

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

FRANCISCA FLÁVIA DA SILVA

Resistência anti-helmíntica e controle biológico de nematódeos  
gastrintestinais de ovinos em ambiente semiárido

PATOS-PB

2018

FRANCISCA FLÁVIA DA SILVA

Resistência anti-helmíntica e controle biológico de nematódeos  
gastrintestinais de ovinos em ambiente semiárido

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
da Universidade Federal de Campina  
Grande como requisito parcial para a  
obtenção do título de Mestre em Medicina  
Veterinária.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Célia Rodrigues Athayde

Orientadora

Prof. Dr. Vinícius Longo Ribeiro Vilela

Coorientador

Patos/PB

2018

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA  
UFCG**

S586r Silva, Francisca Flávia da

Resistência anti-helmíntica e controle biológico de nematódeos gastrintestinais de ovinos em ambiente semiárido / Francisca Flávia da Silva. – Patos, 2018.

75f.: il.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2018.

"Orientação: Prof. Dra. Ana Célia Rodrigues Athayde."

"Coorientação: Prof. Dr. Vinícius Longo Ribeiro Vilela ."

Referências.

1. Alginato de sódio. 2. Controle biológico. 3. Fungos nematófagos. 4. *Haemonchussp.* 5. Vermífugo. I. Título.

CDU 614: 619

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA


FRANCISCA FLÁVIA DA SILVA

**Mestranda**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

APROVADO EM 27/02/2018

EXAMINADORES:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Marcia Almeida de Melo  
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG  
Presidente (Substituta)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Thaís Ferreira Feitosa

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Vinícius Longo Ribeiro Vilela

## **AGRADECIMENTOS**

Principalmente a Deus por ter me dado saúde e força diante das dificuldades que vivi durante esta longa jornada.

À minha mãe que esteve em oração durante minhas viagens para desenvolver este trabalho, pela educação repassada, pelo amor incondicional e a confiança em mim depositada, ela sempre acreditou que seria possível.

À minha família por ter contribuído, diretamente ou indiretamente, para que eu chegasse até aqui.

Agradeço a todos do Laboratório de Parasitologia do Instituto Federal da Paraíba que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, a exemplo de Hermano Manoel, este esteve do meu lado em todas as etapas do projeto.

Ao professor Vinicius Longo, que aceitou me orientar de braços abertos.

À Maira Severiano, que me ajudou nos momentos difíceis dessa caminhada.

Por fim, a todos os professores, alunos e amigos que fizeram parte deste projeto.

Muito obrigada!

*A Deus, por sempre guiar o meu caminho.*

*A minha mãe, Fátima, pelas orações e*

*esforços para a realização dos meus sonhos.*

**DEDICO**

*O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos no mínimo fará coisas admiráveis (Jose de Alencar).*

## SUMÁRIO

### LISTA DE TABELAS E FIGURAS

<b>1.RESUMO.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 ABSTRACT .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>13</b>
<b>1.3 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>15</b>
<b>2. CAPÍTULO I: Primeiro relato de resistência ao Monepantel em rebanhos de ovinos naturalmente infectados no Brasil: multirresistência de nematódeos a cinco classes de anti-helmínticos. Submetido à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.....</b>	<b>16</b>
2.1 Resumo .....	17
2.2 Abstract .....	19
2.2 Introdução .....	20
2.3 Material e Métodos .....	21
2.4 Resultado .....	22
2.5 Discussão .....	23
2.6 Conclusão .....	25
2.7 Referências .....	26
<b>3. CAPÍTULO II: Influência do tempo de estocagem de péletes de <i>Monacrosporium thaumasium</i> sobre a predação de formas infectantes de nematódeos gastrintestinais de ovinos. Submetido á Veterinary Research Communications.....</b>	<b>34</b>
3.1 Resumo .....	35
3.2 Introdução .....	37
3.3 Material e Métodos .....	38
3.4 Resultado e Discussão .....	39
3.5 Conclusão .....	40
3.6 Referências .....	41
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>5 ANEXO .....</b>	<b>47</b>



## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 1-** Fazendas de ovinos georeferenciadas da região do Sertão, estado da Paraíba, Brasil.....29

**Tabela 1-** Eficácia de anti-helmínticos sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos no Semiárido da Paraíba, Brasil.....30

**Tabela 2** – Percentual de propriedades por categoria de eficácia de anti-helmínticos sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos no Semiárido da Paraíba, Brasil, de acordo com a Portaria nº 48/1997 do MAPA.....31

**Tabela 3** - Número de anti-helmínticos insuficientemente ativos (eficácia <80%) de acordo com a área e taxa de lotação de propriedades produtoras de ovinos no semiárido paraibano.....32

**Tabela 4** - Espécies de nematódeos gastrintestinais recuperados de ovinos submetidos a TRCOF para Monepantel no semiárido da Paraíba, Brasil.....33

### CAPÍTULO II

**Figura 1** - Médias e percentual de redução de larvas infectantes de tricostrongilídeos de ovinos recuperadas de coproculturas do Grupo I: péletes com *M. thaumasium* - 3 anos de estocagem; Grupo II: péletes com *M. thaumasium* - recém-produzidos; Grupo III: péletes sem fungos; e Grupo IV, não recebeu péletes, controle. Letras distintas no mesmo intervalo de tempo diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.....44

**Tabela 1** - Porcentagem de larvas infectantes de tricostrongilídeos de ovinos recuperadas de coproculturas do Grupo I: péletes com *M. thaumasium* - 3 anos de estocagem; Grupo II: péletes com *M. thaumasium* - recém-produzidos; Grupo III: péletes sem fungos; e Grupo IV, não recebeu péletes, controle.....45

## RESUMO

No capítulo I, o objetivo do trabalho foi avaliar a ação do Monepantel e outros anti-helmínticos sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos do Semiárido da Paraíba. O segundo trata-se da influência do tempo de estocagem de três anos de péletes de *M. thaumasium* sobre a predação de larvas infectantes de tricostrongilídeos de ovinos. O primeiro estudo foi desenvolvido em 20 propriedades, onde utilizamos 30 ovinos de cada propriedade sem tratamento anti-helmíntico a pelo menos três meses. Os animais foram divididos em cinco grupos: grupo I, tratados com 2,0 mL / 10 kg de Albendazol 10%; grupo II, tratados com 2,5 mL / 10 kg de Ivermectina 0,08%; grupo III, tratado com 1,0 mL / 10 kg de Closantel 10%; grupo IV, tratado com 1,0 mL / 10 kg de Cloridrato de Levamisole 5%; e o grupo V, tratados com 1,0 mL / 10 kg de Monepantel 2,5%. Amostras fecais foram coletadas nos dias zero e dez para realização das análises fecais. Para avaliar a resistência, aplicou-se o teste de redução na contagem de ovos por grama de fezes (RCOF) e a coprocultura. Foi observada a multirresistência em todas as propriedades avaliadas, onde 95% das fazendas tinham alta resistência ao Albendazol, 85% à Ivermectina, 80% ao Closantel, 40% ao Levamisole e 45% ao Monepantel. O segundo TRCOF para Monepantel foi realizado quatro meses após o primeiro na propriedade 15, onde o vermífugo foi ineficaz, resultando em eficácia de 75%. Duas ovelhas foram eutanaziadas e necropsiadas, e *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Oesophagostomum columbianum* e *Trichuris ovis* foram recuperados. O segundo estudo foi realizado no Instituto Federal da Paraíba, campus Sousa, Foram utilizados oito ovinos com OPG negativo, divididos em quatro grupos experimentais: Grupo I, 3g/10 kg de p.v de péletes de *M. thaumasium* – 36 meses de estocagem, dose única; Grupo II, 3g/ 10 kg de péletes de *M. thaumasium* - recém produzidos, dose única; Grupo III, 3g/10 kg p.v, de péletes sem fungos; Grupo IV, controle. A cada 24h, até 120 h, as fezes dos animais foram coletadas e enviadas ao Laboratório de Parasitologia Veterinária para realização das análises. Foram pesadas 15 gramas de fezes de cada animal e acrescentadas cinco gramas de vermiculite expandida, procedidas as coproculturas e adicionadas 1000 larvas infectantes (L3) de tricostrongilídeos de ovinos, sendo a recuperação larval realizada após sete dias. Observou-se que a predação de larvas no Grupo I (*M. thaumasium* - 36 meses) não diferiu estatisticamente ( $p>0,01$ ) do Grupo II (*M. thaumasium* – recente), apresentando respectivamente reduções de 75 e 79%. Ambos os grupos acrescentaram pico de predação larvas às 72h. O gênero de helminto mais recuperado nas coproculturas foi *Haemonchus* sp. Concluiu-se que os nematódeos gastrintestinais de ovinos estão resistentes ao monepantel e que foi frequente a ocorrência de multirresistência a anti-helmínticos por esses nematódeos. Concluiu-se que o período de estocagem de 3 anos de *M. thaumasium* na matriz de alginato não influenciou a eficácia da predação de larvas de tricostrongilídea de ovelhas, com alta redução da recuperação larval e presença de atividade fúngica nas fezes até 96 horas após administração aos animais.

**PALAVRAS - CHAVE:** Alginato de sódio; controle biológico; fungos nematófagos; *Haemonchus* sp.; Vermífugo.

## ABSTRACT

In Chapter I, the objective of this study was to evaluate the action of Monepantel and other anthelmintics on gastrointestinal nematodes of sheep of the Paraíba Semi-arid. The second is the influence of the three-year storage time of *M. thaumasium* pellets on the predation of infective larvae of trichostrongilide sheep. The first study was developed in 20 properties, where we used 30 sheep from each farm without anthelmintic treatment for at least three months. The animals were divided into five groups: group I, treated with 2.0 mL / 10 kg of 10% Albendazole; group II, treated with 2.5 ml / 10 kg Ivermectin 0.08%; Group III treated with 1.0 mL / 10 kg of 10% Closantel; Group IV, treated with 1.0 mL / 10 kg of 5% Levamisole Hydrochloride; and group V treated with 1.0 mL / 10 kg of 2.5% Monepantel. Fecal samples were collected at days zero and ten to perform fecal analyzes. To evaluate the resistance, the reduction test was applied in egg count per gram of feces (RCOF) and coproculture. Multiresistance was observed in all the properties evaluated, where 95% of the farms had high resistance to Albendazole, 85% to Ivermectin, 80% to Closantel, 40% to Levamisole and 45% to Monepantel. The second TRCOF for Monepantel was performed four months after the first one at property 15, where the vermifuge was ineffective, resulting in 75% efficacy. Two sheep were euthanized and necropsied, and *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Oesophagostomum columbianum* and *Trichuris ovis* were recovered. The second study was carried out at the Federal Institute of Paraíba, Sousa campus. Eight negative OPG sheep were divided into four experimental groups: Group I, 3g / 10kg of pellets of *M. thaumasium* - 36 months of storage, dose only; Group II, 3g / 10 kg of *M. thaumasium* pellets - freshly produced, single dose; Group III, 3g / 10 kg p.v, of pellets without fungi; Group IV, control. Every 24 hours, up to 120 h, the faeces of the animals were collected and sent to the Veterinary Parasitology Laboratory for analysis. Fifteen grams of feces from each animal were weighed and five grams of expanded vermiculite were added, the coprocultures were added and 1000 infective larvae (L3) of trichostrongilídeos of ovinos, being the larval recovery realized after seven days. It was observed that the predation of larvae in Group I (*M. thaumasium* - 36 months) did not differ statistically ( $p > 0.01$ ) from Group II (*M. thaumasium* - recent), respectively presenting reductions of 75 and 79%. Both groups added peak predation to larvae at 72 h. The genus of helminth most recovered in coprocultures was *Haemonchus* sp. It was concluded that the gastrointestinal nematodes of sheep are resistant to monepantel and that the occurrence of multi-resistance to anthelmintic by these nematodes was frequent. It was concluded that the 3-year storage period of *M. thaumasium* in the alginate matrix did not influence the efficacy of predation of sheep trichostrongilide larvae with high reduction of larval recovery and presence of fungal activity in the feces up to 96 hours after administration animals.

