25–33, 2021.

HINNEY, B. *et al.* Development of a three-colour digital PCR for early and quantitative detection of benzimidazole resistance-associated single nucleotide polymorphisms in *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology. Drugs and drug resistance**, v. 22, p. 88-95, 2023. doi:10.1016/j.ijpddr.2023.06.001.

HOBERG, E. R.; LICHTENFELS, J. R.; GIBBONS, L. Phylogeny for species of *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongyloidea): considerations of their evolutionary history and global biogeography among Camelidae and Pecora (Artiodactyla). **The Journal of Parasitology**, v. 90, n. 5, p. 1085–1102, 2004. doi:10.1645/GE-3309.

HODGKINSON, J. E. *et al.* The role of polymorphisms at β tubulin isotype 1 codons 167 and 200 in benzimidazole resistance in cyathostomins. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 10, p. 1149–1160, 2008. doi:10.1016/j.ijpara.2008.02.001.

HOFFMANN, W. A. *et al.* The sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. **American Public Health Association**, v. 9, p. 281-298, 1934.

HOSTE, H.; LE FRILEUX, Y.; POMMARET A. Comparison of selective and systematic treatments to control nematode infection of the digestive tract in dairy goats. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 345-355, 2002.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa da pecuária municipal – PPM**. 2023.

JABAR, J. H. *et al.* Prevalence, Haematological and Molecular Studies of *Haemonchus contortus* Isolated from Goat at AL-Muthanna Province, Iraq. **Archives of Razi Institute**, v. 78, n. 1, p. 287-295, 2023. doi:10.22092/ARI.2022.359004.2353.

KALULE, F. *et al.* Prevalence of gastrointestinal parasites and molecular identification of beta-tubulin mutations associated with benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* in goats from selected districts of Uganda. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 42, 2023. doi.org/10.1016/j.vprsr.2023.100889.

KAPLAN, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, v. 10, n. 4, p. 77-81, 2004. doi: 10.1016/j.pt.2004.08.001.

KAPO, N. *et al.* First Report of Benzimidazole Resistance in Field Population of *Haemonchus contortus* from Sheep, Goats and Cattle in Bosnia and Herzegovina. **Pathogens, Basel**, v. 13, 2024. doi:10.3390/pathogens13010077.

KNOLL, S. *et al.* Practical guide for microscopic identification of infectious gastrointestinal nematode larvae in sheep from Sardinia, Italy, backed by molecular analysis. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, 2021. doi:10.1186/s13071-021-05013-9.

KOTZE, A. C.; PRICHARD, R. K. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. **Advances in parasitology**, v. 93, p. 397-428, 2016. doi:10.1016/bs.apar.2016.02.012.

LICHTENFELS, J. R.; PILITT, P. A. Synlophe patterns of the Haemonchinae of ruminants (Nematoda: Trichostrongyloidea). **The Journal of Parasitology**, v. 86, n.5, p. 1093-1098, 2000. doi:10.1645/0022-3395(2000)086[1093:SPOTHO]2.0.CO;2.

LIMA, M. M. de *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 / Brazilian Animal Science**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 94–100, 2010. doi: 10.5216/cab.v11i1.1103.

MACEDO, L. O. *et al.* Prevalence and risk factors associated with infection by *Eimeria* spp. in goats and sheep in Northeastern Brazil. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 44, n. 3, p. 607–612, 2020. doi: 10.1007/s12639-020-01235-3.

MARQUES, C. A. T. *et al.* Uso de tratamentos seletivos direcionados no controle de nematoides gastrintestinais em diferentes categorias de ovinos em sistema de pastejo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 470–476, mar. 2018.

MARTIN, R. J. Modes of action of anthelmintic drugs. **The Veterinary Journal**, v. 154, n. 1, p. 11–34, 1997. doi:10.1016/s1090-0233(05)80005-x.

MARTINS, Isabella Vilhena Freire. **Parasitologia veterinária**. 2. ed. Vitória: EDUFES, 2019. 320p.

MARTINS, N. S. *et al.* Gastrointestinal Parasites in Sheep from the Brazilian Pampa Biome: Prevalence and Associated Factors. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 44, 2022. doi:10.29374/2527-2179.bjvm001522.

MAURIZIO, A. *et al.* Control of gastrointestinal helminths in small ruminants to prevent anthelmintic resistance: the Italian experience. **Parasitology**, v. 150, n. 12, p. 1105-1118, 2023. doi:10.1017/S0031182023000343.

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.; VILLAROEL, A.S.; GIRÃO, M. D. Resistência a anti-helmínticos em nematóides gastrintestinais de ovinos e caprinos, no município de Pentecoste, Estado do Ceará. **Ciência Animal**, v. 8, p. 7-11. 1998.

MOLENTO, M. B. *et al.* Exames coproparasitológicos em ruminantes: Uma abordagem espaço-temporal. **Revista Brasileira de Buiatria**, v. 4, n. 1, 2021.

MOLENTO, M. B. *et al.* Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1139–1145, 2004.

MONTEIRO, M.G.; BRISOLA, M.V.; VIEIRA FILHO, J.E.R. Diagnóstico da cadeia produtiva de caprinos e ovinos no Brasil. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada** (Ipea). [Internet]. 2021.

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

NAEEM, M.; IQBAL, Z.; ROOHI, N. Ovine haemonchosis: a review. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, n. 19, 2020. doi:10.1007/s11250-020-02439-8.

NASCIMENTO, M. I. S. S. *et al.* Insights two main products from the goat wine culture in the Brazilian Northeast. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, 2022. doi: 10.33448/rsd-v11i5.28264.

