

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**APLICAÇÃO DO ENSAIO DE SEQUENCIAMENTO
GENÉTICO "NEMABIOMA" COMO TESTE DE
DIAGNÓSTICO PARA NEMATÓDEOS PARASITOS DE
BOVINOS**

**Murilo Abud Bichuette
Médico Veterinário**

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**APLICAÇÃO DO ENSAIO DE SEQUENCIAMENTO
GENÉTICO "NEMABIOMA" COMO TESTE DE
DIAGNÓSTICO PARA NEMATÓDEOS PARASITOS DE
BOVINOS**

**Murilo Abud Bichuette
Orientador: Prof. Dr. Alvimar José da Costa**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Patologia Animal)

2017

Bichuette, Murilo Abud
B583a Aplicação do ensaio de sequenciamento genético "Nemabioma"
 como teste de diagnóstico para nematódeos parasitos de bovinos /
 Murilo Abud Bichuette. -- Jaboticabal, 2017
 38 p. : il. ; 29 cm

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
 Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
 Orientador: Alvimar José da Costa
 Banca examinadora: Gilson Pereira de Oliveira, Welber Daniel
 Zanetti Lopes, Katia Denise Saraiva Bresciani, Carlos Noriyuki Kaneto
 Bibliografia

 1. Biologia molecular. 2. Nematódeo. 3. Strongylida. I. Título. II.
 Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

 CDU 619:616.993:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

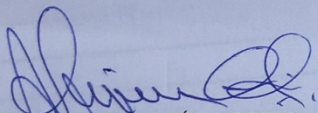
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: APLICAÇÃO DO ENSAIO DE SEQUENCIAMENTO GENÉTICO "NEMABIOMA" PARA RELACIONAR A COMUNIDADE PARASITÁRIA DAS LARVAS EM TERCEIRO ESTÁDIO À COMPOSIÇÃO DO BIOMA DE NEMATÓDEOS ADULTOS PRESENTES NO TRATO GASTROINTESTINAL DE RUMINANTES

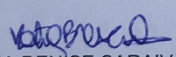
AUTOR: MURILO ABUD BICHUETTE

ORIENTADOR: ALVIMAR JOSÉ DA COSTA

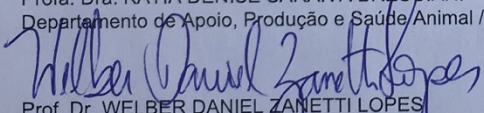
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: PATOLOGIA ANIMAL pela Comissão Examinadora:



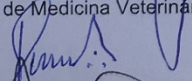
Prof. Dr. ALVIMAR JOSÉ DA COSTA
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



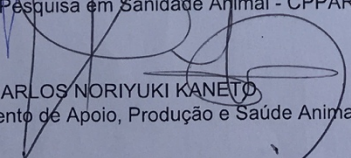
Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMVA / Unesp - Araçatuba, SP



Prof. Dr. WELBER DANIEL ZANETTI LOPES
Faculdade de Medicina Veterinária / Universidade Federal de Goiás - Goiânia, GO



Prof. Dr. GILSON PEREIRA DE OLIVEIRA
Centro de Pesquisa em Sanidade Animal - CPPAR / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. CARLOS NORIYUKI KANETO
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMVA / Unesp - Araçatuba, SP

Jaboticabal, 03 de fevereiro de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MURILO ABUD BICHUETTE - nasceu em Ribeirão Preto, São Paulo, em 12 de agosto de 1986. Em 2004 concluiu o ensino médio no Colégio Einstein em Ribeirão Preto. Em março de 2005 ingressou no Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Em 2006 integrou-se ao Programa de Educação Tutorial - PET e no mesmo ano teve aprovado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP um projeto de pesquisa em Iniciação Científica. De dezembro de 2007 a março de 2008 realizou intercâmbio em Nevada, Estados Unidos. Em 2009 realizou parte do estágio de graduação em Córdoba, Argentina. Em 8 de janeiro de 2010 recebeu o grau de Médico Veterinário. Em 2010 iniciou o Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva, pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sem bolsa. Em 2013 ingressou no Doutorado, pelo programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Animal, pela Faculdade de Ciências e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, usufruindo da bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, por 25 meses. Trabalhou no Departamento de Biológicos da Ourofino Saúde Animal de fevereiro de 2010 a fevereiro de 2012 e no Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da Pfizer/ Zoetis Indústria de Produtos Veterinários de março de 2012 a abril de 2014. Foi pesquisador do Centro de Pesquisas em Sanidade Animal – CPPAR, FCAV, UNESP, de fevereiro a setembro de 2015 e fez Doutorado Sanduíche de outubro de 2015 a setembro de 2016 na Universidade de Calgary, Canadá, pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE, vinculado à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, com bolsa de 12 meses custeada por esta Instituição.

A obrigação de produzir aliena a paixão de criar.

Raoul Vaneigem

Dedico:
à minha mãe Ramiza Abud Bichuette

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Enio Bichuette e Ramiza Abud Bichuette, grandes responsáveis por essa caminhada.

Aos meus irmãos Guilherme Abud Bichuette e Alexandre Abud Bichuette, pela força em todos os momentos.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV/UNESP, Jaboticabal.

Ao Professor Doutor Alvimar José da Costa.

Ao Professor Doutor John Gilleard pela oportunidade e ensinamentos.

A CAPES. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 (**99999.007058/2015-02**). Este processo é referente apenas às despesas com viagens e manutenção do pesquisador no exterior. As despesas relacionadas às coletas no Brasil foram financiadas pelo próprio autor e todas as análises de sequenciamento genético foram custeadas pela universidade canadense. À Professora Doutora Adolorata Aparecida Bianco Carvalho, pela orientação no Mestrado, compreensão e ensinamentos desde meu ingresso no Programa de Educação Tutorial em 2006.

Ao Médico Veterinário Rodrigo Lechugo Valarelli, pela confiança depositada. Sem seu apoio, este trabalho não teria sido iniciado.

Ao Professor Doutor Gilson Pereira de Oliveira.

Ao Professor Doutor Welber Daniel Zanetti Lopes.

Ao Professor Dr. Pedro L. M. Soares, Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos, Valmir Ribeiro “China” e Marilene Costa, do Laboratório de Nematologia/ Agronomia/ FCAV.

Ao Professor Dr. Marcos Rogério André, Professora Dra. Kátia Denise Saraiva Bresciani e Dra. Carolina Buzzulini pelas correções e participação na banca examinadora do Exame Geral de Qualificação.

Aos pesquisadores do Centro de Pesquisas em Sanidade Animal – CPPAR, FCAV, UNESP.

A colega Michelle dos Santos pelo apoio e auxílio na reclassificação morfológica das larvas

Aos colegas Russell Avramenko, Brad Von Paridon, Janneke Wit, Andrew Rezansoff, Elizabeth Redman, James Wasmuth, James Wang, Dave Curran, Nidhi Sharma, Mani Lejune, Kevin Martel, David Esau, Alexander Donath, Jeff Yeung, Calum Hoad e Rogério Soares.

Aos estagiários João Henrique Barbosa Toscano, Bruna Salatta, Aletéia, Alana, Lana, Josi, Ana, Lúcia, Daniela Scarpa e Ana Lúcia Doni.

Ao Aurélio, Dilssélio Paim, Clóvis.

A Célia Thomazelli e Lilian Celiane, pela ajuda sempre que precisei.

A Médica Veterinária Maria do Carmo Cilento, pelo apoio e coleguismo de trabalho.

Aos colaboradores da pós-graduação Maria da Consolata Mulotto Nunes “Nina”, Fernanda Raymundo, Rodrigo Rabelo dos Santos, Diego Henrique Mafra.

Aos amigos e colegas de profissão Carlos Eduardo Aguilar Gamero Aguiar e Matheus Henrique Magalhães da Silva e “Gessé”.

A todos que contribuíram de alguma maneira para a execução deste trabalho

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1. Seleção dos bovinos	8
3.2. Aclimação, pesagem, identificação e alimentação	8
3.3. Contagens de OPG	8
3.4. Coproculturas	9
3.5. Necropsia parasitológica	10
3.6. Classificação morfológica das L3	11
3.7. Extração do DNA genômico	12
3.8. Sequenciamento "deep amplicon" do rDNA ITS-2	12
3.9. Bioinformática e análise estatística	14
4. RESULTADOS	15
4.1. Contagens de OPG	16
4.2. Contagens e classificação morfológica de nematódeos adultos	18
4.3. Classificação morfológica das L3	20
4.4. "Nemabioma" das L3	22
4.5. Classificação morfológica das L3 vs "Nemabioma" das L3	23
4.6. classificação morfológica dos namatódeos adultos vs "Nemabioma" das L3	24
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO	33
7. BIBLIOGRAFIA	34

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Contagens individuais de ovos por grama de fezes (OPG) dos animais A, B, C, D, E, F e G entre os dias 14 e 28.....	16
FIGURA 2. Média aritmética das contagens individuais de ovos por grama de fezes (OPG) dos setes animais entre os dias 14 e 28.....	16
FIGURA 3. Número total estimado de nematódeos adultos recuperados após a necropsia parasitológica no dia 28. (<i>Cooperia punctata</i> , <i>Haemonchus placei</i> , <i>Trichostrongylus axei</i> e <i>Cooperia pectinata</i>).....	17
FIGURA 4. Número total estimado de nematódeos adultos recuperados após a necropsia parasitológica no dia 28. (<i>Oesophagostomum radiatum</i> , <i>Cooperia spatulata</i> , <i>Trichostrongylus colubriformis</i> , <i>Haemonchus similis</i> , <i>Trichuris discolor</i> , formas imaturas L4 e <i>Dictyocaulus viviparus</i>).....	17
FIGURA 5. Classificação morfológica das L3 provenientes dos animais A, B, C, D, E, F, e G, entre os dias 14 e 28 (agrupadas por gêneros).....	18
FIGURA 6. Média aritmética da classificação morfológica das L3 provenientes dos animais A, B, C, D, E, F, e G, entre os dias 14 e 28 (agrupadas por datas e gêneros).....	18
FIGURA 7. “Nemabioma” das L3 provenientes dos animais A, B, C, D, E, F, e G, entre os dias 14 e 28. (agrupadas por espécies).....	19
FIGURA 8. Média aritmética do “Nemabioma” das L3 provenientes dos animais A, B, C, D, E, F, e G, entre os dias 14 e 28 (agrupadas por datas e espécies).....	19
FIGURA 9. Médias aritméticas do “Nemabioma das L3 e médias aritméticas” da classificação morfológica das L3, provenientes dos animais A, B, C, D, E, F, e G, entre os dias 14 e 28 (agrupadas por datas e gêneros).....	20

FIGURA 10. Bioma das L3 reveladas pelo “Nemabioma” e comunidades parasitárias dos nematódeos adultos dos animais A, B, C, D, E, F, e G no dia 28 (agrupados por espécies).....	21
FIGURA 11. Média aritmética do bioma L3 reveladas pelo “Nemabioma” e média aritmética das comunidades parasitárias dos nematódeos adultos dos animais A, B, C, D, E, F, e G no dia 28 (agrupados por espécies).....	21

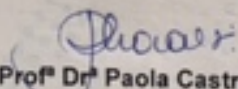
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Aplicação do ensaio de sequenciamento genético (nemabioma) como um teste de diagnóstico para helmintos parasitos de bovinos", protocolo nº 15881/15, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 14 de setembro de 2015.

Vigência do Projeto	15/09/2015 a 15/02/2017
Espécie / Linhagem	Bovinos mestiços (<i>Bos taurus taurus</i> X <i>Bos taurus indicus</i>)
Nº de animais	14
Peso / Idade	70 a 140 Kg / 06 a 12 meses
Sexo	Machos
Origem	Formiga / Minas Gerais

Jaboticabal, 14 de setembro de 2015.


Profª Drª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

APLICAÇÃO DO ENSAIO DE SEQUENCIAMENTO GENÉTICO "NEMABIOMA" PARA RELACIONAR A COMUNIDADE PARASITÁRIA DAS LARVAS EM TERCEIRO ESTÁDIO À COMPOSIÇÃO DO BIOMA DE NEMATÓDEOS ADULTOS PRESENTES NO TRATO GASTROINTESTINAL DE RUMINANTES

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento **00199999.007058/2015-02**. Este processo é referente apenas às despesas com viagens e manutenção do pesquisador no exterior. As despesas relacionadas às coletas no Brasil foram financiadas pelo próprio autor e todas as análises de sequenciamento genético foram custeadas pela universidade canadense.

