

É Possível Estimar a Eficiência Real dos Anti-helmínticos por Meio de Testes in Vitro?

Magda Vieira Benavides ¹
Alessandro Pelegrine Minho ²

A verminose ovina causa problemas de perda de peso e, em casos extremos, óbito de animais. No intuito de manter os animais sadios, a pergunta mais frequente dos produtores é: com que anti-helmíntico tratar seus animais para resolver o problema da verminose? O medicamento certo para cada propriedade depende de fatores como o histórico de tratamentos dos rebanhos (data/dose/princípio ativo), uma vez que antiparasitários frequentemente usados podem causar a resistência dos parasitos frente ao químico.

Os exames de rotina dos laboratórios de parasitologia veterinária são o OPG (GORDON; WHITLOCK, 1939) e a coprocultura (ROBERTS; O'SULLIVAN, 1950). O primeiro determina o número de ovos de parasitos presentes nas fezes, porém não consegue identificar as espécies de parasitos, o que é possível, sete dias mais tarde, por meio da coprocultura.

Uma técnica de campo, o teste de redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF), usa o OPG para identificar o anti-helmíntico mais recomendado para um determinado rebanho. Trata-se de um teste efetivo, mas laborioso, oneroso e moroso. Por outro lado, técnicas laboratoriais são também capazes de avaliar a resistência de parasitos a princípios ativos, podendo ser realizadas de forma mais rápida e menos onerosa.

Vantagens e desvantagens dos testes de campo e laboratoriais serão, portanto, abordados neste Comunicado Técnico, que tem por objetivo mostrar a técnicos e ovinocultores (a) os fundamentos dos atuais testes de campo para a avaliação dos isolados³ de parasitos de animais de campo como resistentes (ou não) a princípios ativos, e (b) os avanços obtidos com os testes laboratoriais de antiparasitários na esperança de facilitar a identificação do anti-helmíntico mais recomendado, sem a necessidade de testes a campo.

Como é realizada a identificação do anti-helmíntico mais recomendável para seu rebanho?

Existe uma tendência de o produtor rural pensar que aquilo que funciona para o tratamento dos animais do seu vizinho também funciona para a sua propriedade, porém o isolado de parasitos de animais a campo de propriedades vizinhas pode ser diferente, pois são populações de parasitos que foram "expostos" a sucessivos tratamentos com diferentes grupos de princípios ativos. Em outras palavras, é importante que seja avaliada a eficácia do anti-helmíntico no rebanho em questão, a qual é variável em função do: histórico de utilização da droga, número de tratamentos durante o ano, frequência da entrada de novos animais, relevo da propriedade, tipo de pastagem, tipo de criação, manejo sanitário, manejo nutricional, entre outros.

¹ Zootecnista, PhD em Wool Science, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS.

² Médico Veterinário, Pós-Doutor em Sanidade Animal, pesquisador da Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS.

³ O termo isolado de parasitos se refere à população de nematódeos gastrintestinais que acomete um determinado rebanho animal em um determinado período de tempo (todos os vermes que estão na propriedade).

Para saber que princípio ativo é o mais adequado para determinada propriedade rural é necessário realizar o teste de redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF). Este utiliza uma metodologia onde animais de campo são agrupados em tantos grupos quanto o número de anti-helmínticos se deseja testar, além do grupo controle não tratado. Grupos com, aproximadamente, 10 animais cada. Amostras de fezes são coletadas, diretamente da ampola retal, de forma individual, por isso a identificação dos animais é essencial (tatuagem, brinco, tinta ou outras). No laboratório é realizado o exame de contagem de OPG onde o número de ovos de Trichostrongilídeos (família de parasitos de importância veterinária) é denominado como OPG (número de ovos por grama de fezes) do dia zero.

