

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**DIAGNÓSTICO DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM
BOVINOS**

JOSÉ HENRIQUE DAS NEVES

Botucatu – SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DIAGNÓSTICO DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM BOVINOS

JOSÉ HENRIQUE DAS NEVES

Dissertação de mestrado apresentada
junto ao Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do título
de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro
Francisco Talamini do Amarante.

Nome do Autor: José Henrique das Neves

Título: DIAGNÓSTICO DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM BOVINOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante

Presidente e Orientador

Departamento de Parasitologia

IBB – UNESP - Botucatu

Prof. Dra. Cyntia Ludovico Martins

Membro

Departamento de Produção Animal

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Helder Louvandini

Membro

Centro de Energia Nuclear na Agricultura

USP – Piracicaba

Data da Defesa: 21 de fevereiro de 2014.

Dedicatória

Primeiramente a Deus, por abençoar-me nesta trajetória na vida acadêmica.

À minha mãe, Maria José Figueiredo (Zezé), sempre me incentivando a lutar em busca dos meus objetivos.

Ao meu pai José Osório Munhoz das Neves, que me ensinou o valor do trabalho.

Aos demais familiares que contribuíram cada um à sua maneira, em minha formação.

Aos amigos da “República Ública”, pela amizade e momentos inesquecíveis.

Agradecimentos

À minha família e amigos, que jamais me abandonaram nesta caminhada.

A todos os produtores rurais que disponibilizaram seu rebanho para esta pesquisa.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – UNESP pelo apoio e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Aos membros da banca examinadora da qualificação, Alexandre Secorun Borges e Roberto Calderon Gonçalves, da banca de defesa, Cyntia Ludovico Martins e Helder Louvandini por disponibilizarem seu tempo para correção e avaliação desta dissertação.

Ao professor Alessandro Francisco Talamini do Amarante pela paciência na orientação, e pela oportunidade de aprender, aperfeiçoar e acrescentar conhecimentos na área de parasitologia, dando-me oportunidade de ingressar na pós-graduação sob sua orientação, mesmo não tendo cursado a graduação nesta instituição.

A todos os amigos do Laboratório de Helminologia Veterinária que me ajudaram nas colheitas de dados desta pesquisa, pois sem eles seria impossível a realização deste experimento, Michelle Cardoso, César Bassetto, Maurício Wilmsen, Maria Regina Silva, Marina Frontana e Lucca Baptistella de Napoli.

Agradeço aos amigos particulares que me ajudaram às vezes mesmo sem terem conhecimento sobre esta área, se prontificaram imediatamente em me apoiar, Luna Scarpari, Luara Canal, Maria Érika Picharillo, Ramiro Oliveira, Augusto Schulz, Talles Carvalho, Ana Lopes e outros que não me recordo devido às inúmeras colheitas.

Aos amigos: Karoline Alves Rodrigues que sempre era o “plano B”, pois quando eu estava sem ninguém para auxiliar-me, ela era capaz de cancelar seus compromissos para me ajudar e por último, mas não menos importante, ao amigo Nadino Carvalho que sempre suportou minhas loucuras, principalmente no auge das colheitas de dados, onde muitas vezes era necessário acordar as 04:00 h e trabalhar nos fins de semana e feriados, para darmos conta do cronograma, sempre apoiando e sendo parceiro em tudo.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Exportação brasileira de produtos bovinos no ano de 2012.	12
TABELA 2: Prevalência e intensidade média da infecção por nematódeos parasitas de bovinos, determinadas por necropsia, em estados brasileiros. ...	17
TABELA 3: Prevalência e intensidade média da infecção por cestódeos e trematódeos parasitas de bovinos, determinadas por necropsia, em estados brasileiros.	19
TABELA 4: Drogas anti-helmínticas atualmente disponíveis no Brasil para o controle de nematódeos de ruminantes.	22
TABELA 5: Introdução de drogas anti-helmínticas para ruminantes e relatos de resistência anti-helmíntica as drogas.	27
TABELA 6: Casos de resistência anti-helmíntica em bovinos no Brasil.	29
TABELA 7: Eficiência de diferentes soluções de flutuação e densidades, para o diagnóstico de ovos, oocistos e larvas de 1º estágio de parasitas de bovinos, búfalos, ovinos e caprinos, utilizando a técnica Flotac.	35

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Bezerros jovens parasitados e utilizados neste experimento.	14
FIGURA 2: Ovos de parasita da Ordem Strongylida (A), <i>Trichuris</i> spp. (B) e, <i>Moniezia benedeni</i> (D). Oocistos de <i>Eimeria</i> spp. (E) e amostra de fezes de animal com infecção mista por nematódeo, <i>Moniezia</i> e <i>Eimeria</i> spp. (C).	16
FIGURA 3: Relatos de resistência anti-helmíntica em bovinos no mundo.	28
FIGURA 4: Coleta de fezes (A), administração de anti-helmíntico (B) e bovinos jovens utilizados na pesquisa (C).	32
FIGURA 5: Câmaras de McMaster (A) e Câmaras de Flotac (B).	34

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	11
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	12
1.2.1 BOVINOCULTURA NO BRASIL.....	12
1.2.2 DIAGNÓSTICO DAS HELMINTOSES POR MEIO DA CONTAGEM DE OVOS POR GRAMA DE FEZES (OPG).....	13
1.2.3 PREJUÍZOS NA PRODUÇÃO DE BOVINOS	14
1.2.4 ESPÉCIES DE NEMATÓDEOS PARASITAS DE BOVINOS	15
1.2.5 MEDIDAS ALTERNATIVAS OU COMPLEMENTARES DE CONTROLE DE HELMINTOS 19	
1.2.6 DROGAS ANTI-HELMÍNTICAS	21
1.2.6.1 IVERMECTINA.....	22
1.2.6.2 MOXIDECTINA	24
1.2.6.3 ALBENDAZOL	25
1.2.6.4 LEVAMISOL	26
1.2.7 RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA	26
1.2.8 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA	29
1.2.8.1 MÉTODOS “ <i>IN VITRO</i> ”	30
1.2.8.1.1 TESTE DE ECLOSÃO DOS OVOS	30
1.2.8.1.2 TESTE DE DESENVOLVIMENTO LARVAL	30
1.2.8.1.3 TESTE DE BASE MOLECULAR (PCR).....	30
1.2.8.2 MÉTODOS “ <i>IN-VIVO</i> ”	31
1.2.8.2.1 MÉTODOS “ <i>IN-VIVO</i> ” COM NECROPSIA.....	31
1.2.8.2.2 MÉTODOS “ <i>IN VIVO</i> ” COM EXAME DE FEZES	31
1.2.9 TÉCNICAS DE CONTAGEM DE OPG PARA DIAGNÓSTICO ANTI-HELMÍNTICO.....	33
1.2.9.1 CONTAGEM DE OPG EM CÂMARA DE MCMMASTER.....	33
1.2.9.2 CONTAGEM DE OPG EM CÂMARA FLOTAC	33
1.2.10 FÓRMULAS MATEMÁTICAS PARA O CÁLCULO DO FECRT	36
2 TRABALHO CIENTÍFICO	38
3 BIBLIOGRAFIA.....	63

NEVES, J.H. **Diagnóstico de Resistência Anti-helmíntica em Bovinos**. Botucatu, 2014. 72p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Resumo

A resistência anti-helmíntica em bovinos se tornou um problema global, e no Brasil tem sido relatada em alguns estados. Devido à necessidade de métodos mais precisos de diagnóstico da resistência anti-helmíntica, o objetivo deste trabalho foi avaliar duas técnicas (McMaster e Flotac) e duas fórmulas matemáticas (FECRT1 - de acordo com a média de OPG e FECRT2 - de acordo com o número total de ovos contados) para calcular o teste de redução de ovos nas fezes (FECRT). Os anti-helmínticos testados foram ivermectina (0,2 mg/kg), moxidectina (0,2 mg/kg), sulfóxido de albendazol (2,5 mg/kg) e fosfato de levamisol (4,7 mg/kg), administrada na dose recomendada pelo fabricante. Dez propriedades foram avaliadas, quatro visitas em cada, pré-tratamento (D - 2), processamento (D 0), 10 dias pós-tratamento (D10) e 28 dias pós-tratamento (D28). Em todas as propriedades foi observada resistência a um ou mais agentes anti-helmínticos testados, independentemente da técnica ou da fórmula matemática avaliada. Os gêneros/espécies encontradas com resistência a um ou mais anti-helmínticos foram *Haemonchus placei*, *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp. e *Oesophagostomum radiatum*. Em conclusão, a resistência anti-helmíntica está presente em todos os rebanhos avaliados. A técnica Flotac e a fórmula matemática FECR2 foram mais precisas do que a técnica de McMaster e fórmula FECR1. Há necessidade de maior conscientização dos produtores sobre o uso de anti-helmínticos. Portanto, em estudos futuros de resistência anti-helmíntica em bovinos, recomenda-se a utilização do método de diagnóstico com uma maior precisão, como é o método Flotac. Na interpretação dos resultados, nosso estudo indica que o cálculo pela fórmula FECR2, o que elimina o uso de um grupo de controle, deve ser recomendada.

Palavras-chave: eficácia, resistência, bovino.

NEVES, J.H. **Diagnosis of Anthelmintic Resistance in Cattle**. Botucatu, 2014. 72p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Abstract

The anthelmintic resistance in cattle has become a global problem, and in Brazil it has been reported in some states. Due to the need for more accurate methods of diagnosis of anthelmintic resistance the purpose this work was to evaluate two techniques (McMaster and Flotac) and two mathematical formulas (FECRT1 - according to the average EPG and FECRT2 - according to the total number of eggs counted) to calculate the faecal egg count reduction test (FECRT) in the diagnosis of anthelmintic resistance in cattle. The anthelmintic tested were ivermectin (0.2 mg/kg), moxidectin (0.2 mg/kg), albendazole sulfoxide (2.5 mg/kg) and levamisole phosphate (4.7 mg/kg), administered at the dose recommended by the manufacturer. Ten farms were assessed, four visits in each pre-treatment (D -2), processing (D 0), 10 days post-treatment (D 10) and 28 days post-treatment (D 28). In all of the properties was observed resistance to one or more anthelmintics tested, regardless of the technique (McMaster or Flotac) or FECRT the mathematical formula (1 and 2). The genera/species found with resistance to one or more anthelmintics were *Haemonchus placei*, *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp. and *Oesophagostomum radiatum*. In conclusion, the anthelmintic resistance is present in all herds evaluated. The Flotac technical and mathematical formula FECR2 were more accurate than the McMaster technique and formula FECR1. Need is greater awareness of the producers on the use of anthelmintics. Therefore, in future studies on anthelmintic resistance in cattle, use of the method of diagnosis with higher accuracy, it is recommended, as is the case FLOTAC method. In interpreting the results, our study indicates that the calculation by formula FECR2 %, which eliminates the use of a control group, should be recommended.

Key words: efficacy, resistance, cattle.

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura no Brasil está passando por um processo de aumento da produtividade, com decréscimo de 3,4 % na área destinada à pastagem e acréscimo de 50 % na taxa de ocupação (animal/hectare) entre 1990 e 2011 (ANUALPEC, 2012). O país permanece com o 2º maior rebanho comercial do mundo e o 2º maior produtor de carne bovina. Porém, devido o aumento dos custos de produção, tem sido necessária maior profissionalização dos proprietários e profissionais envolvidos na produção agropecuária (ANUALPEC, 2013).

Dentre os fatores que afetam a produção de ruminantes, o parasitismo por helmintos é um dos principais, sendo que o principal método de controle destes parasitas é a utilização de anti-helmínticos (GRAEF et al., 2013). Porém, devido ao aparecimento da resistência anti-helmíntica, a importância do monitoramento da eficácia dos produtos disponíveis no mercado e os gêneros/espécies de parasitas envolvidos, têm sido objeto de estudo em vários locais do mundo como na Argélia (BENTOUNSI et al., 2012), Argentina (FAZZIO et al., 2012), Escócia (BARTLEY et al., 2012), Estados Unidos (YAZWINSKI et al., 2013) e Nova Zelândia (LEATHWICK e MILLER, 2013).

No Brasil foram relatados casos de resistência anti-helmíntica em endoparasitos de bovinos nos estados de Minas Gerais (RANGEL et al., 2005), São Paulo (SOUTELLO et al., 2007), Rio de Janeiro (CARDOSO et al., 2008), Santa Catarina (SOUZA et al., 2008), Rio Grande do Sul (CEZAR et al., 2010) e Mato Grosso do Sul (BORGES et al., 2013), sendo que no Estado de São Paulo foi descrito pela primeira vez no mundo resistência de *Oesophagostomum radiatum* à moxidectina (CONDI et al., 2009).

Além das perdas causadas pelo parasitismo, à utilização de produtos ineficazes como a ivermectina (BORGES et al., 2013; CEZAR et al., 2010; SOUTELLO et al., 2007), gera resíduos contaminantes que interferem no meio ambiente (LUMARET et al., 2012).

Segundo Coles et al. (2006), existe grande necessidade de melhoria dos métodos de detecção de resistência anti-helmíntica, em particular para a detecção de resistência às lactonas macrocíclicas, em bovinos. Portanto, o estudo sobre os fatores ligados ao diagnóstico de resistência anti-helmíntica é de fundamental importância para a produção de bovinos no Brasil.

1.2 Revisão de Literatura

1.2.1 Bovinocultura no Brasil

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. Sendo que o rebanho nacional aumentou de 118,1 milhões/animais em 1980, para 211,3 milhões/animais em 2012 (SIDRA, 2014), o que coloca o Brasil junto aos líderes mundiais do setor. Além de abastecer o mercado interno, os produtos e subprodutos oriundos de bovinos geram mais de 8 bilhões de dólares em exportações anualmente (TABELA 1).

TABELA 1: Exportação brasileira de produtos bovinos no ano de 2012.

	Produtos	Bilhões de Dólares (US\$)
Pecuária de Corte	Carne Bovina Industrializada	0,636
	Carne Bovina "in natura"	4,495
	Miudezas Bovinas (Frescas/resfriadas)	0,015
	Línguas de Bovinos (Congeladas)	0,034
	Fígados de Bovinos (Congelados)	0,001
	Rabos de Bovinos (Congelados)	0,004
	Outras Miudezas de Bovinos (Comestíveis congelados)	0,224
	Tripas de Bovinos (Congeladas)	0,306
	Bovinos vivos	0,594
	Couro Bovino	2,055
	Sebo de Bovinos	0,004
Pecuária de Leite	Produtos	
	Leite e Creme de Leite (não concentrado)	0,018
	Leite em pó/Creme de Leite (concentrado)	0,055
	Iogurte e Creme de Leite (Fermentado)	0,003
	Soro de Leite e Produtos Concentrados	0,001
	Manteiga e Derivados	0,002
Queijos e Requeijão	0,092	
	Total	8,541

Elaborado pelo autor de acordo com dados disponíveis em ANUALPEC, 2013.

Vários fatores contribuem para estes resultados e para a contínua expansão da atividade no Brasil como: o clima tropical e equatorial úmido onde está localizada a maior parte do rebanho brasileiro, a grande extensão territorial, a capacidade de expansão em unidade animal/hectare devido à

baixa lotação atual, a disponibilidade de subprodutos para alimentação e o baixo custo de produção.

No entanto, para atender a demanda do mercado, atualmente os produtores brasileiros têm de se adequar aos anseios do consumidor moderno.

O consumidor brasileiro está cada vez mais interessado em conhecer a maneira pela qual o alimento foi produzido, desde a sua origem até a sua mesa, exigindo do seu governo responsabilidade para atestar a qualidade, a segurança e a sua proteção (BRASIL, 2009).

Os resíduos de insumos utilizados na produção de bovinos causam vários prejuízos à pecuária, por exemplo, embargos comerciais pelos mercados que adquirem a carne bovina, como os estados Unidos e a União Europeia, além da exposição nociva do consumidor brasileiro a resíduos contaminantes tais como as drogas antimicrobianas e antiparasitárias (MAPA, 1999).

Resíduos de antibióticos no leite causam inibição de culturas lácteas sensíveis utilizadas na fabricação de queijos, iogurtes e outros produtos fermentados, dificultando a obtenção destes produtos ou alterando sua qualidade (BRITO e LANGE, 2008). Dentre os parasiticidas, a ivermectina é o principal responsável pela contaminação ambiental e impacto sobre a fauna existente no solo (LUMARET et al., 2012).

É sabido que os parasitas causam diversos prejuízos aos bovinos, e a utilização racional de fármacos é uma necessidade atual. Para isso, o conhecimento sobre as espécies de parasitas, em especial os nematódeos que acometem os bovinos, é fundamental para elaboração de estratégias sustentáveis de controle, sem a utilização e/ou com a diminuição do uso de anti-helmínticos.

1.2.2 Diagnóstico das Helmintoses por meio da Contagem de Ovos por Grama de Fezes (OPG)

Estudos demonstraram que existe correlação mediana de 0,32 a 0,47 (BRICARELLO et al., 2007; GIRÃO et al., 1985) entre a carga parasitária de bovinos e as contagens de ovos de nematódeos por grama de fezes (OPG), utilizando a técnica de McMaster. No entanto, Condi et al. (2009) encontraram alta correlação de 0,65. Porém, não foram encontrados estudos avaliando a

correlação entre a carga parasitária e uma técnica de OPG com maior acurácia, por exemplo, Flotac.

O monitoramento do grau de infecção dos animais por meio das contagens de OPG, em conjunto com a coprocultura, permite avaliar o momento ideal para everminação dos animais.

Os valores de OPG tendem a diminuir nos bovinos à medida que se tornam adultos. Os bovinos adquirem imunidade eficiente ao redor dos 18 - 24 meses de idade (BIANCHIN et al., 1995; BORGES et al., 2013). Portanto, é recomendável como estratégia de controle de helmintos, o tratamento de bovinos em crescimento (Figura 1), com faixa etária inferior a 18 – 24 meses, com o objetivo de diminuir o número de ovos excretados nas fezes, diminuindo a contaminação ambiental e conseqüentemente o nível de reinfecção. Com isso, pode-se reduzir o número de casos clínicos de verminose e, principalmente evitar perdas econômicas decorrentes da verminose.



FIGURA 1: Bezerros jovens parasitados e utilizados neste experimento.

1.2.3 Prejuízos na Produção de Bovinos

O crescimento de bezerros pode ser prejudicado pelo parasitismo gastrointestinal subclínico mesmo antes do desmame. Este fato foi observado em Mato Grosso do Sul, por (CATTO et al., 2005), onde bovinos jovens tratados antes da desmama, aos 3-5 meses de idade, ganharam de 4 a 7 kg a mais do que os não tratados. No mesmo estado, (BIANCHIN et al., 1995) observaram que bezerros da raça Nelore, tratados estrategicamente com anti-

helmínticos, nos meses de maio, julho e setembro, com faixa etária do desmame aos 18-24 meses de idade, ganharam em média 41 kg a mais do que os não tratados.