**KEY - WORDS:** Sodium alginate; biological control; nematophagous fungi; *Haemonchus* sp.; Vermifuge.

## INTRODUÇÃO GERAL

A ovinocultura é uma atividade econômica realizada em quase todos os continentes, sobre vários tipos de vegetação e vegetais, mas é de valor significativo somente em alguns países e, na maioria dos casos, é desenvolvida de forma empírica e extensiva.

O Brasil tem um rebanho de mais de 16,2 milhões de ovelhas e 56,8% estão concentrados na região nordeste do país. O estado da Paraíba ocupa o quinto lugar, com 442 589 ovelhas (IBGE, 2009). O cultivo de ovinos na região semiárida do Nordeste do Brasil é focado em carne e produção de couro e é economicamente afetada por altas taxas de mortalidade, geralmente associadas à helmintose gastrointestinal (LIMA et al., 2010).

Apesar de numericamente expressivo, o rebanho ovino da região Nordeste mantém índices produtivos ainda baixos em função de vários fatores, dentre eles as helmintoses gastrintestinais. Estas enfermidades são responsáveis por elevadas perdas econômicas devido à redução no consumo de alimentos, perda de peso, crescimento retardado, baixa fertilidade, queda na produção de leite e, nos casos de infecções maciças, mortalidade acentuada (LIMA, et al., 2010).

Vários anti-helmínticos vêm sendo utilizados no tratamento de nematódeos, sendo o Monepantel o fármaco mais recente no combate a essas verminoses. Este pertence a uma nova classe de anti-helmíntico, os derivados de Amino-Acetonitrila (DAA), o qual age em parasitos gastrointestinais resistente a todos os agentes anti-helmínticos clássicos, segundo Ducray et al. (2008). Diversas pesquisas avaliando estratégias alternativas ao controle parasitário vêm sendo desenvolvidas no Brasil e no mundo, a exemplo do uso de fungos nematófagos altamente eficazes no controle das larvas no pasto (SILVEIRA et al., 2017; VILELA et al., 2012; VILELA et al., 2013).

Após a administração dos fungos, estes passam pelo trato gastrintestinal e são eliminados juntos com as fezes no meio ambiente, onde colonizam o bolo fecal, estabelecendo contato com as larvas eclodidas, produzindo armadilhas que as leva à morte, diminuindo assim a quantidade de larvas infectantes na pastagem, impedindo a reinfecção dos animais (SILVA et al., 2009), entretanto não disponíveis atualmente no mercado.

Esta dissertação é composta por dois capítulos constituídos por artigos científicos originais. O primeiro, enviado à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, qualis CAPES A2, descreve o primeiro relato de resistência ao Monepantel em rebanhos de ovinos naturalmente infectados no Brasil e a multirresistência de nematódeos a cinco classes de anti

helmínticos. O segundo artigo será enviado a *Veterinary Research Communications*, qualis CAPES B1, e descreve a influência do tempo de estocagem de péletes de *Monacrosporium thaumasium* sobre a predação de formas infectantes de nematódeos gastrintestinais de ovinos.

## REFERÊNCIAS

- DUCRAY, P., GAUVRY, N., PAUTRAT, F., GOEBEL, T., FRUECHTEL, J., DESAULES, Y., SCHORDERET WEBER, S., BOUVIER, J., WAGNER, T., FROELICH, O., KAMINSKY, R. Discovery of amino-acetonitrile derivatives, a new class of synthetic anthelmintic compounds. **Veterinary Parasitology**, v 18, p. 2935–2938, 2008.
- LIMA, W. C., ATHAYDE, A. C. R., MEDEIROS, G. R., LIMA, D. A. S. D., BORBUREMA, J. B., SANTOS, E. M., VILELA, V. L. R., AZEVEDO, S. S. Nematóides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 1002-1009, 2010.
- SILVA, A. R., ARAÚJO, J. V., BRAGA, F. R., FRASSY, L. N., TAVELA, A. O., CARVALHO, R. O., CASTEJON, F. V. Biological control of sheep gastrointestinal nematodiasis in a tropical region of southeast of Brazil with the nematode predatory fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium*. **Parasitology Research**, v. 105, p. 1707-1713, 2009.
- SILVEIRA, W. F., OLIVEIRA, G. D., BRAGA, F. R., CARVALHO, L. M., DOMINGUES., SILVA, L. A., ZANUNCIO, J. C., ARAÚJO, J. V. Predation rate of nematophagous fungi after passing through the gastrointestinal tract of goats. **Small Ruminant Research**, v. 147, p. 101-105, 2017.
- VILELA, V.L.R., FEITOSA, T.F., BRAGA, F.R., ARAÚJO, J.V., LUCENA, S.C., DANTAS, E.S., ATHAYDE, A.C.R., SILVA, W.W. Efficacy of *Monacrosporium thaumasium* in the control of goat gastrointestinal helminthiasis in a semi-arid region of Brazil. **Parasitology Research**, v. 112, p. 871–877, 2013.
- VILELA, V.L.R., FEITOSA, T.F., BRAGA, F.R., ARAÚJO, J.V., SOUTO, D.V.O., SANTOS, H.E.S., SILVA, G.L.L., ATHAYDE, A.C.R. Biological control of goat gastrointestinal helminthiasis by *Duddingtonia flagrans* in a semi-arid region of the northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 127–133, 2012.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. *Epi Info* [online]. 2009 [cited 2012 Mar 08]. Available from: <http://www.ibge.gov.br>

## **CAPÍTULO I**

**Primeiro relato de resistência ao Monepantel em rebanhos de ovinos naturalmente infectados no Brasil: multirresistência de nematódeos a cinco classes de anti-helmínticos**

Manuscrito submetido à  
Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária



## **Primeiro relato de resistência ao Monepantel em rebanhos de ovinos naturalmente infectados no Brasil: multirresistência de nematódeos a cinco classes de anti-helmínticos**

Francisca Flávia da Silva<sup>1</sup>, Hermano Manoel Francisco Figueiredo Bezerra<sup>2</sup>, Ana Célia Rodrigues Athayde<sup>2</sup>, Vinícius Longo Ribeiro Vilela<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), CEP: 58.108-110, Patos-PB, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária, Instituto Federal da Paraíba (IFPB), CEP: 58800-970, Sousa-PB, Brasil.

\* Corresponding author. Tel: +55 83 3422 2214; fax: +55 83 3422 2246. E-mail: [vilelavlr@yahoo.com.br](mailto:vilelavlr@yahoo.com.br)

### **RESUMO**

Este estudo objetivou avaliar a ação do Monepantel e outros anti-helmínticos sobre nematódeos gastrintestinais de carneiro do Semiárido da Paraíba, Nordeste do Brasil. O experimento foi desenvolvido no período de julho a dezembro de 2016, e o Teste de redução da contagem de ovos fecais (FECRT) foi realizado em 20 propriedades. Em cada propriedade foram escolhidos 30 animais sem tratamento anti-helmíntico a pelo menos três meses. Os animais foram divididos em cinco grupos contendo seis animais cada: grupo I, tratados com 2,0 mL / 10 kg de Albendazol 10%; grupo II, tratados com 2,5 mL / 10 kg de Ivermectina 0,08%; grupo III, tratado com 1,0 mL / 10 kg de Closantel 10%; grupo IV, tratado com 1,0 mL / 10 kg de Cloridrato de Levamisole 5%; e o grupo V, tratados com 1,0 mL / 10 kg de Monepantel 2,5%. Todos os tratamentos foram administrados por via oral como uma dose única. Amostras fecais foram coletadas nos dias zero e dez dias após os tratamentos para realização das análises fecais. Para avaliar a resistência, aplicou-se o teste de redução na contagem de ovos por grama de fezes (RCOF) e o cultivo de larvas de helmintos. Foi observada a multirresistência em todas as propriedades avaliadas, onde 95% das fazendas tinham alta resistência ao Albendazol, 85% à Ivermectina, 80% ao Closantel, 40% ao Levamisole e 45% ao Monepantel. O helminto mais prevalente nas coproculturas foi o *Haemonchus* spp. O segundo TRCOF para Monepantel foi realizado quatro meses após o primeiro na propriedade 15, onde o vermífugo foi ineficaz, resultando em eficácia de 75%. Duas ovelhas (nº 4 e nº 12), com idade aproximada de dez

meses, foram eutanaziadas e necropsiadas, e *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Oesophagostomum columbianum* e *Trichuris ovis* foram recuperados. Concluiu-se que os nematódeos gastrintestinais de ovinos já estão resistentes ao monepantel em criações brasileiras localizadas no Semiárido do Estado da Paraíba, especialmente *Haemonchus contortus*.

**PALAVRAS-CHAVE:** derivado de amino-acetonitrilo; *Haemonchus contortus*; cultivo de ovelhas; FECRT; vermífugo.

**First report of monepantel resistance in naturally infected sheep herds in Brazil:  
nematode resistance to five anthelmintics classes**

**ABSTRACT**

This study aimed to evaluate the action of monepantel and other anthelmintics on sheep gastrointestinal nematodes from the semi-arid region of Paraíba, Northeastern Brazil. The experiment was conducted from July to December 2016, and the Fecal Egg Count Reduction Test (FECRT) was carried out on 20 properties. In each herd, 30 animals were selected without anthelmintic treatment during the last 3 months, and were divided into five groups containing six animals each: group I, treated with 2.0 mL/10 kg albendazole 10%; group II, treated with 2.5 mL/10 kg ivermectin 0.08%; group III, treated with 1.0 mL/ 10 kg closantel 10%; group IV, treated with 1.0 mL/10 kg levamisole hydrochloride 5%; and group V, treated with 1.0 mL/ 10 kg monepantel 2.5%. All treatments were administered orally as a single dose. Fecal samples were collected on days zero and 10 after treatment, to perform fecal analyses. To evaluate the resistance, the FECRT and coprocultures were performed. Multiresistance was observed in all the properties evaluated; 95% of the farms had high resistance to albendazole, 85% to ivermectin, 80% to closantel, 40% to levamisole, and 45% to monepantel. The genus of helminth most prevalent in coprocultures was *Haemonchus* spp. On property 15, where monepantel was ineffective, a second FECRT for this vermifuge was carried out 4 months after the first, resulting in 75% efficacy. Immediately after the FECRT result, two ewes (4 and 12) were euthanized and necropsied, and *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Oesophagostomum columbianum*, and *Trichuris ovis* were recovered. It was concluded that the resistance of sheep gastrointestinal nematodes, especially *Haemonchus contortus*, to antihelmintics, including monepantel, is high.