Geralmente, no décimo dia (entre 7 a 14 dias, dependendo dos produtos utilizados e da disponibilidade do produtor), retorna-se à propriedade e coletam-se novamente amostras de fezes dos mesmos animais, individualmente, e no laboratório é realizada nova contagem de ovos. Calcula-se então a redução do número de ovos de parasitos do dia 10 com relação aos do dia zero e, por comparação entre os grupos, é escolhido o anti-helmíntico com maior eficácia para o tratamento dos animais.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
D	D	D	D	sem D
C1	C1	C1	C1	C1
2500	2000	3000	3000	2500
C2	C2	C2	C2	C2
100	1000	1500	3000	2500

Dia 0:
Formação de 4 grupos de 10 animais cada
Identificação individual dos animais
Dosificação (D) dos grupos com 4 princípios ativos diferentes
Coleta de fezes 1 (C1)
Teste de OPG no laboratório
Resultado: OPG inicial

Dia 10:
Coleta de fezes 2 (C2)
Teste de OPG no laboratório
Resultado: OPG final
Cálculo da redução de OPG

Ex: Grupo 1 OPG inicial (média) = 2500
OPG final (média) = 100

$$\frac{2500 - 100}{2500} \times 100 = 96\%$$

Interpretação: Houve uma eficácia de 96% do anti-helmíntico testado no grupo 1, ou seja, o vermífugo usado no Grupo 1⁴ controlará os parasitos de forma eficiente.

Figura 1. Fluxograma do teste de redução de contagem de ovos nas fezes exemplificando teste de 4 anti-helmínticos considerando uma população de 40 animais.

O TRCOF significa que um técnico visite a propriedade duas vezes em um intervalo de 10 dias. No entanto, para cada grupo de princípios ativos deveria ser usado um intervalo diferente (COLES, 2005). No caso dos benzimidazóis: 7-10 dias; no caso dos imidatiázóis: 3-7 dias e no caso das lactonas macrocíclicas (avermectinas): 14-17 dias. Portanto, se for usado o intervalo médio de 10 dias, somente o primeiro grupo teria uma avaliação correta. Por outro lado, torna-se laborioso fazer com que o técnico retorne a propriedade nos dias 7, 10 e 17 (além do dia zero) para obter resultados fidedignos para os três principais grupos de princípios ativos. Na prática, é recomendável que o produtor de ovinos utilize o TRCOF uma vez ao ano (FORTES; MOLENTO, 2013), com o objetivo de monitorar a eficácia dos medicamentos, e substituir o medicamento (princípio ativo) que apresentar percentual abaixo de 80% de eficácia.

Na realidade, o principal alvo deste teste é avaliar o isolado de campo que o produtor possui na sua propriedade, independentemente do número de animais que ele possui no rebanho. Quanto ao número de anti-helmínticos a serem utilizados, na prática, devem ser usados, pelo menos, aqueles em uso na propriedade e o novo princípio ativo a ser testado (planejamento para troca anual de princípio ativo).

Existem técnicas laboratoriais capazes de identificar o melhor anti-helmíntico a ser utilizado?

Uma alternativa aos ensaios in vivo são os testes laboratoriais (ou in vitro) para a detecção de resistência anti-helmíntica a diversos grupos de medicamentos. Prévio ao desenvolvimento destes testes, a única forma de identificar resistência de parasitos a princípios ativos era por meio de infecção de animais, culminando com a necropsia parasitológica dos mesmos, delineamento bastante oneroso.

⁴ A população de parasitos é considerada "resistente" quando a redução do número de OPG é < 95%.

Apesar de poderem ser realizados com um "pool"⁵ de fezes enviado pelo próprio produtor rural (proveniente de uma única coleta), um dos limitantes dos testes in vitro se deve ao fato deles basearem seus resultados em fases de vida livre do parasito (de ovos⁶ a L3, geralmente encontrados no ambiente), ou seja, estágios passíveis de serem obtidos em cultivo no laboratório, a partir de ovos de nematóides coletados das fezes dos animais. No entanto, os medicamentos agem no estômago dos hospedeiros, onde se encontram larvas L4, fêmeas e machos adultos. Apesar de alguns trabalhos mostrarem avanços no cultivo in vitro de estádios larvais além do L3 (STRINGFELLOW, 1986), é percebido entre pesquisadores que estádios mais avançados no ciclo dos parasitos (nematódeos adultos) só podem ser obtidos por meio de coleta direta em animais parasitados após necropsia destes, o que oneraria os exames laboratoriais. A correta avaliação dos produtos ativos, portanto, depende da correlação entre os resultados de L3 e de adultos, fato que só pode ser observado por meio da comparação do TRCOF (a campo) com os de laboratório.