Soutello et al. (2002) observaram ganho em peso de 54 kg a mais, para bovinos machos do desmame (8-9 meses de idade) até os 24 meses de idade, após tratamento estratégico (3x/ano) com moxidectina, em comparação aos animais não tratados.

Borges et al. (2013) avaliaram garrotes de 15 meses de idade da raça Nelore, criados extensivamente, com pastejo em *Brachiaria* spp., em uma propriedade com diagnóstico prévio de resistência à ivermectina. Após a administração de um fármaco com eficácia de 81%, observou-se ganho médio diário (GMD) de 106 gramas/dia a mais que o grupo não tratado, durante um período de 112 dias.

A maioria dos bovinos são parasitados por várias espécies de helmintos ao mesmo tempo (BRESCIANI et al., 2001; SANTOS et al., 2010), o que dificulta a mensuração das perdas causadas pelo envolvimento de cada espécie e/ou gênero de parasita. Porém, vários outros fatores podem influenciar na mensuração dessas perdas como, disponibilidade e qualidade da forragem, categoria animal, suplementação mineral, suplementação protéica, sexo e raça.

1.2.4 Espécies de Nematódeos Parasitas de Bovinos

Alguns gêneros de parasitas de bovinos são identificados pela visualização dos ovos e oocistos encontrados nas fezes dos bovinos (FIGURA 2). No entanto, a maioria dos gêneros/espécies é identificada a partir de larvas de terceiro estágio, produzidas em coproculturas.

A prevalência e a intensidade média dos helmintos que parasitam bovinos estão descritos na TABELA 2, sendo que os gêneros mais prevalentes encontrados em todos os estudos foram *Haemonchus* spp., *Cooperia* spp. e *Oesophagostomum* sp. As espécies de nematódeos gastrintestinais mais importantes em bovinos criados no Brasil são: *Haemonchus placei*, *Haemonchus similis*, *Ostertagia ostertagi* e *Trichostrongylus axei*; todos parasitas do abomaso. No intestino delgado, destacam-se *Cooperia pectinata*,

Cooperia punctata, *Strongyloides papillosus* e *Nematodirus* spp. No intestino grosso são comuns às espécies de *Oesophagostomum radiatum* e *Trichuris discolor*.

Dentre os trematódeos que acometem os bovinos, em estudos epidemiológicos não foi relatada a presença de *Fasciola hepatica* (TABELA 3). Porém, esporadicamente são descritos surtos (ADRIEN et al., 2013) e achados em linhas de abate de frigoríficos, pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), como no estado de Goiás, onde dos 4,53% dos 949 animais inspecionados estavam parasitados (ARAÚJO et al., 2007).

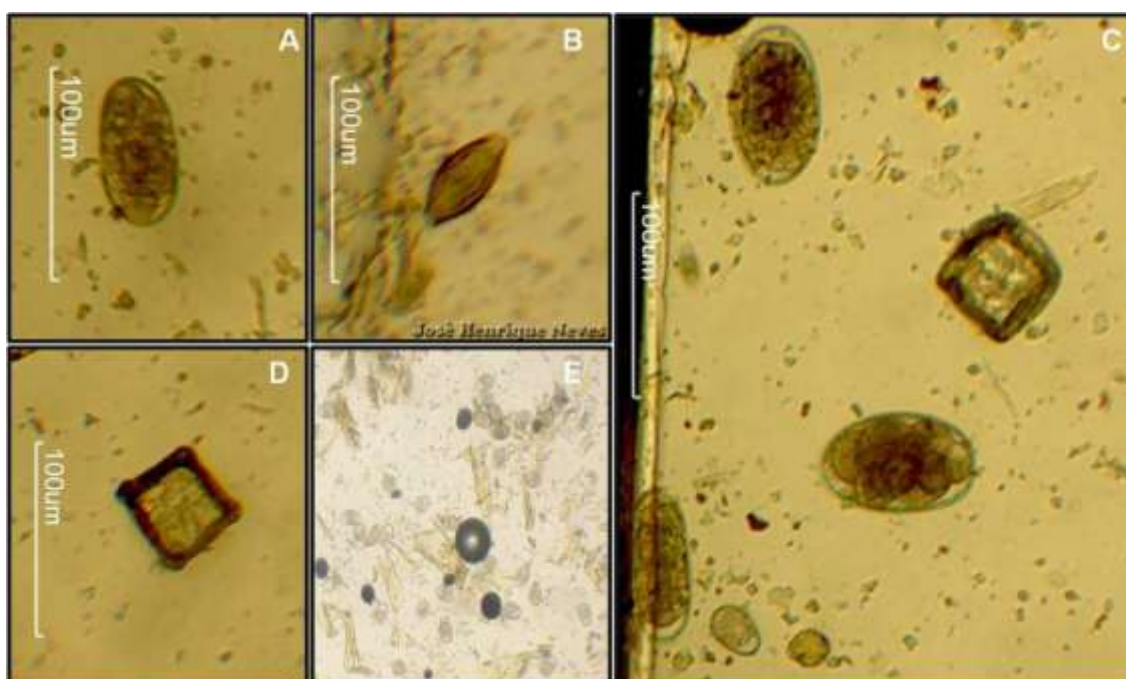


FIGURA 2: Ovos de parasita da Ordem Strongylida (A), *Trichuris* spp. (B) e, *Moniezia benedeni* (D). Oocistos de *Eimeria* spp. (E) e amostra de fezes de animal com infecção mista por nematódeo, *Moniezia* e *Eimeria* spp. (C).

Apesar de estudos epidemiológicos serem fundamentais para a elaboração das estratégias de controle dos helmintos, hoje em dia são cada vez mais raras estas pesquisas básicas. Durante esta revisão, foram encontrados 11 trabalhos realizados entre 1971 e 2002, e apenas um realizado nos últimos 12 anos (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

TABELA 2: Prevalência e intensidade média da infecção por nematódeos parasitas de bovinos, determinadas por necropsia, em estados brasileiros.

Ano	1971 ⁽¹⁾	1981 ⁽²⁾	1983 ⁽³⁾	1985 ⁽⁴⁾	1985 ⁽⁵⁾	1985 ⁽⁶⁾	1989 ⁽⁷⁾	2001 ⁽⁸⁾	2001 ⁽⁹⁾	2001 ⁽¹⁰⁾	2002 ⁽¹¹⁾	2010 ⁽¹²⁾	
Estado	MS e MT n=65	MS n=45	BA n=48	PI n=25	SP n=74	SP n=40	SP n=6	SP n=48	SP n=55	SP n=42	RJ n=98	MG n=76	
OE	Espécie	P% (IM)	P% (IM)	P% (IM)	P% (IM)	P% (IM)	P% (IM)	P% (IM)	P% (IM)	P% (IM)	P% (IM)	P% (IM)	
AB	<i>Haemonchus contortus</i>	23,9	69,7 (90)	72,9 (493)	90,0 (1341)	100 (116)	12,5 (8)	83,3 (151)	-	94,5 (2675)	-	-	
	<i>Haemonchus placei</i>	-	-	-	-	-	-	-	33,3 (215)	-	97,6 (2010)	99,0 (1039)	100 (3895)
	<i>Haemonchus similis</i>	76,1	87,0 (1527)	81,3 (483)	94,0 (430)	43,2 (116)	75,0 (179)	83,3 (1210)	33,3 (675)	50,9 (185)	21,4 (175)	-	29,0 (160)
	<i>Ostertagia lyrata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,8 (3,50)	-	2,6 (1)
	<i>Ostertagia ostertagi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,1 (12)	-	2,6 (3)
	<i>Ostertagia trifurcata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3 (0,3)
	<i>Trichostrongylus axei</i>	-	42,0 (395)	8,3 (82)	88,0 (2172)	24,3 (66)	12,5 (205)	66,7 (353)	-	69,1 (110)	26,2 (466)	*	69,7 (239)
ID	<i>Agriostomum wryburgi</i>	-	-	16,7 (3)	-	2,7 (8)	10,0 (10)	-	-	-	-	-	-
	<i>Bunostomum phlebotomum</i>	23,0	26,5 (4)	52,1 (32)	36,0 (5)	9,5 (34)	2,5 (10)	16,7 (40)	-	60,0 (32)	16,7 (54)	10,0 (0,5)	2,6 (0,3)
	<i>Capillaria bovis</i>	-	-	-	8,0	-	-	-	-	3,6 (1)	11,9 (46)	-	9,2 (1)
	<i>Cooperia curticei</i>	-	-	-	20,0 (260)	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Cooperia pectinata</i>	17,6	49,7 (506)	8,3 (15)	74,0 (2581)	44,6 (1040)	35,0 (143)	83,3 (8521)	2,1 (5)	69,1 (497)	19,1 (1043)	-	34,2 (1010)
	<i>Cooperia punctata</i>	82,4	88,6 (3989)	95,8 (3905)	98,0 (6655)	100 (3649)	82,5 (477)	100 (11109)	54,2 (1120)	100 (3160)	92,9 (8733)	-	100 (5595)
	<i>Cooperia punctata/spatulata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100 (9361)	-

	<i>Cooperia spatulata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	29,1 (50)	14,3 (770)	-	32,9 (138)
	<i>Strongyloides papillosus</i>	-	25,0 (63)	-	4,0 (360)	-	-	-	-	-	2,4 (10)	*	1,3 (0,1)
	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	6,1	-	8,3 (15)	28,0 (315)	-	10,0 (360)	-	-	-	2,4 (20)	-	10,5 (11)
	<i>Trichostrongylus longispicularis</i>	-	22,3 (38)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,6 (0,5)
	<i>Oesophagostomum radiatum</i>	26,1	83,0 (175)	79,2 (75)	94,0 (315)	86,5 (160)	17,5 (121)	83,3 (56)	41,7 (60)	98,2 (348)	73,8 (295)	89,0 (103)	94,7 (471)
IG	<i>Trichuris discolor</i>	7,6	35,6 (39)	-	30,0 (4)	21,6 (34)	-	50,0 (17)	-	56,4 (47)	38,1 (67)	64,3 (15)	47,4 (32)
	<i>Trichuris spp.</i>	-	-	47,9 (66)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP	<i>Setaria cervi</i>	-	-	-	18,0	-	-	-	-	-	-	-	-
PM	<i>Dictyocaulus viviparus</i>	-	-	31,3 (24)	12,0	13,5 (382)	-	-	-	9,1	16,7 (22)	*	-

OE = Órgão de eleição, AB = Abomaso, ID = Intestino Delgado, IG = Intestino Grosso, CP = Cavidade Peritoneal, PM = Pulmão;

n = número de animais;

P = prevalência;

IM = intensidade média da infecção;

* = infecções esporádicas não mensuradas;

MS = Mato Grosso do Sul, MT = Mato Grosso, SP = São Paulo, PI = Piauí, MG = Minas Gerais, BA = Bahia, RJ = Rio de Janeiro;

¹(GRISI e NUERNBERG, 1971), ²(CATTO e UENO, 1981), ³(SANTANA et al., 1983), ⁴(GIRÃO et al., 1985), ⁵(OLIVEIRA e MATSUMOTO, 1985), ⁶(RODRIGUES et al., 1985), ⁷(ZOCOLLER et al., 1983), ⁸(BRESCIANI et al., 2001), ⁹(LANDIM et al., 2001), ¹⁰(BORGES et al., 2001), ¹¹(PIMENTEL NETO e FONSECA, 2002) e ¹²(SANTOS et al., 2010).

1 A necessidade de novas pesquisas de epidemiologia é factível,
 2 principalmente nos estados de Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, Mato
 3 Grosso do Sul e Pará, onde estão localizados os maiores rebanhos do país e
 4 juntos são responsáveis por 54,36% do rebanho nacional (SIDRA, 2014). No
 5 entanto, para a realização destas é necessário o treinamento de técnicos para
 6 a correta identificação das espécies. Amarante (2011) aborda esta questão
 7 com muita propriedade e faz a seguinte menção: A identificação precisa das
 8 diferentes espécies, bem como o conhecimento sobre a epidemiologia das
 9 gastroenterites parasitárias, são fundamentais para a elaboração de estratégias
 10 sustentáveis de profilaxia das parasitoses.

11 Na TABELA 2 é possível visualizar que em alguns estudos em que foi
 12 diagnosticada a espécie *Haemonchus contortus* em bovinos, podem se tratar
 13 na verdade de *Haemonchus placei*, conforme observado por Amarante (2011).

14

15 TABELA 3: Prevalência e intensidade média da infecção por cestódeos e
 16 trematódeos parasitas de bovinos, determinadas por necropsia, em estados
 17 brasileiros.

Ano		1985 ⁽¹⁾	1985 ⁽²⁾	1985 ⁽³⁾	1989 ⁽⁴⁾	2001 ⁽⁵⁾	2002 ⁽⁶⁾
Estado		PI n=25	SP n=74	SP n=40	SP n=6	SP n=42	RJ n=98
OE	Espécie	P% (IM)	P% (IM)	P% (IM)	P% (IM)	P% (IM)	P% (IM)
ID	<i>Moniezia benedeni</i>	-	-	2,5 (1)	16,7 (1)	4,8 (1)	*
PC	<i>Eurytrema coelomaticum</i>	-	14,9 (146)	-	-	4,8 (45)	-
RM	<i>Paramphistomum</i> spp.	8,0	-	-	-	-	-

18 OE = Órgão de eleição, ID = Intestino Delgado, PC = Pâncreas, RM = Rúmen;

19 n = número de animais; P = prevalência; IM = intensidade média da infecção;

20 * = infecções esporádicas não mensuradas; SP = São Paulo, PI = Piauí, RJ =

21 Rio de Janeiro; ¹(GIRÃO et al., 1985), ²(OLIVEIRA e MATSUMOTO, 1985),

22 ³(RODRIGUES et al., 1985), ⁴(ZOCOLLER et al., 1983), ⁵(BORGES et al.,

23 2001), ⁶(PIMENTEL NETO e FONSECA, 2002).

24

25 1.2.5 Medidas Alternativas ou Complementares de Controle de Helmintos

26

27 O controle adequado dos helmintos pode ser alcançado por meio de
 28 algumas medidas, por exemplo, pastejo simultâneo entre ovinos e bovinos,
 29 onde devido à especificidade parasitária, os bovinos são capazes de eliminar
 30 as infecções por helmintos que não são específicos a espécie (AMARANTE et

31 al., 1997). Essa interação entre espécies animais proporcionou efeito benéfico
32 significativo no controle da verminose ovina, após a utilização de pastejo
33 rotacionado e alternado de ovinos e bovinos adultos (FERNANDES et al.,
34 2004).

35 Recentemente, Brito et al. (2013) ao avaliarem bovinos pastejando
36 isoladamente, ovinos pastejando isoladamente, bovinos e ovinos pastejando
37 simultaneamente, e bovinos pastejando previamente aos ovinos, observaram
38 que para os ovinos, os sistemas consorciados apresentaram redução na
39 infecção endoparasitária, sendo o pastejo simultâneo com ovinos melhor que o
40 pastejo prévio de bovinos e alternado com ovinos. No entanto, para os bovinos,
41 nenhuma diferença entre os sistemas de pastejo foi verificada, porém o pastejo
42 simultâneo (ovinos e bovinos) pode ser uma ferramenta para reduzir a
43 necessidade de tratamentos anti-helmínticos em ovinos. Além de que os
44 bovinos são menos seletivos que os ovinos e ingerem partes grosseiras da
45 pastagem, como talos, proporcionando melhor rebrota do capim e
46 conseqüentemente maior relação folha: colmo.

47 Outras medidas de controle também são descritas na literatura, como:
48 seleção de reprodutores bovinos resistentes aos nematódeos gastrintestinais,
49 devido à herdabilidade da característica ($h = 0,3$) (GASBARRE et al., 2001).

50 Bricarello et al. (2007) observaram coeficiente de correlação ($r = 0,64$)
51 entre a carga parasitária de *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp., em bovinos da
52 raça Nelore, indicação de que a seleção para a resistência a uma das
53 espécies, conseqüentemente, melhora a resistência à outra.

54 Utilizando vacina, Bassetto et al. (2011) obtiveram redução na contagem
55 de OPG de 99% para *Haemonchus contortus* e 97% para *Haemonchus placei*,
56 após a imunização com vacina contendo glicoproteínas de membrana do
57 intestino de *H. contortus*, em bezerros da raça holandesa, infectados
58 experimentalmente.

59 Tratamentos fitoterápicos e homeopáticos também são descritos na
60 literatura. No entanto, em uma pesquisa recente, Catto et al. (2013) verificaram
61 em dois ciclos experimentais subsequentes de 318 e 313 dias de duração, que
62 não houve diferença significativa ($P > 0,05$), entre o tratamento com dois
63 produtos homeopáticos, um fitoterápico e um grupo controle, nas contagens de
64 OPG, moscas dos chifres, carrapatos e no ganho em peso. No mesmo

65 experimento, o grupo tratado alopaticamente com moxidectina, obteve menor
66 média da contagem de OPG ($P<0,05$), menor média nas contagens de
67 carrapato ($P<0,05$), e ganharam de 22 a 30 kg de peso vivo a mais ($P<0,05$)
68 que o grupo não tratado ou tratado com medicamentos alternativos. Portanto
69 emprego de drogas anti-helmínticas convencionais ainda se mostra como a
70 medida mais eficiente para o controle de helmintos.

71

72 **1.2.6 Drogas Anti-helmínticas**

73 Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde
74 Animal (SIDAN), o faturamento total do setor no Brasil no ano de 2012 foi de
75 R\$ 3,7 bilhões, sendo que os antiparasitários representaram 25% deste
76 faturamento e dentre as espécies animais, os ruminantes representam a classe
77 mais expressiva com 54,2% do mercado (SIDAN, 2013).

78 Atualmente, as drogas anti-helmínticas para ruminantes comercializadas
79 no Brasil de acordo com o princípio ativo são: 10 para bovinos, 9 para ovinos e
80 5 para caprinos, conforme TABELA 4.

81 Em três estudos em rebanhos leiteiros no Brasil (CHARLES e
82 FURLONG, 1996; DELGADO et al., 2009; PEREIRA, 2011), foram observados
83 que os anti-helmínticos mais utilizados por pecuaristas brasileiros são os
84 pertencentes à classe das lactonas macrocíclicas (ivermectina, doramectina,
85 abamectina e moxidectina), seguido dos imidazotiazóis (levamisol) e
86 benzimidazóis (albendazol). Foram relatados casos de resistência anti-
87 helmíntica a todos estes produtos, no entanto, a maioria dos casos de
88 resistência é descrito para o grupo químico das lactonas macrocíclicas, em
89 especial a ivermectina.

90 Para o anti-helmíntico ser eficaz, alguns fatores são importantes como: a
91 concentração de droga no local onde o parasita se encontra no organismo do
92 hospedeiro e o tempo de exposição do parasita a droga (LANUSSE et al.,
93 1997).

94 A administração de um mesmo fármaco pode apresentar diferentes
95 persistências de concentrações plasmáticas, de acordo com a espécie animal,
96 por exemplo, o metabólito sulfóxido de albendazol (fração detectável do
97 albendazol no plasma) foi observado por até 54, 42 e 36 horas em ovinos,
98 caprinos e bovinos, respectivamente (DELATOUR et al., 1991).