RESUMO - As perdas potenciais pelas infecções por nematódeos em bovinos no Brasil foram estimadas em \$7,1 bilhões por ano. Indiscutivelmente, deve-se fazer o uso criterioso das drogas disponíveis, assim como o desenvolvimento de novas formulações, para enfrentar a problemática da resistência anti-helmíntica. O método atualmente empregado para o teste de medicamentos é invasivo e, portanto, enfrenta dificuldades em se adequar aos novos modelos em bem-estar animal. Outras técnicas utilizadas são as contagens de ovos de nematódeos por grama de fezes (OPGs) pré e pós-tratamento, que apresentam resultados não confiáveis para este propósito. Com fins científicos, emprega-se a PCR convencional ou a PCR em tempo real, técnicas quali e semi- quantitativa, respectivamente. O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre a comunidade parasitária das larvas em terceiro estágio após coproculturas e a composição do bioma de nematódeos adultos presentes no trato gastrointestinal. As proporções das larvas foram avaliadas por meio da tradicional morfologia e o novo método de sequenciamento "Nemabioma", enquanto as contagens e classificações dos vermes adultos foram realizadas pelos clássicos métodos morfológicos. Neste experimento, utilizaram-se sete bovinos mestiços, naturalmente infectados, entre oito e 12 meses de idade. Contagens de OPG foram realizadas a cada dois dias, do 14^o ao 28^o dia do estudo. As culturas de larvas foram realizadas utilizando-se as amostras de fezes colhidas nos dias 14, 16, 20, 24 e 28 do estudo. As larvas L3 foram sempre extraídas após 10 dias de cultura. Os animais foram experimentalmente eutanasiados no dia 28 para a subsequente colheita e classificação de helmintos adultos. Este é o primeiro estudo que relaciona as comunidades parasitárias de nematódeos em amostras de larvas e helmintos adultos utilizando o "Nemabioma". Os resultados deste estudo indicam que as espécies *Haemonchus*

placei e *Oesophagostomum radiatum* são superestimados na comunidade das L3 avaliadas pelo “Nemabioma”. Por outro lado, *Cooperia punctata* e *Trichostrongylus axei* aparecem sub-representados. Tal fato explica-se, principalmente, pela diferença de fecundidade entre as fêmeas das várias espécies de nematódeos adultos que parasitam um mesmo animal.

Palavras-chave: *biologia molecular; nematódeo; strongylida*

APPLYING THE NEW “NEMABIOME” GENETIC SEQUENCING ASSAY AS A DIAGNOSIS TEST FOR NEMATODIOS IN RUMINANTS

ABSTRACT - The potential detrimental effects of cattle nematode infections in Brazil have been estimated at USD 7.1 billion a year. It is undeniable, the necessity of appropriate drug use and the development of new formulations, to face the problematic of anthelmintic drug resistance. The current method for testing new drugs is both invasive and represents threats against recent animal welfare models. Other approaches currently used are Fecal Egg Counts (FECs) pre and post treatment, which are not reliable. Occasionally, conventional and real-time PCR are employed, which are non-quantitative and semi-quantitative techniques respectively. The objective of this study was to evaluate the relationship between the parasite community present in cultured fecal samples, and the composition of adult worms present in the gastrointestinal tract. Species proportions in larvae were assessed with the traditional morphological analysis and a recently developed “Nemabiome” sequencing assay, while the adult species proportions were assessed with classical morphological approaches. To this end, an experiment using natural infected bovines was designed. Seven crossbred calves were selected from eight to 12 months of age. FECs were done every 2 days, from the 14th to the 28th day of the study. Cultures of larvae were performed using fecal samples extracted on days +14, +16, +20, +24 and +28. The L3's were always extracted after 10 days of culture. The animals were necropsied on day +28 for collection and subsequent classification and counting of adult worms. This was the first time the comparison among the community of nematodes species present in larvae samples, and adult worms, has been described in the literature using these techniques. Differences in fecundity between nematode species can influence the apparent composition of larvae in the feces, how this relates to the actual adult worm burden is crucial to understanding the actual nematode infection, and the resulting implications. **Key-words:** *molecular biology; nematode; strongylida*

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Devido à ascensão e competitividade, o agronegócio brasileiro vem sendo uma atividade com perspectiva segura e rentável em todos os seus seguimentos. Com um clima diversificado, precipitações regulares, energia solar abundante e quase 13% de toda a água doce disponível no planeta, o Brasil tem 388 milhões de hectares de terras agricultáveis férteis e de alta produtividade, dos quais, 90 milhões ainda não explorados. Esses fatores fazem do país um lugar de vocação natural para o agronegócio e todos as atividades relacionados à suas cadeias produtivas (MAPA, 2016).

Ao considerar as últimas décadas, os ganhos de produtividade da pecuária estão cada vez maiores, decorrentes, principalmente, da melhoria genética na implantação de rebanho comercial, novas culturas com linhagens de pastagens naturais e técnicas de manejo reprodutivo. Estes fatores, em conjunto, impulsionaram para o alcance de melhores taxas de desfrute no rebanho. Se por um lado isso trouxe benefícios, por outro criou inúmeros problemas sanitários, dentre eles, as parasitoses (CRUZ et al., 2009).

De acordo com Vidotto (2002), torna-se inviável a criação econômica de bovinos sem um combate sistemático aos seus principais endo e ectoparasitas. No entanto, alguns dos entraves de produção são os danos causados pelas parasitoses, principalmente quando se trata de animais jovens, com idade entre cinco e 18 meses que são os mais acometidos, sendo esta fase uma das grandes responsáveis pelos imensos prejuízos econômicos na bovinocultura (BIANCHIN et al., 1996).

O estudo mais recente que aborda as potenciais perdas econômicas por parasitismo em bovinos no Brasil foi elaborado por GRISI et al., (2014). Neste trabalho, foram avaliadas as perdas com base no número total de animais em situação de risco e efeitos prejudiciais esperados sobre a produtividade do gado no país. Considerando que os dados das perdas de produção provêm de bovinos não tratados (animais controle), as perdas econômicas descritas à seguir não representam o real impacto do parasitismo em bovinos no Brasil,

mas as perdas potenciais caso o rebanho não fosse tratado. As perdas econômicas potenciais somadas, ao ano, podem chegar a 13,9 bilhões de dólares. Este valor advém da soma dos prejuízos potenciais por cada um dos parasitos, como discriminado a seguir: *Rhipicephalus (B.) microplus* (3,2 bi); *Haematobia irritans* (2,5 bi); larvas de *Dermatobia hominis* (380 mi); larvas de *Cochilomyia hominivorax* (340 mi); *Stomoxys calcitrans* (340 mi); nematódeos gastrintestinais (7,1 bi).

Quanto ao endoparasitismo em bovinos, destacam-se os nematódeos gastrintestinais, responsáveis pela gastrenterite parasitária dos ruminantes, um dos fatores que muito contribui para o baixo índice de produtividade da bovinocultura brasileira. Entre os efeitos relacionados, consta a diminuição do consumo voluntário de alimentos (apetite), da capacidade de digestão e absorção dos nutrientes para o crescimento, do desempenho reprodutivo, da qualidade de carcaça, do sistema imune, inclusive podendo levar os animais à óbito. (HOLMES, 1987; HAWKINS, 1993).

As infecções por helmintos muitas vezes são subestimadas pelos criadores, principalmente nos casos sub-clínicos. Diferentemente dos ectoparasitos, o endoparasitismo pode passar despercebido pelo produtor e causar perdas difíceis de serem estimadas (COOP & HOLMES, 1996).

Pinheiro et al., (2000) estimaram que a mortalidade de bezerros causada pela helmintose, no estado do Rio Grande do Sul, atinja uma amplitude de 10 a 30%, enquanto que a diferença entre ganho de peso dos bovinos tratados e não tratados pode chegar a 50Kg/bezerro.

Em criações de bovinos leiteiros, devido ao seu manejo mais intensivo, a verminose ocasiona prejuízos bem mais evidentes, pois estes são forçados a se alimentar sem muita seletividade e próximos aos bolos fecais. Isto faz com que adquiram cargas maiores de helmintos, o que, somado ao fator nutricional, leva a uma diminuição na imunidade e aumento nos percentuais de mortalidade (BIANCHIN & HORNER, 1995).

Embora o controle de parasitos de bovinos represente um importante fator na produção, as tentativas de combate empregadas na maioria das fazendas de criações são realizadas de maneira incorreta por meio do uso excessivo e desordenado das bases terapêuticas que por sua vez oneram o custo de produção e ainda não alcançam os objetivos de controle. Ainda, é preciso ser melhor respeitado o período de carência dos medicamentos a fim de se evitar resíduos nos produtos de origem animal (SINDAN, 2014).

Os produtores rurais têm sido, ultimamente, menos favorecidos pelos novos incrementos das indústrias farmacêuticas. A escassez de novas moléculas restringe o controle eficiente das parasitoses. Isto agrava e acelera ainda mais o fenômeno da resistência parasitária, uma vez que os helmintos são submetidos frequentemente aos mesmos princípios ativos. (FAO, 2004).

A resistência parasitária ocorre quando uma estirpe de parasito é capaz de tolerar doses de um princípio que é eficaz contra outras populações da mesma espécie, sendo essa característica herdável. Desta forma, considera-se propensa à resistência, quando a droga não consegue debelar 95% da espécie parasitária. Assim, por definição, resistência lateral é aquela em que uma espécie sobrevivente a uma droga não é afetada por outras de mesmo mecanismo de ação, podendo ou não ter sido exposta anteriormente a ela. Quando uma espécie é tolerante a drogas pertencentes a diferentes grupos químicos com modos de ação distintos, denomina-se resistência cruzada (PRICHARD, 1980).

Estes fatores, somados, têm levado ao desenvolvimento de pesquisas de controle complementares, tais como pastejo alternado (FERNANDES et al., 2004), seleção de animais geneticamente resistentes (AMARANTE, 2004), controle biológico por meio de fungos nematófagos (ARAÚJO et al., 2004) ou vacinas (HEWITSON & MAIZELS, 2014), dentre outros.

Devido à elevada prolificidade e adaptação às diversas condições climáticas, os endoparasitos possuem ampla distribuição geográfica e alta prevalência, especialmente em áreas de clima tropical e subtropical. Cada parasito possui

um determinado número de combinações ecológicas as quais permitem seu desenvolvimento em determinada região (MOLENTO, 2005).

Os gêneros de helmintos que mais frequentemente parasitam ruminantes na região sudeste do Brasil são: *Haemonchus* spp, *Cooperia* spp, *Oesophagostomum* spp e *Trichostrongylus* spp (ARANTES et al., 1995).

As técnicas de diagnóstico comumente aplicadas em helmintologia veterinária para ruminantes consistem basicamente na contagem de ovos por grama de fezes, coproculturas, PCR convencional/ PCR em tempo real e necropsias parasitológicas. Infelizmente, de maneira geral, os métodos de diagnóstico têm evoluído muito pouco na helmintologia ao longo das últimas décadas e ainda apresentam limitações quanto à sensibilidade, especificidade ou adequação aos novos modelos em bem-estar animal.

As contagens de ovos por grama de fezes são usualmente realizadas de acordo com uma das três metodologias a seguir: McMaster (GORDON & WHITLOCK, 1939), Cornell-Wisconsin (EGWANG, 1982) ou Flotac (CRINGOLI et al., 2010). Embora existam peculiaridades nos procedimentos, estes consistem, basicamente, na pesagem e diluição das fezes, suspensão dos ovos de nematódeos em solução salina e contagem dos mesmos. Desde que o *status* imunológico dos animais seja levado em consideração para a interpretação dos resultados, as contagens de ovos por grama de fezes trazem resultados confiáveis para a mensuração da carga parasitária (AMARANTE & AMARANTE, 2016). O Flotac é mais preciso e sensível que o McMaster e Cornell-Wisconsin, especialmente para amostras com baixas contagens de ovos (LEVECKE et al., 2012, NEVES et al., 2014). Como os ovos de nematódeos pertencentes à ordem Strongylida são morfologicamente iguais, as técnicas acima citadas são apenas quantitativas, ou seja, não permitem diferenciação entre os parasitos dos diversos gêneros inseridos nesta família.

Como método auxiliar às técnicas de contagem de ovos por grama de fezes, podem ser realizadas as Coproculturas (ROBERTS, & O'SULLIVAN, 1950), seguidas por classificações morfológicas das larvas em terceiro estágio "L3"

(VAN WYK & MAYHEW 2013). A técnica apresenta limitações por dois motivos: o primeiro é que as amostras de fezes devem ser mantidas em culturas por um período mínimo de 7 a 10 dias para que sejam extraídas larvas em terceiro estágio de desenvolvimento (UENO & GONÇALVES, 1998). O segundo é que nem todas as larvas de espécies de nematódeos, mesmo em terceiro estágio, podem ser classificadas por morfologia. A identificação, geralmente, limita-se aos gêneros. Quanto ao *Haemonchus* spp, consegue-se diferenciar as espécies *H. placei*, *H. similis* e *H. contortus* por uma pessoa qualificada. Ademais, é possível a identificação de *Strongyloides papillosus*, *Bunostomum phlebotomum* e *Ostertagia ostertagi*. Por outro lado, *Cooperia* spp não pode ser diferenciada em *C. punctata*, *C. pectinata* e *C. spatulata*. Tratando-se de *Trichostrongylus* spp, não há distinção entre *T. axei* e *T. colubriformis*. Já o *Oesophagostomum* spp, em bovinos, acaba sendo classificado como *O. radiatum* não pela sua morfologia, mas pela sua especificidade parasitária, enquanto em pequenos ruminantes não se diferencia *O. venulosum* de *O. columbianum*. (KEITH, 1953; UENO & GONÇALVES, 1998; VAN WYK & MAYHEW 2013; SANTOS, 2014). De forma geral, a classificação de L3 é dispendiosa em termos de tempo, exige mão-de-obra bastante qualificada, não classifica todas as espécies e por meio desta técnica, não é possível analisar-se o mesmo número de larvas que uma técnica molecular.