Os métodos in vitro não possuem a interação do efeito do hospedeiro no estabelecimento da infecção parasitária e na variação da farmacodinâmica da droga no organismo animal (CHAGAS et al., 2011). No entanto, os testes laboratoriais in vitro são mais rápidos, mais econômicos e menos trabalhosos do que os in vivo (DEMELE et al., 2012). Os testes laboratoriais mostraram ter um uso promissor em simular o comportamento dos princípios ativos nos parasitos.

Mais recentemente, uma série de testes in vitro foram desenvolvidos. Entre eles:

- A) Eclodibilidade de ovos (LE JAMBRE, 1976)
- B) Paralisia larvar (MARTIN; LE JAMBRE, 1979)
- C) Desenvolvimento larvar (COLES et al., 1988, 1992)
- D) Inibição de alimentação larvar (ÁLVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2005)
- E) Inibição da migração larvar (WAGLAND et al., 1992)

O teste de eclodibilidade de ovos avalia a capacidade dos ovos de parasito se tornarem larvas e o de paralisia larvar estima a percentagem de L3 paralisadas em diluições seriadas de anti-helmínticos, sob condições laboratoriais. Mais recentemente, outras adaptações e padronizações têm sido adicionadas ao repertório de exames parasitológicos usados para testar princípios ativos, como o "teste de desenvolvimento larvar" que mede a capacidade do ovo se desenvolver até L3 sob a ação de determinado anti-helmíntico em cultura contendo *E. coli* como nutriente. Uma versão do teste de desenvolvimento larvar é chamada de DrenchRite⁷ (da *Microbial Screening Technologies*, New South Wales, Australia), usado pela Universidade da Geórgia nos Estados Unidos, que identifica quais são as drogas mais eficientes no campo. Esse ensaio está baseado no teste de desenvolvimento larvar para detectar resistência contra benzimidazóis, imidazotiazóis/tetrahidropirimidinas e avermectinas/milbemicinas. Mais tarde, o teste de desenvolvimento larvar foi capaz de identificar resistência de *H contortus* e *T. colubriformis* a *moxidectina* (KAPLAN et al., 2007), resultados confirmados pelo teste de redução de OPG em estabelecimentos produtores de caprinos.

O teste de inibição da alimentação larvar estima a capacidade do parasito em se alimentar quando está em contato com o princípio ativo, e o "teste de migração larvar" avalia a capacidade de L3 migrarem ativamente por meio de peneiras de nylon com malhas de 25 μ m (no caso de parasitos de ovinos) após a incubação destas com anti-helmínticos. Cada um destes testes mede mecanismos importantes da fisiologia do parasito, dado a que alguns princípios ativos afetam a eclodibilidade, a alimentação, ou a motilidade do parasito.

Seria possível então conciliar os mais recentes conhecimentos acadêmicos em testes parasitológicos com o TRCOF, teste laborioso para saber qual medicamento deva ser usado para determinada população de parasitos no campo?

⁵ O pool é o conjunto de fezes coletadas de vários animais, o qual perfaz uma única amostra. Para a coleta de fezes para realização dos testes in vitro, levar em consideração a última data de tratamento anti-helmíntico do rebanho e o período de carência (eficácia) do produto utilizado.

⁶ Para exemplificar, o ciclo do *Trichostrongylus colubriformis* inicia na forma de ovos (nas fezes), que com temperatura e umidade propícias se transformam em larva estadio 1 (L1, média de 2 dias), estas em L2 (32 dias) que se alimentam de bactérias no bolo fecal a L3. As L3 (em média 32 dias até o estágio de L4) possuem cutícula protetora e também são chamadas de larvas infectantes pois são ingeridas pelo hospedeiro (ANDERSEN et al., 1966), se transformam em L4, posteriormente larvas imaturas e finalmente adultas.

⁷ Disponível em: <<https://www.wormx.info/storeyhowell2012>> .

Tais técnicas laboratoriais estão sendo usadas para avaliar anti-helmínticos in vitro, dispensando, portanto, os testes com animais. No entanto, inexistiu um padrão internacional reconhecido por grupos de parasitologistas que defina que testes devam ser utilizados para simular in vitro um resultado no campo.