**KEYWORDS:** amino-acetonitrile derivative; *Haemonchus contortus*; farming sheep; FECRT; vermifuge.

## INTRODUÇÃO

A ovinocultura ocupa lugar de destaque no Nordeste brasileiro, onde os produtores utilizam seus produtos e subprodutos na alimentação e no comércio, gerando estabilidade e desenvolvimento para a região. No entanto, diversos fatores restringem a produção e a produtividade desses animais, dentre eles problemas nutricionais, práticas de manejo inadequadas no tocante à higiene sanitária, em especial, as más condições de higiene que favorecem o aumento da população de parasitos gastrintestinais, dentre eles, *Haemonchus contortus* que é considerado o parasito de maior importância epidemiológica pela sua alta resistência a anti-helmínticos (IDRIS et al., 2012).

A principal forma de controlar as doenças parasitárias é feita pelo uso de compostos químicos de amplo espectro de atuação, na maioria das vezes os produtores administram os anti-helmínticos de forma empírica (CEZAR et al., 2010). Dentre os fármacos mais utilizados para o controle parasitário destacam-se os grupos dos Benzimidazóis (Albendazole, Fenbendazole e Oxfendazole), Milbemicinas (Moxidectina), Avermectinas (Ivermectina); Imidazotiazoles (Cloridrato de Levamisole) e Salicilanilidas (Closantel sódico) (BORGES, 2003; VIEIRA et al., 2013). Relatórios de *H. contortus* multirresistente a todos estes agentes anti-helmínticos foram particularmente alarmantes na Nova Zelândia (SUTHERLAND et al., 2008) e no Semiárido do Estado da Paraíba (LIMA et al., 2010; MELO et al., 2013; VILELA et al., 2016).

A utilização irracional de anti-helmínticos vem contribuindo para a resistência dos endoparasitos gastrintestinais de pequenos ruminantes, cujas drogas em sua maioria estão disponíveis no mercado. O Monepantel, por sua vez, pertence a uma nova classe de anti-helmínticos, os derivados de Amino-Acetonitrila (DAA), o qual age em parasitos gastrintestinais resistentes a todos os agentes anti-helmínticos clássicos, segundo Ducray et al. (2008). De acordo com a pesquisa realizada por Baker et al. (2012), o Monepantel apresentou eficácia de 100% em relação a combinação dos anti-helmínticos Abamectin + levamisole + oxfendazole que apresentou 40% de eficácia contra *H. contortus* multiresistentes em ovinos. Já Mederos; Ramos; Banchemo et al. (2014) e Van den Brom et al. (2015) observaram resistência precoce em rebanhos de ovinos do Uruguai e Holanda, respectivamente, envolvendo *Haemonchus contortus*. Da mesma forma, Martins et al. (2017) observaram que helmintos de ovinos já estão resistentes ao Monepantel em criações brasileiras localizadas no estado de São Paulo, especialmente o *Haemonchus contortus*.

Todavia, não havia estudos no Brasil que avaliassem a eficácia do Monepantel em diferentes rebanhos de ovinos. Diante disso, o presente estudo teve por objeto avaliar a ação do Monepantel e outros anti-helmínticos sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos do Semiárido do Brasil.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi desenvolvido em 20 propriedades produtoras de ovinos do Semiárido da Paraíba, por um período de seis meses, julho a dezembro de 2016. Foram utilizados 30 animais de cada propriedade, perfazendo um total de 600 (seiscentos), de ambos os sexos, sem padrão racial definido (SPRD), sem tratamento anti-helmíntico há pelo menos três meses e que apresentassem OPG > 500. Posteriormente, os animais foram identificados individualmente e distribuídos aleatoriamente em cinco grupos: grupo I, tratados com Albendazole a 10%, dosagem de 2,0 mL/ 10kg de peso vivo; grupo II, tratados com Ivermectina a 0,08%, dosagem de 2,5 mL/10 kg de peso vivo; grupo III, tratados com closantel a 10%, dosagem de 1,0 mL/10 kg de peso vivo; grupo IV, tratados com Cloridrato de Levamisole a 5%, dosagem de 1,0 mL/10 kg de peso vivo; e Grupo V, tratados com Monepantel a 2,5%, dosagem de 1,0 mL/10 kg de peso vivo. Todos os tratamentos foram realizados em dose única, via oral, de acordo com as recomendações dos fabricantes.

As amostras fecais foram coletadas individualmente e diretamente da ampola retal, sendo em seguida acondicionadas em sacos plásticos, identificadas, mantidas refrigeradas em caixa isotérmica e prontamente encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia Veterinária (LPV) do Instituto Federal da Paraíba (IFPB), Sousa - PB, para a realização das análises coproparasitológicas.

Nesse sentido, procedeu-se a realização da contagem de Ovos Por Grama de fezes (OPG), de acordo com Gordon e Whitlock (1939) e coproculturas, bem como com Roberts e O'Sullivan (1950). A avaliação da Redução na Contagem de Ovos Fecais (RCOF), foi realizada segundo Coles et al. (1992). Tais procedimentos foram realizados no dia zero e no dia dez após a administração dos anti-helmínticos.

A avaliação da eficácia dos fármacos baseou-se no Regulamento Técnico da Portaria nº 48/1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para substâncias químicas dotadas de atividade antiparasitária, utilizando-se o seguinte critério: é altamente

efetivo quando reduz mais que 98% da carga parasitária; efetivo 90-98%; moderadamente efetivo 80-89%; e insuficientemente ativo < 80% (BRASIL, 1997).

Foram realizados questionários epidemiológicos em todas as fazendas visitadas, a fim de levantar informações sobre fatores que poderiam atuar como potenciais fatores de risco associados ao desenvolvimento de resistência de parasitas gastrointestinais.

Em uma das propriedades que apresentaram alta resistência ao Monepantel (Prop. 15), novo TRCOF para esse fármaco foi realizado quatro meses depois, em 20 ovinos, para fins de confirmação da resistência.

No dia seguinte à confirmação da resistência, os dois animais que apresentaram maior carga parasitária foram adquiridos, sacrificados e necropsiados, de acordo com normas internacionais estabelecidas pela World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP), descritas por Vercruyse et al. (2002). Logo, o trato gastrintestinal dos ovinos foi separado por seus segmentos anatômicos (abomaso, intestino delgado e intestino grosso), isolados e separados por ligaduras duplas com fio de algodão. O abomaso dos animais era aberto em sua curvatura maior e o conteúdo armazenado em um recipiente, onde uma alíquota de 10% foi conservada em Formol 5%. A mucosa de todo o abomaso foi submersa em solução salina a 39 °C, por 6 h. Posteriormente, uma alíquota de 10% do material digerido foi preservada em formol 5%. Procedimentos similares foram realizados também com relação aos intestinos delgado e grosso. A contagem e a identificação dos helmintos recuperados foram procedidas de acordo com Ueno e Gonçalves (1998).

## RESULTADOS

A multirresistência foi observada em todas as propriedades avaliadas, sendo constatado que, em 30% (6/ 20), a resistência se deu a dois fármacos; em 40% (8/ 20) a três; em 25% (5/ 20) a quatro, e em 5% (1/20) a todos os fármacos avaliados (Tabela 1).

Categorizando as propriedades quanto à eficácia dos fármacos, foi observado que o Levamisole apresentou-se altamente efetivo em 30% (6/ 20) das análises. Já o Albendazole foi o que demonstrou menor eficácia, sendo em 90% (18/ 20) classificado como insuficientemente ativo. Notou-se que o Monepantel foi altamente efetivo em apenas 40% (8/ 20) (Tabela 2).

O gênero de helminto mais prevalente na maioria das coproculturas foi o *Haemonchus* spp. 74,22%, seguido por *Oesophagostomum* spp. 18,61%, e *Trichostrongylus* spp. 7,17%.

Observou-se que o sistema de criação mais utilizado era o semi-intensivo (10/20), seguido de extensivo (9/20), e intensivo (1/20). As raças de ovinos criadas eram Santa Inês

50%, SRD 40%, Morada Nova 5% e Dorper 5%. O tamanho médio da criação era de 85,35 ovinos. Dentre os princípios ativos utilizados em uso isolado ou associado, a Ivermectina foi a mais citada (13/20), seguida por Albendazole (6/20), Closantel (3/20) e Levamisol (3/20). As aplicações destes anti-helmínticos eram feitas de 60 em 60 dias em 50% das propriedades, de 90 em 90 dias em 15% das propriedades, de 120 em 120 dias em 25% dos rebanhos e 240 em 240 dias em 10% das propriedades estudadas.

Não se observou influência da taxa de lotação sobre a quantidade de anti-helmínticos insuficientemente ativos (eficácia <80%). Nas cinco propriedades com  $\leq 10$  ha (0,648 UA/ ha), dos 25 testes com anti-helmínticos, 15 (60%) resultaram ineficientes. Semelhante, nas quatro propriedades com  $\geq 50$  ha (0,154 UA/ ha), 13 (65%) ensaios com anti-helmínticos foram altamente resistentes, sendo o Monepantel ineficaz em 75% (3/4) desses ensaios (Tabela 3).

Na propriedade 15, novo TRCOF para Monepantel foi realizado quatro meses após o primeiro, resultando em eficácia de 75%. Duas ovelhas (nº 4 e nº 12), com idade aproximada de dez meses, foram eutanaziadas e necropsiadas, tendo helmintos gastrintestinais recuperados, quantificados e identificados (Tabela).

Observou-se que os animais necropsiados apresentavam-se com alto número de nematódeos em seus tratos gastrintestinais após o TRCOF para Monepantel. *H. contortus* foi a espécie mais presente na recuperação de helmintos adultos, seguido por *T. colubriformis*, *T. axei*, *O. columbianum* e *T. ovis*.

## DISCUSSÃO

O presente estudo foi o primeiro a testar a eficácia anti-helmíntica do Monepantel frente a nematódeos gastrintestinais em diferentes rebanhos ovinos no Brasil. Esse fármaco apresentou-se insuficientemente ativo (eficácia < 80%) em 25% (5/20) das propriedades analisadas, demonstrando quadro de resistência na região. Cintra et al. (2016) relatou pela primeira vez a ocorrência de resistência ao monepantel no Brasil associada a *T. colubriformis*, em ovelhas naturalmente infectadas e confinadas da Fazenda Experimental da Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), com uma eficácia de -21,5%. Medeiros et al. (2014), relataram pela primeira vez a ocorrência de resistência ao Monepantel na América Latina, associada a *Haemonchus* sp. em duas propriedades do Uruguai. O trabalho realizado por Van Den Brom et al. (2015), demonstrou eficácia de 0% pelo TRCOF em uma criação de ovinos na Holanda, relacionada ao gênero *Haemonchus*.

O monepantel foi introduzido no mercado brasileiro com a promessa de eficácia de 100% no tratamento de parasitos gastrintestinal de ovinos, inclusive aqueles que já desenvolveram resistência a outros princípios ativos. Porém, mesmo com a utilização do fármaco pela primeira vez nas propriedades estudadas foram verificados quadros de resistência ao anti-helmíntico. É bem descrito que o tratamento maçal em intervalos curtos, a exemplo do manejo inadequado, induz à seleção de linhagens de parasitos resistentes, além de gerar resíduos contaminantes ao meio ambiente e aumentar custos na produção (Sutherland et al., 2008; Zaros et al., 2014).