99 TABELA 4: Drogas anti-helmínticas atualmente disponíveis no Brasil para o
100 controle de nematódeos de ruminantes.

Grupo Químico	Princípio Ativo	Ex: Nomes Comerciais	Espécie Animal
Benzimidazóis	Albendazol	Albendathor [®] , Valbazen [®]	Bovinos, Ovinos e Caprinos
	Oxfendazol	Oxfaden [®]	Bovinos, Ovinos e Caprinos
Imidazotiazóis	Levamisole	Ripercol [®]	Bovinos e Ovinos
Organofosforados	Triclorfone	Neguvon [®] , Triveron [®]	Bovinos, Ovinos e Caprinos
Salicilanidas	Closantel	Diantel [®] , Galgosantel [®]	Bovinos, Ovinos e Caprinos
Amino-acetonitrílicos (<i>amino-acenitrile derivatives</i> , AAD)	Monepantel	Zolvix [®]	Ovinos
Lactonas Macroclílicas	Ivermectina	Altec [®] , Ivomec [®] , Ivermectin [®]	Bovinos, Ovinos e Caprinos
	Abamectina	Duotin [®] , Abactin [®]	Bovinos
	Doramectina	Dectomax [®] , Doramec [®]	Bovinos e Ovinos
	Eprinomectina	Eprinex [®]	Bovinos
	Moxidectina	Cyductin [®] , Onix [®]	Bovinos e Ovinos

101 Elaborado pelo autore com base em informações disponíveis sobre os produtos
102 com licenças vigentes pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
103 (MAPA).

104

105 Lifschitz et al. (2000) observaram a presença de ivermectina por 38, 48,
106 48 e 38 dias após tratamento (0,2 mg/kg por via subcutânea), na mucosa
107 abomasal, mucosa intestinal, pele e nos parasitas, respectivamente,
108 comprovando a longa persistência deste fármaco nos tecidos alvo, em bovinos.

109 No mesmo experimento foi observada alta correlação ($r = 0,88$) entre os
110 perfis de concentração da droga no plasma e aqueles alcançados no tecido da
111 mucosa gastrintestinal, pulmão e pele. Sendo assim, a mensuração da
112 ivermectina através da concentração plasmática é um bom parâmetro para
113 avaliar a disposição da droga nos tecidos.

114

115 1.2.6.1 Ivermectina

116 A ivermectina é um endectocida, ou seja, possui ação nos endoparasitas
117 e ectoparasitas, sendo estes os nematódeos gastrointestinais e pulmonares,

118 insetos e ácaros. No Brasil, ela está disponível para bovinos, na formulação
119 injetável, nas concentrações de 0,2 mg/kg (ex: Baymec[®], Bayer), 0,45 mg/kg
120 (ex: Solution[®] 3,5 % LA, MSD Saúde Animal), 0,63 mg/kg (ex: Ivomec[®] Gold,
121 Merial), 0,8 mg/kg (ex: Master LP[®], Ouro Fino) e tópica na concentração de 0,5
122 mg/kg (ex: Ivomec[®] Pour-On, Merial; Baymec[®] Pour-on, Bayer).

123 Após a administração da ivermectina, por via subcutânea, a droga é
124 absorvida no espaço subcutâneo, chega à circulação sistêmica, e é distribuída
125 nos tecidos e locais onde se encontram os parasitas-alvo.

126 O mecanismo de ação da ivermectina envolve tanto a potencialização do
127 ácido gama-amino butírico (GABA), um neurotransmissor inibitório das
128 respostas motoras dos parasitos, como a interação com os canais de
129 glutamato-cloro independentes de GABA, aumentando a permeabilidade da
130 membrana das células nervosas dos parasitos aos íons de cloro. Assim, a
131 ivermectina causa bloqueio neuromuscular, resultando em paralisia flácida e
132 morte do parasito (MCKELLAR e BENCHAOUI, 1996).

133 A ivermectina é quase exclusivamente (98%) excretada nas fezes,
134 independentemente das espécies e via de administração, com menos de 2%
135 da dose excretada na urina (CHIU et al., 1990; MCKELLAR e BENCHAOUI,
136 1996).

137 Os resíduos de ivermectina presente nas fezes de bovinos causam
138 impacto na fauna não-alvo, interferindo na harmonia do ecossistema
139 (LUMARET et al., 2012).

140 Besouros coprófagos enterram cerca de 70% das fezes dos bovinos em
141 até 10 dias após a exposição das fezes frescas (MIRANDA et al., 2000).
142 Período esse que abrange as elevadas concentrações residuais de ivermectina
143 nas fezes (ALVINERIE et al., 1998; CHIU et al., 1990; LANUSSE et al., 1997).

144 A fauna coprófaga é essencial para a degradação do bolo fecal. No
145 entanto, em um estudo a campo, foi observada a falha na degradação das
146 fezes de bovinos, devido à ausência de insetos, após o tratamento com
147 ivermectina de liberação lenta (PRICHARD et al., 2012; WALL e STRONG,
148 1987).

149 Iglesias et al. (2006) observaram uma redução de 33% na contagem
150 total de artrópodes presentes no bolo fecal, após a administração de
151 ivermectina (0,2 mg/kg) em bovinos. No mesmo experimento, as menores

152 concentrações de ivermectina encontradas em amostras de fezes do grupo
153 tratado aos 60 dias pós-tratamento, foram superiores as concentrações
154 indicadas por Strong e James (1993), passíveis de causar efeitos sub-letais
155 nos organismos não-alvo.

156 Suarez (2002) observou redução na quantidade total de artrópodes,
157 ácaros e dípteros, dos três aos 29 dias pós-tratamento com ivermectina e
158 doramectina (ambas 0,2 mg/kg).

159 Devido inúmeros relatos da ineficácia da ivermectina e dos efeitos
160 danosos ao meio ambiente, sua utilização para ruminantes hoje em dia é
161 motivo de ser questionada.

162

163 **1.2.6.2 Moxidectina**

164 A moxidectina é um endectocida, pertencente à classe das lactonas
165 macrocíclicas. Suas moléculas são grandes, com peso molecular de 600 kD, e
166 diferem das avermectinas em sua estrutura química (LANUSSE et al., 2009).
167 Ela possui atividade semelhante à ivermectina, sobre os mesmos parasitas de
168 bovinos e no Brasil, está disponível em formulação injetável nas concentrações
169 de 0,2 mg/kg (ex: Exceller[®], Vallée; Cydectin[®], Zoetis) e 1 mg/kg (ex: Onix[®],
170 Zoetis).

171 A ivermectina e a moxidectina têm diferentes cinéticas no plasma e nos
172 tecidos, que afetam a duração da atividade (LANUSSE et al., 1997). A via de
173 excreção é a mesma da ivermectina. No entanto, a ivermectina tem atividade
174 durante 14 a 28 dias, enquanto moxidectina possui maior período de atividade
175 (14 a 42 dias), quando administradas em dose única, com uma formulação de
176 ação não prolongada (PRICHARD et al., 2012). Porém, ivermectina e a
177 moxidectina foram detectadas no plasma de bovinos, 80 dias após aplicação
178 de 0,2 mg/kg de ambos os fármaco (LANUSSE et al., 1997).

179 As lactonas macrocíclicas (ivermectina e moxidectina) apresentam
180 atividade sobre helmintos, devido o GABA ser o seu principal neurotransmissor.
181 No entanto, elas não apresentam atividade sobre cestódeos e trematódeos
182 (SPINOSA et al., 2006), parasitas que não possuem receptores GABA.

183 1.2.6.3 Albendazol

184 O albendazol é um fármaco endoparasiticida, e possui atividade sobre
185 nematódeos gastrintestinais e pulmonares, cestódeos e trematódeos. Uma
186 particularidade deste fármaco é que ele também possui atividade ovicida.

187 No Brasil esta droga está disponível para bovinos em forma injetável, de
188 sulfóxido de albendazol na concentração de 2,5 mg/kg (ex: Albendathor[®],
189 Tortuga) e em formulação oral 5 mg/kg (ex: Albendazole[®], Matsuda).

190 A biotransformação dos benzimidazóis ocorre primeiramente no fígado,
191 onde o composto original é biotransformado por processos de oxidação
192 (sulfoxidação) e hidroxilação em metabólitos ativos (sulfóxido) e inativos
193 (sulfonas) que são eliminados basicamente pela urina (SPINOSA et al., 2006).

194 Seu mecanismo de ação envolve dois modos: 1) Despolimerização da
195 tubulina – onde os microtúbulos, estruturas que compõem o citoesqueleto das
196 células, modificam-se por processos de polimerização das subunidades da
197 proteína tubulina. A ligação dos benzimidazóis a tubulina do parasita resulta na
198 sua despolimerização, alterando os microtúbulos, interrompendo processos
199 vitais para a função celular, como a divisão mitótica, transporte de nutrientes e
200 alteram a forma da célula (SPINOSA et al., 2006); 2) Inibição da enzima
201 fumarato-redutase nas reações mitocondriais - os benzimidazóis interferem no
202 metabolismo energético do parasita, por inibirem a absorção ou o metabolismo
203 da glicose, resultando no esgotamento das reservas energéticas, causando a
204 morte do nematódeo por inanição (SPINOSA et al., 2006).

205 A persistência do albendazol é relativamente curta, quando comparada
206 as lactonas macrocíclicas. Cristofol et al. (2001) observaram a presença de
207 sulfóxido de albendazol, em fluido abomasal, fluido intestinal e mucosa
208 intestinal, até 32 horas após a administração de sulfóxido de albendazol 7,5
209 mg/kg em bovinos, por via intra-venosa (IV). No entanto, este fármaco não foi
210 detectado no tecido dos parasitas 20 horas pós-tratamento.

211 O principal mecanismo de resistência aos benzimidazóis envolve
212 mudanças na estrutura primária de β - tubulinas, os blocos de construção de
213 microtúbulos. Especificamente, as mutações pontuais no gene de β - tubulina
214 isotipo 1, conduzindo a substituições de aminoácidos nos códons 167, 198 e
215 200 da proteína, têm sido associados com resistência em nematódeos. Estes
216 polimorfismos de nucleotídeo único oferecem um meio de detectar a presença

217 de resistência dentro de populações de helmintos (SAMSON-
218 HIMMELSTJERNA et al., 2007).

219

220 **1.2.6.4 Levamisol**

221 O levamisol pertence à classe dos imidazotiazóis, tem um amplo
222 espectro de ação nematodocida, incluindo nematódeos gastrintestinais e
223 pulmonares, e não apresentam atividade cestodocida e trematodocida.

224 No Brasil este fármaco está disponível em formulação oral de cloridrato
225 de levamisol na concentração de 5 mg/kg (ex: Ripercol[®] L Solução, Zoetis), e
226 injetável na concentração de 4,5 mg/kg (ex: Levamisol Injetável Matsuda[®],
227 Matsuda). Segundo (Lanusse et al., 2009), os sais de fostato e cloridrato
228 permitem formular o levamisole como uma solução estéril de administração
229 subcutânea, intramuscular, oral ou intra-ruminal.

230 Os imidazotiazóis são agonistas colinérgicos e penetram no parasito
231 pela cutícula (SPINOSA et al., 2006). Sendo que o levamisol imita a acetilcolina
232 e atua como um agonista dos receptores nicotínicos pós-sinápticos de
233 acetilcolina, localizados na musculatura do nematódeo, e devido o levamisol
234 não ser quebrado rapidamente (como a acetilcolina), ele induz a uma paralisia
235 espástica, que permite a expulsão do parasita do hospedeiro (MARTIN et al.,
236 2005).

237 A resistência dos parasitas ao levamisol pode estar associada à
238 seletividade deste fármaco a um determinado receptor colinérgico, sendo que
239 Martin et al. (2005) observaram redução dos receptores colinérgicos do tipo-L,
240 associados com a resistência ao levamisol.

241

242 **1.2.7 Resistência Anti-helmíntica**

243 Após a introdução das drogas anti-helmínticas no mercado mundial em
244 1940, a utilização destes produtos para controle de parasitas de ruminantes, foi
245 aumentando gradativamente e simultaneamente ao surgimento de novas
246 drogas. No entanto, com o surgimento das drogas endectocidas entre 1980 e
247 1990, estes produtos passaram a ser utilizados em larga escala.

248 Na TABELA 5 é possível observar o ano de introdução do anti-helmíntico
249 no mercado, e o primeiro relato de resistência à respectiva droga, sendo que

250 existem relatos de resistência anti-helmíntica a todas as classes de
251 medicamentos disponíveis no mundo.

252

253 TABELA 5: Introdução de drogas anti-helmínticas para ruminantes e relatos de
254 resistência anti-helmíntica as drogas.

Classe Anti-helmíntica	Nome Genérico da Droga	Introduzido no Mercado	Relato de Resistência	Referência
Compostos Heterocíclicos	Fenotiazina	1940	1957	Leland et al., 1957
	Piperazina	1954	1966	Drudge et al., 1988
Benzimidazóis	Tiabendazol	1961	1964	Drudge et al., 1964
	Cambendazol	1970	1975	Berger, 1975
	Oxibendazol	1970	1985	Drudge et al., 1985
	Mebendazol	1972	1975	Berger, 1975
	Albendazol	1972	1983	Cawthorne e Whitehead 1983
	Febendazol	1975	1982	Boersema e Lewingvan der Wiel 1982
	Oxfendazol	1976	1981	Le Jambre et al., 1981
Imidazotiazóis e Tetrahydropirimidinas	Triclabendazol	1983	1998	Mitchell et al., 1998
	Levamisol	1970	1979	Sangster et al., 1979
	Pirantel	1974	1996	Chapman et al., 1996
	Oxantel	1976	-	-
	Morantel	1970	1979	Sangster et al., 1979
Lactonas Macroclícas	Abamectina	Fim dos anos 1970	2001	Wooster et al., 2001
	Ivermectina	1981	1988	Wyk e Malan, 1988
	Moxidectina	1991	1995	Leathwick, 1995
	Doramectina	1993	2007	Borgsteede et al., 2007
	Eprinomectina	1996	2003	Loveridge et al., 2003
Amino-acetonitrílicos (AAD)	Monepantel	2009	2013	Scott et al., 2013
Spiroindole	Derquantel + Abamectina	2010	2011	Kaminsky et al., 2011

255 Adaptado de Graef et al. (2013).

256

257 O uso de anti-helmínticos simultaneamente em todas as categorias de
258 bovinos, juntamente com o uso excessivo e sem critérios técnicos (DELGADO
259 et al., 2009), provavelmente foi o fator principal do surgimento da resistência,
260 sendo hoje difundida no mundo todo, conforme FIGURA 3.



261

262 FIGURA 3: Relatos de resistência anti-helmíntica em bovinos no mundo.

263

264 No Brasil, os primeiros relatos de resistência anti-helmíntica em
265 ruminantes ocorreram no Rio Grande do Sul. Em ovinos foi registrada a
266 presença de *H. contortus* resistente ao Tiabendazol (SANTOS e GONÇALVES,
267 1967) e em bovinos *Haemonchus* spp. resistente ao oxfendazole e ao
268 albendazole (PINHEIRO e ECHEVARRIA, 1990).

269 Posteriormente, vários gêneros de nematódeos resistentes foram
270 descritos em bovinos no Brasil (Tabela 6).

271 A moxidectina foi à última droga lançada no mercado brasileiro (década
272 de 90) para o controle de nematódeos de bovinos. Além de novas drogas não
273 serem lançadas frequentemente, a última, como é o caso do monepantel para
274 ovinos, são de alto valor, aumento os custos de produção. Portanto o uso
275 consciente destes produtos atuais é imprescindível para a manutenção dos que
276 ainda possuem eficácia.

277 Durante esta revisão sobre fármacos disponíveis no Brasil, para o
278 closantel não foi encontrado relato de resistência anti-helmíntica em bovinos.
279 Provavelmente a utilização desse produto é restrita devido ao fato de estar
280 disponível apenas para uso oral, o que limita a sua aplicação em bovinos, pois,
281 segundo Pereira (2011), 78,9% dos proprietários preferem a utilização de
282 formulações injetáveis. Outra questão a ser observada, é que geralmente o
283 nematódeo mais prevalente em rebanhos brasileiros é *Cooperia* spp., e dentre

284 os parasitas de ruminantes da superfamília Trichostrongyloidea, este fármaco é
 285 descrito com atividade apenas sobre *Haemonchus* spp. (SPINOSA et al.,
 286 2006). Por outro lado, em ovinos, já foram descritos casos de resistência anti-
 287 helmíntica de *Haemonchus* spp. ao closantel (ALMEIDA et al., 2010;
 288 ECHEVARRIA et al., 1996; RAMOS et al., 2002).

289

290 TABELA 6: Casos de resistência anti-helmíntica em bovinos no Brasil.

Classe Anti-helmíntica	Dosagem	Nematódeos espécies/genero	Autor
Abamectina LA	0,2 mg/kg	Haem., Coop., Tric.	Cezar et al., 2010 Rangel et al., 2005; Cardoso et al., 2008;
Doramectina	0,2 mg/kg	Haem., Coop., Oeso., Tric.	Cezar et al., 2010; Borges et al., 2013
Doramectina	0,7 mg/kg	Haem., Coop., Oeso., Tric.	Borges et al., 2013
Fosfato de Levamisol	4,7 a 5 mg/kg	Haem., Coop., Tric., Oste.	Soutello et al., 2007; Souza et al., 2008 Rangel et al., 2005; Soutello et al., 2007;
Ivermectina	0,2 mg/kg	Haem., Coop., Tric., Oste. Trichuris	Souza et al., 2008; Cardoso et al., 2008; Cezar et al., 2010; Lopes et al., 2009
Ivermectina	0,8 mg/kg	Haem., Coop.	Cezar et al., 2010
Ivermectina	1,9 mg/kg	Haem., Coop., Tric.	Cezar et al., 2010
Ivermectina	0,6 a 0,63 mg/kg	Haem., Coop., Oeso., Tric., Oste., Trichuris	Cezar et al., 2010; Borges et al., 2013; Lopes et al., 2009
Ivermectina + Abamectina	0,45 + 0,25 mg/kg	Haem., Coop.	Cezar et al., 2010; Borges et al., 2013
Ivermectina LA	0,2 mg/kg	Haem., Coop., Tric.	Rangel et al., 2005; Cezar et al., 2010
Moxidectin	0,2 mg/kg	Haem., Coop., Oeso., Tric.; Trichuris	Condi et al., 2009; Souza et al., 2010 Soutello et al., 2007;
Sulfóxido de Albendazol	2,5 a 3,75 mg/kg	Haem., Coop.	Souza et al., 2008; Cezar et al., 2010
Triclorfon	48,5 mg/kg	Tric., Oeso.	Lopes et al., 2009

291 Haem. (*Haemonchus* spp.), Coop. (*Cooperia* spp), Tric. (*Trichostrongylus* spp.),292 Oeso. (*Oesophagostomum* spp.), Oste. (*Ostertagia* spp.).