A Tabela 1 mostra um resumo de resultados de literatura utilizando vários testes in vitro. Nela pode-se observar que a determinação dos níveis de resistência de *H. contortus* frente ao closantel não foi possível de ser observada por meio dos testes de desenvolvimento larvar (LACEY et al., 1990), paralisia larvar (DOBSON et al., 1986), e de eclodibilidade de ovos (LE JAMBRE, 1976). No entanto, o teste de migração de larvas L3 e L4 de *H. contortus* foi capaz de demonstrar níveis de resistência frente a este princípio ativo (ROTHWELL; SANGSTER, 1993). Este mesmo teste foi ainda capaz de detectar resistência de *H. contortus* frente ao levamisole, tiabendazole e ivermectina.

Os testes de motilidade larvar (GILL et al., 1991), desenvolvimento larvar (GIORDANO et al., 1988; KAPLAN et al., 2007), inibição da alimentação larvar (ÁLVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2005) e migração larvar (DEMELENER et al., 2010) foram efetivos na identificação da resistência de *H. contortus* frente a ivermectina. Sendo que a resistência de *T. colubriformis* e *T. circumcincta* também foi detectada por meio do teste de inibição da alimentação larvar (ÁLVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2005). Por sua vez, a resistência dos parasitos frente a moxidectina foi detectada pelo teste de desenvolvimento larvar para os parasitos *H. contortus* e *T. colubriformis* (KAPLAN et al., 2007) e no de inibição da migração larvar para a resistência de *H. contortus*, *T. colubriformis* e *T. circumcincta* (DEMELENER et al., 2013).

O teste de migração larvar modificado foi exitoso em identificar a resistência de *H. contortus* frente às lactonas macrocíclicas (KOTZE et al., 2006), teste que não teve o mesmo sucesso para os parasitos *T. colubriformis* e *O. circumcincta*.

O teste de paralisia larvar foi capaz de detectar a resistência de *O. circumcincta* frente a levamisole (MARTIN; LE JAMBRE, 1979), bem como o de desenvolvimento larvar (VÁRADY; CORBA, 1999) para os parasitos *H. contortus* e *O. circumcincta*.

Os melhores testes para a detecção da resistência de tiabendazole em *H. contortus* e *O. circumcincta* foram os de eclodibilidade larvar (LE JAMBRE, 1976) e desenvolvimento larvar (VÁRADY; CORBA, 1999). Cabe ressaltar que ainda existem testes bioquímicos e moleculares para a detecção de resistência dos parasitos aos princípios ativos (TAYLOR et al., 1992), mas que são utilizados essencialmente em pesquisa científica, estando ainda, distantes da realidade de serem disponibilizados aos produtores rurais para identificação de resistência anti-helmíntica em isolados de campo.

Diante da revisão realizada quanto ao estado da arte sobre os testes de eficiência do uso de anti-helmínticos, é fundamental a detecção precoce e fidedigna da resistência parasitária na criação de ovinos. Dentro desse contexto, experimentos comparando os resultados de testes de redução de OPG com os testes in vitro são fundamentais para validar se realmente será possível estimar resultados de campo com os observados em testes

Tabela 1. Literatura referente a testes laboratoriais de resistência de parasitos frente a diversos produtos anti-helmínticos.