Bartley et al. (2004), sublinham que o quadro de resistência anti-helmíntica aos nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes tem sido observado em todo mundo. Neste estudo, foi observada a multirresistência em todas as propriedades avaliadas, onde 95% das fazendas tinham alta resistência ao Albendazol, 85% à Ivermectina, 80% ao Closantel, 40% ao Levamisole e 45% ao Monepantel. Em outro estudo, envolvendo 35 fazendas de ovelhas no estado de São Paulo, foi observada a resistência ao Albendazole e a Ivermectina em 100% das fazendas estudadas, 92% ao Closantel e 53% ao Levamisole. (Veríssimo et al., 2012). Alta resistência anti-helmíntica também foi observada por Melo et al. (2013), quando avaliaram a eficácia da Ivermectina e do Levamisole em 13 propriedades produtoras de ovinos no Agreste do Estado da Paraíba, obtendo redução de apenas 30,9% e 93%, respectivamente.

Categorizando as propriedades quanto à eficácia dos fármacos, foi observado que o Levamisole apresentou-se altamente efetivo em 30% das análises. Já o Albendazole foi o que demonstrou menor eficácia, sendo em 90% classificado como insuficientemente ativo. Notou-se que o Monepantel foi altamente efetivo em apenas 40%. Apesar do Monepantel ser uma molécula nova e sem histórico de utilização nos animais deste rebanho, este fármaco não se mostrou eficiente sobre os nematódeos gastrintestinais.

Na maioria das coproculturas o gênero de helminto mais prevalente foi *Haemonchus* spp. (74,22%), corroborando com Vieira et al. (2014), que identificou (79,9%), de *Haemonchus* sp. em ovinos na região Semiárida do Estado da Paraíba. Os sucessivos tratamentos anti-helmínticos realizados nas propriedades levam a uma maior pressão de seleção para *Haemonchus*, dando-o a ser o mais prevalente na maioria das pesquisas (Vilela et al., 2012; Melo et al., 2013; Vilela et al. 2016). Provavelmente, esse verme adquire resistência mais rápida devido ao seu alto potencial biótico, grande variabilidade genética, além de albergar o alelo que causa a diminuição da susceptibilidade a uma droga (Blackhall et al., 1998).



Não se observou influência da taxa de lotação sobre a quantidade de anti-helmínticos considerados insuficientemente ativos (eficácia <80%). Nas cinco propriedades com  $\leq 10$  ha (0,648 UA/ ha), dos 25 testes com anti-helmínticos, 15 (60%) resultaram ineficientes. Semelhante, nas quatro propriedades com  $\geq 50$  ha (0,154 UA/ ha), 13 (65%) ensaios com anti-helmínticos foram altamente resistentes, sendo o Monepantel ineficaz em 75% (3/ 4) desses ensaios.

Em uma segunda etapa do trabalho, após a identificação das propriedades, considerando a ineficácia do anti-helmíntico Monepantel, foram conduzidos TRCOF em uma propriedade, onde o composto alcançou maior percentual de redução de OPG de 75%. Em relação à quantificação e identificação de helmintos adultos, foi possível diagnosticar uma ineficácia terapêutica do Zolvix® contra a espécie *Haemonchus contortus*, sendo a de maior importância na ovinocultura mundial. Em São Paulo, Martins et al. (2017), diagnosticaram quadro de resistência ao monepantel 2,5% com teste crítico (necropsia parasitológica) em ovinos no qual o composto apresentou-se ineficaz contra o *Haemonchus contortus* 24, 65%. Já Cintra et al. (2016) detectaram resistência de *T. colubriformis* -21, 5% ao monepantel na redução dos parasitas totais.

Vários fatores colaboram para o desenvolvimento da resistência aos fármacos utilizados no controle de nematódeos gastrintestinal, tais como o uso incontrolado dos anti-helmínticos, na maioria das vezes pela falta de conhecimento dos produtores, as precárias práticas de manejo e a facilidade na aquisição desses medicamentos. Segundo Vilela et al. (2012), o elevado quadro de resistência a anti-helmínticos observado em estudos conduzidos no Semiárido do Nordeste Brasileiro deve-se ao fato de ser uma prática comum a vermifugação maciça de todo o rebanho de pequenos ruminantes de quatro a seis vezes por ano.

## CONCLUSÃO

Concluiu-se que os nematódeos gastrintestinais de ovinos já estão resistentes ao monepantel em criações brasileiras localizadas no Semiárido do Estado da Paraíba, especialmente *Haemonchus contortus*. O manejo incorreto que continua sendo realizado para o controle das helmintoses gastrintestinais tende a agravar a multirresistência que foi observada em todas as propriedades avaliadas.

**Agradecimentos:** Os autores desejam reconhecer o apoio financeiro recebido da Coordenação para o Melhoramento do Pessoal de Educação Superior - CAPES, Brasil. O experimento foi

aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, Patos-PB, Brasil, em 23 de maio de 2016.

## REFERÊNCIAS

- Baker KE, George SD, Stein PA, Seewald W, Rolfe PF, Hosking BC (2012) Efficacy of monepantel and anthelmintic combinations against multiple-resistant *Haemonchus contortus* in sheep, including characterisation of the nematode isolate. *Vet. Parasitol* 186: 513–517. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.060>
- Bartley DJ, Jackson F, Jackson E, Sargison N (2004) Characterisation of two triple resistant field isolates of *Teladorsagia* from Scottish lowland sheep farms. *Vet. Parasitol* 123: 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.06.018>
- Blackhall WJ, Pouliot JF, Prichard RK, Beech RN (1998) *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectine and moxidectin selected strains. *Exp. Parasitol* 90: 42–48. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4316>
- Borges CCL (2003) Atividade in vitro de anti-helmínticos sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de caprinos, utilizando a técnica de coprocultura quantitativa (Ueno, 1995). *Parasitol. Latinoam* 58: 142–147. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122003000300010>
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Regulamento Técnico para Licenciamento e/ou Renovação de Licença de Produtos Antiparasitários de Uso Veterinário. Portaria nº 48, de 12 de maio de 1997. Diário Oficial da União de 16/05/1997, Seção 1, Página 10165. <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=72818869>. Acessado em 28 de janeiro de 2018
- Cezar AS, Toscan G, Camillo G, Sangioni LA, Ribas HO, Vogel FSF. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in sheep flock in southern Brazil. *Vet. Parasitol* 2010; 173 (): 157- 160.
- Cintra MCR, Teixeira VN, Nascimentoa LV, Sotomaior CS. Lack of efficacy of monepantel against *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. *Vet Parasitol* 2016; 216 (): 4–6.
- Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A., Waller, P. J., 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44, 35–44.
- Gordon, H.M., Whitlock, H.V., 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Counc. Sc. Ind. Res.* 12, 50–52.
- Idris, A., Moors, E., Sohnrey, B., Gauly, M. 2012. Gastrointestinal nematode infections in German sheep. *Parasitol. Res.* 110, 1453–1459.

Kaminsky, R., Ducray, P., Jung, M., Clover, R., Rufener, L., Bouvier, J., Weber, S.S., Wenger, A., Wieland-Berghausen, S., Goebel, T., Gauvry, N., Pautrat, F., Skripsky, T., Froelich, O., Komoin-Oka, C., Westlund, B., Sluder, A., Maser, P., 2008. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*. 452, 176-181.

Lima, W.C., Athayde, A.C.R., Medeiros, G.R., Lima, D.S.D., Borburema, J.B., Santos, E.M., Vilela, V.L.R., Azevedo, S.S., 2010. Nematóides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. *Pesq. Vet. Bras.* 30, 1003-1009.

Martins, A.C., Bergamasco, P.L.F., Felippeli, G., Tebaldi, J.H., Moraes, M.F.D., Testi, A.J.P., Lopera, I.M., Hoppe, E.G.L., 2017. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep: fecal egg count reduction tests and randomized controlled trials. *Semina: Ciênc. Agrár.* 38, 231-238.

Mederos, A.E., Ramos, Z., Banchemo, G.E., 2014. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. *Parasit. Vectors.* 7, 598.

Melo, L.R.B., Vilela, V.L.R., Feitosa, T.F., Almeida Neto, J.L., Morais, D.F., 2013. Anthelmintic resistance in small ruminants from the Semiarid of Paraíba state, Brazil. *Ars Vet.* 29, 104-108.

Roberts, F.H.S., O'Sullivan, J.P., 1950. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Aust. J. Agr. Res.* 1, 99-102.

Scott, I., Pomroy, B., Paul, K., Greg, S., Barbara, A., Moss, A., 2013. Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.* 198, 166-171.

Sutherland, I.A., Damsteegt, A., Miller, C.M., Leathwick, D.M., 2008. Multiple species of nematodes resistant to ivermectin and a benzimidazole-levamisole combination on a sheep farm in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 56, 67-70.

Ueno, H., Gonçalves, P. C., 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4. Ed. Japan: Japan International Cooperation Agency, 143.

Van den Brom, R., Moll, L., Kappert, C., Vellema, P., 2015. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. *Vet. Parasitol.* 209, 278-280.

Vercruysse, J., Holdsworth, P., Letonja, T., Conder, G.; Hamamoto, K., Okano, K., Rehbein, S., 2002. International harmonisation of anthelmintic efficacy guidelines (Part 2). *Vet. Parasitol.* 103, 277-297.

Verissimo, C.J., Meo Niciura, S.C.M., Alberti, A. L. A., Rodrigues, C. F. C., Barbosa, C. M. P., Chiebao, D. P., Cardoso, D., Silva, G. S., Pereira, J. R., Margatho, L. F. F., Costa, R. L. D., Nardon, R.F., Ueno, T. E. H. , Curci, V. C. L.M., Molentol, M. B., 2012. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from Sao Paulo state, Brazil. *Rev. Vet. Parasitol.* 187, 209- 216.

Vieira, V.D., Vilela, V.L.R., Feitosa, T. F., Athayde, A. C. R., Azevedo, S. S., Souto, D. V. O., Silveira, G. L., Melo, L.R.B., 2014. Sheep gastrointestinal helminthiasis in the Sertão region of Paraíba State, Northeastern Brazil: prevalence and risk factors. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 23, 488-494.

Vilela, V.L.R., Feitosa, T.F., Braga, F.R., Araújo, J.V., Souto, D.V.O., Santos, H.E.S., Silva, G.L.L., Athayde, A.C.R., 2012. Biological control of goat gastrointestinal helminthiasis by *Duddingtonia flagrans* in a semi-arid region of the northeastern Brazil. *Vet. Parasitol.* 188, 127–133.

Zaros L.G., Neves M.R.M., Benvenuti C.L., Navarro A.M.C., Sider L.H., Coutinho L.L., Vieira L.S. 2014. Response of resistant and susceptible Brazilian Somalis crossbreed sheep naturally infected by *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Res.* 113, 1155-1161.