Quanto às técnicas moleculares usualmente empregadas, destacam-se a “Convencional Polymerase Chain Reaction” (CPCR) e a “Real Time Polymerase Chain Reaction” (qPCR). A CPCR é uma técnica bastante sensível e permite a identificação dos gêneros (SCHNIEDER et al., 1999), ou ainda, das espécies (WIMMER et al., 2004) dos principais nematódeos parasitas de ruminantes, tanto em amostras de ovos como de larvas. A técnica é exclusivamente qualitativa e, portanto, não expressa os valores quantitativos. Ainda, são necessários oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada uma das espécies investigadas. Já a qPCR é, ao mesmo tempo, uma técnica qualitativa e quantitativa. Por meio deste método, podem ser identificadas e quantificadas as espécies de nematódeos de ruminantes tanto por meio das larvas (SAMSON-HIMMELSTJERNA et al. 2002), como dos ovos (ROEBER et

al., 2012). É bastante útil e confiável para amostras que contenham uma ou apenas poucas espécies envolvidas. Por exigir oligonucleotídeos iniciadores específicos, as análises podem ser limitadas em alguns casos. Os oligonucleotídeos iniciadores algumas vezes são gênero-específicos e, em não raros casos, precisam ser desenhados para as populações de acordo com a região do globo em que a pesquisa está sendo conduzida. Além disso, quando se investiga uma amostra que contenha várias espécies, são necessários diversos oligonucleotídeos iniciadores ao mesmo tempo. Estes diferentes oligonucleotídeos iniciadores competem pelos mesmos recursos e podem apresentar diferentes desempenhos, o que não raramente interfere no resultado quantitativo final. Outro fator que deve ser mencionado é que, por meio deste modelo, só serão encontradas as espécies de parasitos que o investigador suspeite previamente que estejam presentes nas amostras. Os resultados de espécies inesperadas, não são demonstrados.

A necropsia parasitológica seguida pela quantificação e identificação dos helmintos adultos (LEVINE, 1968; UENO & GONÇALVES, 1988; ACHI et al., 2003, COSTA, 2012) é o método mais sensível e específico para a mensuração da carga parasitária (WOOD et al, 1995). Porém, por ser invasiva e exigir a eutanásia dos animais, a técnica tem enfrentado sérios problemas em termos de adequação aos novos modelos em bem-estar animal.

Portanto, a necessidade da aplicação de um método qualitativo e quantitativo que identifique de maneira confiável as interações complexas de nematódeos de diferentes espécies por meio das larvas em terceiro estágio de desenvolvimento (L3) estimularam o delineamento desta pesquisa. A análise quantitativa e qualitativa ao nível de espécie pelo novo método de diagnóstico ‘Nemabioma’ aplicado às larvas certamente será uma ferramenta fundamental para o futuro da Helminologia Veterinária.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar a relação entre os resultados do “Nemabioma” aplicado para larvas em estágio L3, a população de larvas L3 classificadas por morfologia e a real comunidade parasitária de bovinos, estabelecida pela contagem e classificação morfológica dos nematódeos adultos.

Objetivos específicos:

- Comparar os valores obtidos na análise do “Nemabioma” com os resultados de morfologia das larvas “L3”
- Contrastar o bioma das populações de helmintos adultos classificados por morfologia com a comunidade parasitária de suas respectivas L3 pelo “Nemabioma”.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção dos bovinos

No dia zero do estudo foram selecionados no Centro de Pesquisas em Sanidade Animal – CPPAR, FCAV, UNESP sete bovinos mestiços com idade entre oito e 12 meses, naturalmente infectados por nematódeos gastrointestinais, provenientes de Formiga/ MG. Os animais não haviam recebido qualquer medicação anti-parasitária nos 150 dias que antecederam o estudo. Somente foram selecionados para o estudo bovinos que apresentaram contagens médias individuais de 500 ovos da ordem Strongylida por grama de fezes (GORDON e WHITLOCK, 1939, modificada). O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP – Câmpus de Jaboticabal – SP, sob número de protocolo 15881/15.

3.2. Aclimação, pesagem, identificação e alimentação

No dia +14 do estudo, os animais foram pesados individualmente e identificados com brinco numérico. Os bovinos receberam silagem de milho, sal mineral e água *ad libitum* durante todo o estudo. Entre os dias zero e +14, os bezerros foram mantidos em baias individuais com piso de concreto (período de aclimação) e permaneceram nas mesmas instalações até o final do período experimental, (D28).

3.3. Contagens de OPG

Nos dias +14, +16, +18, +20, +22, +24, +26 e +28 foram realizadas contagens de OPG conforme a metodologia descrita por Gordon e Whitlock (1939), com algumas modificações. As amostras de fezes foram colhidas diretamente da ampola retal dos bovinos com o auxílio de um saco plástico devidamente identificado (número do animal, data de colheita e dia do estudo) e levadas diretamente ao laboratório do Centro de Pesquisas em Sanidade Animal - CPPAR, onde foram pesadas e uma alíquota de 2g de cada animal separada para análise. No laboratório, estas amostras foram acondicionadas em frascos de vidro de 150mL e adicionado-se 28mL de solução salina saturada. Após homogeneização com o auxílio de bastões de vidro, o conteúdo foi filtrado por

um tamis de 850 μm . A seguir, preencheu-se com o filtrado ambos os lados de duas câmaras de Mc Master, usando pipetas de Pasteur descartáveis. Após dois minutos, foram levadas ao microscópio de luz e realizou-se a contagem de ovos de helmintos gastrintestinais da ordem Strongylida, utilizando aumento de 10x. O resultado obtido nas contagens foi multiplicado por 25 para a obtenção do valor de ovos por grama de fezes (OPG).

3.4. Coproculturas

Nos dias +14, +16, +18, +20, +22, +24, +26 e +28 uma amostra de aproximadamente 150 gramas de fezes foi colhida de cada animal e destinada à obtenção de larvas de terceiro estágio (L3) por meio de coproculturas individuais e em duplicata, segundo a técnica de ROBERTS & O'SULLIVAN (1950), modificada.

Amostras de fezes frescas foram colhidas diretamente da ampola retal dos animais em cada data experimental. As alíquotas foram misturadas com uma amostra de igual volume de vermiculita, até a obtenção de uma massa úmida. De acordo com a consistência da amostra de fezes foi adicionado ou não um pouco de água. Acrescentou-se água até que se formasse uma massa que, quando expremida na palma da mão, fluísse um pouco de líquido. O conteúdo foi bem homogeneizado em um recipiente e cada amostra foi acondicionada em frascos de vidro de 150mL, até aproximadamente $\frac{3}{4}$ de sua capacidade. Um furo foi realizado com o dedo indicador bem no centro do conteúdo para o aumento da aeração durante o processo. Após limpeza dos bordos, os frascos foram tampados com placas de Petri, tomando-se o cuidado de colocar um cordão entre a placa e a borda do recipiente, facilitando, ainda mais a aeração. O objetivo de tal procedimento foi facilitar a aerobiose, o que dificulta o crescimento de fungos que podem influenciar de maneira prejudicial ao desenvolvimento das larvas.

Os frascos foram mantidos em condições de temperatura ambiente, uma vez que quando fixa-se a temperatura, existe uma tendência em priorizar o desenvolvimento das larvas de um determinado gênero quando comparados aos demais (UENO & GONÇALVEZ, 1998). As amostras foram avaliadas

diariamente e umidecidas de maneira similar, quando houvesse ressecamento do cultivo. A colheita das larvas foi realizada sempre após 10 dias de cultura, respeitando-se uma amostragem em duplicata para cada animal, em cada dia de colheita. Os frascos de vidro foram completados até a borda com água corrente e tampados com placa de Petri, invertendo-se bruscamente, para evitar o derramamento de água. Colocou-se 12mL de água levemente morna na placa e aguardou-se quatro horas. Após este período, retirou-se o líquido com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, o qual foi imediatamente transferido para um tubo tipo falcon de 15mL e levado à centrifuga. Após centrifugação a 3000g por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado, restando cerca de 2mL do líquido, contendo as larvas, no fundo do tubo. Ao conteúdo, foi adicionado etanol à 70% até que se completasse o volume de 10mL. Estas amostras foram devidamente seladas e estocadas em freezer à -20° C até o momento do uso, no Laboratório de Parasitologia da Universidade de Calgary, Canadá.

3.5. Necropsia parasitológica

No dia +28 do estudo foi realizado o processo de eutanásia, conforme procedimento descrito no “Guidelines on Euthanasia of American Veterinary Medical Association AVMA - (2007)”. Para realização deste procedimento, cada animal foi primeiramente sedado com cloridrato de xilazina 2g, na dose de 0,3mg/kg (1,5mL/100kg). Aproximadamente 15 minutos após a administração do sedativo, os bovinos foram anestesiados, pela via intravenosa, com tiopental sódico 1g (dissolvido em solução fisiológica estéril, o que corresponde à 20mL de solução à 5%), na dose de 5mg/kg (1g/200kg). Somente após ser constatada a inconsciência total do animal (ausência dos reflexos palpebrais e mastigatórios), realizou-se a sangria dos mesmos, de modo que, a morte do animal ocorresse por hipovolemia.

Logo após a eutanásia, foi retirado da cavidade abdominal de cada bovino o sistema digestório que, por sua vez, foi separado por meio de ligaduras duplas utilizando-se um barbante nos diferentes segmentos anatômicos (abomaso, intestino delgado e intestino grosso). Com o auxílio de um enterótomo, cada segmento supracitado foi aberto no sentido longitudinal dentro de um balde

identificado com o número do animal e segmento anatômico. Em seguida, a mucosa já aberta de cada um destes segmentos foi raspada e enxaguada, com o auxílio de um enterótomo e água corrente, pondo o seu conteúdo (dentro do balde) posteriormente peneirado em um tamis (USBS-50 - Tyler 48, com abertura de 0,297mm) recolhendo-se *in totum* os helmintos (fase adulta ou larval). A parte sólida obtida do conteúdo de cada segmento foi fixada em solução de formol a 10%, aquecido a 80°C, e armazenada em um recipiente plástico contendo a seguinte identificação: número do animal, segmento anatômico, data da necropsia e número do estudo. O enterótomo e o tamis foram lavados com água corrente e sabão neutro no intervalo entre o processamento de cada segmento anatômico. Os abomasos foram, ainda, individualmente submetidos ao processo de digestão da mucosa com solução de 1% de pepsina em 3% de ácido clorídrico a fim de se obter helmintos presentes na mucosa.

Do conteúdo total colhido do abomaso, intestino delgado e intestino grosso, retirou-se uma alíquota de 10% (após homogeneização) para exame e estimativa da carga parasitária (helmintos). Já o conteúdo oriundo da digestão do abomaso, foi colhido e analisado *in totum*. A colheita, contagem e identificação genérica dos helmintos foram efetuadas em microscópio estereoscópio (lupa). O diagnóstico específico dos helmintos capturados foi realizado por meio da avaliação da bolsa copuladora e/ou pela região anterior do nematódeo, dependendo da espécie encontrada, de acordo com os critérios taxonômicos descritos por LEVINE (1968); UENO & GONÇALVES (1988) e ACHI et al. (2003), COSTA (2012). Quando uma determinada espécie de helminto fosse recuperada em mais de um órgão, a carga total desta espécie, para cada animal, foi calculada somando-se os helmintos presentes em todos os órgãos ou segmentos.

3.6. Classificação morfológica das L3

Uma alíquota de 5 mL das amostras de larvas em estágio L3 provenientes de cada uma das coproculturas referentes às colheitas nos dias +14, +16, +18, +20, +22, +24, +26 e +28 foi submetida às análises morfológicas. As larvas foram mortas por uma solução de lugol, após serem depositadas em lâmina e

cobertas por lamínula. Após este procedimento foram levadas ao microscópio de luz e 50 larvas foram identificadas ao nível de gênero, de acordo com os critérios taxonômicos descritos por VAN WYK & MAYHEW (2013).

3.7. Extração do DNA genômico

Os frascos contendo as L3 foram retirados do freezer e aproximadamente 1000 larvas foram isoladas. O etanol a 70% foi removido das amostras por meio de três centrifugações por 3min a 2500g com 1mL de tampão (50Mm KCL; 10mM Tris (pH 8.3); 2,5 mM MgCl₂; 0,45% Nonidet P-40; 0,45% Tween 20; 0,01% gelatina). O conteúdo final foi ressuspenso em 50µL do mesmo tampão. As amostras foram incubadas 95°C por 15 minutos e, em seguida, levadas ao freezer e mantidas a -80°C por 60 minutos. Após este período, foram retiradas do freezer e adicionado 150µL do tampão de extração (50Mm KCL; 10mM Tris (pH 8.3); 2,5 mM MgCl₂; 0,45% Nonidet P-40; 0,45% Tween 20; 0,01% gelatina + 120µg/mL de proteinase K). As larvas foram novamente incubadas, a 60°C por 120 minutos e 750 RPM. Após esta etapa de incubação, a proteinase K foi inativada por aquecimento a 95°C por 20 minutos. Ao final deste processo, foram preparadas diluições de 1:10 em água de grau reativa e o conteúdo estocado a -80° C até o momento do uso.