Parasito	Princípio ativo	Teste	Autor	Resultado
<i>T. circumcincta</i>	Benzimidazole, imidatiazole e lactonas macrocíclicas	Inibição da alimentação larvar	Martínez-Valladares et al. (2012)	+
<i>H. contortus</i>	Closantel	Eclodibilidade de ovos	Le Jambre (1976)	-
<i>H. contortus</i>	Closantel	Paralisia larvar	Dobson et al. (1986)	-
<i>H. contortus</i>	Closantel	Desenvolvimento larvar	Lacey et al. (1990)	-
<i>H. contortus</i>	Closantel, levamisole, Tiabendazole, Ivermectina	Migração larvar	Rothwell e Sangster (1993)	+
<i>T. colubriformis</i>	Ivermectina	Desenvolvimento larvar	Giordano et al. (1988)	+
<i>H. contortus</i>	Ivermectina	Motilidade larvar	Gill et al. (1991)	+
<i>H. contortus, T. colubriformis, T. circumcincta</i>	Ivermectina	Inibição da alimentação larvar	Álvarez-Sánchez et al. (2005)	+
<i>H. contortus</i>	Ivermectina	Migração larvar	Demeler et al. (2010)	+
<i>H. contortus</i>	Ivermectina e moxidectina	Desenvolvimento larvar	Kaplan et al. (2007)	+
<i>H. contortus</i>	Ivermectina e moxidectina	Desenvolvimento larvar	Kaplan et al. (2007)	+
<i>H. contortus, T. colubriformis</i>	Lactonas macrocíclicas	Migração larvar modificada	Kotze et al. (2006)	+
<i>H. contortus</i>	Lactonas macrocíclicas	Migração larvar modificada	Kotze et al. (2006)	-
<i>T. colubriformis</i>	Lactonas macrocíclicas	Migração larvar modificada	Kotze et al. (2006)	-
<i>O. circumcincta</i>	Lactonas macrocíclicas	Migração larvar modificada	Kotze et al. (2006)	-
<i>O. circumcincta</i>	Levamisole	Paralisia larvar	Martin e Le Jambre (1979)	+
<i>H. contortus, T. colubriformis, T. circumcincta</i>	Moxidectina	Inibição da migração larvar	Demeler et al. (2013)	+
<i>H. contortus</i>	Tiabendazole	Eclodibilidade de ovos	Le Jambre (1976)	+
<i>O. circumcincta</i>	Tiabendazole	Eclodibilidade de ovos	Le Jambre (1976)	+
<i>H. contortus</i>	Tiabendazole e levamisole	Desenvolvimento larvar	Várady e Corba (1999)	+