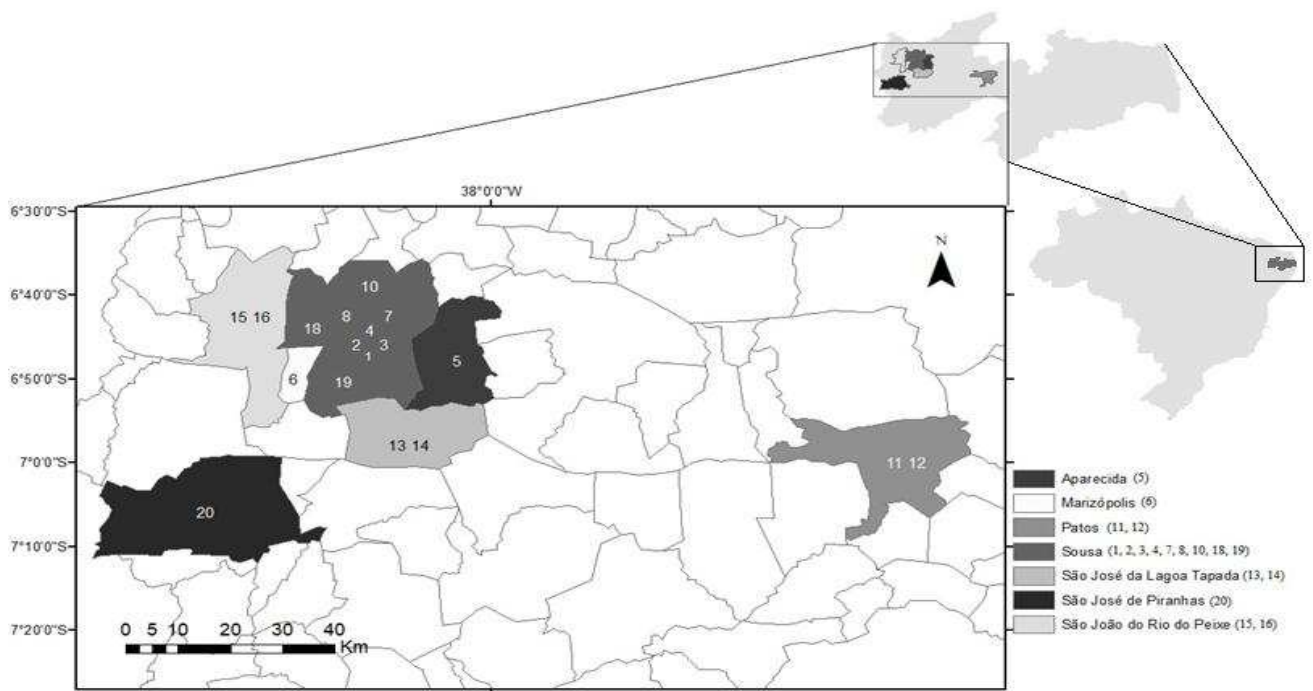


Figura 1. Fazendas de ovinos georeferenciadas da região do Sertão, estado da Paraíba, Brasil.

Tabela 1. Eficácia de anti-helmínticos sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos no Semiárido da Paraíba, Brasil.

Propriedade	Albendazole (%)	Levamisole (%)	Closantel (%)	Ivermectin (%)	Monepantel (%)
1	31	100	76	-21	100
2	47	74	67	-33	98
3	19	60	53	93	68
4	-3	98	73	83	84
5	36	100	77	51	98
6	47	100	59	63	100
7	63	90	66	-14	88
8	75	97	93	40	98
9	71	99	95	28	86
10	80	87	74	29	92
11	45	79	90	31	77
12	53	-5	50	93	88
13	50	90	30	69	58
14	73	78	13	58	78
15	94	96	44	57	68
16	50	100	56	66	94
17	50	100	86	100	98
18	-17	77	56	-41	91
19	70	97	25	83	91
20	-60	81	94	-133	100
Standard	20,4	84,9	63,8	35,1	87,7

Tabela 2. Percentual de propriedades por categoria de eficácia de anti-helmínticos sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos no Semiárido da Paraíba, Brasil, de acordo com a Portaria nº 48/1997 do MAPA.

Categorias de eficácia	Anti-helmíntico				
	Albendazole (%)	Levamisole (%)	Closantel (%)	Ivermectina (%)	Monepantel (%)
Altamente Efetivo (> 98%)	-	30	-	5	15
Efetivo (90-98%)	5	30	20	10	40
Moderadamente Efetivo (80-89%)	5	10	5	10	20
Insuficientement e Ativo (<80%)	90	30	75	75	25

Tabela 3. Número de anti-helmínticos insuficientemente ativos (eficácia <80%) de acordo com a área e taxa de lotação de propriedades produtoras de ovinos no semiárido paraibano.

Área da propriedade - ha	Nº de propriedades - (%)	Taxa de lotação – UA/ ha	Resistência				
			A	L	C	I	M
≤10	5 (25)	0.648	5	2	4	3	1
11–24	6 (30)	0.559	6	3	3	4	1
25–49	5 (25)	0.149	4	1	5	5	-
≥ 50	4 (20)	0.154	3	1	3	3	3

A, albendazole; C, closantel; I, ivermectina; L, levamisole; M, monepantel.



Tabela 4. Espécies de nematódeos gastrintestinais recuperados de ovinos submetidos a TRCOF para Monepantel no semiárido da Paraíba, Brasil.

Espécies	Sexo	Animal 4	Animal 12	Média
<i>Haemonchus contortus</i>	Fêmea	120	530	325
	Macho	70	290	180
<i>Trichostrongylus axei</i>	Fêmea	50	160	105
	Macho	10	70	40
<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Fêmea	160	80	120
	Macho	50	60	55
<i>Oesophagostomum columbianum</i>	Fêmea	-	-	-
	Macho	-	10	5
<i>Trichuris ovis</i>	Fêmea	-	-	-
	Macho	-	10	5
	Total	460	1210	-
	Média	-	-	835

## **Capítulo II**

**Influência do tempo de estocagem de péletes de *Monacrosporium thaumasium* sobre a predação de formas infectantes de nematódeos gastrintestinais de ovinos**

Manuscrito submetido à  
Veterinary Research Communications

## **Influência do tempo de estocagem de péletes de *Monacrosporium thaumasium* sobre a predação de formas infectantes de nematódeos gastrintestinais de ovinos**

Francisca Flávia da Silva. Paulo Wbiratan Lopes da Costa

Roberto Alves Bezerra. Samara dos Santos Silva.

Natália Ingrid Souto da Silva. Jorge Domingos da Silva Lima

Fabio Ribeiro Braga. Jackson Victor de Araújo

Vinícius Longo Ribeiro Vilela. Ana Célia Rodrigues Athayde

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), CEP: 58.108-110, Patos-PB, Brasil.

Departamento de Medicina Veterinária, Instituto Federal da Paraíba (IFPB), CEP: 58800-970, Sousa-PB, Brasil.

Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, CEP: 36.570-000, Viçosa-MG, Brasil

Autor para correspondência: Tel: +55 83 3422 2214; fax: +55 83 3422 2246. E-mail: [vilelavlr@yahoo.com.br](mailto:vilelavlr@yahoo.com.br)

### **RESUMO**

Objetivou-se avaliar a influência do tempo de estocagem de péletes de *Monacrosporium thaumasium* sobre a predação de larvas infectantes de tricostrongilídeos de ovinos no semiárido do estado da Paraíba, Nordeste brasileiro. Foram utilizados oito ovinos com OPG negativo, divididos em quatro grupos experimentais contendo dois animais: Grupo I, tratados com péletes de *M. thaumasium* – 36 meses de estocagem, cada animal recebeu 3g de péletes/10 kg peso vivo, dose única; Grupo II, tratados com *M. thaumasium* - péletes recém produzidos, cada animal recebeu 3g de péletes/10 kg p.v., dose única; Grupo III, cada animal recebeu 3g/10 kg p.v. de péletes sem fungos, recém produzidos; e Grupo IV, controle, não recebeu péletes. Imediatamente após a administração dos tratamentos (0h) e a cada 24h, até 120 h, as fezes dos animais foram coletadas e submetidas ao Laboratório de Parasitologia Veterinária – LPV do IFPB, campus Sousa, para realização das análises. Foram pesadas 15 gramas de fezes de cada animal e acrescidas cinco gramas de vermiculita expandida, procedidas as coproculturas e adicionadas 1000 larvas infectantes (L3) de tricostrongilídeos de ovinos, sendo a recuperação

larval realizada após sete dias. Observou-se que a predação de larvas no Grupo I (*M. thaumasium* - 36 meses) não diferiu estatisticamente ( $p>0,01$ ) do Grupo II (*M. thaumasium* – recente), apresentando respectivamente reduções de 75 e 79%. Ambos os grupos acrescentaram pico de predação larvas às 72h. O gênero de helminto mais recuperado nas coproculturas foi *Haemonchus* sp. Concluiu-se que o período de estocagem de 36 meses de péletes de *M. thaumasium* em matriz de alginato não influenciou a eficácia de predação de larvas de tricostrongilídeos de ovinos, havendo atividade fúngica nas fezes até 96 horas após a administração aos animais.

**Palavras - chave:** Alginato de sódio, controle biológico, fungos nematófagos, *Haemonchus* sp., ovinocultura.

## INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias são um problema antigo e uma grave barreira para os produtores de pequenos ruminantes. Sua principal forma de controle é feita pela administração de anti-helmínticos do grupo dos Benzimidazóis (Albendazole, Fenbendazole e Oxfendazole), Milbemicinas (Moxidectina), Avermectinas (Ivermectina), Imidazotiazoles (Cloridrato de Levamisole) e Salicilanilidas (Closantel sódico) (Borges 2003; Vieira et al. 2013). Diversos estudos relataram a resistência aos anti-helmínticos mais utilizados no Semiárido do Estado da Paraíba (Lima et al. 2010; Melo et al. 2013; Vilela et al. 2016). A utilização equivocada e indiscriminada dos anti-helmínticos associada à alta densidade populacional em pequenas áreas de pastagem nativa da Caatinga vem contribuindo para a resistência dos endoparasitas gastrintestinais de pequenos ruminantes (Vieira et al. 2014a, 2014b).

Diante da resistência adquirida pelos parasitas aos anti-helmínticos convencionais, a utilização de agentes biológicos com atuação sobre ovos e larvas de nematóides tricostrongilídeos tem se mostrado uma alternativa para a higienização das pastagens e tem sido intensificada nos últimos anos. Assim, os fungos nematófagos são os microorganismos mais estudados com este objetivo (Campos et al. 2009).

Após a administração dos fungos, estes passam pelo trato gastrintestinal e são eliminados juntos com as fezes no meio ambiente, onde colonizam o bolo fecal, estabelecendo contato com as larvas eclodidas, produzindo armadilhas que as levam à morte, diminuindo assim a quantidade de larvas infectantes na pastagem, impedindo a reinfecção dos animais (Silva et al. 2009).

Araújo et al. (2000), sublinham que o *Monacrosporium thaumasium*, sedimentado em uma matriz de alginato de sódio, tem a capacidade de sobreviver a passagem através do trato gastrointestinal de ruminantes sem perder sua atividade predatória. Outros estudos também comprovaram a sua capacidade de predação de larvas em matriz de alginato de sódio em laboratório e condições de campo, utilizado isoladamente ou associado a *Duddingtonia flagrans* (Campos et al. 2009; Mota et al. 2002; Silva et al. 2009; Tavela et al. 2011; Vilela et al. 2013; Vilela et al. 2016). No entanto, não há descrições da viabilidade predatória de fungos nematófagos peletizados em matriz de alginato de sódio após estocagem.