3.8. Sequenciamento “deep amplicon” do rDNA ITS-2

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar o rDNA ITS-2 no *deep sequencing* são modificações dos oligonucleotídeos iniciadores NC1 e NC2, os quais são complementares às sequências 5.8S e 28S, respectivamente (GASSER et al., 2003). Adaptadores foram adicionados a estes oligonucleotídeos iniciadores para permitir o subsequente anelamento do oligonucleotídeo iniciador seguinte. Quatro oligonucleotídeos iniciadores “forward” (NC1Adp, NC1Adp1N, NC1Adp2N, NC1Adp3N) e oligonucleotídeos iniciadores “reverse” (NC2Adp, NC2Adp1N, NC2Adp2N, NC2Adp3N) foram utilizados. “Adp” representa a “tag” de sequenciamento e “N” é o número de nucleotídeos aleatórios incluídos entre a sequência específica dos oligonucleotídeos iniciadores e a sequência “adapter” para aumentar a diversidade de “amplicons” gerada. Os oligonucleotídeos iniciadores foram projetados para prevenir a saturação dos canais de sequenciamento. Os

múltiplos oligonucleotídeos iniciadores “forward” (NC1) e “reverse” (NC2) foram misturados em iguais proporções e usados para a PCR sob as seguintes condições: 5µL KAPA HiFi HotStart Fidelity Buffer (5X) (KAPA Biosystems, USA), 0.75µL NC1+Adapter Primer (10µM), 0.75µL NC2+Adapter Primer (10µM), 0.75µL dNTPs (10mM), 0.5µL KAPA HiFi HotStart Polymerase (0.5U), 13.25µL ddH₂O, 4µL do DNA extraído das larvas em diluição de 1:10. As condições térmicas e de temperatura foram: 95°C por 3 minutos, seguidos por 25 ciclos a 98°C por 20seg., 62°C por 15seg., 72°C por 15seg., seguidos pela extensão final a 72°C por 2 minutos. Os produtos da PCR foram purificados com o AMPure XP Magnetic Beads (1X) (Beckman Coulter, Inc.), de acordo com o protocolo do fabricante. As “tags” índices e P5/P7 foram então adicionadas aos “amplicons” do rDNA ITS-2 utilizando-se ciclos limitados de amplificação pela PCR. Oito “forward” e 12 “reverse barcoded primers” foram misturados para fazer uma combinação única de 96 “barcodes”. As seguintes condições para PCR foram utilizadas: 5µL KAPA HiFi HotStart Fidelity Buffer (5X) (KAPA Biosystems, USA), 1.25µL *Forward Primer* (N501-508) (10µM), 1.25µL *Reverse Primer* (N701-712) (10µM), 0.75µL dNTPs (10mM), 0.5µL KAPA HiFi *Polymerase* (0.5U), 14.25µL H₂O e 2µL do produto de amplificação do primeiro ciclo. Os parâmetros para o termociclador foram de 98°C por 45 segundos, seguidos por setes ciclos a 98°C por 20 seg., 63°C por 20seg. e 72°C por dois minutos. Os produtos foram purificados pelo “AMPure XP magnetic beads (1X)” e uma “master sequencing library” foi criada pela mistura de aproximadamente 50ng dos produtos da purificação. A concentração final da “pooled library” foi mensurada com o “KAPA qPCR Library Quantification Kit” (KAPA Biosystems, USA), seguindo as recomendações do protocolo do fabricante. A “pooled library” foi submetida ao “MiSeq Desktop Sequencer” utilizando-se “500 cycle pair-end reagent kit” (MiSeq Reagent Kits v2, MS-103-2003) a uma concentração de 12.5nM com a adição de 25% “PhiX Control v3”. O “MiSeq” foi programado para gerar apenas documentos “FASTQ” com “no post-run analysis”. O “MiSeq” separou automaticamente todas as sequências por amostras durante o processo “post-run” por meio da identificação dos índices.

3.9. Bioinformática e análise estatística

As sequências consenso foram construídas à partir das sobreposições dos reads com pair-end gerados em formato FASTQ, com o auxílio dos padrões da versão FLASH 1.2.7 (MAGOČ & SALZBERG, 2011). A versão BLASTN 2.2.29+ foi então utilizada para contrastar as sequências formadas com uma base de dados de sequências de referência, gerada à partir do sequenciamento dos “rDNA ITS-2” de uma única larva, isolada de uma cultura pura (CAMACHO et al., 2009). Foi definido um limiar de identidade > 97% entre a sequência testada e a sequência referência de cada espécie. Esta margem leva em consideração os erros de sequenciamento e a variação intra-espécies na região ITS-2. Sequências negativamente identificadas por este método foram ainda pesquisadas por BLASTN, contra a base de dados do GenBank, para a obtenção de um melhor resultado. Sequências que não corresponderam a nenhuma sequência de “rDNA ITS-2” do Genbank foram classificadas como sequências de artefatos ou contaminantes e, conseqüentemente, não computadas. A composição percentual de cada espécie na amostra foi calculada pela divisão entre o número de leituras da espécie pelo número total de leituras da amostra. As amostras com menos de 2000 leituras foram descartadas, uma vez que o resultado é indicativo que uma das etapas de preparação da amostra falhou. As estatísticas foram realizadas com o auxílio do SPSS Statistics (IBM Corp. 2012. IBM SPSS Statistics para Macintosh, versão 21.0 Armonk, NY.: IBM Corp).

4. RESULTADOS

Os resultados deste estudo são cruciais para o melhor entendimento de como a fecundidade das diferentes espécies de parasitos adultos se reflete no bioma de suas respectivas populações de larvas. Por meio dos resultados obtidos serão discutidos fatores como sobrevivência das larvas às condições ambientais, especificidade parasitária e fecundidade.

A Figura 1 mostra as contagens de ovos por gramas (OPGs) de fezes individuais, ao passo que a Figura 2 sintetiza os valores de acordo com as médias aritméticas em cada data experimental. Na Figura 1, nota-se que no início do experimento todos os animais apresentavam contagens de OPG iguais ou superiores a 500. Os valores variaram de 325 (animal C no D22) a 9.600 (animal F no D22). No D28 todas as amostras apresentaram maiores números de ovos por grama de fezes em razão do jejum alimentar aplicado aos animais no período que antecedeu a necropsia parasitológica. Este fato pode ser confirmado com os dados da Tabela 2. Nesta, observa-se uma pequena variação das médias aritméticas das contagens de ovos entre os dias 14 e 26, sendo 1813 ovos o valor médio mínimo e 2279o máximo. Já no dia 28, a média das contagens dos sete animais foi de 6957 OPG.

4.1. Contagens de OPG

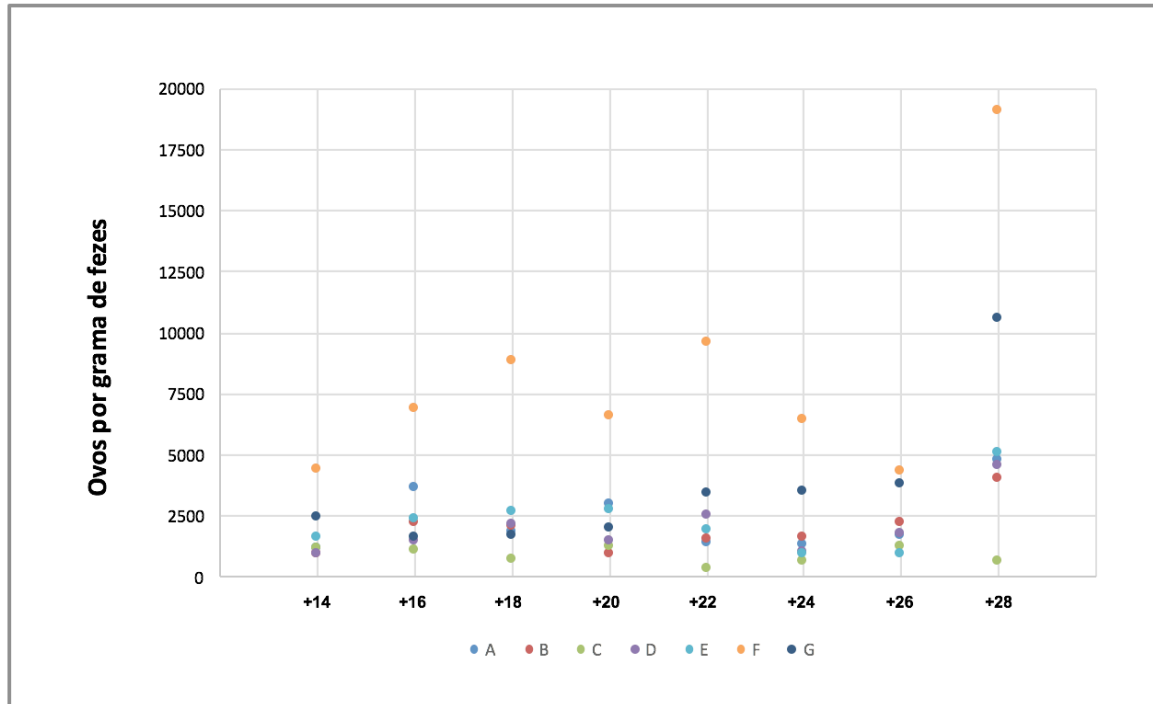


Figura 1. Contagens individuais de ovos por grama de fezes (OPG) dos animais A, B, C, D, E, F e G entre os dias 14 e 28.

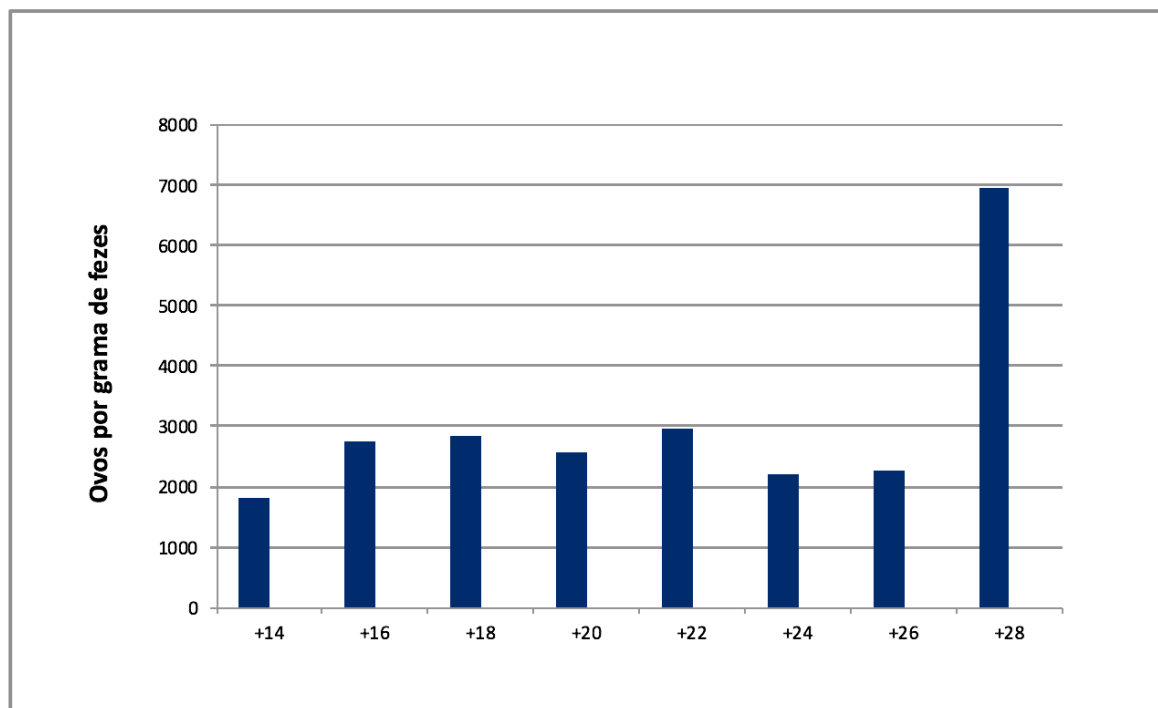


Figura 2. Média aritmética das contagens individuais de ovos por grama de fezes (OPG) dos setes animais entre os dias 14 e 28

Os valores estimados das contagens de nematódeos adultos encontram-se expressos nas Tabelas 3 e 4. Estes valores são o produto da multiplicação das contagens dos nematódeos adultos por 10, uma vez que se coletou 10% do conteúdo total para a quantificação dos helmintos adultos. *Cooperia punctata* foi o parasito recuperado em maior quantidade (59.420), seguido pelo *H. placei* (36.460), *T. axei* (20.181), *C. pectinata* (4.121), *C. spatulata* (3077), *O. radiatum* (1920), *T. colubriformis* (296), *H. similis* (96) e *Trichuris discolor* (42). Identificou-se ainda, aproximadamente 803 *Dictyocaulus viviparus* nas traquéias, brônquios e bronquíolos. O número total de parasitos adultos recuperados não quer dizer, necessariamente, que aquela espécie foi a que estava presente em maior quantidade de indivíduos. O *Oesophagostomum radiatum*, por exemplo, embora em menor quantidade que a *C. pectinata*, esteve presente em seis dos sete animais, enquanto a esta última em apenas um indivíduo.