Referências

- ANDERSEN, F. L.; WANG, G. T.; LEVINE, N. D. Effect of temperature on survival of the free-living stages of *Trichostrongylus colubriformis*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 52, n. 4, p. 713-721, Aug. 1966.
- ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, M. A.; GARCÍA, J. P.; BARTLEY, D.; JACKSON, F.; ROJO-VAZQUEZ, F. A. The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 110, n. 1, p. 56-61, May 2005.
- CHAGAS, A. C. S.; NICIURA, S. C. M.; MOLENTO, M. B. (Ed.). **Manual prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2011. 153 p.
- COLES, G. C. Anthelmintic resistance—looking to the future: a UK perspective. **Research in Veterinary Science**, London, v. 78, n. 2, p. 99-108, Apr. 2005.
- COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 44, n. 1-2, p. 35-44, Sept. 1992.
- COLES, G. C.; TRITSCHLER SECOND, J. P.; GIORDANO, D. J.; LASTE, N. J.; SCHMIDT, A. L. Larval development test for detection of anthelmintic resistant nematodes. **Research in Veterinary Science**, London, v. 45, n. 1, p. 50-53, July 1988.
- DEMELE, J.; GILL, J. H.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SANGSTER, N. C. The *in vitro* assay profile of macrocyclic lactone resistance in three species of sheep trichostrongyloids. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, Oxford, v. 3, p. 109-118, Dec. 2013.
- DEMELE, J.; KLEINSCHMIDT, N.; KÜTTLER, U.; KOOPMANN, R.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Evaluation of the egg hatch assay and the larval migration inhibition assay to detect anthelmintic resistance in cattle parasitic nematodes on farms. **Parasitology International**, Tokyo, v. 61, n. 4, p. 614-618, Dec. 2012.
- DEMELE, J.; KÜTTLER, U.; EL-ABDELLATI, A.; STAFFORD, K.; RYDZIK, A.; VARADY, M.; KENYON, F.; COLES, G.; HÖGLUND, J.; JACKSON, F. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 174, n. 1, p. 58-64, Nov. 2010.
- DOBSON, R. J.; DONALD, A. D.; WALLER, P. J.; SNOWDON, K. L. An egg-hatch assay for resistance to levamisole in trichostrongyloid nematode parasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 19, n. 1-2, p. 77-84, Jan. 1986.
- FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 33, n. 12, p. 1391-1402, dez. 2013.
- GILL, J. H.; REDWIN, J. M.; VAN WYK, J. A.; LACEY, E. Detection of resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 7, p. 771-776, Nov. 1991.
- GIORDANO, D. J.; TRITSCHLER, J. P.; COLES, G. C. Selection of ivermectin-resistant *Trichostrongylus colubriformis* in lambs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 139-148, Dec. 1988.
- GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, Jena, v. 12, n. 1, p. 50-52, 1939.
- KAPLAN, R. M.; VIDYASHANKAR, A. N.; HOWELL, S. B.; NEISS, J. M.; WILLIAMSON, L. H.; TERRILL, T. H. A novel approach for combining the use of *in vitro* and *in vivo* data to measure and detect emerging moxidectin resistance in gastrointestinal nematodes of goats. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 37, n. 7, p. 795-804, June 2007.
- KOTZE, A. C.; LE JAMBRE, L. F.; O'GRADY, J. A modified larval migration assay for detection of resistance to macrocyclic lactones in *Haemonchus contortus*, and drug screening with Trichostrongylidae parasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, n. 3, p. 294-305, Apr. 2006.
- LACEY, E.; REDWIN, J. M.; GILL, J. H.; DEMARGHERITI, V. M.; WALLER, P. J. A larval development assay for the simultaneous detection of broad spectrum anthelmintic resistance. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PARASITOLOGY, 7., 1990, Paris. **Proceedings...** Rahway: MSD Agvet, 1990. p. 177-184.
- LE JAMBRE, L. F. Egg hatch as an *in vitro* assay of thiabendazole resistance in nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 2, n. 4, p. 385-391, Dec. 1976.
- MARTIN, P. J.; LE JAMBRE, L. F. Larval paralysis as an *in vitro* assay of levamisole and morantel tartrate resistance in *Ostertagia*. **Veterinary Science Communications**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 159-164, Jan. 1979.
- MARTÍNEZ-VALLADARES, M.; FAMULARO, M. R.; FERNÁNDEZ-PATO, N.; CORDERO-PÉREZ, C.; CASTAÑÓN-ORDÓÑEZ, L.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A. Characterization of a multidrug resistant *Teladorsagia circumcincta* isolate from Spain. **Parasitology Research**, New York, v. 110, n. 5, p. 2083-2087, May 2012.
- ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 1, n. 1, p. 99-102, 1950.
- ROTHWELL, J. T.; SANGSTER, N. C. An *in vitro* assay utilizing parasitic larval *Haemonchus contortus* to detect resistance to closantel and other anthelmintics. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 573-578, Aug. 1993.
- STRINGFELLOW, F. Cultivation of *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) from infective larvae to the adult male and the egg-laying female. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 72, n. 2, p. 339-345, Apr. 1986.
- TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 103, n. 3, p. 183-194, Jan. 2002.
- VÁRADY, M.; ČORBA, J. Comparison of six *in vitro* tests in determining benzimidazole and levamisole resistance in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* of sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 80, n. 3, p. 239-249, Jan. 1999.
- WAGLAND, B. M.; JONES, W. O.; HRIBAR, L.; BENDIXSEN, T.; EMERY, D. L. A new simplified assay for larval migration inhibition. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 8, p. 1183-1185, Dec. 1992.

Comunicado Técnico, 97

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Pecuária Sul

Endereço: BR 153, km 632,9 Caixa Postal 242,
96401-970 - Bagé, RS

Fone: (53) 3240-4650

Fax: (53) 3240-4651

www.embrapa.br/pecuaria-sul

www.embrapa.br/fale-conosco/sac



1ª edição

Publicação digitalizada (2017)

Comitê de Publicações

Presidente: *Fernando Flores Cardoso*

Secretária-Executiva: *Márcia Cristina Teixeira da Silveira*

Membros: *Bruna Pena Sollero, Elisa Köhler Osmari, Estefania Damboriarena, Fabiane Pinto Lamego, Graciela Olivella Oliveira, Jorge Luiz Sant'Anna dos Santos, Robert Domingues, Sérgio de Oliveira Jüchem.*

Suplentes: *Henry Gomes de Carvalho, Marcos Jun Iti Yokoo*

Expediente

Supervisor editorial: *Lisiane Brisolara*

Revisor de texto: *Felipe Rosa*

Normalização bibliográfica: *Graciela Olivella Oliveira*

Editoração eletrônica: *Murilo Gonçalves*