Por isso, este trabalho teve por objetivo avaliar a influência do tempo de estocagem de três anos de péletes de *M. thaumasium* sobre a predação de larvas infectantes de tricostrongilídeos de ovinos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Produção de Massa Micelial

Foi utilizado um isolado de *M. thaumasium* (NF34a) obtido de solos brasileiros (Zona da Mata de Minas Gerais). Os micélios fúngicos foram obtidos através da transferência de discos de cultura (aproximadamente 4 mm de diâmetro) de isolados de fungos em 2% de agar de água (2% WA) para frascos Erlenmeyer de 250 mL com 150 mL de meio GPY líquido (glicose, peptona de sódio e extrato de levedura) e incubou sob agitação de 120 rpm no escuro a 26 °C durante 10 dias. Após este período, os micélios foram removidos, filtrados e pesados em um balanço analítico. Todos os procedimentos seguiram a metodologia de Araújo et al. (2010).

### Ensaio Experimental

O experimento foi desenvolvido no Departamento de Medicina Veterinária do Instituto Federal da Paraíba (IFPB), Sousa – PB. Foram utilizados péletes de *M. thaumasium* (NF34) em matriz de alginato de sódio estocados em sacos plásticos a temperaturas de 2 – 8 °C, no escuro, por três anos, bem como péletes recém-produzidos.

Foram utilizados oito ovelhas da raça Santa Inês, com idades entre 1 e 2 anos, com OPG (Gordon e Whitlock 1939) negativo, divididos em quatro grupos experimentais contendo dois animais: Grupo I, recebeu péletes de *M. thaumasium*, com 36 meses de estocagem, onde cada animal recebeu 3g de péletes/ 10 kg peso vivo, dose única; Grupo II, tratados com *M. thaumasium*, com péletes recém-produzidos, em que cada animal recebeu 3g de péletes/10 kg p.v, dose única; Grupo III, cada animal recebeu 3g/10 kg p.v., de péletes sem fungos, recém produzidos; e Grupo IV, denominado grupo controle, não recebeu péletes. Para a administração individual, era adicionada 100g de ração comercial para ovinos para facilitar a ingestão.

A cada 24 horas, durante cinco dias (24, 48, 72, 96 e 120 h), as fezes dos animais foram coletadas e enviadas ao Laboratório de Parasitologia Veterinária – LPV do IFPB, campus Sousa, para realização das análises. Eram pesadas 15 gramas de fezes de cada animal e acrescidas cinco gramas de vermiculita expandida, procedidas as coproculturas (Roberts e O’Sullivan 1950) e adicionadas 1000 larvas infectantes (L3) de tricostrongilídeos de ovinos. Posteriormente, as coproculturas eram incubadas em BOD por sete dias, a 28°C. Passado esse

período, as L3 das coproculturas eram recuperadas pelo método de Baermann, quantificadas e identificadas em microscópio óptico (aumento de 100x), de acordo com Ueno e Gonçalves (1994).

A porcentagem de redução larval foi determinada de acordo com Mendoza-de-Guives et al. (1999): redução (%) = média L3 recuperadas do grupo de controle - L3 recuperadas do grupo tratado  $\times$  100 / média L3 recuperadas do grupo controle. Os dados foram submetido à análise de variância (teste F). Posteriormente, os resultados foram comparados usando o teste de Tukey no nível de probabilidade de 1%, utilizando o software Biostat 3.0 (Ayres et al. 2003).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,01$ ) na predação de larvas infectantes de tricostrongilídeos de ovinos entre os grupos que receberam péletes contendo *M. thaumasium* (Grupo I – 36 meses e Grupo 2 – recente) ao longo do período avaliado (Fig 1). As reduções larvais chegaram a 75% no Grupo I e 79% no Grupo II. Este estudo foi o primeiro a descrever a atividade predatória de um fungo nematófago peletizado em matriz de alginato de sódio após um longo período de estocagem (36 meses). Mota et al. (2002) observaram redução de larvas de *H. contortus* por *Arthrobotrys robusta* (I-31) e *M. thaumasium* (N3F4a) armazenados em sílica gel por 18 meses, reduzindo 68,83% e 73,83%, respectivamente, o número de larvas em comparação ao grupo controle. Já Braga et al. (2014) observaram que o fungo *A. robusta*, armazenado em sílica gel por sete anos, demonstrou uma redução das larvas de *H. contortus* de 73,84% em relação ao grupo controle sem fungos.

A predação larval foi estatisticamente significativa ( $p \leq 0,01$ ) na comparação dos Grupos I e II, com o Grupo III – péletes sem fungos e Grupo IV – controle nos intervalos de 24 a 96 horas após a administração dos péletes aos animais, com pico de atividade às 72 h, reduções respecctivas de 75 e 79% (Fig 1). De acordo com Assis e Araújo (2003) e Araújo et al. (2010), esses intervalos de tempo provaram ser ideais por haver maior passagem fúngica pelo trato gastrintestinal. Tavela et al. (2013), relataram redução no número de larvas de ciatostomíneos recuperadas de coproculturas de equinos tratados com diferentes doses da associação dos fungos *D. flagrans* (AC001) e *M. thaumasium* (NF34a), onde todos os intervalos estudados (12h a 72h) apresentaram taxa de redução no número de L3 recuperadas de coproculturas superior a 80%.

A recuperação de larvas no Grupo III – péletes sem fungos, não diferiu estatisticamente ( $p > 0,01$ ) do Grupo IV – controle, ao longo do experimento, reforçando que a composição dos péletes por alginato de sódio não interfere na predação larval. Alguns estudos mostraram que a utilização de formulações à base de péletes de alginato de sódio foi bem sucedida em condições laboratoriais e de campo (Silva et al. 2011; Vilela et al. 2013; Silva et al. 2014). Araújo et al. (2000a) e Araújo et al. (2000b) afirmaram que a peletização do micélio não interfere na predação fúngica e pode ser um método importante no controle biológico dos nematoides.

Observou-se maior prevalência dos gêneros *Haemonchus*, seguido por *Trichostrongylus*, *Oesophagostomum* e *Strongyloides* (Tabela 1). É comum a fauna helmíntica de pequenos ruminantes da região semiárida do Nordeste do Brasil ser composta por esses gêneros de helmintos. Melo et al. (2013) e Vilela et al. (2016) observaram a mesma composição helmíntica em coproculturas de ovinos em ambiente semiárido da Paraíba, Brasil, com maior prevalência de *Haemonchus* sp. Provavelmente esse verme adquire resistência mais rápida devido ao seu alto potencial biótico, grande variabilidade genética, além de albergar o alelo que causa a diminuição da susceptibilidade a uma droga (Blackhall et al. 1998).

Os resultados da presente pesquisa indicaram uma boa perspectiva para a comercialização dos péletes de matriz de alginato de sódio de *M. thaumasium* quando armazenados a temperaturas entre 2°C e 8°C, uma vez que podem ser estocados por longos períodos sem perder eficácia predatória.

## CONCLUSÃO

Concluiu-se que o período de estocagem de 36 meses de péletes de *M. thaumasium* em matriz de alginato não influenciou a eficácia de predação de larvas de trichostrongilídeos de ovinos, havendo alta redução de recuperação de larvas e presença de atividade fúngica nas fezes até 96 horas após a administração aos animais.

Os dados obtidos demonstraram que a utilização de péletes de *M. thaumasium* (NF34) foi eficaz no controle *in vitro* de larvas infectantes de trichostrongilídeos de ovinos, após 36 meses de armazenamento em alginato de sódio, mostrando que o produto pode ser armazenado por um longo período mantendo sua atividade predatória.



### **Agradecimentos:**

Os autores desejam reconhecer o apoio financeiro recebido da Coordenação para a Melhoria do Pessoal de Educação Superior - CAPES, Brasil. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, Patos-PB, Brasil, em 23 de maio de 2016.

### **Conflito de Interesse:**

Os autores declaram que não têm conflito de interesses.

### **REFERÊNCIAS**

- Araújo, JM., Araújo, JV., Braga, FR., Carvalho, RO., 2010. In vitro predatory activity of nematophagous fungi and after passing through gastrointestinal tract of equine on infective larvae of *Strongyloides westeri*. Parasitol Res. 107. 103–108. [https://doi: 10.1007/s00436-010-1841-y](https://doi.org/10.1007/s00436-010-1841-y).
- Araújo, JV., Sampaio, WM., Vasconcelos, RS., Campos, AK., 2000b. Effects of different temperatures and mineral salt on pellets of *Monacrosporium thaumasium*—a nematode-trapping fungus. Vet Arhiv. 70(4).181–190. RI <https://hrcak.srce.hr/100509>.
- Araújo, JV., Stephano, MA., Sampaio, WM., 2000a. Effects of temperature, mineral salt and passage through the gastrointestinal tract of calves on sodium alginate formulation of *Arthrobotrys*, a nematode-trapping fungus. . Rev. Braz. Vet. Parasitol. 9.55-59.
- Blackhall, WJ., Pouliot JF., Prichard, RK., Beech, RN., 1998. *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectine and moxidectin selected strains. Experimental Parasitol. 90. 42-48. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4316>.
- Braga, FR., Carvalho, RO., Silva, AR., Araújo, JV., Frassy, LN., Lafisca, A., Soares, FEF., 2014. Predatory capability of the nematophagous fungus *Arthrobotrys robusta* preserved in silica gel on infecting larvae of *Haemonchus contortus*. Articles. 46.571–574. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-014-0544-2>.
- Borges, CCL., 2003. Atividade in vitro de anti-helmínticos sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de caprinos, utilizando a técnica de coprocultura quantitativa (Ueno, 1995). Parasitol latinoam. 58 (3-4). 142-147. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122003000300010>.
- Campos, AK., Araújo, JV., Guimarães, MP., Dias, AS., 2009. Resistance of different fungal structures of *Duddingtonia flagrans* to the digestive process and predatory ability on larvae of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in goat feces. Parasitol Res. 105. 913-919. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1476-z>
- Lima, WC., Athayde, ACR., Medeiros, GR., Lima, DSD., Borburema, JB., Santos, EM., Vilela, VLR., Azevedo, SS., 2010. Nematóides resistentes a alguns anti-helmínticos em

rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. Pes Vet Bras. 30(12).1003-1009.  
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010001200001>

Melo, LRB., Vilela, VLR., Feitosa, TF., Almeida, Neto JL., Morais, DF., 2013. Anthelmintic resistance in small ruminants from the Semiarid of paraíba state, brazil. Ars Vet. 29 (2). 104-108. <http://doi: 10.15361/2175-0106.2013v29n2p104-108>

Mendoza-De-Guives P, Davies KG, Clarck SJ, Behnke JM. Predatory behaviour of trapping fungi against srf mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. Parasitol 1999; 119(1): 95-104. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182099004424>

Mota, MA., Campos, AK., Araújo, JV., 2002. Evaluation of the predatory capacity of the fungi *Arthrobotrys robusta* and *Monacrosporium thaumasium* submitted to different preservation methods against gastrointestinal parasitic nematodes of bovines. Rev. Braz. Vet. Parasitol. 11. 13–17.