4.2. Contagens e classificação morfológica de nematódeos adultos

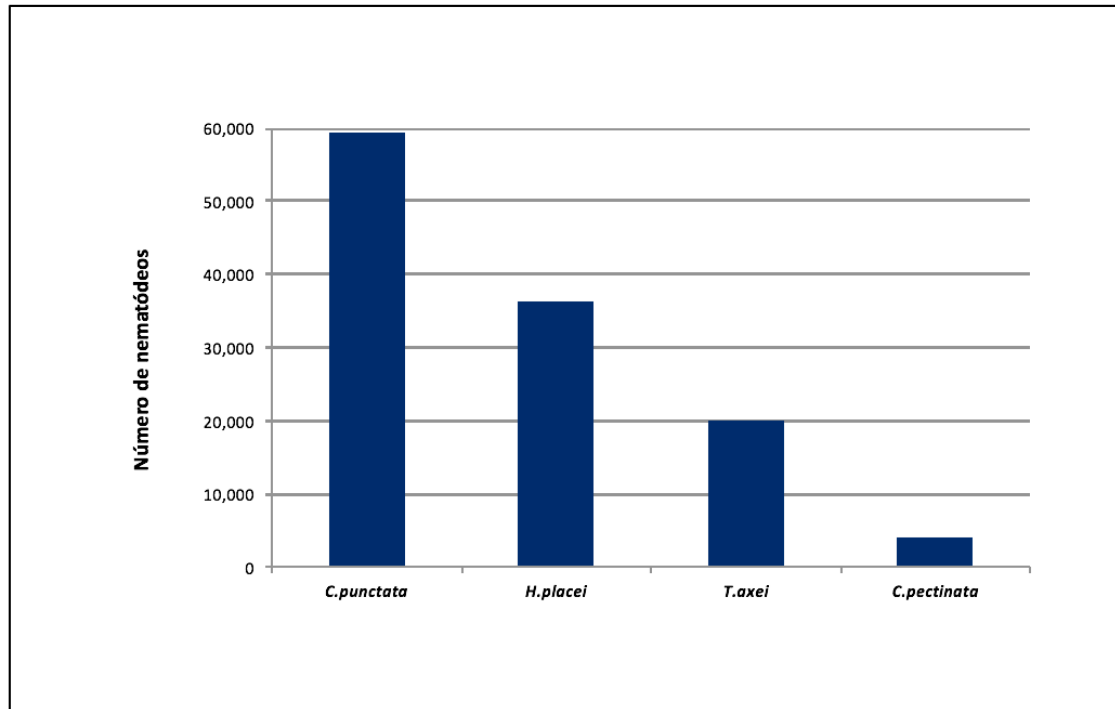


Figura 3. Número total estimado de nematódeos adultos recuperados após a necropsia parasitológica no dia 28. (*Cooperia punctata*, *Haemonchus placei*, *Trichostrongylus axei* e *Cooperia pectinata*)

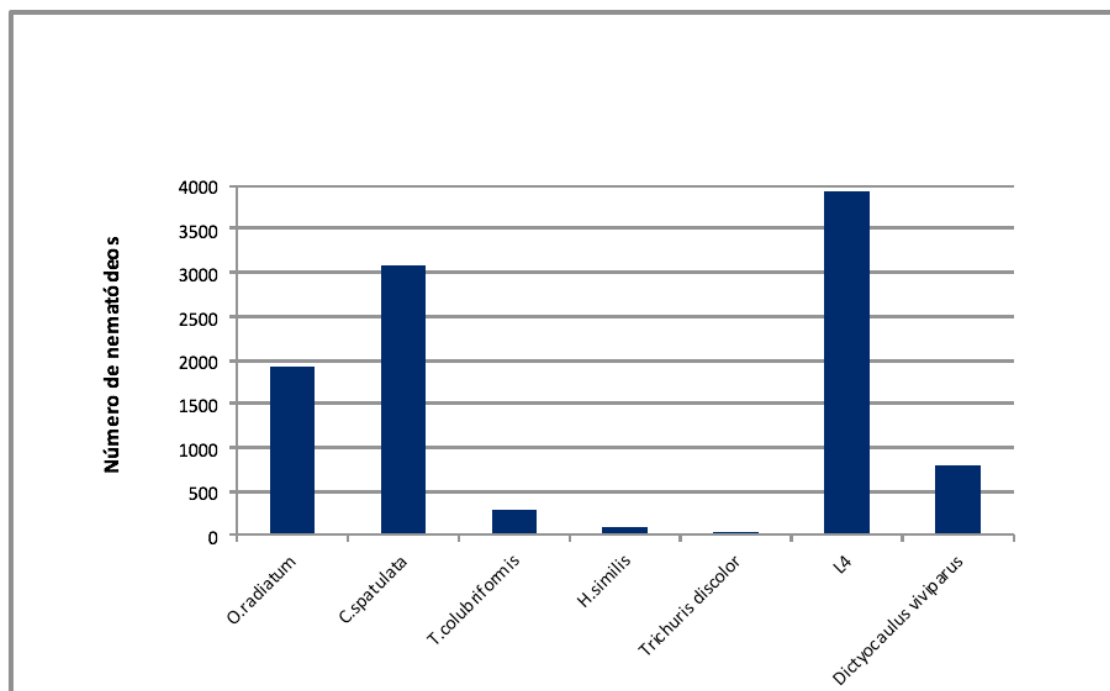


Figura 4. Número total estimado de nematódeos adultos recuperados após a necropsia parasitológica no dia 28. (*Oesophagostomum radiatum*, *Cooperia spatulata*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Haemonchus similis*, *Trichuris discolor*, formas imaturas L4 e *Dictyocaulus viviparus*).

Na Figura 5 estão representados graficamente os resultados obtidos na classificação morfológica das larvas em estágio L3. Por meio deste método, foi possível classifica-las, somente, de acordo com os gêneros. Nos animais identificados como D, F e G, nota-se que houve maior variação dos resultados ao longo das colheitas e, de maneira geral, os parasitos dos gêneros *Oesophagostomum* spp e *Trichostrongylus* spp tiveram uma representação percentual menor e, portanto, observa-se maior variação em presença ou ausência nas amostras do mesmo animal ao longo dos dias. Quando calculada a médias percentuais de cada gênero por data experimental (Figura.6), nota-se no D16 que o *Oesophagostomum* spp estava praticamente ausente (1,1%). O mesmo ocorreu com o *Trichostrongylus* spp no D20 (0,3%). Houve predominância do gênero *Haemonchus* spp em cinco dos sete animais, seguido por *Cooperia* spp.

4.3. Classificação morfológica das L3

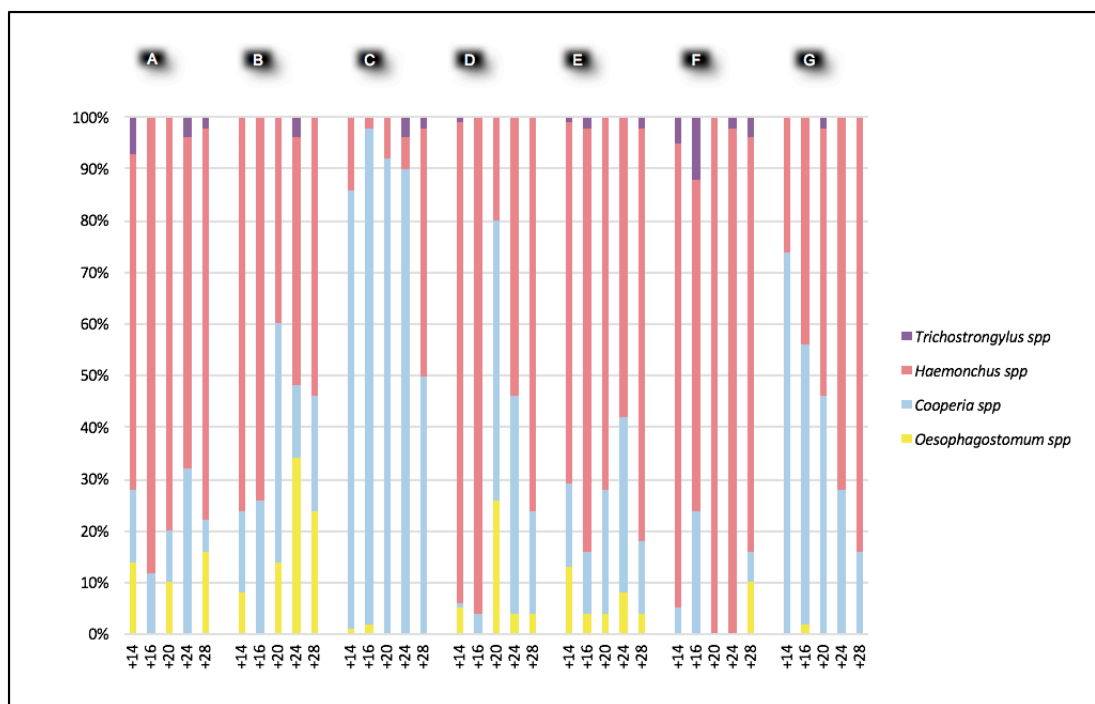


Figura 5. Classificação morfológica das L3 provenientes dos animais A, B, C, D, E, F, e G, entre os dias 14 e 28 (agrupadas por gêneros).

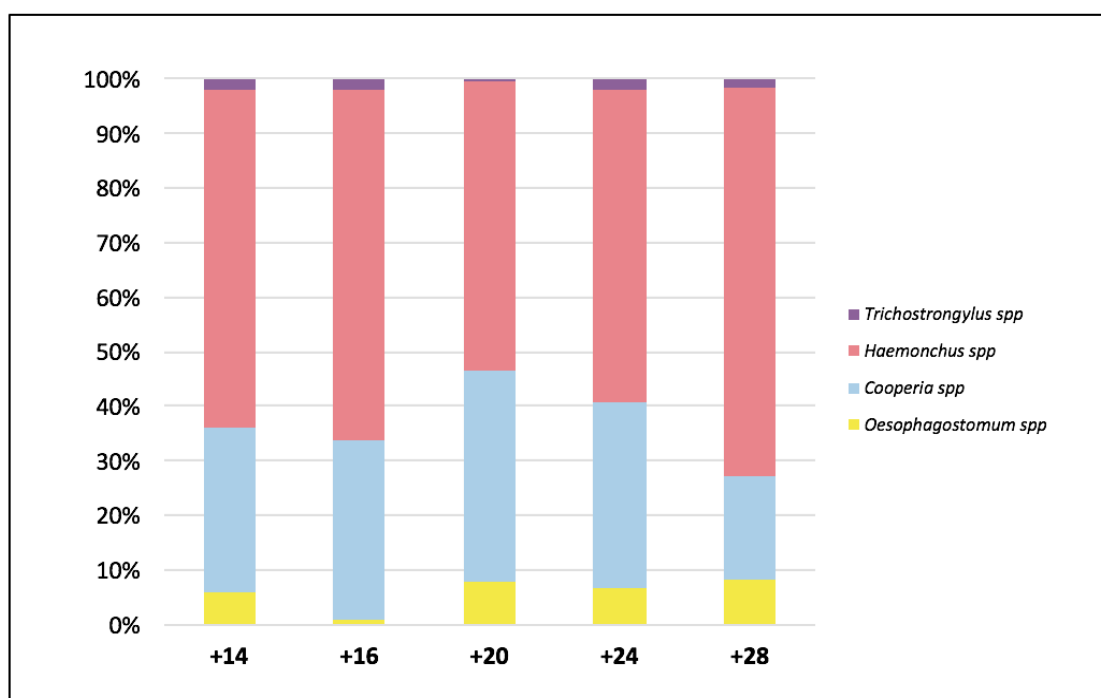


Figura 6. Média aritmética da classificação morfológica das L3 provenientes dos animais A, B, C, D, E, F, e G, entre os dias 14 e 28 (agrupadas por datas e gêneros).

Os resultados das análises por meio do ensaio sequenciamento genético “nambaioma” para larvas em estágio L3 encontram-se na Figura 7. Nota-se que por meio desta técnica as larvas são classificadas em espécies, ao invés de generos, como trouxeram as Figuras anteriores (5 e 6) de classificação morfológicas das L3. Ainda referente à Figura 7, observa-se pouca variação nas amostras analisadas de um mesmo animal ao longo dos 14 dias de análises. A Figura 8 sintetiza os resultados do “nambaioma” por data experimental, calculando as médias aritméticas dos percentuais de determinado parasito presente nos bovinos. Existe uma dominancia do *H.placei*, seguido por *C.punctata*, *O.radiatum*, *T.axei*, *C.pectinata*, *C.spatulata* e *H.similis*.