293

294 **1.2.8 Métodos de Diagnóstico de Resistência Anti-helmíntica**

295 Vários métodos para a detecção da resistência anti-helmíntica são
 296 descritos na literatura, sendo que os mais utilizados são os recomendados pela

297 Associação Mundial para o Avanço na Parasitologia Veterinária (WAAVP)
298 (COLES et al., 2006, 1992). Os métodos podem ser “*in vitro*” e “*in vivo*”.

299

300 **1.2.8.1 Métodos “*in vitro*”**

301 **1.2.8.1.1 Teste de eclosão dos ovos**

302 Este teste é descrito para a detecção de resistência aos benzimidazóis.
303 Consiste na incubação dos ovos em conjunto com diferentes concentrações de
304 benzimidazol, e após o tempo determinado realiza-se a contagem dos ovos e
305 larvas em cada poço da placa. O tiabendazol é usado devido à sua
306 relativamente elevada solubilidade em água. A sensibilidade do tiabendazol
307 diminui com a idade dos ovos, portanto há duas formas para sua utilização,
308 com ovos frescos (coletados em no máximo 3 horas antes do teste), ou com
309 ovos armazenados de forma anaeróbia. O teste detalhado é descrito por Coles
310 et al. (2006).

311

312 **1.2.8.1.2 Teste de desenvolvimento larval**

313 Consistem na comparação do número larvas infectantes sobreviventes
314 na presença ou não, de anti-helmíntico. Este teste é diferente em vários
315 aspectos do teste de eclosão de ovos, por exemplo, a idade de ovos utilizados
316 não é importante, e ao final do teste são comparadas as espécies/gêneros das
317 larvas infectantes sobreviventes ao anti-helmíntico, em relação às
318 espécies/gêneros encontradas nos poços do grupo controle. O teste
319 atualmente só é confiável para os benzimidazóis e para o levamisol. No
320 entanto, o teste não foi adequadamente avaliado para uso com nematódeos de
321 bovinos, sendo mais utilizado para ovinos e equinos (COLES et al., 2006).

322

323 **1.2.8.1.3 Teste de base molecular (PCR)**

324 A técnica da PCR permite que um fragmento específico da molécula de
325 DNA (parasitas adultos, ovos e/ou larvas infectantes) seja amplificado milhares
326 de vezes, a fim de detectar e analisar a sequência alvo do estudo (genes
327 relacionados à resistência), em comparação com primers específicos para
328 resistência.

329 Segundo Coles et al. (2006) este teste é indicado somente para o
330 diagnóstico de resistência aos benzimidazóis, devido os mecanismos

331 moleculares de resistência para levamisol e/ou pirantel e lactonas
332 macrocíclicas, ainda serem insuficientemente compreendidos.

333

334 **1.2.8.2 Métodos “*in-vivo*”**

335 **1.2.8.2.1 Métodos “*in-vivo*” com necropsia**

336 Teste de eficácia controlada – Consiste na necropsia e quantificação da
337 carga parasitária de helmintos (UENO e GONÇALVES, 1998).

338 Não há dúvida de que o teste controlado é o mais preciso dos métodos
339 de detecção de resistência. (TAYLOR et al., 2002) abordaram as dificuldades
340 metodológicas relacionadas ao assunto e faz a seguinte menção à necropsia
341 de animais: o teste controlado é o mais confiável para avaliar a eficácia anti-
342 helmíntica, mas também é o mais caro por ser extremamente laborioso e por
343 requer o sacrifício dos animais. Por essa razão é pouco usado.

344

345 **1.2.8.2.2 Métodos “*in vivo*” com exame de fezes**

346 Teste de redução da contagem de ovos nas fezes (FECRT) - consiste na
347 comparação da contagem de OPG do grupo tratado em relação ao grupo não
348 tratado, e/ou na comparação da redução de OPG do grupo após tratamento,
349 em relação ao mesmo grupo antes do tratamento;

350 Segundo Coles et al. (2006) para realização do FECRT em bovinos, são
351 necessários no mínimo 15 animais (por grupo), realiza-se uma coleta prévia
352 onde são selecionados os animais com contagem individual ≥ 150 OPG,
353 distribuem-se os lotes a partir dos valores de OPG e realiza-se a administração
354 dos anti-helmínticos a serem avaliados. A segunda coleta é realizada de
355 acordo com a base anti-helmíntica utilizada, sendo de 3 a 7 dias pós-
356 tratamento para Levamisol, 8 a 10 dias para os benzimidazóis e para as
357 lactonas macrocíclicas que possuem maior persistência no organismo, 28 dias
358 pós-tratamento.

359 O FECRT é o principal método para a detecção da resistência anti-
360 helmíntica, e pode ser utilizado para detectar a presença de nematódeos
361 gastrintestinais com resistência a todos os grupos de anti-helmínticos (COLES
362 et al., 2006). Porém, existe grande necessidade de melhoria dos métodos de
363 detecção de resistência anti-helmíntica.

364 Vários fatores dificultam o diagnóstico da resistência em bovinos. Em
365 primeiro lugar, recomenda-se que os grupos de animais a serem tratados com
366 os diferentes produtos, sejam constituídos por pelo menos 15 animais, com
367 contagens mínimas de 150 OPG (COLES et al., 2006, 1992). Frequentemente,
368 a maioria dos animais do rebanho, mesmo jovens, apresenta baixa contagem
369 de OPG. Além disso, a maioria das propriedades não tem número de animais
370 suficientes para o teste simultâneo de várias drogas (FIGURA 4). Por exemplo,
371 75 animais com contagem superior a 150 OPG seriam necessários para se
372 testar quatro anti-helmínticos, mantendo-se um grupo, não tratado, como
373 controle. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de novas abordagens
374 para o diagnóstico da resistência anti-helmíntica, buscando a melhoria dos
375 métodos já existentes e/ou introdução de novos métodos a fim de melhorar a
376 detecção da resistência, minimizando a quantidade de animais envolvidos e
377 consequentemente diminuindo os custos.



378
379 FIGURA 4: Coleta de fezes (A), administração de anti-helmíntico (B) e bovinos
380 jovens utilizados na pesquisa (C).

381

382 **1.2.9 Técnicas de Contagem de OPG para Diagnóstico Anti-helmíntico**

383

384 **1.2.9.1 Contagem de OPG em Câmara de McMaster**

385 Esta é a técnica mais utilizada pela comunidade científica, para a
386 contagem de OPG. Esta técnica foi descrita inicialmente por Gordon e Whitlock
387 (1939), e é comumente empregada para a contagem de OPG de ovos de
388 nematódeos gastrintestinais de ruminantes.

389 Esta técnica é realizada da seguinte forma:

- 390 ❖ Pesar de 4 gramas de fezes bovinas coletadas diretamente do reto;
- 391 ❖ Colocar as fezes em um recipiente (ex: copo plástico, becker),
392 acrescentando-se 56 mL de solução hipersaturada (com gravidade de
393 1,120 a 1,200 gramas/mL) de NaCl ou sacarose;
- 394 ❖ Triturar as fezes com auxílio de bastão de vidro;
- 395 ❖ Filtrar em gaze, com o auxílio de peneira, para outro recipiente;
- 396 ❖ Homogeneizar o filtrado, e com auxílio de pipeta, retirar uma pequena
397 quantidade da amostra e preencher os dois lados da câmara;
- 398 ❖ Aguardar 1 a 2 minutos, para realizar a contagem nos dois lados da
399 câmara em objetiva com aumento de 10x do microscópio;
- 400 ❖ O resultado do OPG se dá pelo resultado do total de ovos encontrados
401 nos dois lados da câmara, multiplicado por 50 (ex: 5 ovos encontrados x
402 50, é igual a 250 OPG);

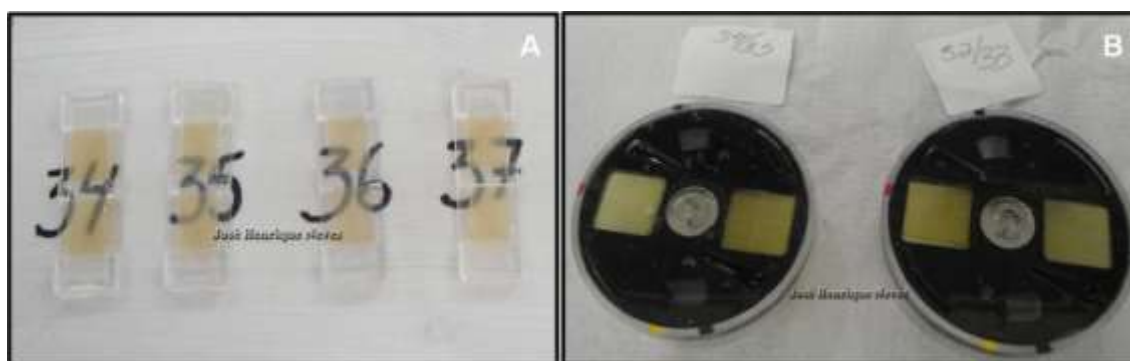
403 Vários trabalhos demonstram que existe correlação significativa entre o
404 OPG e número total de helmintos adultos (BRICARELLO et al., 2007; GIRÃO et
405 al., 1985) fato este que torna esta técnica tão difundida nos testes de
406 resistência anti-helmíntica, além da praticidade, rapidez, baixo custo e não
407 necessitar de equipamentos auxiliares (ex: centrífuga). No entanto, a técnica
408 para a contagem de OPG em câmara de McMaster, apresenta limitações,
409 especialmente em bovinos, que com frequência apresentam contagens
410 reduzidas de ovos nas fezes, o que dificulta a interpretação dos resultados.

411

412 **1.2.9.2 Contagem de OPG em Câmara Flotac**

413 Pesquisadores italianos (CRINGOLI et al., 2010) desenvolveram uma
414 nova câmara denominada Flotac (FIGURA 5), para o diagnóstico de
415 nematódeos, cestódeos, trematódeos e protozoários em diferentes espécies

416 animais como: bovinos, búfalos, ovinos, caprinos, gatos, cães, equinos e
417 humanos.



418
419 FIGURA 5: Câmaras de McMaster (A) e Câmaras de Flotac (B).

420

421 Nesta técnica foram avaliadas diferentes soluções de flutuação
422 (sacarose, cloreto de sódio (saturada), sulfato de zinco, nitrato de sódio,
423 sacarose + iodo mercurato de potássio, sulfato de magnésio, iodo mercurato de
424 potássio e sulfato de zinco + iodo mercurato de potássio) em diferentes
425 densidades (1,20, 1,25, 1,28, 1,35, 1,44 e 1,45 gramas/mL), e foram
426 determinadas as soluções e densidades específicas para cada espécie/gênero
427 de parasita avaliado (CRINGOLI et al., 2010).

428 A eficiência de diferentes soluções e densidades para o diagnóstico de
429 parasitas em fezes frescas de bovinos, búfalos, ovinos e caprinos são descritas
430 na TABELA 7:

431 As amostras fecais de herbívoros (bovinos, búfalos, equinos, ovinos e
432 caprinos) podem ser coletadas e armazenadas da mesma forma, sendo
433 coletadas diretamente do reto, em sacos plásticos individuais, armazenadas a
434 4 °C e processadas dentro de 24 a 48 horas (CRINGOLI et al., 2010).

435 A técnica Flotac para o diagnóstico de parasitas de herbívoros é
436 realizada da seguinte forma:

- 437 ❖ Pesagem de 10 gramas de fezes;
- 438 ❖ Coloca-se as fezes em recipiente (copo plástico/becker) e
439 acrescenta-se 90 mL de água;
- 440 ❖ Homogeneizar a amostra;
- 441 ❖ Transferir para outro recipiente, filtrando-a com auxílio de peneira;
- 442 ❖ Homogeneizar, pipetar e transferir 11 mL do filtrado para um tubo;
- 443 ❖ Centrifugar a 1.500 r.p.m. por 3 minutos;

- 444 ❖ Descartar o sobrenadante;
- 445 ❖ Adicionar a solução de flutuação no tubo até o nível de 11 mL e
- 446 homogeneizar com pipeta;
- 447 ❖ Preencher os dois lados da câmara, com cautela para evitar
- 448 bolhas de ar;
- 449 ❖ Centrifugar a 1.000 r.p.m. por 5 minutos;
- 450 ❖ Abrir parcialmente a câmara (este passo requer treinamento do
- 451 técnico, portanto ver no artigo original);
- 452 ❖ Realizar a contagem dos dois lados da câmara;
- 453 ❖ A quantidade de ovos encontrada será expressa em OPG, sem a
- 454 necessidade de fator multiplicação (ex: 182 ovos encontrados = 182
- 455 OPG);

456 A técnica em câmara Flotac, quando comparada com os métodos

457 Cornell-Wisconsin e em câmara de McMaster, forneceu resultados mais

458 confiáveis para o teste de redução na contagem de ovos por grama de fezes, e

459 menor viés principalmente em rebanhos com baixo (1-49 OPG) nível de

460 excreção de ovos de helmintos (LEVECKE et al., 2012).

461

462 TABELA 7: Eficiência de diferentes soluções de flutuação e densidades, para o

463 diagnóstico de ovos, oocistos e larvas de 1º estágio de parasitas de bovinos,

464 búfalos, ovinos e caprinos, utilizando a técnica Flotac.

Parasita	Forma Parasitária	Solução de Flutuação (SF) e Densidade (D)								
		SF1	SF2	SF3	SF4	SF5	SF6	SF7	SF8	SF9
		D	D	D	D	D	D	D	D	D
		1,20	1,20	1,20	1,20	1,25	1,28	1,35	1,44	1,45
<i>Eimeria</i> spp.	Oocistos	+	++	+	+	+++	++	+	+	-
Estrongilídeos Gastrintestinais	Ovos	+++	+++	++	++	+++	++	++	+	+
<i>Moniezia</i> spp.	Ovos	++	++	+++	++	++	+++	++	+	++
<i>Fasciola hepatica</i>	Ovos (Casca)	-	-	-	-	-	-	+++	+	+++
<i>Calicophoron daubneyi</i>	Ovos (Casca)	-	-	-	-	-	-	+++	+	+++
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	Ovos	-	-	-	-	-	-	++	+++	++
Vermes pulmonares	Larva 1º estágio	-	-	++	-	-	+	++	+	+++

465 SF1 (solução de sacarose), SF2 (solução de cloreto de sódio saturada), SF3

466 (sulfato de zinco), SF4 (nitrato de sódio), SF5 (sacarose + iodo mercurato de

467 potássio), SF6 (sulfato de magnésio), SF7 (sulfato de zinco), SF8 (iodo

468 mercurato de potássio) e SF9 (sulfato de zinco + iodo mercurato de potássio);
 469 +++ (maior eficiência), ++ (eficiente), + (baixa eficiência), - (não sugerido).

470

471 **1.2.10 Fórmulas Matemáticas para o Cálculo do FECRT**

472 Várias fórmulas matemáticas (FM) são descritas na literatura para o
 473 cálculo do FECRT, sendo que há uma divergência entre estudos.

474 George et al. (2011) avaliaram diferentes fórmulas para o teste FECRT
 475 descritas por vários autores sendo:

476 ✓ FM 1 - (DASH et al., 1988): $FECRT (\%) = 100 \times [1 - (T2/T1) (C2/C1)]$;

477 ✓ FM 2 - (COLES et al., 1992): $FECRT (\%) = 100 \times [1 - (T2/C2)]$;

478 ✓ FM 3 - (KOCHAPAKDEE et al., 1995): $FECRT (\%) = 100 \times [1 - (T2/T1)]$;

479 ✓ FM 4 - (MCKENNA, 2006): $FECRT (\%) = 100 \times [1 - (T2/C1)]$;

480 onde T1 e T2 = média aritmética do OPG do grupo tratado no pré e pós-
 481 tratamento, e C1 e C2 = média aritmética do OPG de um grupo não tratado
 482 (Controle) no pré e pós-tratamento, respectivamente e os resultados obtidos do
 483 cálculo das FECRT (%) por estes quatro métodos diferentes, revelaram
 484 estimativas muito próximas (GEORGE et al., 2011). No entanto, a utilização FM
 485 3 seria mais relevante para estimar a redução na contagem de ovos, devido
 486 não precisar do grupo de controle. Em concordância, Calvete e Uriarte (2013),
 487 também recomendam o FM 3, que possui maior acurácia para quantificar a
 488 redução na contagem de ovos nas fezes, em comparação a fórmula FM 2.

489 McKenna (2006) também avaliou estas quatro fórmulas e observou que
 490 a FM 3 demonstra maior sensibilidade em relação a FM 1 e FM 2, porém
 491 especificidade idêntica às demais fórmulas. Sendo que, segundo o autor, as
 492 definições de sensibilidade e especificidade são as seguintes:

493 • Sensibilidade – é a porcentagem de casos de resistência anti-helmíntica
 494 corretamente diagnosticados como “resistentes” pelo FECRT;

495 • Especificidade – é a porcentagem de casos não resistentes
 496 corretamente diagnosticados como “suscetíveis” pelo FECRT;

497 A sensibilidade e especificidade do FECRT são estimadas por
 498 comparações com testes de abate controlado: a resistência anti-helmíntica é
 499 considerada presente quando a eliminação de parasitas é inferior a 95% da
 500 carga parasitária total após o tratamento anti-helmíntico (MCKENNA, 2006).

501 É consensual entre estes autores que o FM 3, que compara os mesmos
502 animais antes e após o tratamento anti-helmíntico, é a fórmula matemática
503 mais indicada para o FECRT. No entanto, para um anti-helmíntico ser eficaz
504 ele deve promover redução superior a 95% na contagem de ovos por grama
505 de fezes, com limite inferior do intervalo inferior de confiança a 95%, maior ou
506 igual a 90%, limite este que às vezes é incorretamente determinado nos
507 métodos atuais.

508 Dobson et al. (2012) propõem uma nova metodologia, sendo a
509 substituição da média da contagem de OPG, pela contagem total de ovos
510 encontrados ($FECRT (\%) = 100 \times [1 - (\text{soma da contagem total de ovos do T2} / \text{soma da contagem total de ovos do T1})]$). Deste modo, a amplitude entre o
511 limite superior e inferior do intervalo de confiança a 95% é diminuída,
512 aumentando a precisão do intervalo de confiança.

514 Devido os fatores apresentados nesta revisão, o objetivo desta pesquisa
515 foi comparar duas técnicas e duas fórmulas matemáticas, a fim determinar qual
516 é a melhor abordagem metodológica para o correto diagnóstico de resistência
517 anti-helmíntica em bovinos.

518 2 Trabalho Científico

519 Nas páginas a seguir encontra-se o manuscrito a ser encaminhado à
520 revista Veterinary Research, no formato Original research papers (Regular
521 Papers). Após a defesa o artigo será corrigido e encaminhado à revista.
522 Resumo das normas da revista:

523 1º Os manuscritos devem ser escritos em Inglês;

524 2º Ter as linhas numeradas, com margens amplas e espaçamento duplo
525 por toda parte;

526 3º Manuscrito deve ser organizado na seguinte ordem: título, nome dos
527 autores, endereço postal completo de filiações, telefone, e-mail, endereço,
528 resumo, palavras-chave, introdução, material e métodos, resultados, discussão,
529 conclusão, agradecimentos, referências, tabelas, figuras;

530 4º Títulos e subtítulos não devem ser executados dentro do texto, devem
531 ser digitados em uma linha separada, sem recuo, em letras minúsculas;

532 5º Usar unidades do Sistema Internacional.