Roberts, FHS., O'sullivan, JP., 1950. Methods of egg counts and laval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. Aust. J. Agr. Res.1. 99- 102.

Silva, AR., Braga, FR., Borges, LA., Oliveira, JM., Lima, WS., Guimarães, MP., Araújo, JV., 2014. Evaluation of the effectiveness of *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* in the biological control of gastrointestinal nematodes in female bovines bred in the semiarid region. Vet Res. 37.1-10. <https://doi.org/10.1007/s11259-014-9590-5>

Silva, AR., Araújo, JV., Braga, FR., Alves, CDF., 2011. Activity *in vitro* of fungal conidia of *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on *Haemonchus contortus* infective larvae. Journal of Helmintholog. 85 (2). 138-141.  
<https://doi.org/10.1017/S0022149X10000362>

Silva, AR., Araújo, JV., Braga, FR., Frassy, LN., Tavela, AO., Carvalho, RO., Castejon, FV., 2009. Biological control of sheep gastrointestinal nematodiasis in a tropical region of southeast of Brazil with the nematode predatory fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium*. Parasitol Res. 105. 1707-1713.  
<https://doi.org/10.1007/s00436-009-1613-8>

Tavela, AO., Araújo, JV., Braga, FR., Silveira., WF., Dornelas e Silva, VH., Júnior, MC., Borges, LA., Araújo, JM., Benjamim, LA., Carvalho, GR., Paula, AT., 2013. Coadministration of sodium alginate pellets containing the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on cyathostomin infective larvae after passing through the gastrointestinal tract of horses. 94(3). 568-572. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.11.011>

Tavela, AO., Araújo, JV., Braga, FR., Araújo, JM., Queiroz, L., Silveira., WF., Borges, LA., 2012. In vitro association of nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* (ACOOI), *Monacrosporium thaumasium* (NF34) and *Pochonia chlamydosporia* (VCI) to control horse cyathostomin (Nematoda: Strongylidae). Biocontrol Science and Technology. 22(5). 607-610.  
<https://doi.org/10.1080/09583157.2012.672952>

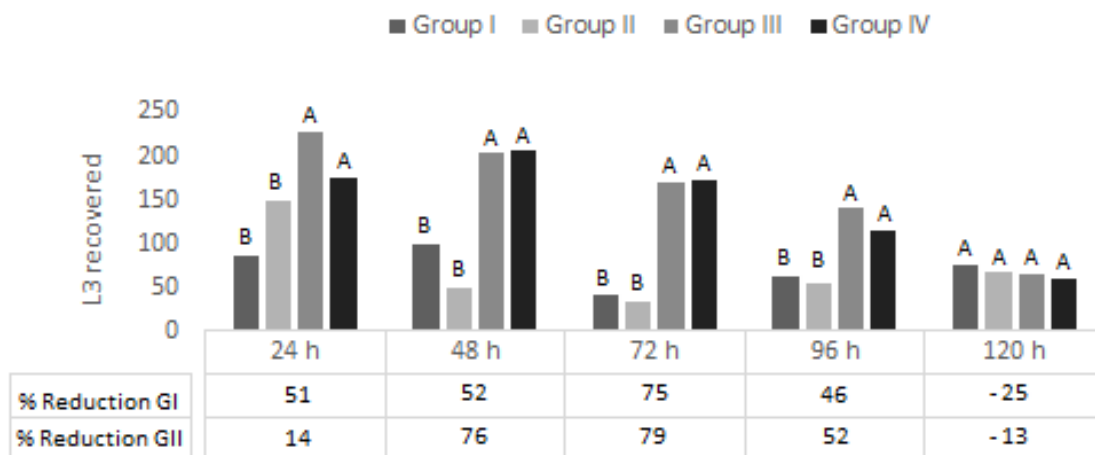
Vieira, VD., Vilela, VLR., Feitosa, TF., Athayde, ACR., Azevedo, SS., Souto, DVO., Silveira, GL., Melo, LRB., 2014. Sheep gastrointestinal helminthiasis in the Sertão region of Paraíba State, Northeastern Brazil: prevalence and risk factors. *Rev. Braz. Vet. Parasitol* 23(4). 488-494. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014089>

Vilela, VLR., Feitosa, TF., Braga, FR., Araújo, JV., Santos, A., Morais, DF., Souto, DVO., Athayde, ACR., 2016. Coadministration of nematophagous fungi for biological control over gastrointestinal helminths in sheep in the semiarid region of northeastern Brazil. *Vet Parasitol* 221.139-143. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.03.027>

Vilela, VLR., Feitosa, TF., Braga, FR., Araújo, JV., Lucena, SC., Dantas, ES., Athayde, ACR., Silva, ww., 2013. Efficacy of *Monacrosporium thaumasium* in the control of goat gastrointestinal helminthiasis in a semi-arid region of Brazil. *Parasitol Res* 112(2). 871-877. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3078-4>

Vilela, VLR., Feitosa, TF., Braga, FR., Araújo, JV., Souto, DVO., Santos, HES., Athayde, ACR., 2012. Biological control of goat gastrointestinal helminthiasis by *Duddingtonia flagrans* in a semi-arid region of the Northeastern Brazil. *Vet Parasitol* 188(1-2)127-133. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.02.018>

Ueno, H., Gonçalves, PC., 1994. *Manual para Diagnóstico das Helmintoses de Ruminantes*. Japan International Cooperation Agency, Tokyo.



**Fig. 1**

Médias e percentual de redução de larvas infectantes de tricostrongilídeos de ovinos recuperadas de coproculturas do Grupo I: péletes com *M. thaumasium* - 3 anos de estocagem; Grupo II: péletes com *M. thaumasium* - recém-produzidos; Grupo III: péletes sem fungos; e Grupo IV, não recebeu péletes, controle. Letras distintas no mesmo intervalo de tempo diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade

**Tabela 1** Porcentagem de larvas infectantes de tricostrongilídeos de ovinos recuperadas de coproculturas do Grupo I: péletes com *M. thaumasium* – 36 meses de estocagem; Grupo II: péletes com *M. thaumasium* - recém-produzidos; Grupo III: péletes sem fungos; e Grupo IV, não recebeu péletes, controle

Grupos		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Grupo I	H	64	62	72	70	55	63
	T	24	38	24	20	40	10
	O	12	0	4	10	5	27
	S	0	0	0	0	0	0
Grupo II	H	72	56	70	90	70	80
	T	18	40	30	10	20	10
	O	10	4	0	0	10	10
	S	0	0	0	0	0	0
Grupo III	H	69	75	70	82	70	90
	T	23	22	30	18	10	6
	O	8	3	0	0	10	4
	S	0	0	0	0	10	0
Grupo IV	H	90	68	94	86	74	80
	T	10	25	6	14	15	14
	O	0	7	0	0	5	6
	S	0	0	0	0	6	0


H. *Haemonchus* sp.; T.- *Trichostrongylus* spp.; O. – *Oesophagostomum*.; S. – *Strongyloide*.

## CONCLUSÃO GERAL

Concluiu-se que os nematódeos gastrintestinais de ovinos já estão resistentes ao monepantel em criações brasileiras localizadas no Semiárido do Estado da Paraíba e que foi frequente a ocorrência de multirresistência a anti-helmínticos por esses nematódeos. Concluiu-se também que a utilização de fungos nematófagos pode ser uma alternativa viável para o controle da verminose gastrintestinal de ovinos, pois a predação larval nas fezes dos animais que receberam *Monacrosporium thaumasium* (NF34a) recente e após três anos de armazenamento apresentaram um resultado satisfatório.

Há uma grande necessidade de disseminar informações a respeito das medidas de controle das helmintoses gastrintestinais, enfatizando a adoção de práticas aplicáveis a região Semiárida. Um período prolongado para a realização de um controle integrado das helmintoses gastrintestinais deve ser levado em consideração.

# **ANEXO**

 <https://outlook.live.com>

11



Para: flaviavet\_ufcg@hotmail.com;

28-Jan-2018

Dear Dr. Silva:

A manuscript titled First report of monepantel resistance in naturally infected sheep herds in Brazil: nematode resistance to five anthelmintics classes (RBPV-2018-0024) has been submitted by Dr. Vinícius Vilela to the Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, ScholarOne Manuscripts, automatically creates a user account for you. Your USER ID and PASSWORD for your account is as follows:

Site URL:

<https://mc04.manuscriptcentral.com/rbpv->



 <https://outlook.live.com>



## Veterinary Research Communicat

sáb 03/03/2018 22:12

**Para:** Francisca Flávia Silva (flaviapl...



Evernote

Dear Mrs Silva,

Thank you for submitting your manuscript, "Influence of storage time of pellets of *Monacrosporium thaumasium* on the predation of infective forms of gastrointestinal nematodes of sheep", to Veterinary Research Communications

The submission id is: VERC-D-18-00113

Please refer to this number in any future correspondence.

---



## **INSTRUCTIONS FOR AUTHORS**

### **REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA BRAZILIAN JOURNAL OF VETERINARY PARASITOLOGY**

#### **INTRODUCTION**

The Brazilian Journal of Veterinary Parasitology is the official journal of the Brazilian College of Veterinary Parasitology (CBPV). The journal is a quarterly publication that covers topics on helminths, protozoans and arthropods as well as other related subjects. Manuscripts can be submitted in English by researchers from any country regardless of CBPV affiliation. The Brazilian Journal of Veterinary Parasitology offers free online access to all its archives dating back to 1992, which was its first year of publication.

#### **EDITORIAL GUIDELINES**

The Brazilian Journal of Veterinary Parasitology accepts articles that focus primarily on animal parasites. Authors are required to send a signed cover letter in which they declare that they were responsible for the whole process of producing the manuscript and that it is entirely an unpublished original article. If the abstract of the manuscript has been presented in scientific meetings, this should be stated in the signed cover letter as well.

Author consent forms for manuscripts that have more than one author are required, to ensure that all authors agree with the publication. All authors need to have made substantial contributions to the study design, data acquisition, data analysis and interpretation, and drafting of the article, and need to have given final approval of the version to be submitted. Collaborators who did not actively participate in the process described above may be listed in the Acknowledgements section. Researchers who provided technical support or suggestions or a department head who made the research work possible should be acknowledged. Manuscripts with a number of authors that does not seem justifiable will be assessed by our assistant scientific editors in relation to the experimental research protocol.

The manuscript review process will follow the journal's Editorial Guidelines and consider the editors' and/or ad hoc reviewer's opinions. The Editor-in-chief and assistant scientific editors may make suggestions or request changes to the manuscript but the authors are ultimately responsible for the entire text content. Articles that are submitted for publication will be

reviewed by at least two anonymous reviewers, of whom one will be a foreigner. The reviewers will be selected by the editor-in-chief and assistant scientific editors. If the reviewers' opinions are discordant with each other, the article will be sent to a third reviewer.

The Brazilian Journal of Veterinary Parasitology accepts manuscripts as Full Articles, Short Communications and Review Articles. Review Articles are submitted by experts on request from the editors. Unsolicited review articles will not be accepted but the editors or assistant scientific editors may accept suggestions for a review topic.