4.4. “Nemabioma” das L3

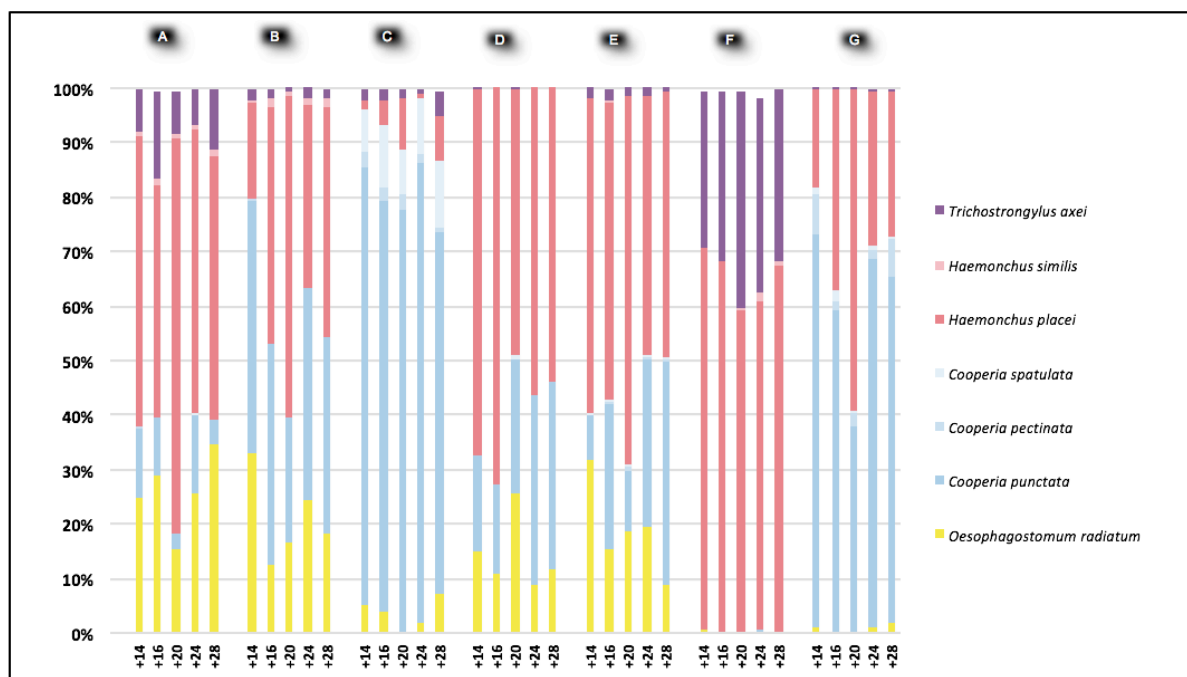


Figura 7. “Nemabioma” das L3 provenientes dos animais A, B, C, D, E, F, e G, entre os dias 14 e 28. (agrupadas por espécies)

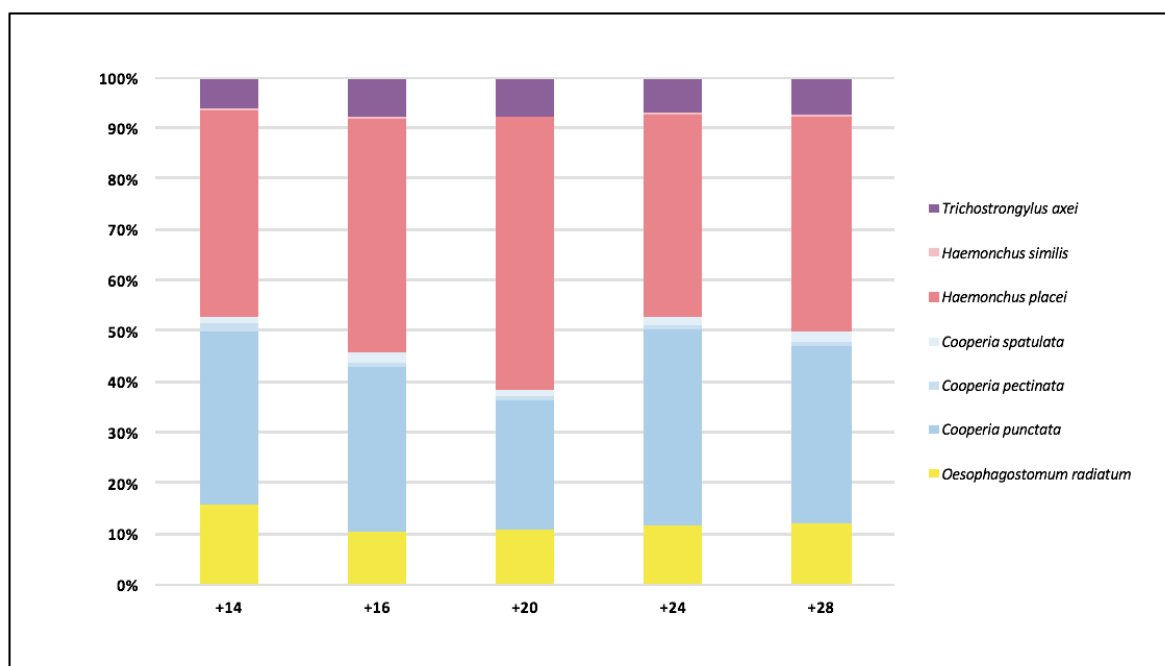


Figura 8. Média aritmética do “Nemabioma” das L3 provenientes dos animais A, B, C, D, E, F, e G, entre os dias 14 e 28 (agrupadas por datas e espécies).

4.5. Classificação morfológica das L3 vs “Nemabioma” das L3

A Figura 9 traz a comparação da classificação morfológica das L3 com os resultados do “nemabioma” de tais larvas. Nota-se uma consistência entre os dados, especialmente para *Cooperia* spp e *Haemonchus* spp. Os dados referentes ao *Oesophagostomum* spp e *Trichostrongylus* spp indicam que estes parasitos aparecem em maior percentagem no sequenciamento genético, quando comparados à morfologia.

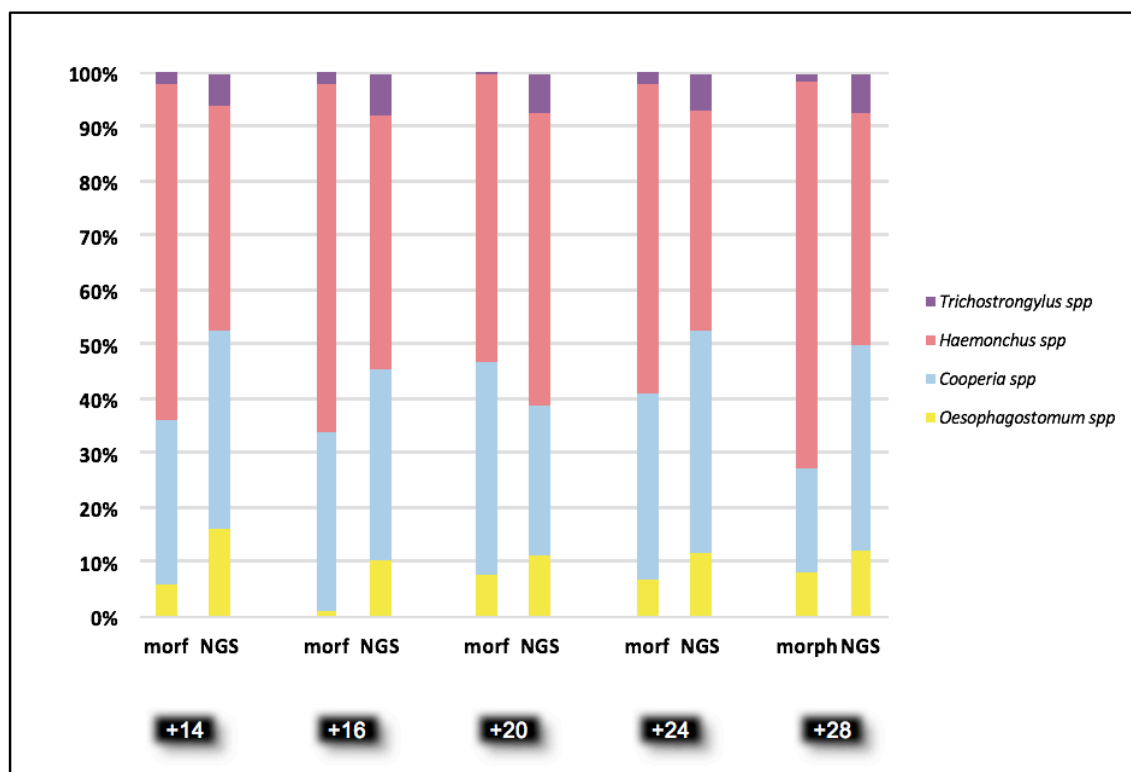


Figura 9. Médias aritméticas do “Nemabioma das L3 e médias aritméticas” da classificação morfológica das L3, provenientes dos animais A, B, C, D, E, F, e G, entre os dias 14 e 28 (agrupadas por datas e gêneros).

4.6. classificação morfológica dos nematódeos adultos vs “Nemabioma” das L3

A figura 10 traz os resultados do “nemabioma” aplicado às larvas em estágio L3 aplicada às amostras de fezes coletadas na última data experimental (D28) e contrasta tais dados percentuais à comunidade parasitária de nematódeos adultos recuperados e classificados dos bovinos na mesma data experimental. Os resultados expressos nesta figura são individuais, ou seja, para cada um dos sete animais (nomeados de A a G). Analisando esta tabela, nota-se que os resultados do “nemabioma” não são exatamente o reflexo dos resultados da comunidade parasitária de vermes adultos. O *Oesophagostomum radiatum* foi identificado em seis dos sete indivíduos e, em todos eles, sua proporção percentual no “nemabioma” foi maior que na população de vermes adultos. A *Cooperia pectinata* também esteve presente em seis dos sete animais e, ao contrário do verme anteriormente citado, apareceu subestimada no nemabioma, em cinco dos seis indivíduos. A *Cooperia pectinata* mostrou-se em menor frequência, o que nos impede de fazer tais inferências. Já a *Cooperia spatulata*, interessante, foi identificada apenas no indivíduo C. Quanto ao *Haemonchus placei*, foi identificado em todos os animais por ambas as técnicas e, assim como o *Oesophagostomum radiatum*, suas proporções percentuais foram superestimadas pelo “nemabioma”. Observando os dados referentes ao *Haemonchus similis*, este aparece em considerável menor frequência que o par de seu gênero, sendo identificado em apenas 3 animais pelo “nemabioma”, ao passo que, em apenas um indivíduo pela técnica de identificação morfológica dos helmintos adultos. Por fim, o último gênero de nematelmintos trazido por esta tabela, foi o *Trichostrongylus* spp. O *T. axei* apareceu em todos os indivíduos, sempre subestimado percentualmente nas comunidades de L3 pelo “nemabioma”. O *T. colubriformis* apareceu em baixíssima frequência e percentualidade, o que dificulta fazer alusões aos resultados deste parasito.

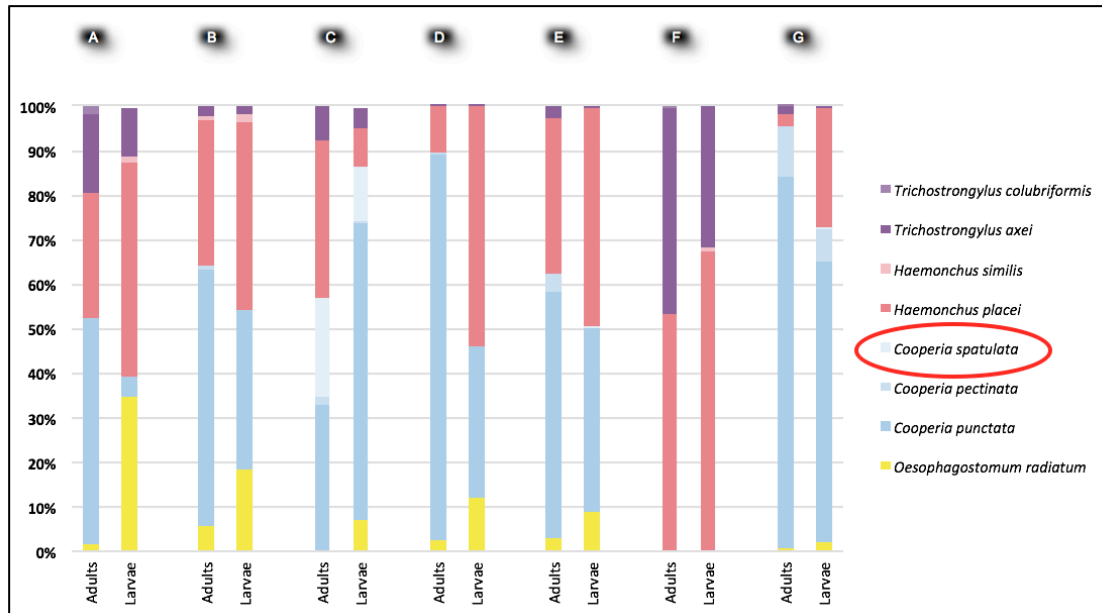


Figura 10. Bioma das L3 reveladas pelo “Nemabioma” e comunidades parasitárias dos nematódeos adultos dos animais A, B, C, D, E, F, e G no dia 28 (agrupados por espécies).

A figura de número 11, nada mais é que a média aritmética dos percentuais de cada parasito identificados por morfologia de adultos e “nemabioma” das L3. Ela é, basicamente, a síntese por meio das médias aritméticas dos dados individuais presentes na tabela 10, anteriormente expressa. De acordo com a tabela 11, nota-se claramente que a proporção do *Oesophagostomum radiatum* e o *Haemonchus placei* são superestimadas nas comunidades das L3 em comparação com as populações dos helmintos adultos. Por outro lado, *Cooperia pectinata* e *Trichostrongylus axei*, são subestimados nas L3, reveladas pelo “nemabioma”. *Cooperia pectinata*, *Cooperia spatulata*, *Haemonchus similis* e *Trichostrongylus colubriformis* aparecem em menos frequência e percentagem e, portanto, não serão comparados por uma técnica ou outra. Nota-se que na carga parasitária no animal, representa por nematódeos adultos, há o predomínio de *Coperia punctata* (52.3%), seguida pelo *Haemonchus placei* (28,2%). Na população de L3, porém, o *Haemonchus placei* representa 42.1% das larvas enquanto a *C.punctata* apenas 35,0% do total. *O.radiatum* passa de 1,9% nos adultos para 11,9% nas larvas e *T.axei* varia de 11,2% para 7,1%.