533

534

Diagnosis of anthelmintic resistance in cattle

José Henrique das Neves^{a*}, Nadino Carvalho^a, Alessandro F. T. Amarante^a

^aUNESP – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
Departamento de Parasitologia, IBB, CEP 18618-970, Botucatu, SP, Brazil.

*Corresponding author: nevesjh@fmvz.unesp.br

Abstract

The anthelmintic resistance in cattle has become a global problem, and in Brazil it has been reported in some states. Due to the need for more accurate methods of diagnosis of anthelmintic resistance the purpose this work was to evaluate two techniques (McMaster and Flotac) and two mathematical formulas (FECRT1 - according to the average EPG and FECRT2 - according to the total number of eggs shown) to calculate the reduction of eggs in stool test (FECRT) in the diagnosis of anthelmintic resistance in cattle. The anthelmintic tested were ivermectin (0.2 mg/kg), moxidectin (0.2 mg/kg), albendazole sulfoxide (2.5 mg/kg) and levamisole phosphate (4.7 mg/kg), administered at the dose recommended by the manufacturer. Ten farms were assessed, four visits in each pre -treatment (D-2), processing (D0), 10 days after treatment (D10) and 28 days post-treatment (D28). In all of the properties was observed resistance to one or more anthelmintics tested, regardless of the technique (McMaster or Flotac) or FECRT the mathematical formula (1 and 2). The genera/species found with resistance to one or more anthelmintics were *Haemonchus placei*, *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp. and *Oesophagostomum radiatum*. In conclusion, the anthelmintic resistance is present in all herds evaluated. The Flotac technical and mathematical formula FECR2 were more accurate than the McMaster technique and formula FECR1.

561 Need is greater awareness of the producers on the use of anthelmintics. Therefore, in
562 future studies on anthelmintic resistance in cattle, use of the method of diagnosis with
563 higher accuracy, it is recommended, as is the case Flotac method. In interpreting the
564 results, our study indicates that the calculation by formula FECR2 %, which eliminates
565 the use of a control group, should be recommended.

566

567 **1.Introduction**

568 Parasitism by gastrointestinal nematodes (GIN) is a cause of significant losses in
569 cattle industry, due to productivity decrease and high costs with drugs used in the
570 prophylaxis of infections. Although the infection by GIN may cause death, the main
571 loss is due to a reduction in body weight gain of young animals. Steers with GIN
572 infections showed a decrease of more than 11 kg in body weight gain when evaluated
573 during 112 days (Borges et al., 2013).

574 Administration of anthelmintic drugs is the most used method for the
575 prophylaxis of helminth infections, however, it has been applied indiscriminately. In the
576 state of Minas Gerais, it has been shown that in the 69.1% of the 1289 properties
577 analyzed, the farmers did not have any knowledge about the control of helminth
578 infections of cattle (Delgado et al., 2009). Most owners treated animals of all categories
579 with anthelmintic without any technical criteria, and the main drugs used were those
580 belonging to the avermectin class (Delgado et al., 2009).

581 As a result of indiscriminate use, anthelmintic resistance has become a global
582 problem in cattle industry, with numerous reports on different countries, such as Algeria
583 (Bentounsi et al., 2012), Argentina (Fazzio et al., 2012), UK (Bartley et al., 2012), USA
584 (Yazwinski et al., 2013) and New Zealand (Leathwick and Miller, 2013). In Brazil there
585 are reports of resistance, especially involving *Haemonchus* spp. and *Cooperia* spp. in

586 the states of Minas Gerais (Lopes et al., 2009; Rangel et al., 2005), São Paulo (Borges et
587 al., 2008; Condi et al., 2009; Soutello et al., 2007), Santa Catarina (Souza et al., 2008),
588 Rio Grande do Sul (Cezar et al., 2010) and Mato Grosso do Sul (Borges et al., 2013).

589 The primary method used for the diagnosis of anthelmintic resistance is the
590 faecal egg count reduction test (FECRT), which can be used to detect the presence of
591 GIN resistant to all groups of anthelmintics (Coles et al., 2006). However, there is a
592 great need for improved methods of detecting anthelmintic resistance. Several factors
593 complicate the diagnosis of resistance in cattle. Firstly, it is recommended that each
594 group of animals should have at least 15 animals, with a minimum of 150 eggs per gram
595 of faeces (EPG) (Coles et al., 1992). Often, most of the animals in a herd, even young,
596 have low faecal egg counts (FEC). Furthermore, most of the properties do not have a
597 sufficient number of animals allow testing several drugs simultaneously. For example,
598 75 animals with more than 150 EPG would be needed to test four anthelmintics,
599 considering also an untreated control group. An innovation was introduced by Dobson
600 et al. (2012) in a formulae which uses the total number of eggs counted rather than eggs
601 per gram of faeces to determine the efficacy. This approach focuses attention on how
602 many eggs are observed, rather than the number of animals in each group or the egg
603 detection level. They suggest that rather attempting to estimate the mean, the effort
604 would be better directed to counting a large number of eggs pre-treatment from high
605 shedding animals (e.g. the four animals in the group with the highest counts) and then
606 counting the same animals with the same degree of sensitivity post-treatment, thus
607 avoiding the low or zero egg producing animals. These animals contribute greatly to the
608 variance but provide little useful information to the estimate of efficacy. The required
609 paradigm shift is to ignore the animal as the experimental unit, regarding the egg as the
610 unit of interest (Dobson et al., 2012).

611 Therefore, it is necessary to develop new approaches for the diagnosis of
612 anthelmintic resistance. In this study, we investigated the occurrence of anthelmintic
613 resistance to levamisole, albendazole, ivermectin and moxidectin in cattle from ten
614 properties using two techniques for counting eggs in faeces, McMaster (Ueno and
615 Gonçalves, 1998) and Flotac (Cringoli et al., 2010), and also two mathematical
616 formulas used to calculate the efficacy of the anthelmintic treatments.

617

618 **2. Materials and methods**

619 This work was developed in accordance with the ethical principles of animal
620 experimentation and was approved by the local ethics committee on animal use
621 (protocol 44/2012/CEUA-FMVZ).

622

623 *2.1. Description of Cattle Herds and Management*

624 Ten cattle farms located in São Paulo State, Brazil (Fig. 1) were evaluated from
625 May 2012 to June 2013. The presence of balance for weighing animals was prerequisite
626 for the test to be carried out on the property in order to enable the accurate
627 administration of the anthelmintic doses. The total area of the properties ranged from
628 121 to 1815 hectares and the number of cattle in each ranged from 210 to 800 heads; the
629 age, sex and breed of animals in each farm are presented in Table 1. The bovines did not
630 receive any anthelmintic treatment within eight weeks prior to the experiment.

631

632 *2.2. Experimental description.*

633 The bovines were allocated into experimental groups based on their previous
634 stratification according to their FEC obtained by the Flotac method, performed in
635 individual faecal samples two days before treatment. The animals were classified into

636 FEC classes of five animals each. Randomly, one bovine of each class was allocated to
637 the following groups: Group 1 - treated with injectable ivermectin (0.2 mg/kg of body
638 weight (BW), Ivomec[®], Merial, Brazil); Group 2 - treated with injectable moxidectin
639 (0.2 mg/kg BW, Cydectin[®], Fort Dodge, Brazil); Group 3 - treated with injectable
640 albendazole sulphoxide (2.5 mg/kg; Albendathor[®], Tortuga, Brazil); Group 4 - treated
641 with injectable levamisole phosphate (4.7 mg/kg BW, Ripercol[®], Fort Dodge, Brazil);
642 and Group 5 - control (not treated). Animals were treated with each anthelmintic
643 according to the manufacturer's instructions and the number of animals in each group
644 ranged from 8 to 11, depending on the number of young animals available in each farm
645 (Table 1).

646

647 *2.3. Faecal examination*

648 Faecal samples from each animal were collected two days before the treatment
649 (D-2) and again 10 and 28 days post treatment. Samples were individually processed
650 using the modified McMaster technique with a sensitivity of 50 eggs/g (Ueno and
651 Gonçalves, 1998) and the Flotac Dual technique with a sensitivity of 2 eggs/g (Cringoli
652 et al., 2010). On the same collection days, composite faecal cultures were prepared for
653 each group to obtain and differentiate third stage larvae into parasitic genus (Amarante,
654 2011; Ueno and Gonçalves, 1998; Wyk and Mayhew, 2013). In the case of
655 *Haemonchus* larvae, the distance between the tip of the larval tail and the end of the
656 sheath tail were measured. Those larvae with mean (\pm standard error) measures
657 99.2 ± 0.70 μm were identified as *Haemonchus placei*, while those with average
658 (standard error) of 57.3 ± 0.80 μm were identified as *Haemonchus similis* (Amarante,
659 2011).

660

661 2.4. *Statistical analysis*

662 The faecal egg count reduction (FECR) estimation methods were calculated
663 according to the following formulae:

664
$$\text{FECR-1} = 100 \times (1 - (T2/C2)),$$

665 where T2 and C2 are the post-treatment arithmetic means of the individual egg counts
666 for the treated and control groups, respectively (Coles et al., 1992).

667
$$\text{FECR-2} = 100 \times (1 - (T2/T1)),$$

668 where T1 and T2 represented the total pre- and post-treatment faecal nematode egg
669 counts of a treated group. The lower 95% confidence limits (LCL) was estimated from
670 the cumulative inverse beta distribution by: $95\% \text{LCL} = 100 \times (1 - (\text{BETA}(\text{INV}(0.975, x$
671 $+ 1, n - x + 1))))$, while the 95% upper-CL (UCL) was estimated by: $95\% \text{UCL} = 100 \times$
672 $(1((\text{BETA}(\text{INV}(0.025, x + 1, n - x + 1))))$ according to descriptions by Dobson et al.
673 (2012).

674 In both cases, there resistance was considered present when FECR was lower
675 than 95% and the lower confidence interval limit (95%) was lower than 90%. When
676 only one of those parameters was identified, there was just suspect resistance (Coles et
677 al., 1992).

678

679 **3. Results**

680 3.1. *History of use and criteria for choice of anthelmintics*

681 In all farms, the administration of anthelmintics was the only approach used to
682 control GIN infections. The frequency of anthelmintic treatments ranged from 2 to
683 12/year, and all farms used mostly macrocyclic lactones, especially ivermectin (Table
684 1), due to its action also against ectoparasites. Albendazole and levamisole and were
685 also used, respectively in one and five farms. In only one property (Farm 1), the animals
686 were weighed before administration of anthelmintic. In the other farms the dose was

687 calculated based on visual estimation of the body weight. Most owners drenched the
688 cattle in combination with the vaccine against foot-and-mouth disease, following the
689 official national calendar of prophylaxis of this disease. One farm reported that the
690 administration was performed when the animals had clinical signs of parasitism (Farm
691 5). In 6 farms, treatments were administered in all animals of the herd, in two, only
692 animals up to 18 months old were treated.

693

694 *3.2. Comparison of parasitological techniques and formulas used to calculate*
695 *the efficacy*

696 In the data analysis, due to the higher values of variance, the efficacy calculated
697 with data obtained with the McMaster method always presented confidence intervals
698 with higher width than those obtained with the FLOTAC method. Therefore, using data
699 from McMaster, there were suspected resistance in some cases, even with high efficacy
700 (FECR > 95%), due to the lower limit of the confidence interval being less than 90%.
701 For example, in farms 5 and 7 levamisole showed high efficacy based on the values
702 obtained with the FLOTAC method 10 days after treatment (Table 2). On the other
703 hand, suspected presence of resistant nematodes was recorded in those properties based
704 on results by the McMaster method, i.e., a false diagnosis of suspect anthelmintic
705 resistance.

706 The two formulas employed to calculate the efficacy presented coinciding
707 results. One of the few exceptions occurred in the property 9, 28 days after treatment
708 with moxidectin. With the use of EPG values obtained with FLOTAC method, it is
709 observed that the efficacy was relatively low, 75.6 % (CI = 91, 36) with the FECR1
710 formula, which uses data from the untreated control group for the calculation of
711 efficacy. With the use of FECR2 formula, the drug would be considered effective with

712 95.4% reduction (CI = 96, 94). This discrepancy in results was due to the sharp
713 reduction in the EPG values that occurred in animals of the control group in that
714 property (Table 3). Since the formula FECR1 uses the values of the control group to
715 calculate the efficacy, there was bias in the result obtained with this formula.

716 As regards the definition of the day post treatment for collecting samples, the
717 results indicate no need for collection on two dates. In evaluation of albendazole,
718 levamisole and ivermectin, results obtained 10 days post treatment are satisfactory. On
719 the other hand, in the case of moxidectin, it is preferable the late sampling, in the case
720 28 days post treatment.

721 3.3. *Nematodes with resistance*

722 Due to greater accuracy and precision, results obtained through FLOTAC
723 method and the FECR2 formula were considered for determining the presence of
724 anthelmintic resistance in the farms.

725 Excepting farm 1 for albendazole and farm 6 for levamisole, these anthelmintics
726 showed high efficacy against GIN (Tables 4 and 2). After treatment with albendazole,
727 *Cooperia* larvae were predominant corresponding to 100% of the larvae in 13 of the 15
728 fecal cultures that yield third stage larvae (Table 4). Relatively high percentages of
729 *Trichostrongylus* spp. (in farms 3 and 7) and *Haemonchus placei* (in farms 2 and 9)
730 were found after treatment with levamisole, although *Cooperia* spp. have also prevailed
731 in cultures (Table 2).

732 In general, ivermectin proved totally ineffective (Table 5). The low efficacy of
733 ivermectin was observed in all the properties already at the early sampling at 10 days
734 after treatment. Besides *Cooperia* spp., most of the farms presented relatively high
735 percentage of *Haemonchus placei* with resistance. The results also indicated the

736 presence of *Oesophagostomum radiatum* (Farms 2, 4, 6 and 10) and *Trichostrongylus*
737 spp. (Farm 3) with resistance.

738 Moxidectin showed efficacy superior to 95% only in Farm 9, 28 days after
739 treatment (Table 6). The percentage of nematodes in fecal cultures were similar to those
740 reported after treatment with ivermectin, calling attention farm 3 that showed 82% and
741 72% *Trichostrongylus* spp. 10 and 28 days after treatment with moxidectin, respectively
742 (Table 6).

743

744 **4. Discussion**

745 In the present study it was possible to evaluate different approaches to detect
746 anthelmintic resistance in cattle showing different degrees of infection by GIN: (1) two
747 techniques to perform faecal egg counting, McMASTER with a sensitivity of 50 EPG
748 and FLOTAC with a sensitivity of 2 EPG; (2) two formulas employed to determine the
749 anthelmintic efficacy; and (3) two different periods for sampling, 10 and 28 post
750 anthelmintic treatment.

751 Our results indicated that the most reliable results were obtained using the
752 FLOTAC technique associated with the FECRT2 formulae that compares pre and post
753 treatment FEC in the same group. In agreement with our results, (Levecke et al., 2012)
754 reported that FLOTAC provided the most precise FECRT results (inversely correlated
755 with width of the 95% CI of the FECRT), while CORNELL-WISCONSIN and
756 McMASTER gave similar imprecise results. However, according to those authors the
757 true drug efficacy is likely to be underestimated when FEC are low and drugs are more
758 efficacious, this regardless of the analytic sensitivity of the FEC method.

759 The McMASTER has been the most used method in surveys of anthelmintic
760 resistance due to its simplicity, however lacks sensitivity. Before the anthelmintic
761 treatment, eggs were detected in all samples by the FLOTAC method, but some of them

762 did not present eggs by the McMASTER method. Therefore, the FLOTAC method
763 allowed the use of animals with light infections, that otherwise would be discarded. This
764 is of pivotal importance in studies with cattle that usually shed small number of eggs per
765 gram of faeces. The number of animals per group is another limiting factor for the
766 realization of FECRT in cattle herds. (Coles et al., 2006, 1992) recommended at least 15
767 cattle per group with $FEC \geq 150$ EPG. This requirement would make impractical to
768 perform the FECRT in most of the cattle farms. In the present study, for example, due to
769 the difficulty of obtaining farms with a large number of cattle, we used groups with 8-
770 11 animals. In addition, it was possible to carry out the trial in farms where animals
771 were presenting low mean FEC, such as Farms 1 and 10.

772 Regarding the formula used to determine the efficacy, overall the results
773 obtained by the formula FECRT2 (Dobson et al., 2012) proved more reliable than the
774 FECRT1, decreasing the width of the confidence interval and, therefore, avoiding false
775 diagnosis of anthelmintic resistance. The approach with FECR2 formulae presents the
776 additional advantage of not requiring a control group, so fewer animals to the test and,
777 therefore smaller number of samples to be processed in the laboratory. In other studies,
778 there was also indication that methods based on group averages calculated from
779 individual FECs (individual-based FECRT method) performed without a control group
780 ($FECRT2=100 \times (1 - [T2/T1])$) are the most appropriate to quantify the anthelmintic
781 resistance (Cabaret and Berrag, 2004; Calvete and Uriarte, 2013; George et al., 2011) in
782 comparison with methods that uses data from non treated control group to determine the
783 efficacy (Coles et al., 1992).

784 Our results demonstrate that the late collection of faeces (28 days post treatment)
785 is useful only if moxidectin is being subject to evaluation, otherwise, a single collection
786 around 10 days post treatment is enough to determine the efficacy of anthelmintics,

787 including ivermectin. This time is important due to the short pre-patent period of some
788 nematodes like *Cooperia punctata* that reach patency 11-14 days post infection (Wood
789 et al., 1995). The presence of this genus in fecal culture by day 28 days post treatment,
790 associated with high FEC, can occur due to reinfection after elimination of anthelmintic
791 by the host organism, especially in the case of levamisole and albendazole that present a
792 short period of activity after administration, which differs from the avermectins that
793 may have activity for 14–28 days and from moxidectin that has the longest period of
794 activity, from 14 to 42 days, depending on the target species (Prichard et al., 2012).

795 In two farms (1 and 4) moxidectin would be considered with high efficacy
796 taking into consideration only the sampling at 10 days post treatment. However, the
797 efficacy proved to be lower when the samples were taken 28 days post treatment.
798 Apparently, MOX decreased the number of eggs in female *Cooperia* spp. worms that
799 survived the treatment (Condi et al., 2009; Graef et al., 2013), which is not the case of
800 IVM (Graef et al., 2013). Therefore, our results showed that the FECRT is not a reliable
801 assay to detect MOX resistance when samples were collected 10 days after treatment,
802 while it was possible to detect resistance 28 days later, when worms possibly recover
803 the normal fecundity. Cezar et al. (2010) also found that moxidectin provided a
804 reduction of 95% and 100% in FEC at 7 and 14 days after treatment, respectively.
805 However, this effect was not confirmed in the sample taken 21 days after treatment.