NUNES, R. L. **Análise genética de isolados do *Haemonchus* sp isolados de ruminantes domésticos para identificação da resistência ao anti-helmíntico Benzimidazol**. 2012. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2012.

O'CONNOR, L. J.; WALKDEN-BROWN, S. W.; KAHN, L. P. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 1-2, p. 1-15, 2006. doi:10.1016/j.vetpar.2006.08.035.

OLIVEIRA, D. A. S. *et al.* Parasitos gastrintestinais em caprinos no município de Quixadá, Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 1505–1510, 2018. doi: 10.1590/1678-5150-PVB-4828.

OSÓRIO, T. M. *et al.* Resistência anti-helmíntica em nematódeos gastrointestinais na ovinocultura: uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 11, p. 89194-89205, 2020. doi:10.34117/bjdv6n11-368.

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

PARVIN, S. *et al.* Frequency of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* populations isolated from sheep and goats in Bangladesh. **Annals of Parasitology**, v. 68, n. 3, p. 563-568, 2022. doi:10.17420/ap6803.463.

POTÂRNICHE, A. V. *et al.* An Insight into Practices Associated with the Control of Internal Parasites in the Dairy Goat Herds of Romania: A Questionnaire Survey. **Animals**, v. 14, n. 16, 2024, doi:10.3390/ani14162375.

POTÂRNICHE, A.V. *et al.* First Report of Anthelmintic Resistance in Gastrointestinal Nematodes in Goats in Romania. **Animals (Basel)**, v. 11, n. 10, p. 2761, 2021. doi: 10.3390/ani11102761.

PRICHARD, R. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trends in Parasitology**, v. 17, p. 445–453, 2001.

RAUFF-ADEDOTUN, A. A. *et al.* Prevalence, potential risk factors and genetic diversity of Blastocystis in ruminant livestock animals from Penang, Malaysia. **Parasitology Research**, v. 122, n. 9, p. 2193-2205, 2023. doi:10.1007/s00436-023-07920-5.

REDMAN, E. *et al.* The Emergence of Resistance to the Benzimidazole Anthelmintics in Parasitic Nematodes of Livestock Is Characterised by Multiple Independent Hard and Soft Selective Sweeps. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, 2015. doi:10.1371/journal.pntd.0003494.

RIET-CORREA, B.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Sistemas produtivos de caprinocultura leiteira no semiárido nordestino: controle integrado das parasitoses gastrointestinais visando contornar a resistência anti-helmíntica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 7, p. 901–908, 2013.

ROBERTS, F.H.S.; O'SULLIVAN, P.J. Methods for eggs counts and larval cultures for strongyles infecting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal Agricultural Research**, Victoria, v. 1, n. 1, p. 99-102, 1950.

RUFENER, L. *et al.* In vitro selection of *Haemonchus contortus* for benzimidazole resistance reveals a mutation at amino acid 198 of beta-tubulin. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 168, p. 120-122, 2009.

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Molecular diagnosis of anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 99–107, 2006.

SANGSTER, N. *et al.* Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 637-653. 2002.

SANTOS, G. C. L.; CABRAL, A. M. D. Índices bioclimáticos, modelagem matemática e índices estatísticos para avaliação de modelos utilizados na estimativa do conforto térmico animal. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, 2021.

SANTOS, J. M. L. dos. *et al.* Identification and quantification of benzimidazole resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 199, n. 3-4, p. 160–164, 2014. doi:10.1016/j.vetpar.2013.11.006.

SCZESNY-MORAES, E. A. *et al.* Resistência anti-helmíntica de nematóides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 229–236, 2010.

SENAR – SISTEMA NACIONAL DE APRENDIZAGEM RURAL. **Ovinocultura: criação e manejo de ovinos de corte**. Brasília: Senar, 2019.

SILVA, F. F. da *et al.* Nematode resistance to five anthelmintic classes in naturally infected sheep herds in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 4, 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.

SILVESTRE, A.; HUMBERT, J.F. A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites **Experimental Parasitology**,v. 95, p. 271-276, 2000.

SOARES, S. C. P. et al. Resistance of gastrointestinal nematoids of goats and sheep to the antihelmintics levamisol, ivermectin and albendazole. **Ciência Animal Brasileira**, v. 24, 2023.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. ISBN 978-85-277-3133-1.

TORRES-ACOSTA, J. F. J.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 77, p. 159-173, 2008.

TUERHONG, R. *et al.* The first molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* from sheep in Hejing and Minfeng counties of Southern Xinjiang. **Parasitology Research**, v. 123, n. 299, 2024. doi: 10.1007/s00436-024-08314-x.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4. ed. Tokyo: **Japan International Cooperation Agency**, p. 143, 1998.

VERÍSSIMO, C.J. et al. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 209-216, 2012.

VIEIRA, L. S. et al. Atividade in vitro dos Benzimidazóis: Oxfendazole, Fenbendazole, Albendazole e Thiabendazole em nematódeos gastrintestinais de caprinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 24, n. 10, p. 1201-1209, 1989.

WALLER, P. J.; DASH, K. M.; BARGER, I. A., et al. Anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep: learning from the Australian experience. **Veterinary Record**, v.136, p.411-413, 1995.

WANG, C. et al. Recent Research Progress in China on *Haemonchus contortus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01509.

WOLSTENHOLME A.J.; ROGERS, A. T. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. **Parasitology**, v. 131, p. 85-95, 2005.

WYROBISZ, A.; KOWAL, J.; NOSAL, P. Insight into species diversity of the Trichostrongylidae Leiper, 1912 (Nematoda: Strongylida) in ruminants. **Journal of Helminthology**, v. 90, n. 6, p. 639–646, 2015. doi:10.1017/s0022149x15001017.

XU, M. et al. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, p. 327–335, 1998.