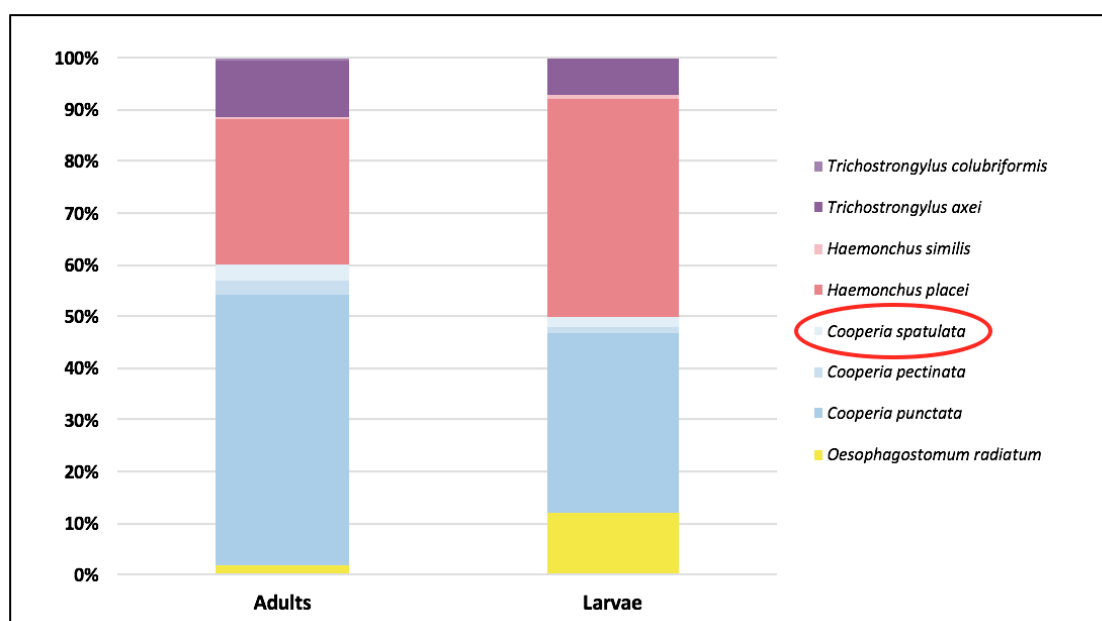


Figura 11. Média aritmética do bioma L3 reveladas pelo “Nemabioma” e média aritmética das comunidades parasitárias dos nematódeos adultos dos animais A, B, C, D, E, F, e G no dia 28 (agrupados por espécies).

5. DISCUSSÃO

5.1. Contagens de OPG e de nematódeos adultos

As contagens de ovos por grama de fezes mantiveram-se pouco variáveis durante toda a fase de coleta das amostras (dias 14 a 28), o que demonstra um certo equilíbrio entre parasito e hospedeiro. O nível de infecção dos animais foi considerado moderado (200-700 OPG) a pesado (>700 OPG). (Ueno & Gonçalves, 1998).

Quanto aos nematódeos adultos recuperados, foram identificadas 10 espécies, o que representa um bioma bastante rico para ser pesquisado, uma vez que dificilmente é encontrado em outras áreas do globo. É dominado essencialmente pela *Cooperia punctata*, seguida pelo *Haemonchus placei*. Os dados corroboram com os achados de em Oliveira (1988), três dos quatro experimentos descritos em Lopes *et al.*, (2014) e com os dados de Silva *et al.*, (2015) Borges 2001, Oliveira 1985. Em menores quantidades, recuperou-se *Cooperia pectinata*, *Cooperia spatulata*, *Haemochnus similis*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Oesophagostomum radiatum*, *Trichuris discolor* e *Dictyocaulus viviparus*.

5.2. Classificação morfológica das larvas e “nemabioma” das L3

Na classificação morfológica das larvas, certa variação nos dados obtidos em uma mesma amostra de datas experimentais seriadas pode ser explicada, em parte, pelo fato de serem analisadas apenas 50 L3. Além disso, os erros humanos podem ser consideráveis, pois o método consiste, basicamente, em avaliar o comprimento da cauda, com a exceção dos pontos refringentes das cooperias (VAN WYK & MAYHEW 2013), que muitas vezes são de difícil identificação. O *Trichostrongylus* spp e o *Oesophagostomum* spp podem, inclusive, ter sido classificados como *Hemonchus* spp. Tal fato justifica-se, pois, no “nemabioma” os dados para estes gêneros, ou melhor, já identificados em espécies, foram mais consistentes. Ressalta-se que, na análise molecular, foram utilizadas 1.000 larvas em vez de apenas 50. O método de sequenciamento genético apresentou grande vantagem frente à análise

molecular, pois, além de nos proporcionar dados mais consistentes, os resultados foram demonstrados de acordo com as espécies em vez do gênero.

5.3. Classificação morfológica dos adultos e “nemabioma” das L3

As análises por meio do novo método “nemabioma” permitiram uma comparação única. Foi a primeira vez que se comparou as comunidades de nematódeos adultos (em espécie) com o bioma de L3 (em espécie). Catto & Ueno (1981) e Girão et al., (1985), já na década de 80 haviam realizado trabalhos de natureza parecida neste país. Ambos consistiram, basicamente, em quantificar e avaliar morfológicamente os nematódeos adultos recuperados de bovinos e as L3 extraídas de coproculturas. O fato das populações de L3 obtidas em coproculturas não refletirem exatamente a proporção dos nematódeos adultos recuperados dos animais intrigou a ciência por muito tempo, mas infelizmente inferências não podiam ser feitas com segurança, uma vez que para L3 falava-se em gênero e para os adultos, em espécies. Ou, seja, não era possível comparar populações de determinado gênero com biomas de determinadas espécies. Para ilustrar, foram confeccionadas duas figuras, de acordo com os dados extraídos dos artigos dos próprios autores. A Figura 12 refere-se aos dados publicados por Catto & Ueno (1981), enquanto a Figura 13 foi elaborada com base nos valores de e Girão et al., (1985).

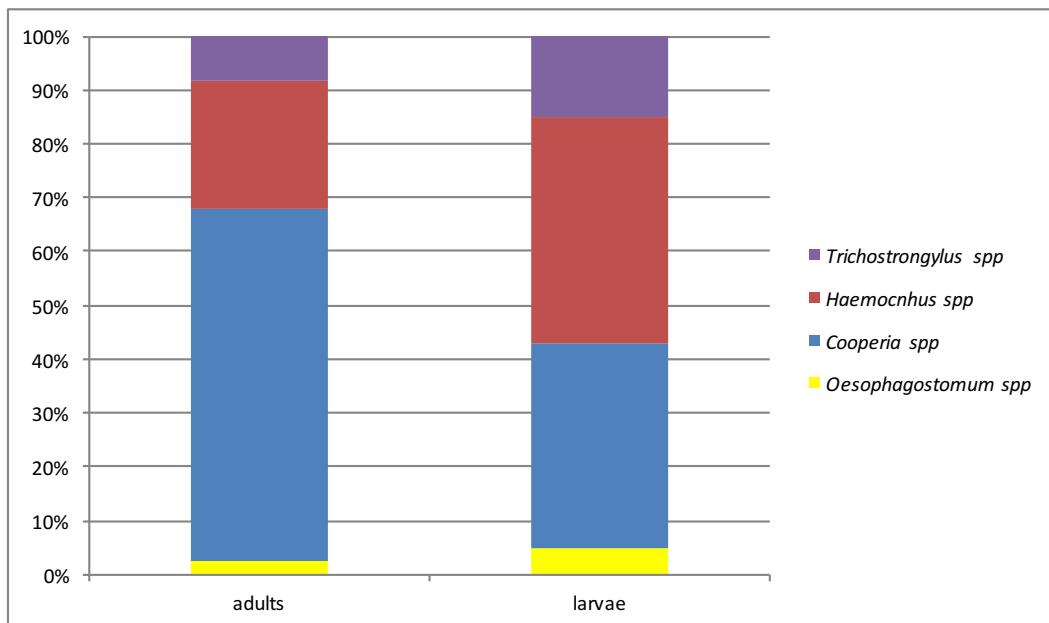


Figura 12. Bioma descrito por Catto & Ueno, Região Centro-Oeste, Brasil, 1981.

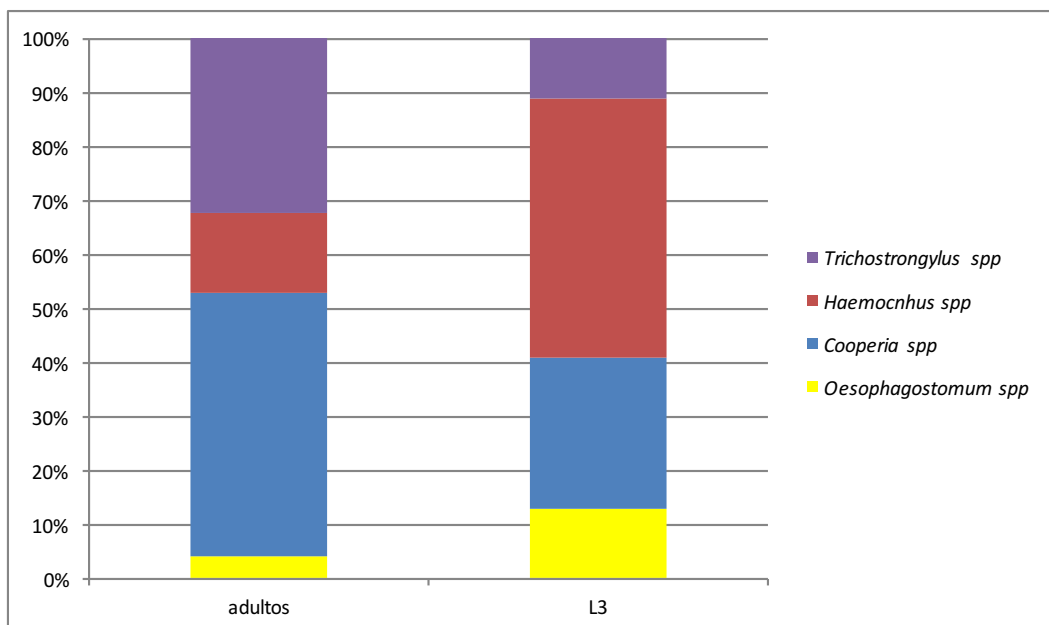


Figura 13. Bioma descrito por Girão et. al., Região Norte, Brasil, 1985.

Em ambas as figuras (12 e 13), nota-se que para a população de nematódeos adultos há predominância da *Cooperia* spp sobre o *Haemonchus* spp. Nas populações de L3, ocorre justamente o oposto, ou seja, a *Cooperia* spp é sub representada quando comparada ao *Haemonchus* spp.

Comparando-se as populações de um mesmo parasita nos adultos com L3, nota-se que o *Haemonchus* spp e *Oesophagostomum* spp são superestimados nas populações de larvas, enquanto a *Cooperia* spp é subestimada.

Todos os resultados acima descritos corroboram com os achados desta pesquisa, demonstrados anteriormente na tabela 11, porém, estratificados em espécies.

Quanto ao *Trichostrongylus* spp, os dados apresentados por Girão et. al (1985) também condizem com os achados desta pesquisa, ou seja, a população de *Trichostrongylus* spp é subestimada na comunidade de L3. No estudo de Catto & Ueno (1981), ele é superestimado, porém, não se especifica qual a espécie do nematódeo, *Trichostrongylus axei* ou *Trichostrongylus colubriformis*.

Com base nos dados referentes ao número médio de ovos de nematódeos produzidos diariamente por suas respectivas fêmeas, apresentados nos quadros 1 e 2 à seguir, podemos afirmar que *Haemonchus placei* e *Oesophagostomum radiatum* são superestimados nas culturas de L3 pois as fêmeas destes helmintos são mais prolíficas quando comparadas às genitoras de *Cooperia punctata* e *Trichostrongylus axei*.

Tabela 1. Número médio de ovos de nematódeos liberados por cada fêmea.
(FAO.ORG)

Gênero	Postura diária de ovos/fêmea/dia
<i>Haemonchus</i>	5.000-15.000
<i>Trichostrongylus</i>	100-200
<i>Cooperia</i>	1000-3000
<i>Ostertagia</i>	100-200
<i>Nematodirus</i>	50-100
<i>Oesophagostomum</i>	5.000 – 10.000
<i>Chabertia</i>	5.000 – 10.000

Tabela 2. Número médio de ovos de nematódeos liberados por cada fêmea.
(UENO & GONÇALVES, 1998)

Gênero	Postura diária de ovos/fêmea/dia
<i>Haemonchus</i>	5.000-10.000
<i>Trichostrongylus</i>	100-200
<i>Cooperia</i>	100-200
<i>Ostertagia</i>	100-200
<i>Nematodirus</i>	50-100
<i>Oesophagostomum</i>	3.000

Um fato curioso é que mesmo as fêmeas de *Haemonchus placei* e *Oesophagostomum radiatum* serem mais prolíficas, estas espécies encontram-se, na maioria das vezes, em menor quantidade nos animais, quando comparadas à *Cooperia punctata*. Dentre diversos questionamentos, dois merecem destaque.

O primeiro seria justificar a sobrevivência destas larvas nas condições ambientais de determinada região. Ou seja, mesmo sendo produzidas e eliminadas no meio ambiente maior quantidade, determinada espécie pode não atingir o seu objetivo de parasitar o hospedeiro pelo fato de suas larvas não resistirem como outras às diversidades climáticas. Com base nesta suposição, investigou-se em literatura a sobrevivência das larvas destas espécies no Brasil.