806 Only 3 of the 10 farms had used moxidectin previously, but 9 of them had
807 resistance to this drug, possibly as a result of lateral resistance due to selection pressure
808 caused by the constant use of ivermectin. Although ivermectin and moxidectin belong
809 to the same family of macrocyclic lactones, they have similar but not identical, spectral
810 ranges of activity. Some important differences between moxidectin and avermectins in
811 interaction with various invertebrate ligand-gated ion channels are known and could be

812 the basis of different efficacy and safety profiles. Profound differences between
813 moxidectin and the avermectins are seen in interactions with ABC transporters in
814 mammals and nematodes (Prichard et al., 2012).

815 The highest degree of resistance to moxidectin occurred on farm 10, precisely
816 the farm that had been using this anthelmintic in a formulation with high concentration
817 (moxidectin 10%, 1.0 mg/kg, Onyx[®], Zoetis). In this case, the high selection pressure
818 resulted in *Cooperia* spp. and *Oesophagostomum radiatum* populations with a high
819 degree of resistance. Such moxidectin resistance had been reported previously in cattle
820 raised in Brazil (Condi et al., 2009; Rangel et al., 2005; Soutello et al., 2007).

821 In general, our results confirmed the lack of efficacy of ivermectin against GIN
822 in accordance with other studies carried out in Brazil (Borges et al., 2013; Soutello et
823 al., 2007; Souza et al., 2008). The main parasites found with resistance to ivermectin
824 were *Haemonchus placei* and *Cooperia* spp., in agreement with Rangel et al. (2005) and
825 (Borges et al., 2008). The resistance of *Trichostrongylus* spp. to macrocyclic lactones
826 has been described to a lesser extent (Cezar et al., 2010), corroborating the results of
827 this work. Suspected resistance of *Haemonchus similis* to moxidectin in one farm and to
828 levamisole in three farms was also found. There is no report of *H. similis* with
829 anthelmintic resistance. Therefore controlled efficacy trial for this confirmation is
830 required.

831 The severity of the anthelmintic resistance involving ivermectin is certainly a
832 reflection of the lack of criteria and excessive use of anthelmintics, especially
833 avermectins (Delgado et al., 2009). The low efficacy of avermectins is an important
834 cause of economical loss, due to expenses on ineffective products, management costs
835 and reduced productivity. This finding reinforces the importance of the routinely use of
836 methods to evaluate anthelmintic efficacy in cattle. However, it is not an easy task

837 convincing farmers about the need to invest in such tests, because GIN infections in
838 cattle are usually subclinical and losses are not perceived by the farmers (Cezar et al.,
839 2010).

840 In conclusion, anthelmintic resistance to macrocyclic lactones are present in all
841 herds evaluated, and the awareness of farmers about the rational use of anthelmintics is
842 pivotal for the maintenance of the efficacy of other products, such as levamisole and
843 albendazole, which still demonstrated high efficacy in most of the farms evaluated. In
844 surveys about anthelmintic resistance in cattle, the use of diagnostic method with higher
845 accuracy is recommended, as is the case FLOTAC method, which allows the use of a
846 smaller number of animals, being an alternative for small producers. In interpreting the
847 results, our study indicates that the calculation of efficacy by FECR2 formulae (Dobson
848 et al., 2012), which eliminates the use of a control group, should be recommended.

849

850 **Acknowledgements**

851 The authors would like to thank the technical assistance of César C.
852 Bassetto, Maurício O. Wilmsen, Maria R.L. Silva, and Michelle C. Santos. José
853 Henrique das Neves and Nadino Carvalho received financial support from CAPES
854 (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and A.F.T. Amarante
855 from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

856 **Reference**

- 857 Amarante, A.F.T., 2011. Why is it important to correctly identify *Haemonchus* species?
858 *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 20, 263–268.
- 859 Bartley, D.J., McArthur, C.L., Devin, L.M., Sutra, J.F., Morrison, A.A., Lespine, A.,
860 Matthews, J.B., 2012. Characterisation of macrocyclic lactone resistance in two
861 field-derived isolates of *Cooperia oncophora*. *Vet. Parasitol.* 190, 454–460.

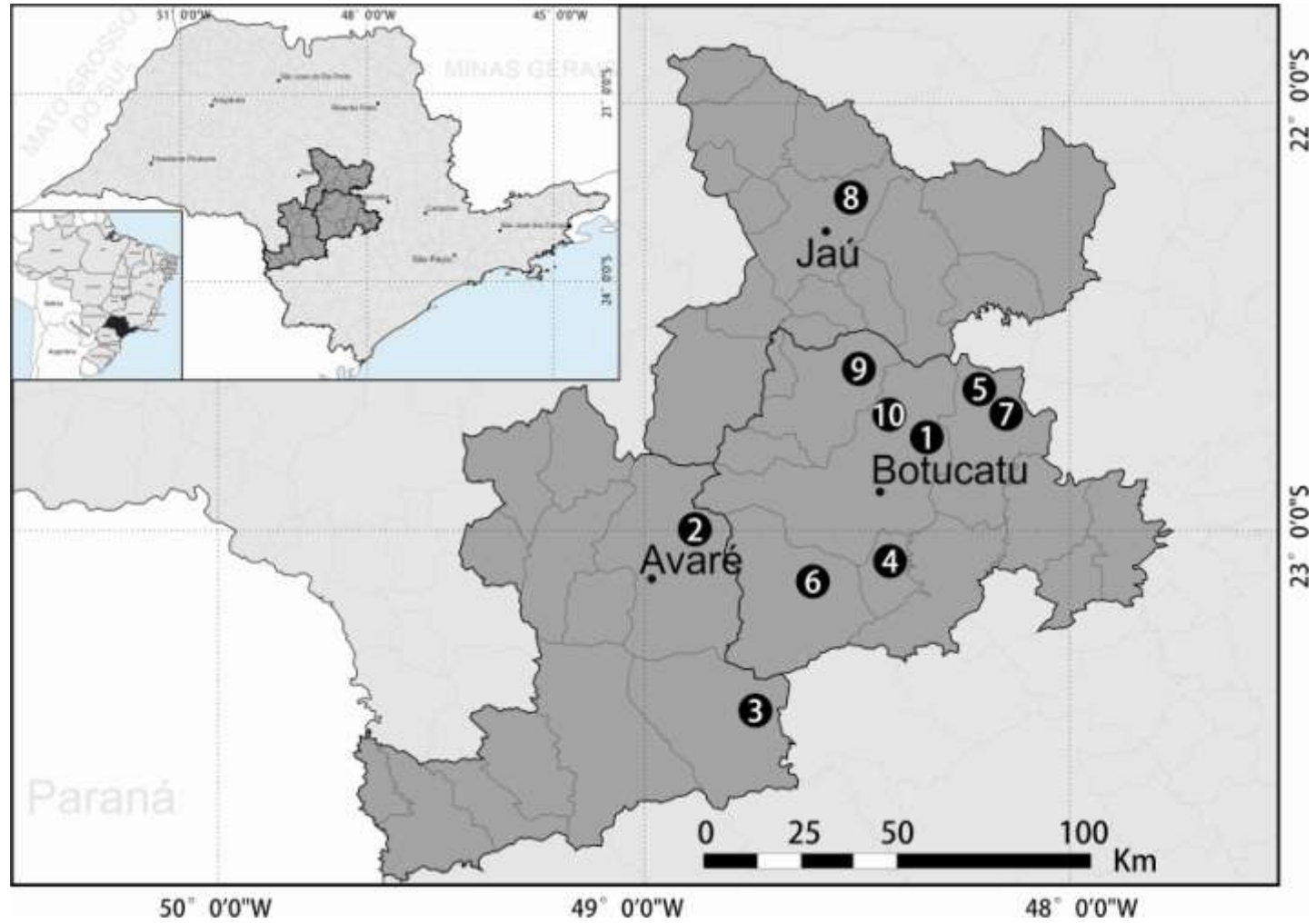
- 862 Bentounsi, B., Khaznadar, A., Cabaret, J., 2012. Resistance of *Trichostrongylus* spp.
863 (Nematoda) to benzimidazole in Algerian cattle herds grazed with sheep. *Parasitol.*
864 *Res.* 110, 1021–1023.
- 865 Borges, F.A., Almeida, G.D., Heckler, R.P., Lemes, R.T., Onizuka, M.K. V, Borges,
866 D.G.L., 2013. Anthelmintic resistance impact on tropical beef cattle productivity:
867 effect on weight gain of weaned calves. *Trop. Anim. Health Prod.* 45, 723–7.
- 868 Borges, F.A., Silva, H.C., Buzzulini, C., Soares, V.E., Santos, E., Oliveira, G.P., Costa,
869 A.J., 2008. Endectocide activity of a new long-action formulation containing
870 2.25% ivermectin+1.25% abamectin in cattle. *Vet. Parasitol.* 155, 299–307.
- 871 Cabaret, J., Berrag, B., 2004. Faecal egg count reduction test for assessing anthelmintic
872 efficacy: average versus individually based estimations. *Vet. Parasitol.* 121, 105–
873 113.
- 874 Calvete, C., Uriarte, J., 2013. Improving the detection of anthelmintic resistance:
875 evaluation of faecal egg count reduction test procedures suitable for farm routines.
876 *Vet. Parasitol.* 196, 438–452.
- 877 Cezar, A.S., Vogel, F.S.F., Sangioni, L.A., Antonello, A.M., Camillo, G., Toscan, G.,
878 Araujo, L.O., 2010. Ação anti-helmíntica de diferentes formulações de lactonas
879 macrocíclicas em cepas resistentes de nematódeos de bovinos. *Pesqui. Veterinária*
880 *Bras.* 30, 523–528.
- 881 Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M. a, Waller,
882 P.J., 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology
883 (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of
884 veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44, 35–44.
- 885 Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna,
886 G., Silvestre, a, Taylor, M. a, Vercruyse, J., 2006. The detection of anthelmintic
887 resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 136, 167–85.
- 888 Condi, G.K., Soutello, R.V.G., Amarante, A.F.T., 2009. Moxidectin-resistant
889 nematodes in cattle in Brazil. *Vet. Parasitol.* 161, 213–217.
- 890 Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Utzinger, J., 2010. FLOTAC: new multivalent
891 techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites
892 in animals and humans. *Nat. Protoc.* 5, 503–515.
- 893 Delgado, F.E.F., Lima, W.D.S., Cunha, A.P., Bello, A.C.P.P., Domingues, L.N.,
894 Wanderley, R.P.B., Leite, P.V.B., Leite, R.C., 2009. Verminoses dos Bovinos:
895 Percepção de Pecuaristas em Minas Gerais, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol.*
896 *Veterinária* 18, 29–33.
- 897 Dobson, R.J., Hosking, B.C., Jacobson, C.L., Cotter, J.L., Besier, R.B., Stein, P.A.,
898 Reid, S.A., 2012. Preserving new anthelmintics: a simple method for estimating
899 faecal egg count reduction test (FECRT) confidence limits when efficacy and/or
900 nematode aggregation is high. *Vet. Parasitol.* 186, 79–92.

- 901 Fazio, L.E., Yacachury, N., Galvan, W.R., Peruzzo, E., Sánchez, R.O., Gimeno, E.J.,
902 2012. Impact of ivermectin-resistant gastrointestinal nematodes in feedlot cattle in
903 Argentina. *Pesqui. Veterinária Bras.* 32, 419–423.
- 904 George, N., Persad, K., Sagam, R., Offiah, V.N., Adesiyun, A.A., Harewood, W.,
905 Lambie, N., Basu, A.K., 2011. Efficacy of commonly used anthelmintics: first
906 report of multiple drug resistance in gastrointestinal nematodes of sheep in
907 Trinidad. *Vet. Parasitol.* 183, 194–197.
- 908 Graef, J., Claerebout, E., Geldhof, P., 2013. Anthelmintic resistance of gastrointestinal
909 cattle nematodes. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* 82, 113–123.
- 910 Leathwick, D.M., Miller, C.M., 2013. Efficacy of oral, injectable and pour-on
911 formulations of moxidectin against gastrointestinal nematodes in cattle in New
912 Zealand. *Vet. Parasitol.* 191, 293–300.
- 913 Levecke, B., Rinaldi, L., Charlier, J., Maurelli, M.P., Bosco, A., Vercruysse, J.,
914 Cringoli, G., 2012. The bias, accuracy and precision of faecal egg count reduction
915 test results in cattle using McMaster, Cornell-Wisconsin and FLOTAC egg
916 counting methods. *Vet. Parasitol.* 188, 194–199.
- 917 Lopes, W.D.Z., dos Santos, T.R., Borges, F.A., Sakamoto, C. a M., Soares, V.E., Costa,
918 G.H.N., Camargo, G., Pulga, M.E., Bhushan, C., Costa, A.J., 2009. Anthelmintic
919 efficacy of oral trichlorfon solution against ivermectin resistant nematode strains in
920 cattle. *Vet. Parasitol.* 166, 98–102.
- 921 Prichard, R., Ménez, C., Lespine, A., 2012. Moxidectin and the avermectins:
922 Consanguinity but not identity. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 2, 134–153.
- 923 Rangel, V.B., Leite, R.C., Oliveira, P.R., Santos Jr, E.J., 2005. Resistência de *Cooperia*
924 *spp.* e *Haemonchus spp.* às avermectinas em bovinos de corte. *Arq. Bras. Med.*
925 *Veterinária e Zootec.* 57, 186–190.
- 926 Soutello, R.V.G., Seno, M.C.Z., Amarante, A.F.T., 2007. Anthelmintic resistance in
927 cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 148, 360–
928 364.
- 929 Souza, A.P., Ramos, C.I., Bellato, V., Sartor, A.A., Schelbauer, C.A., 2008. Resistência
930 de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto
931 Catarinense. *Ciência Rural* 38, 1363–1367.
- 932 Ueno, H., Gonçalves, P.C., 1998. Manual para Diagnóstico das Helminthoses de
933 Ruminantes, 4th ed. 1998.
- 934 Wood, I.B., Amaral, N.K., Bairden, K., Duncan, J.L., Kassai, T., Malone Jr, J.B.,
935 Pankavich, J.A., Reinecke, R.K., Slocombe, O., Taylor, S.M., Vercruysse, J., 1995.
936 World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.)
937 Second Edition of Guidelines for Evaluating the Efficacy of Anthelmintics in
938 Ruminants (Bovine, Ovine, Caprine)'. *Vet. Parasitol.* 58, 181–213.

- 939 Wyk, J. Van, Mayhew, E., 2013. Morphological identification of parasitic nematode
940 infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. Onderstepoort
941 J. Vet. Res. 80, 1–14.
- 942 Yazwinski, T.A., Tucker, C.A., Wray, E., Jones, L., Reynolds, J., Hornsby, P., Powell,
943 J., 2013. Control trial and fecal egg count reduction test determinations of
944 nematocidal efficacies of moxidectin and generic ivermectin in recently weaned,
945 naturally infected calves. *Vet. Parasitol.* 195, 95–101.
- 946

947

Figure 1 – Geographical coordinates of 10 herds cattle the state of São Paulo, Brazil.



948

949

950 Table 1 Characteristics of 10 farms, number of bovines per group (n), total number in farm, breed, sex, age (\pm standard deviation), other animals in farm, most used
951 anthelmintics, and anthelmintics treatments per year.

Farm	n	Number of Cattle	Breed	Sex	Age (months)	Other Livestock	Most used anthelmintics	Anthelmintic treatments
1	10	210	Nelore x Angus	M/F	3.74 \pm 1.04	7 Horses	iver/dor	3x/year
2	10	300	Simental	M/F	13.43 \pm 4.82	6 Horses	iver/dor/lev	6x/year
3	10	260	Nelore	M/F	10.82 \pm 1.52	8 Horses and 58 sheep	iver/aba	2x/year
4	8	283	Holstein	F	12.05 \pm 3.92	None	iver/aba/dor	6x/year
5	9	590	Nelore x Angus	M/F	2.51 \pm 0.95	10 Horses and 60 Buffalo	iver/dor/lev	2x/year
6	11	400	Gir x Holstein	F	9.40 \pm 2.69	3 Horses	iver/dor/lev	6x/year
7	10	800	Nelore	M	8.26 \pm 0.66	15 Horses and 65 sheep	iver/mox/lev/alb	3x/year
8	11	334	Nelore x Angus our Simbrasil	M/F	3.86 \pm 0.47	7 Horses	iver/mox	6x/year
9	10	260	Nelore	M/F	2.79 \pm 0.48	6 Horses	iver/dor	3x/year
10	10	480	Simbrasil x Guzerá	M	11.24 \pm 2.21	4 Horses	iver/aba/mox/lev	12x/year

952 Iver (Ivermectin), Aba (Abamectin), Dor (Doramectin), Mox (Moxidectin), Lev (Levamisole), Alb (Albendazole).

953 Table 2 - Fecal egg count reduction (FECR) and percentage of infective larvae (L3) of
 954 *Haemonchus* spp. (H), *Trichostrongylus* spp. (T), *Cooperia* spp. (C), and
 955 *Oesophagostomum* spp. (O) in fecal cultures 10 and 28 days after treatment of cattle
 956 with phosphate levamisole.

Farm	Days after treatment	% FECR1		% FECR2		L3 (%)			
		Flotac	McMaster	Flotac	McMaster	H	C	T	O
1	10	96.9 (99; 92)	96.7 (99; 85)	95.0 (96; 93)	93.4 (97; 84)	0	100	0	0
	28	54.4 (81; -12)	50.0 (78; -12)	-22.7	-52.5	2	98	0	0
2	10	99.7 (100; 99)	100 (100)	99.7 (100; 99)	100 (100; 99)	7	88	5	0
	28	91.1 (98; 66)	89.7 (97; 69)	88.2 (89; 87)	88.8 (92; 85)	8	88	0	4
3	10	98.1 (99; 96)	98.4 (100; 94)	98.1 (99; 98)	92.0 (95; 87)	0	18	82	0
	28	93.5 (97; 86)	91.7 (96; 81)	91.0 (92; 90)	88.7 (93; 83)	0	83	17	0
4	10	98.0 (100; 90)	97.2 (100; 79)	98.0 (99; 97)	96.8 (99; 91)	0	100	0	0
	28	97.4 (100; 80)	98.7 (100; 89)	97.0 (98; 96)	97.9 (99; 93)	0	100	0	0
5	10	99.3 (100; 98)	96.4 (99; 89)	99.1 (100; 99)	95.7 (98; 88)	0	100	0	0
	28	76.6 (90; 43)	60.2 (81; 17)	73.9 (76; 71)	50.0 (61; 39)	7	93	0	0
6	10	89.4 (97; 64)	93.5 (99; 67)	80.2 (83; 77)	81.8 (93; 61)	0	100	0	0
	28	86.5 (95; 63)	89.6 (97; 63)	46.0 (50; 42)	45.4 (66; 27)	3	96	0	1
7	10	98.3 (100; 90)	97.6 (100; 79)	97.5 (98; 96)	95.2 (99; 84)	0	67	33	0
	28	91.3 (97; 77)	91.6 (98; 71)	80.8 (83; 78)	78.6 (88; 64)	3	95	1	1
8	10	98.8 (99; 98)	98.0 (100; 90)	99.3 (100; 99)	98.4 (100; 95)	0	100	0	0
	28	41.9 (66; 1)	23.5 (65; -66)	57.4 (59; 55)	51.6 (60; 43)	0	100	0	0
9	10	99.3 (100; 98)	100 (100)	99.7 (100; 99)	100 (100; 95)	0	100	0	0
	28	93.0 (98; 78)	88.5 (97; 58)	98.6 (99; 98)	95.4 (98; 88)	13	87	0	0
10	10	98.3 (100; 91)	77.8 (97; 84)	97.3 (99; 93)	81.8 (95; 52)	0	100	0	0
	28	82.4 (95; 40)	53.8 (92; -153)	56.3 (64; 48)	45.4 (72; 21)	2	96	0	2

957 FECR1 (%) = 100 x (1- treated group mean FEC/control group mean FEC), according
 958 to Coles et al. (1992).

959 FECR2 (%) = 100 x (1- post-treatment FEC/ pre-treatment FEC), according to Dobson
 960 et al. (2012).

961 Upper and lower confidence interval limits (95%) are in parentheses.

962 Table 3. Mean of nematode faecal egg counts (FEC) and percentage of infective larvae
 963 (L3) of *Haemonchus* spp. (H), *Trichostrongylus* spp. (T), *Cooperia* spp. (C), and
 964 *Oesophagostomum* spp. (O) in fecal cultures of control groups. Faecal samples taken
 965 two days before and 10 and 28 after anthelmintic treatment, of the experimental cattle.

Farm	Days	Mean EPG		L3 (%)			
		Flotac	McMaster	H	C	T	O
1	-2	184 (6 - 530)	370 (0 - 1050)	8.4	0.2	87.4	4.0
	10	302 (13 - 1152)	605 (0 - 2200)	16.0	74.0	0.0	10.0
	28	502 (28 - 1526)	930 (50 - 2800)	9.0	89.0	0.0	2.0
2	-2	937 (112 - 3768)	1755 (200 - 6350)	85.8	0.2	11.0	3.0
	10	1159 (78 - 2894)	1735 (200 - 5000)	84.0	13.0	2.0	1.0
	28	1222 (154 - 3078)	1550 (50 - 3600)	88.0	9.0	0.0	3.0
3	-2	607 (60 - 2282)	495 (50 - 1200)	47.2	13.6	18.8	20.4
	10	627 (48 - 1488)	930 (50 - 3950)	42.0	9.0	23.0	26.0
	28	861 (96 - 2194)	1025 (0 - 3050)	54.0	19.0	14.0	13.0
4	-2	768 (32 - 3486)	1069 (0 - 5650)	73.6	0.0	26.4	0.0
	10	491 (2 - 1994)	669 (0 - 3800)	46.0	52.0	0.0	2.0
	28	593 (0 - 3664)	950 (0 - 6200)	89.0	10.0	0.0	1.0
5	-2	273 (106 - 554)	422 (100 - 850)	11.8	0.0	88.2	0.0
	10	352 (56 - 878)	467 (150 - 1000)	16.0	82.0	0.0	2.0
	28	329 (64 - 870)	489 (50 - 1400)	15.0	85.0	0.0	0.0
6	-2	142 (20 - 748)	132 (0 - 600)	1.6	0.0	98.4	0.0
	10	248 (0 - 1012)	282 (0 - 1300)	49.0	50.0	0.0	1.0
	28	530 (26 - 2394)	523 (0 - 3050)	63.0	36.0	0.0	1.0
7	-2	236 (20 - 1050)	315 (0 - 750)	50.0	3.0	37.2	9.8
	10	278 (12 - 772)	410 (0 - 1200)	33.0	58.0	1.0	8.0
	28	412 (94 - 1168)	535 (0 - 1650)	80.0	13.0	1.0	6.0
8	-2	387 (20 - 922)	391 (0 - 1500)	1.4	0.0	98.0	0.6
	10	271 (2 - 760)	445 (0 - 2150)	3.0	96.0	0.0	1.0
	28	329 (26 - 676)	368 (50 - 1100)	10.0	89.0	0.0	1.0
9	-2	417 (96 - 1044)	360 (0 - 1100)	0.4	0.0	99.6	0.0
	10	212 (34 - 500)	285 (0 - 850)	4.0	96.0	0.0	0.0
	28	83 (8 - 208)	130 (0 - 500)	34.0	65.0	0.0	1.0
10	-2	59 (2 - 422)	125 (0 - 1000)	9.0	0.0	65.4	25.6
	10	47 (0 - 124)	45 (0 - 100)	58.0	12.0	0.0	30.0
	28	75 (0 - 172)	65 (0 - 400)	26.0	14.0	0.0	60.0

966 Table 4 - Fecal egg count reduction (FECR) and percentage of infective larvae (L3) of
 967 *Haemonchus* spp. (H), *Trichostrongylus* spp. (T), *Cooperia* spp. (C), and
 968 *Oesophagostomum* spp. (O) in fecal cultures 10 and 28 days after treatment of cattle
 969 with albendazole sulphoxide.

Farm	Days after treatment	% FECR1		% FECR2		L3 (%)		
		Flotac	McMaster	Flotac	McMaster	H	C	T O
1	10	95.6 (99; 72)	92.6 (99; 36)	93.8 (95; 92)	91.4 (95; 84)	0	100	0 0
	28	60.0 (83; 6)	60.2 (82; 14)	8.0 (10; 7)	29.5 (39; 22)	0	100	0 0
2	10	100 (100)	100 (100)	99.9 (100; 100)	100 (100; 99)	*	*	* *
	28	84.3 (96; 44)	83.2 (96; 23)	76.2 (77; 75)	78.8 (83; 73)	0	100	0 0
3	10	100 (100)	100 (100)	100 (100; 100)	100 (100; 98)	*	*	* *
	28	82.1 (93; 53)	72.2 (91; 11)	78.6 (80; 77)	62.2 (70; 54)	0	100	0 0
4	10	99.4 (100; 95)	100 (100)	99.5 (100; 99)	100 (100; 95)	1	99	0 0
	28	96.7 (100; 67)	98.0 (100; 83)	96.2 (97; 95)	96.1 (99; 89)	0	100	0 0
5	10	97.1 (99; 91)	96.4 (99; 89)	95.3 (96; 94)	94.5 (98; 85)	0	100	0 0
	28	54.9 (80; 0)	40.9 (73; -29)	32.3 (35; 29)	5.4 (15; 2)	0	100	0 0
6	10	99.8 (100; 99)	100 (100)	99.7 (100; 99)	100 (100; 91)	*	*	* *
	28	89.0 (97; 60)	89.6 (98; 43)	58.1 (62; 55)	66.7 (80; 50)	0	97	0 3
7	10	99.7 (100; 98)	97.6 (99; 89)	99.4 (100; 99)	96.1 (99; 87)	*	*	* *
	28	80.1 (92; 51)	84.1 (95; 53)	67.9 (70; 65)	66.7 (78; 53)	0	100	0 0
8	10	99.3 (100; 97)	98.0 (100; 90)	99.5 (100; 99)	97.9 (99; 83)	0	100	0 0
	28	65.2 (85; 21)	37.0 (75; -59)	71.9 (74; 70)	45.7 (56; 36)	0	100	0 0
9	10	100 (100)	100 (100)	100 (100; 100)	100 (100; 95)	*	*	* *
	28	98.5 (99; 97)	100 (100)	99.7 (100; 99)	100.0 (100; 95)	0	100	0 0
10	10	98.7 (100; 94)	88.9 (99; 8)	97.9 (99; 94)	88.9 (97; 55)	0	100	0 0
	28	35.6 (77; -80)	-30.8 (76; -625)	-70.42	-88.89	0	100	0 0

970 FECR1 (%) = 100 x (1 - treated group mean FEC/control group mean FEC), according
 971 to Coles et al. (1992).

972 FECR2 (%) = 100 x (1 - post-treatment FEC/ pre-treatment FEC), according to Dobson
 973 et al. (2012).

974 Upper and lower confidence interval limits (95%) are in parentheses.

975 * Coproculture with ≤ 20 infective larvae.

976 Table 5 - Fecal egg count reduction (FECR) and percentage of infective larvae (L3) of
 977 *Haemonchus* spp. (H), *Trichostrongylus* spp. (T), *Cooperia* spp. (C), and
 978 *Oesophagostomum* spp. (O) in fecal cultures 10 and 28 days after treatment of cattle
 979 with ivermectin.

Farm	Days after treatment	% FECR1		% FECR2		L3 %			
		Flotac	McMaster	Flotac	McMaster	H	T	C	O
1	10	-46.2 (40; -254)	-75.2 (25; -307)	-101.92	-140.9	0	0	100	0
	28	15.2 (67; -121)	12.4 (67; -132)	-94.34	-85.2	3	0	97	0
2	10	-3.1 (55; -137)	5.8 (63; -140)	-44.75	-44.7	70	0	22	8
	28	0.2 (48; -92)	9.0 (52; -72)	-47.83	-24.8	85	0	9	6
3	10	-12.4 (70; -316)	-31.2 (70; -472)	25.8 (27; 25)	-63.8	81	6	9	4
	28	20.6 (71; -120)	31.7 (76; -93)	28.1 (29; 27)	6.0 (11; 3)	65	20	13	2
4	10	-15.3 (63; -263)	-10.3 (74; -376)	17.5 (19; 16)	7.8 (14; 4)	30	0	68	2
	28	-8.0 (80; -488)	19.1 (87; -399)	6.8 (8; 6)	3.9 (9; 2)	23	0	73	4
5	10	16.3 (54; -52)	32.1 (62; -22)	-0.1	-18.8	5	0	95	0
	28	30.4 (62; -28)	4.6 (50; -83)	22.3 (25; 20)	-75.0	11	0	88	1
6	10	0.9 (70; -225)	-33.9 (65; -412)	-240.0	-137.1	28	0	71	1
	28	7.7 (71; -191)	-13.9 (74; -392)	-575.9	-274.3	91	0	4	5
7	10	12.4 (62; -102)	41.5 (81; -80)	-40.1	2.0 (11; 0)	18	0	81	1
	28	32.3 (69; -50)	55.1 (81; -7)	-60.6	2.0 (11; 0)	84	2	12	2
8	10	-39.9 (33; -194)	-19.4 (54; -210)	13.2 (15; 12)	10.0 (16; 6)	11	0	83	3
	28	-19.3 (41; -140)	-44.4 (32; -207)	10.3 (12; 9)	10.0(16; 6)	12	0	87	1
9	10	-47.5 (60; -447)	-49.1 (53; -374)	43.2(45; 41)	7.6 (15; 4)	2	0	98	0
	28	-164.5 (-5; -565)	-165.4 (2; -617)	60.2 (62; 58)	25.0 (35; 17)	10	0	90	0
10	10	-156.2 (32; -858)	-244.4 (24; -1451)	-87.5	-82.4	8	0	83	9
	28	4.5 (68; -189)	-15.4 (80; -554)	-11.8	11.8 (35; 4)	42	0	25	33

980 FECR1 (%) = $100 \times (1 - \text{treated group mean FEC} / \text{control group mean FEC})$, according
 981 to Coles et al. (1992).

982 FECR2 (%) = $100 \times (1 - \text{post-treatment FEC} / \text{pre-treatment FEC})$, according to Dobson
 983 et al. (2012).

984 Upper and lower confidence interval limits (95%) are in parentheses.

985 Table 6 - Fecal egg count reduction (FECR) and percentage of infective larvae (L3) of
 986 *Haemonchus* spp. (H), *Trichostrongylus* spp. (T), *Cooperia* spp. (C), and
 987 *Oesophagostomum* spp. (O) in fecal cultures 10 and 28 days after treatment of cattle
 988 with moxidectin.

Farm	Days after treatment	% FECR1		% FECR2		L3 (%)			
		Flotac	McMaster	Flotac	McMaster	H	C	T	O
1	10	97.5 (100; 86)	98.3 (100; 92)	95.7 (97; 94)	96.7 (99; 89)	4	96	0	0
	28	84.3 (94; 58)	89.2 (96; 71)	55.0 (58; 52)	67.2 (78; 55)	2	98	0	0
2	10	94.5 (98; 84)	91.3 (97; 71)	92.0 (93; 91)	83.2 (88; 77)	86	3	0	11
	28	91.5 (96; 80)	90.0 (96; 73)	87.0 (88; 86)	82.7 (88; 76)	58	39	0	3
3	10	88.2 (94; 77)	91.4 (97; 78)	89.5 (90; 88)	87.6 (92; 81)	6	0	82	12
	28	92.9 (96; 86)	90.7 (96; 80)	91.2 (92; 90)	85.3 (90; 78)	1	12	72	15
4	10	93.7 (99; 66)	93.5 (99; 63)	95.3 (96; 94)	95.6 (98; 91)	3	95	0	2
	28	67.0 (95; -132)	59.2 (96; -280)	70.5 (72; 69)	61.5 (69; 54)	3	95	0	2
5	10	90.1 (98; 59)	95.2 (98; 88)	88.6 (90; 87)	96.1 (98; 90)	63	25	1	11
	28	83.5 (94; 56)	82.9 (93; 57)	82.3 (84; 80)	85.4 (91; 77)	50	49	0	1
6	10	82.6 (97; 13)	91.9 (99; 48)	71.6 (75; 68)	85.7 (94; 71)	81	3	0	16
	28	75.9 (92; 28)	76.5 (93; 22)	16.1 (19; 14)	22.9 (39; 12)	71	27	0	2
7	10	75.1 (94; -4)	69.5 (93; -37)	72.3 (75; 70)	67.9 (77; 57)	0	20	2	78
	28	57.0 (88; -53)	66.4 (90; -12)	29.1 (32; 37)	53.8 (64; 43)	*	*	*	*
8	10	18.5 (65; -89)	33.7 (78; -98)	48.8 (51; 47)	42.5 (52; 34)	13	86	0	1
	28	12.2 (50; -55)	-25.9 (46; -196)	33.0 (35; 41)	9.7 (17; 6)	7	93	0	0
9	10	97.5 (99; 89)	96.5 (99; 84)	98.8 (99; 98)	98.0 (99; 93)	7	93	0	0
	28	75.6 (91; 36)	57.7 (85; -20)	95.4 (96; 94)	88.9 (94; 81)	14	86	0	0
10	10	49.3 (84; -65)	33.3 (77; -91)	28.1 (36; 22)	-50.0	7	77	0	16
	28	-22.3 (46; -179)	15.4 (80; -263)	-177.1	-175.0	1	64	0	35

989 FECR1 (%) = $100 \times (1 - \text{treated group mean FEC} / \text{control group mean FEC})$, according
 990 to Coles et al. (1992).

991 FECR2 (%) = $100 \times (1 - \text{post-treatment FEC} / \text{pre-treatment FEC})$, according to Dobson
 992 et al. (2012).

993 Upper and lower confidence interval limits (95%) are in parentheses.

994 * Coproculture with ≤ 20 infective larvae.

Table 7. Mean of nematode faecal egg counts (FEC) and percentage of infective larvae (L3) of *Haemonchus* spp. (H), *Trichostrongylus* spp. (T), *Cooperia* spp. (C), and *Oesophagostomum* spp. (O) in fecal cultures. Faecal samples taken two days before the anthelmintic treatment of the experimental cattle.

Farm	n	Flotac	McMaster	L3 (%)			
				H	T	C	O
1	50	192 (4 - 994)	332 (0 - 1650)	8.4	0.2	87.4	4.0
2	50	857 (74 - 3768)	1288 (50 - 6350)	85.8	0.2	11.0	3.0
3	50	720 (22 - 5450)	678 (0 - 3800)	47.2	0.0	18.8	0.0
4	40	627 (26 - 3486)	790 (0 - 5650)	73.6	0.0	26.4	0.0
5	45	277 (42 - 780)	391 (0 - 1350)	11.8	0.0	88.2	0.0
6	55	127 (20 - 748)	143 (0 - 900)	1.6	3.0	98.4	0.0
7	50	220 (20 - 258)	283 (0 - 2000)	50.0	3.0	37.2	9.8
8	55	423 (20 - 1644)	501 (0 - 2250)	1.4	0.0	98.0	0.6
9	50	448 (20 - 2364)	460 (0 - 3400)	0.4	0.0	99.6	0.0
10	50	43 (2 - 462)	66 (0 - 1000)	9.0	0.0	65.4	25.6

n = total number of animals used in each farm.

Minimum and maximum values of FEC are in parenthesis.

3 BIBLIOGRAFIA

ADRIEN, M.L., SCHILD, A.L., MARCOLONGO-PEREIRA, C., FISS, L., RUAS, J.L., GRECCO, F.B., RAFFI, M.B. Acute fasciolosis in cattle in southern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* v. 33, p. 705–709, 2013.

ALMEIDA, F.A., GARCIA, K.C.O.D., TORGERSON, P.R., AMARANTE, A.F.T. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. *Paras. Int.* v. 59, p. 622–625, 2010.

ALVINERIE, M., SUTRA, J.F., GALTIER, P., LIFSCHITZ, A., VIRKEL, G., SALLOVITZ, J., LANUSSE, C. Persistence of ivermectin in plasma and faeces following administration of a sustained-release bolus to cattle. *Res. Vet. Sci.* v. 66, p. 57–61, 1998.

AMARANTE, A.F.T. Why is it important to correctly identify *Haemonchus* species? *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* v. 20, p. 263–268, 2011.

AMARANTE, A.F.T., BAGNOLA JÚNIOR, J., AMARANTE, M.R.V., BARBOSA, M. A. Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil. *Vet. Parasitol.* v. 73, p. 89–104, 1997.

ANUALPEC. *Anuário da Pecuária Brasileira*, São Paulo: FNP. São Paulo, 2012. 378p.

ANUALPEC. *Anuário da Pecuária Brasileira*, São Paulo: FNP. São Paulo, 2013. 357p.

ARAÚJO, J.L.B., LINHARES, G.F.C., OLIVEIRA, A.P.M., AMORIL, J.G., FREITAS, M.R., COSTA, I.C., PINHEIRO, V.J.L., ESSELIN, I.R.R., REIS, S.A. Infecções Autócnes de Bovinos por *Fasciola hepatica* LINNAEUS , 1758 (TREMATODA, FASCIOLIDAE) no Estado de Goiás, Brasil. *Rev. Patol. Trop.* v. 36, p. 96–100, 2007.

BARTLEY, D.J., MCARTHUR, C.L., DEVIN, L.M., SUTRA, J.F., MORRISON, A.A., LESPINE, A., MATTHEWS, J.B. Characterisation of macrocyclic lactone resistance in two field-derived isolates of *Cooperia oncophora*. *Vet. Parasitol.* v. 190, p. 454–460, 2012.

BASSETTO, C.C., SILVA, B.F., NEWLANDS, G.F.J., SMITH, W.D., AMARANTE, A.F.T. Protection of calves against *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* after immunization with gut membrane proteins from *H. contortus*. *Parasite Immunol.* v. 33, p. 377–381, 2011.