Catto (1982), estudou a sobrevivência de quatro gêneros de nematódeos parasitas de bovinos no Brasil Central, sendo eles: *Oesophagostomum* spp, *Cooperia* spp, *Haemonchus* spp e *Trichostrongylus* spp. Este autor relatou que, na época crítica do ano (estação seca), as larvas que foram mais resistentes às adversidades climáticas, foram justamente as do gênero *Cooperia* spp. Na estação seca, 66% das L3 recuperadas dos bolos fecais foram do gênero *Cooperia*, 17,3% de *Haemonchus* spp e 16,5% identificadas como *Oesophagostomum* spp. Já as larvas de *Trichostrongylus* spp ocorreram em números inexpressivos.

Reinecke (1960), na África do Sul, observou que as larvas de *Cooperia* spp eram mais adaptadas aos extremos de temperatura e dessecação, apresentando maior capacidade de sobrevivência e migração.

Os dois estudos supracitados explicam, parcialmente, o porquê de, embora as cooperias serem produzidas em menor quantidade, estão em maior proporção no intestino dos bovinos.

Ainda, o fato de as Cooperias apresentarem o período pré-patente mais curto que os demais nematódeos em questão, favorece o seu estabelecimento no hospedeiro mais rapidamente, especialmente no início da estação chuvosa,

uma vez que o desenvolvimento das larvas está intimamente relacionado aos índices pluviométricos (Catto, 1982).

Larvas dos gêneros *Cooperia*, *Haemonchus* e *Oesophagostomum* foram encontradas nas pastagens até 20 cm e entre 20 e 40 cm de distância do bolo fecal. *Cooperia* (60,97%) foi o gênero mais prevalente nas pastagens e *Haemonchus* (42,65%) foi o gênero mais prevalente nas coproculturas. (Dias *et. al.*, 2007).

Outro fator que não pode ser ignorado é o fenômeno tido como especificidade parasitária. Fávero *et al* (2016) ao realizar a primo-infecção em bezerros com *Haemonchus placei* e *Haemonchus contortus* não observou diferenças nas taxas de infecção e nem na produção de ovos pelas fêmeas dos diferentes nematódeos. Já Santos *et al* (2014) comprovou que, em cordeiros, quando são sensibilizados com um primeiro inóculo e depois desafiados novamente com as larvas de *H.placei* e *H.contortus* existe uma maior resposta imunológica (imunoglobulinas e células inflamatórias na mucosa abomasal) dos cordeiros frente ao *H.placei* e, além disso, uma baixíssima taxa de estabelecimento do *H.placei* nestes animais.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o novo ensaio de sequenciamento genético aplicado para larvas em estágio L3 reflete de maneira bastante próxima as proporções L3 em uma comunidade parasitária. Além disso, tem grande vantagem sobre a técnica tradicional de classificação morfológica de larvas em terceiro estágio, por permitir a identificação da espécie e não somente do gênero. Quando o novo ensaio de sequenciamento genético é comparado com a real proporção da comunidade parasitária de nematódeos adultos, *O.radiatum* e *H.placei* são superestimados, enquanto *C.punctata* e *T.axei*, subestimados. Tal fato explica-se, justamente, pelas fêmeas de *O.radiatum* e *H.placei* eliminarem muito mais ovos diariamente que genitoras das espécies *C.punctata* e *T.axei*. Indiscutivelmente, a nova técnica de sequenciamento genético apresentada pela primeira vez no país, veio para preencher lacunas e trazer respostas na pesquisa em Parasitologia Veterinária.

7. BIBLIOGRAFIA

ACHI, Y.L.; ZINSSTAG, J.; YAO, K.; YEO, N.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. Host specificity of *Haemonchus* spp. for domestic ruminants in the savanna in northern Ivory Coast. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.116, p.151-158, 2003.

AMARANTE, A.F.T. Resistência genética a helmintos gastrintestinais. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 4.; 2004, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2004.

AMARANTE, A.F.T.; AMARANTE, M.R.V. Advances in the diagnosis of the gastrointestinal nematode infections in ruminants. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.53, n.2, p.127-137, 2016.

ARANTES, G.J.; SILVA, C.R.; COSTA, J.O.; MARRA, D.B. Atividade antihelmíntica da ivermectina a 1% (solução injetável), no tratamento de 108 bezerros naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v.4, n.2, p.113-116, 1995.

ARAÚJO, J.V. et al. Controle biológico de tricostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) gastrintestinais de bovinos pelo fungo *Monacrosporium sinense*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.56, n.4, p.467-471, 2004.

BIANCHIN, I. et al. **Epidemiologia dos nematódeos gastrintestinais em bovinos de corte nos cerrados e o controle estratégico no Brasil**. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1996. 120p. (Circular Técnica).

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; AVAGYAN, V.; MA, N.; PAPADOPOULOS, J.; BEALER, K.; MADDEN, T.L. BLAST+: Architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, London, v.10, p.421, 2009.

CATO, J.B. Desenvolvimento e sobrevivência de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de bovinos, durante a estação seca, no Pantanal mato-grossense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.17. n.6, p.923-927, 1982.

CATO, J.B.; UENO, H. Nematodioses gastrintestinais em bezerros zebus no pantanal matogrossense. Prevalência, intensidade de infecção e variação estacional **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.16, n.1, p.129-140, 1981.

COOP, R.L.; HOLMES, P.H. Nutrition and parasite interaction. **International Journal of Parasitology**, Amsterdam, v.26, p.951-962, 1996

COSTA, A.J. **Diagnóstico parasitológico em helmintologia**. I. Helmintologia. Jaboticabal: FCAV-UNESP, 2012. 138p.

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. **Nature Protocols**, New York, v.5, n.3, 2010.

CRUZ, G.M. et al. Desempenho de bezerros da raça Nelore e cruzados desmamados recebendo concentrado em pastagem adubada de *Cynodondactylon* cv. Coast cross. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, MG, v.38, n.1, p.139-148, 2009.

DIAS, A.S.; ARAÚJO, J.V. DE; CAMPOS, A.K.; BRAGA, F.R.; FONSECA, T.A. Relação entre larvas recuperadas da pastagem e contagem de ovos por gramas de fezes (opg) de nematóides gastrintestinais de bovinos na microrregião de Viçosa, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v.16, n.1, p.33-36, 2007.

EGWANG, T.G.; SLOCOMBE, J.O.D. Evaluation of the cornell-wisconsin centrifugal flotation technique for recovering trichostrongylid eggs from bovine feces. **Canadian Journal Comparative Medicine**, Ottawa, v.46, p.133-137, 1982.

FAO. **Module 2**. helminths: anthelmintic resistance: diagnosis, management and prevention. Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants. FAO: Roma, 2004. p.78-118.

FERNANDES, L.H. et al. Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.56, n.6, p.733-740, 2004.

FÁVERO, F.C.; BUZZULINI, C.; CRUZ, B. C.; FELIPPELLI, G.; MACIEL, W. G.; SALATTA, B.; TEIXEIRA, W. F. P.; SOARES, V. E.; OLIVEIRA, G. P.; LOPES, W. D. Z.; COSTA, Z. J. Experimental infection of calves with *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus*: Assessment of parasitological parameters. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.217, n.15, p.25-28, 2016.

GASSER, R.B.; CHILTON, N.B.; HOSTE, H.; BEVERIDGE, I. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.21, n.10, p.2525-2526, 1993.

GIRÃO, E. S.; GIRÃO, R. N.; MEDEIROS, L. P. Prevalência, intensidade de infecção e variação estacional de helmintos em bovinos no Estado do Piauí. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.20, n.8, p.889-897, 1985.

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

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. D. S.; BARROS, A. T. M. D.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A.A.P; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio Janeiro, v.23, n.2, p.150-156, 2014.

HAWKINS, J.A. Economic benefits of parasite control in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.46, n.1/4, p.159-173, 1993.

HEWITSON, J.P.; MAIZELS, R.M. Vaccination against helminth parasite infections. **Expert Review Vaccines**, London, v.13, n.4, p.473-478, 2014.

HOLMES, P.H. Pathophysiology of parasitic infections. **Parasitology**, Cambridge, v.94, p.29-51, 1987.

KEITH, R. K. The differentiation of the infective larvae of some common nematode parasites of cattle. **Australian Journal of Zoology**, East Melbourne, v.1, n.1, p.223-235, 1953.

LEVECKE, L.; 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. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.188, n.1/2, p.194-199, 2012.

LEVINE, N.D. **Nematode parasites of domestic animals and of man**. Minneapolis: Burgess, 1968. 600 p.

LOPES, W.D.Z.; FELIPPELLI, G.; TEIXEIRA, W.F.P.; CRUZ, B.C.; MACIEL, W.G.; BUZZULINI, C.; MATOS, L.V.S GOMES, L.V.C.; PEREIRA, J.C.M.; FÁVERO, F.C.; OLIVEIRA, G.P.; COSTA, A.J.. Resistência de *Haemonchus placei*, *Cooperia punctata* e *Oesophagostomum radiatum* à ivermectina pour-on a 500mcg/kg em rebanhos bovinos no Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.5, p.847-853, 2014.

MAGOČ T, SALZBERG SL. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. **Bioinformatics**, Oxford, v.27, n.21, p.2957-2963, 2011.

MOLENTO, M. B. Avanços no diagnóstico e controle das helmintoses em caprinos. In: SIMPAC - SIMPÓSIO PAULISTA DE CAPRINOCULTURA, 1., 2005. **Anais...** Jaboticabal: Multipress, 2005. p.101-110.

NEVES, J.H.; CARVALHO, N.; RINALDI, L.; CRINGOLI, AMARANTE, A.F.T. Diagnosis of anthelmintic resistance in cattle in Brazil: A comparison of different methodologies **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.206, p.216-226, 2014.

AVMA - American Veterinary Medical Association. **Guidelines on Euthanasia**. 2007. 36 p.

OLIVEIRA, G. P. Epidemiologia dos nematódeos gastrintestinais de bovinos leiteiros no município de São Carlos, Estado de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.23, n.2, p.189-195, 1988.

PINHEIRO, A. C.; ALVES-BRANCO, F.P.J.; SAPPER, M.F.M. **Programa básico de orientação para o controle da verminose dos bovinos de corte no Rio Grande do Sul. In: Controle dos principais ectoparasitos e endoparasitos em bovinos de corte no Rio Grande do Sul**. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2000. p.39. (Documentos, 18)

PRICHARD, R.K.; HALL, C.A.; KELLY, J.D.; MARTIN, I.C.A.; DONALD, A.D. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v.56, p.239-231, 1980.

REINECKE, R.K. A field study of some nematode parasites of bovines in a semi-arid area with special reference to their biology and possible methods of prophylaxis. **Onderstepoort of Veterinary Journal Research**, Pretoria, v.28, n.3, p.365-464, 1960.

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

ROEBER, F.; JEX, A.R.; CAMPBELL, A.J.D.; NIELSEN, R.; ANDERSON, G.A.; STANLEY, K.K.; GASSER, R. B. Establishment of a robotic, high-throughput platform for the specific diagnosis of gastrointestinal nematode infections in sheep. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.42, n.13/14, p.1151-1158, 2012.

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.A. von; HARDER, A.; SCHNIEDER, T. Quantitative analysis of ITS2 sequences in trichostrongyle parasites. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.32, n.12, p.1529-1535, 2002.

SANTOS, M.C.; XAVIER, J.K.; AMARANTE, M.R.V.; BASSETTO, C.C.; AMARANTE, A.F.T. Immune response to *Haemonchus contortus* and *Haemonchus*

placei in sheep and its role on parasite specificity. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.203, n.1/2, p.127–138, 2014.

SANTOS, M.C.S.; AMARANTE, M.R.V.; SILVA, M.R.L.; AMARANTE, A.F.T. Differentiation of *Haemonchus placei* from *Haemonchus contortus* by PCR and by morphometrics of adult parasites and third stage larvae. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v.23, n.4, p.495-500, 2014.

SILVA, H. C.; et al. Endectocide activity of a pour-on formulation containing 1.5 per cent ivermectin +0.5 per cent abamectin in cattle. **Veterinary Record Open**, London, v.2, n.1, p.e000072, 2015. doi:10.1136/vetreco-2014- 000072

SCHNIEDER, T.; HEISE, M.; EPE, C. Genus-specific PCR for the differentiation of eggs or larvae from gastrointestinal nematodes of ruminants. **Parasitology Research**, Berlin, v.85, n.11, p.895-898, 1999.

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

VAN WYK, J.A; MAYHEW, E.; Morphological identification on of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide, **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v.80, n.1, p.14, 2013.

VIDOTTO, O. Estratégias de combate aos principais parasitas que afetam os bovinos. In: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2002, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM/CCA/DZO – NUPEL, 2002. p.192-212.

WIMMER, B.; CRAIG, B.H.; PILKINGTON, J.G.; PEMBERTON, J.M. Non-invasive assessment of parasitic nematode species diversity in wild Soay sheep using molecular markers. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.34, n.5, p.625-631, 2004.

WOOD, I.B.; AMARAL, N.K.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J.L.; KASSAI, T.; MALONE, J.B.; PANKAVICH, J.A.; REINECKE, J.K.; SLOCOMBE, O.; TAYLOR, S.M.; VERCRUYSSSE, J. Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.): Second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.58, p.181-213, 1995.