BENTOUNSI, B., KHAZNADAR, A., CABARET, J. Resistance of *Trichostrongylus* spp. (Nematoda) to benzimidazole in Algerian cattle herds grazed with sheep. *Parasitol. Res.* v. 110, p. 1021–1023, 2012.

BIANCHIN, I., HONER, M.R., NUNES, S.G., NASCIMENTO, Y.A. Effect of stocking rates and anthelmintic treatments on weight gains in weaned Nelore cattle on improved pasture in the Brazilian Cerrado. *Trop. Anim. Health Prod.* v. 27, p. 1–8, 1995.

BORGES, F.A., ALMEIDA, G.D., HECKLER, R.P., LEMES, R.T., ONIZUKA, M.K. V, BORGES, D.G.L. Anthelmintic resistance impact on tropical beef cattle productivity: effect on weight gain of weaned calves. *Trop. Anim. Health Prod.* v. 45, p. 723–727, 2013.

BORGES, F.A., SILVEIRA, D.M., GRAMINHA, E.B.N., CASTAGNOLLI, K.C., SOARES, V.E., NASCIMENTO, A.A., COSTA, A.J. Fauna helmintológica de bovinos da região de Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil. *Semin. Ciências Agrárias.* v. 22, p. 49–53, 2001.

BRASIL. Instrução Normativa n. 26, de 9 de julho de 2009. Regulamento Técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, jul. 2009.

BRESCIANI, K.D.S., NASCIMENTO, A.A., COSTA, A.J., AMARANTE, A.F.T., PERRI, S.H.V., LIMA, L.G.F. Freqüência e intensidade parasitária de helmintos gastrintestinais em bovinos abatidos em frigorífico da região noroeste do Estado de São Paulo, SP, Brasil. *Semin. Ciências Agrárias.* v. 22, p. 93–98, 2001.

BRICARELLO, P.A., ZAROS, L.G., COUTINHO, L.L., ROCHA, R.A., KOOYMAN, F.N.J., DE VRIES, E., GONÇALVES, J.R.S., LIMA, L.G., PIRES, A V, AMARANTE, A.F.T. Field study on nematode resistance in Nelore-breed cattle. *Vet. Parasitol.* v. 148, p. 272–278, 2007.

BRITO, D.L., DALLAGO, B.S.L., LOUVANDINI, H., SANTOS, V.R.V., TORRES, S.E.F.A., GOMES, E.F., AMARANTE, A.F.T. DO, MELO, C.B., MCMANUS,

C.M. Effect of alternate and simultaneous grazing on endoparasite infection in sheep and cattle. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* v. 22, p. 485–494, 2013.

BRITO, M.A.V.P., LANGE, C.C. Resíduos de antibióticos no leite. 2008. Disponível em: <www.cileite.com.br/panorama/qualidade19.html>. Acesso em: 24 fev. 2014.

CALVETE, C., URIARTE, J. Improving the detection of anthelmintic resistance: evaluation of faecal egg count reduction test procedures suitable for farm routines. *Vet. Parasitol.* v. 196, p. 438–452, 2013.

CARDOSO, J.M.S., MARTINS, I.V.F., SANT'ANNA, F.B., TANCREDI, I.P., COUMENDOUROS, K., TANCREDI, M.G.F., SCOTT, F.B., GRISI, L. Identification of ivermectin and doramectin-resistant *Cooperia punctata* (LINSTOW, 1907) in a dairy herd in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian J. Veterinary Anim. Sci.* v. 45, p. 75–81, 2008.

CATTO, J.B., BIANCHIN, I., FEIJÓ, G.L.D., ARAÚJO, F.R., RAMOS, C.A.N., CASTELÃO, A.B.C. Weight gain and control of endo-and ectoparasites of beef heifers treated with allopathic, herbal and homeopathic drugs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* v. 22, p. 502–510, 2013.

CATTO, J.B., BIANCHIN, I., JUNIOR, R.T. Efeitos da everminação de matrizes e de bezerros lactentes em sistema de produção de bovinos de corte na região de Cerrado. *Pesqui. Veterinária Bras.* v. 25, p. 188–194, 2005.

CEZAR, A.S., VOGEL, F.S.F., SANGIONI, L.A., ANTONELLO, A.M., CAMILLO, G., TOSCAN, G., ARAUJO, L.O. Ação anti-helmíntica de diferentes formulações de lactonas macrocíclicas em cepas resistentes de nematódeos de bovinos. *Pesqui. Veterinária Bras.* v. 30, p. 523–528, 2010.

CHARLES, T.P., FURLONG, J. A survey of dairy cattle worm control practices in southeast Brazil. *Vet. Parasitol.* v. 65, p. 65–73, 1996.

CHIU, S.L., GREEN, M.L., BAYLIS, F.P., ELINE, D., ROSEGAY, A., MERIWETHER, H., JACOB, T.A. Absorption, Tissue Distribution, and Excretion of Tritium-Labeled Ivermectin in Cattle, Sheep, and Rat. *J. Agric. Food Chem.* v. 38, p. 2072–2078, 1990.

COLES, G.C., BAUER, C., BORGSTEEDE, F.H., GEERTS, S., KLEI, T.R., TAYLOR, M. A, WALLER, P.J. World Association for the Advancement of

Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* v. 44, p. 35–44, 1992.

COLES, G.C., JACKSON, F., POMROY, W.E., PRICHARD, R.K., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., SILVESTRE, A, TAYLOR, M. A, VERCRUYSSSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* v. 136, p. 167–85, 2006.

CONDI, G.K., SOUTELLO, R.V.G., AMARANTE, A.F.T. Moxidectin-resistant nematodes in cattle in Brazil. *Vet. Parasitol.* v. 161, p. 213–217, 2009.

CRINGOLI, G., RINALDI, L., MAURELLI, M.P., UTZINGER, J. FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nat. Protoc.* v. 5, p. 503–515, 2010.

CRISTOFOL, C., VIRKEL, G., ALVAREZ, L., SÁNCHEZ, S., ARBOIX, M., LANUSSE, C.E. Albendazole sulphoxide enantiomeric ratios in plasma and target tissues after intravenous administration of ricobendazole to cattle. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* v. 24, p. 117–124, 2001.

DASH, K.M., HALL, E., BARGER, I.A. The role of arithmetic and geometric worm egg counts in faecal egg count reduction test and in monitoring strategic drenching programs in sheep. *Aust. Vet. J.* v. 65, p. 66–68, 1988.

DELATOUR, P., GARNIER, F., BENOIT, E., CAUDE, I. Chiral behaviour of the metabolite albendazole sulphoxide in sheep, goats and cattle. *Res. Vet. Sci.* v. 50, p. 134–138, 1991.

DELGADO, F.E.F., LIMA, W.D.S., CUNHA, A.P., BELLO, A.C.P.P., DOMINGUES, L.N., WANDERLEY, R.P.B., LEITE, P.V.B., LEITE, R.C. Verminoses dos Bovinos: Percepção de Pecuaristas em Minas Gerais, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária.* v. 18, p. 29–33, 2009.

DOBSON, R.J., HOSKING, B.C., JACOBSON, C.L., COTTER, J.L., BESIER, R.B., STEIN, P.A., REID, S.A. Preserving new anthelmintics: a simple method for estimating faecal egg count reduction test (FECRT) confidence limits when efficacy and/or nematode aggregation is high. *Vet. Parasitol.* v. 186, p. 79–92, 2012.

ECHEVARRIA, F., BORBA, M.F.S., PINHEIRO, A.C., WALLER, P.J., HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: Brazil. *Vet. Parasitol.* v. 62, p. 199–206, 1996.

FAZZIO, L.E., YACACHURY, N., GALVAN, W.R., PERUZZO, E., SÁNCHEZ, R.O., GIMENO, E.J. Impact of ivermectin-resistant gastrointestinal nematodes in feedlot cattle in Argentina. *Pesqui. Veterinária Bras.* v. 32, p. 419–423, 2012.

FERNANDES, L.H., SENO, M.C.Z., AMARANTE, A.F.T., SOUZA, H., BELLUZZO, C.E.C. Effect of rotational and alternate grazing with adult cattle on the control of nematode parasites in sheep. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* v. 56, p. 733–740, 2004.

GASBARRE, L.C., LEIGHTON, E. A, SONSTEGARD, T. Role of the bovine immune system and genome in resistance to gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* v. 98, p. 51–64, 2001.

GEORGE, N., PERSAD, K., SAGAM, R., OFFIAH, V.N., ADESIYUN, A.A., HAREWOOD, W., LAMBIE, N., BASU, A.K. Efficacy of commonly used anthelmintics: first report of multiple drug resistance in gastrointestinal nematodes of sheep in Trinidad. *Vet. Parasitol.* v. 183, p. 194–197, 2011.

GIRÃO, E.S., GIRÃO, R.N. MEDEIROS, L.P. Prevalência, Intensidade de Infecção e Variação Estacional de Helminthos em Bovinos no Estado do Piauí. *Pesqui. Agropecu. Bras.* v. 20, p. 889–897, 1985.

GORDON, H.M., WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematodes eggs in sheep faeces. *Organ. J. Counc. Sci. Ind. Res.* v. 12, p. 50–52, 1939.

GRAEF, J., CLAEREBOUT, E., GELDHOF, P. Anthelmintic resistance of gastrointestinal cattle nematodes. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* v. 82, p. 113–123, 2013.

IGLESIAS, L.E., SAUMELL, C. A, FERNÁNDEZ, A S., FUSÉ, L. A, LIFSCHITZ, A L., RODRÍGUEZ, E.M., STEFFAN, P.E., FIEL, C. A. Environmental impact of ivermectin excreted by cattle treated in autumn on dung fauna and degradation of faeces on pasture. *Parasitol. Res.* v. 100, p. 93–102, 2006.

KOCHAPAKDEE, S., PANDEY, V.S., PRALOMKARM, W., CHOLDUMRONGKUL, S., NGAMPONGSAI, W., LAWPETCHARA, A.

Anthelmintic resistance in goats in southern Thailand. *Vet. Rec.* v. 137, p. 124–125, 1995.

LANUSSE, C., LIFSCHITZ, A., VIRKEL, G., ALVAREZ, L., SÁNCHEZ, S., SUTRA, J.F., GALTIER, P., ALVINERIE, M. Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* v. 20, p. 91–9, 1997.

LANUSSE, C.E., ALVAREZ, L.I., LIFSCHITZ, A.L. Princípios farmacológicos da terapia anti-helmíntica. In: CAVALCANTE, A.C.R., VIEIRA, L., CHAGAS, A.C.S., MOLENTO, M.B. *Doenças Parasitárias de Caprinos e Ovinos Epidemiologia e Controle*. Brasília, DF, 2009. cap. 22, p. 547–603.

LEATHWICK, D.M., MILLER, C.M. Efficacy of oral, injectable and pour-on formulations of moxidectin against gastrointestinal nematodes in cattle in New Zealand. *Vet. Parasitol.* v. 191, p. 293–300, 2013.

LEVECKE, B., RINALDI, L., CHARLIER, J., MAURELLI, M.P., BOSCO, A., VERCRUYSSSE, J., CRINGOLI, G. The bias, accuracy and precision of faecal egg count reduction test results in cattle using McMaster, Cornell-Wisconsin and FLOTAC egg counting methods. *Vet. Parasitol.* v. 188, p. 194–199, 2012.

LIFSCHITZ, A., VIRKEL, G., SALLOVITZ, J., SUTRA, J.F., GALTIER, P., ALVINERIE, M., LANUSSE, C. Comparative distribution of ivermectin and doramectin to parasite location tissues in cattle. *Vet. Parasitol.* v. 87, p. 327–338, 2000.

LUMARET, J.P., ERROUISSI, F., FLOATE, K., RÖMBKE, J., WARDHAUGH, K. A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *Curr. Pharm. Biotechnol.* v. 13, p. 1004–1060, 2012.

MAPA. Instrução Normativa n. 42, de 20 de dezembro de 1999. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 20 dez. 1999. Seção 1, p. 213.

MARTIN, R.J., VERMA, S., LEVANDOSKI, M., CLARK, C.L., QIAN, H., STEWART, M., ROBERTSON, A.P. Drug resistance and neurotransmitter receptors of nematodes: recent studies on the mode of action of levamisole. *Parasitology*. v. 131, S71–S84, 2005.

MCKELLAR, Q.A., BENCHAOUI, H. Avermectins and milbemicyns. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* v. 19, p. 331–351, 1996.

MCKENNA, P.B. Further comparison of faecal egg count reduction test procedures: sensitivity and specificity. *N. Z. Vet. J.* v. 54, p. 365–366, 2006.

MIRANDA, C.H.B., SANTOS, J.C., BIANCHIN, I. The role of *Digitonthophagus gazella* in pasteurized cleaning and production as a result of burial of cattle dung. *Pasturas Trop.* v. 22, p. 14–18, 2000.

OLIVEIRA, G.P., MATSUMOTO, T. Prevalência e intensidade de infecção por helmintos em bovinos da bacia leiteira de São Carlos, São Paulo. *Pesqui. Agropecu. Bras.* v. 20, p. 1415–1418, 1985.

PEREIRA, J.R. Práticas de controle e prevalência de helmintos gastrintestinais parasitos de bovinos leiteiros em Pindamonhangaba, São Paulo, Brasil. *Rev. Ciências Agroveterinárias.* v. 10, p. 16–22, 2011.

PIMENTEL NETO, M., FONSECA, A.H. Epidemiologia das helmintoses pulmonares e gastrintestinais de bezerros em região de baixada do Estado do Rio de Janeiro. *Pesqui. Veterinária Bras.* v. 22, p. 148–152, 2002.

PINHEIRO, A.C., ECHEVARRIA, F.A.M. Susceptibilidade de *Haemonchus* spp. em bovinos ao tratamento anti-helmíntico com albendazole e oxendazole. *Pesqui. Veterinária Bras.* v. 10, p. 19–21, 1990.

PRICHARD, R., MÉNEZ, C., LESPINE, A. Moxidectin and the avermectins: consanguinity but not identity. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* v. 2, p. 134–153, 2012.

RAMOS, C.I., BELLATO, V., ÁVILA, V.S., COUTINHO, G.C., SOUZA, A.P. Resistência de parasitos gastrintestinais de ovinos a alguns anti-helmínticos no Estado de Santa Catarina, Brasil. *Ciência Rural.* v. 32, p. 473–477, 2002.

RANGEL, V.B., LEITE, R.C., OLIVEIRA, P.R., SANTOS JR, E.J. Resistência de *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp. às avermectinas em bovinos de corte. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* v. 57, p. 186–190, 2005.

RODRIGUES, J., MACHADO, R.Z., REIS, V.E.A. Frequência e Intensidade Parasitária de Helmintos em Bovinos Abatidos no Matadouro Municipal de

Irapuã, SP, Brasil. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* v. 37, p. 257–263, 1985.

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. VON, BLACKHALL, W.J., MCCARTHY, J.S., SKUCE, P.J. Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes. *Parasitology.* v. 134, p. 1077–1086, 2007.

SANTOS, T.R., LOPES, W.D.Z., BUZZULINI, C., BORGES, F.A., SAKAMOTO, C.A.M., LIMA, R.C.A., OLIVEIRA, G.P., COSTA, A.J. Helminth fauna of bovines from the Central-Western region, Minas Gerais State, Brazil. *Ciência Rural.* v. 40, p. 934–938, 2010.

SANTOS, V.T., GONÇALVES, P.C. Verificação de estirpe de *Haemonchus* resistente ao thiabendazole no Rio Grande do Sul (Brasil). *Rev. da Fac. Agron. e Veterinária.* v. 9, p. 201–209, 1967.

SIDAN, 2013. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. Disponível em: <www.sidan.org.br/sd/base.aspx?controle=8>. Acesso em: 13 jan. 2014.

SIDRA, 2014. Sistema IBGE de Recuperação de Dados. Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=73&z=t&o=24&i=P>. Acesso em: 6 fev. 2014.

SOUTELLO, R.V.G., CONDI, G.K., PAES, F., FONZAR, J.F. Influência do parasitismo e da suplementação protéica no desenvolvimento ponderal de novilhos mestiços Angus-Nelore e da raça Guzerá. *Ciências Agrárias e da Saúde.* v. 2, p. 21–27, 2002.

SOUTELLO, R.V.G., SENO, M.C.Z., AMARANTE, A.F.T. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.* v. 148, p. 360–364, 2007.

SOUZA, A.P., RAMOS, C.I., BELLATO, V., SARTOR, A.A., SCHELBAUER, C.A. Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. *Ciência Rural.* v. 38, p. 1363–1367, 2008.

SPINOSA, H.S., GÓRNIAC, S.L., BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária.* 4 ed. Guanabara: Koogan, Rio de Janeiro, 2006. 897p.

STRONG, L., JAMES, S. Some effects of ivermectin on the yellow dung fly, *Scatophaga stercoraria*. *Vet. Parasitol.* v. 48, p. 181–191, 1993.

SUAREZ, V.H. Helminthic control on grazing ruminants and environmental risks in South America. *Vet. Res.* v. 33, p. 563–573, 2002.

TAYLOR, M.A., HUNT, K.R., GOODYEAR, K.L. Anthelmintic resistance detection methods. *Vet. Parasitol.* v. 103, p. 183–194, 2002.

UENO, H., GONÇALVES, P.C. *Manual para Diagnóstico das Helmintoses de Ruminantes*. 4.ed. Japan Agency International Cooperation. 1998. 143p.

WALL, R., STRONG, L. Environmental consequences of treating cattle with the antiparasitic drug ivermectin. *Nature.* v. 327, p. 418–421, 1987.

YAZWINSKI, T.A., TUCKER, C.A., WRAY, E., JONES, L., REYNOLDS, J., HORNSBY, P., POWELL, J. Control trial and fecal egg count reduction test determinations of nematocidal efficacies of moxidectin and generic ivermectin in recently weaned, naturally infected calves. *Vet. Parasitol.* v. 195, p. 95–101, 2013.

ZOCOLLER, M.C.S., MACHADO, R.Z., HONER, M.R., STARKE, W.A. Infecção Natural por Helmintos Gastrintestinais em Bovinos Durante os Primeiros Dois Anos de Vida, na Região de Ilha Solteira, SP. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* v. 35, p. 823–835, 1983.

Anexo I – Descrição dos fármacos utilizados no experimento.

Classe Farmacológica	Nome Comercial	Produto	Dosagem	Fabricante	Lote/Partida	Data Fabricação
Avermectinas	Ivomec®	Ivermectina	0,2mg/kg/p.v.	Merial	BA211/11	Junho/2011
Milbemicinas	Cydectin®	Moxidectina	0,2mg/kg/p.v.	Fort Dodge	014/11	Julho/2011
Imidazotiazóis	Ripercol®	Fosfato de Levamisol	4,7mg/kg/p.v.	Fort Dodge	023/11	Julho/2011
Benzimidazóis	Albendathor®	Sulfóxido de Albendazol	2,5mg/kg/p.v.	Tortuga	143/11	Julho/2011