### **Paper submission:**

The articles submitted must undergo English-language revision, done by reviewers accredited by the RBPV ([http://cbpv.org.br/rbpv/revisoes\\_traducoes.php](http://cbpv.org.br/rbpv/revisoes_traducoes.php)). A certificate of Englishlanguage revision should be sent together with the submitted article. The authors will be expected to bear the costs of the revision. If one of the coauthors is a foreigner who is a native English speaker, this author should review the English-language content of the study and send a formal certifying letter to the RBPV.

### **Publication fee:**

After the article has been accepted, the following publication fees will be charged:

R\$ 250,00 (associados do CBPV em dia com as anuidades);

R\$ 500,00 (não-associados do CBPV).

### **For foreign authors:**

US\$ 92.00 (for associates of CBPV who are up-to-date with their membership dues);

US\$ 184.00 (for non-associates of CBPV).

SWIFT BRASBRRJRPO

IBAN 001026900000288489

Address: Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Zona Rural. CEP: 14884-900. Jaboticabal – SP, Brazil.

Bank data for deposit:

Name: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária/ Revista

Bank: Banco do Brasil (001)

Branch: 0269-0

Current account: 28848-9

### **Peer review process**

The manuscript review process will follow the journal's Editorial Guidelines and consider the editors' and/or the ad hoc reviewer's opinions. Articles that are submitted for publication will be reviewed by at least two anonymous reviewers, of whom one will be a foreigner. The reviewers will be selected by the editor-in-chief and assistant scientific editors. If the reviewers' opinions are discordant with each other, the article will be sent to a third reviewer

The reviewer should fill out the RBPV's evaluation form, which is available in the online submission system (<http://mc04.manuscriptcentral.com/rbpv-scielo>). The author will receive evaluations from at least two reviewers, as statements on evaluation forms and possibly as corrections made directly in the text. The reviewer may then correct the article, if necessary. After the manuscript has been accepted by the ad hoc reviewers, but before it is sent for the authors' responses, it will undergo a final analysis by one of the assistant scientific editors. It should be noted that the assistant scientific editors have autonomous authority to suggest corrections and/or reject publication of an article, even if the reviewers have already approved it.

After the layout and editing processes, the assistant scientific editors and editor-in-chief of the journal will make any final corrections.

Transfer of author's rights:

At the time of submission, the article must be accompanied by a formal letter signed by all the authors, in which they declare that they were responsible for the whole process of producing the manuscript and that it is entirely an unpublished original article; and that they all agree with the submission and, if approved, publication of the article only in the RBPV.

## **ETHICS**

Experiments using animals should be conducted following the Brazilian College of Animal Experimentation guidelines (<http://www.cobea.org.br>). Articles should include the protocol number approved by the Animal Ethics Committee.

## **MANUSCRIPT PREPARATION**

**The following guidelines should be followed during manuscript preparation:**

All articles should be submitted in United States English. Always use concise and impersonal language. Footnotes should be placed at the bottom of the corresponding page and numbered with Arabic numerals in an ascending order. All manuscripts should be typed in Times New Roman font, size 12, page setup with 2.5-cm top and bottom margins, 3-cm left and right

margins, and 1.5-cm line spacing. All pages should be numbered. Full Articles must not exceed 17 pages in the final layout. Short Communications must not exceed 6 pages in the final layout. All tables and illustrations should be presented separately from the main text body and attached to the final manuscript without captions. The related captions should be included in the text after the References. It is the authors' responsibility to make sure that submitted papers are reviewed by one of the English language reviewers certified by RBPV. Full Articles should be structured as follows: Original Title, Translated Title, Author(s), Affiliations, Abstract (Keywords), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions (or a combination of the last three), Acknowledgements (optional), and References. Short Communications should follow the same structure as described above, but they can be presented as a continuous stream of text without the need to include headings. For this category, manuscripts that are submitted will only be accepted if they have a high degree of novelty and originality that brings to light new findings of evident importance. The Editor-in-chief will determine whether these submissions may proceed.

### **Description of each item of the manuscript**

#### **Original title**

The full title and subtitle, if any, should not exceed 18 words. The title should not include any abbreviations, and species names and Latin words should be italicized. Titles that start with "Preliminary studies," "Notes about," and the like should be avoided. Do not use the author's name and date of citation in scientific names. Author(s)/Affiliations List all authors' full name (with no abbreviations). Affiliations should include the original institution names, not their English translations, in the following order: laboratory, department, college or school, institute, university, city, state and country. Include at the bottom of the page the corresponding author information: full address, telephone number, and current e-mail.

#### **References**

References will only be accepted if they are reader-friendly. References of papers published in conference proceedings will not be accepted and theses only if they are available for consultation at official websites such as the CAPES thesis bank: <http://www.capes.gov.br/servicos/banco-de-teses>. All cited references in the text should be carefully checked for the authors' names and dates exactly as they appear in the reference section.

#### **Abstract**

Abstracts are limited to 200 words and should be structured in a single paragraph with no indentation. The abstract should not include references. Acronyms or abbreviations should be written out in full and the abbreviation given in brackets the first time they are used in abstract, for example, indirect fluorescence assay (IFA). The abstract should be informative and present the objectives, a brief description of methods, the main results, and a conclusion. All manuscripts written in English should also have the abstract and keywords written in Portuguese.

### **Keywords**

Keywords should accurately reflect the text content. Limited to a maximum of 6 (six).

### **Introduction**

Should have a clear and concise justification of the study including its relevance and objectives and should keep the number of citations to a minimum.

### **Materials and Methods**

A concise description including core information for the understanding and reproduction of the study. Well-established methods and techniques should be cited and referenced but not described. Statistical analyses should be described at the end of the section.

### **Results**

The content of this section should be informative rather than interpretative. The results should be accompanied by self-explanatory tables, figures, or other illustrations if necessary.

### **Discussion**

Its content should be interpretative and based on the study results only. The discussion can be a single section or it can be presented together with the results and conclusions. It should emphasize the relevance of new findings and new hypotheses clearly supported by the results.

### **Tables**

Tables must be in editable format (e.g., Excel list format) and supplied in separate files. The word “Table” should precede the table title. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals and have a concise and descriptive title placed above them. They should be typed using double spacing and should have horizontal rules separating the header and the last row. The number of tables in the manuscript should be limited to a minimum.

## **Figures**

Figures consist of drawings, photographs, boards, charts, flow charts, and diagrams and should be supplied in TIF, GIF, or JPG format with a minimum resolution of 300 dpi. They should be numbered consecutively with Arabic numerals and the word “Figure” should precede the legend placed below them. List all numbered legends with their symbols and standard icons in a separate file with double spacing. Figures should be limited to a minimum. Digital pictures should be supplied in separate files. A graphic bar scale instead of a numerical one should be used in all illustrations, as it can be adjusted with size reduction.

## **Conclusions**

All conclusions may be presented in the Discussion section or in the Results and the Discussion sections when presented together, at the authors’ choice. If this is the case, there is no need for a separate Conclusions section.

## **Acknowledgments**

Should be limited to a minimum.

## **References**

References should be listed alphabetically and then sorted chronologically, if necessary. More than one reference by the same author(s) in the same year must be identified by the letters “a,” “b,” “c,” etc., placed after the year of publication. Titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus, <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>.

### **Reference to book**

Levine JD. Veterinary protozoology. Ames: ISU Press; 1985.

### **Reference to book chapter**

Menzies PI. Abortion in sheep: diagnosis and control. In: Youngquist RS, Threlfall WR. Current therapy in large animal theriogenology. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2007. p. 667-680.

### **Reference to full article**

Paim F, Souza AP, Bellato V, Sartor AA. Selective control of Rhipicephalus (Boophilus) microplus in fipronil-treated cattle raised on natural pastures in Lages, State of Santa Catarina, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 2011; 20(1): 13-16.

### **Reference to thesis or dissertation**

Araujo MM. Aspectos ecológicos dos helmintos gastrintestinais de caprinos do município de patos, Paraíba - Brasil [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2002.

### **Reference to internet URLs**

Centers for Disease Control and Prevention. Epi Info [online]. 2002 [cited 2003 Jan 10]. Available from: <http://www.cdc.gov/epiinfo/ei2002.htm>.

Note: In the Reference section, all authors should be listed up to a limit of six authors. If more than six authors, the first six authors should be listed followed by et al.

### **Citations**

All citations must follow the author–date system:

**One author:** author's name and year of publication Levine (1985) or (LEVINE, 1985)

**Two authors:** authors' names and year of publication Paim and Souza (2011) or (PAIM & SOUZA, 2011) Three or more authors: first author's name followed by et al. and year of

publication Araújo et al. (2002) or (ARAÚJO et al., 2002)

### **Layout proof**

The final layout of the article in PDF format will be provided by email to the corresponding author. Changes to the article accepted for publication will only be considered at this stage if permission from the Editor is granted. The proof must be carefully checked for accuracy as inclusion of subsequent corrections (e.g., a new author, change of paragraphs or tables) cannot be guaranteed.

## **Veterinary Research Communications**

### **Instructions for Authors**

#### **Authorship Policy**

Authorship should incorporate and should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories:

- Conceived of or designed study



- Performed research
- Analyzed data
- Contributed new methods or models
- Wrote the paper

## **Manuscript Submission**

### *Manuscript Submission*

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

### *Permissions*

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

### *Online Submission*

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

## **Title Page**

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

### *Abstract*

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

## **Text Formatting**

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 181 kB)

## **Headings**

Please use no more than three levels of displayed headings.

## **Abbreviations**

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

## **Footnotes**

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

## **Acknowledgments**

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

## References

### *Citation*

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

### *Reference list*

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

### **Tables**

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

### **Artwork and Illustrations Guidelines**

#### *Electronic Figure Submission*

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

#### *Line Art*

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

#### *Halftone Art*

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

#### *Combination Art*

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

#### *Color Art*

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

#### *Figure Lettering*

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

#### *Figure Numbering*

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

#### *Figure Captions*

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

#### *Figure Placement and Size*

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

#### *Permissions*

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

#### *Accessibility*

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

#### **Electronic Supplementary Material**

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

#### *Submission*

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

#### *Audio, Video, and Animations*

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

#### *Text and Presentations*

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

#### *Spreadsheets*

- Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

#### *Specialized Formats*

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

#### *Collecting Multiple Files*

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

#### *Numbering*

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM\_3.mpg”, “ESM\_4.pdf”.

#### *Captions*

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.



### *Processing of supplementary files*

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

### *Accessibility*

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

### **Ethical Responsibilities of Authors**

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased),

quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

**Important note:** the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.
- Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Changes of authorship or in the order of authors are **not** accepted **after** acceptance of a manuscript.
- Adding and/or deleting authors and/or changing the order of authors **at revision stage** may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the reason for the change(s) and the contribution role(s) of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request.
- Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential proprietary data is excluded.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. Please note that retraction means that the paper is **maintained**

**on the platform**, watermarked "retracted" and explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

- The author's institution may be informed.

### **Compliance with Ethical Standards**

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

### **Disclosure of potential conflicts of interest**

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that**

**are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

- [here](#):

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

**Funding:** This study was funded by X (grant number X).

**Conflict of Interest:** Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Research involving human participants and/or animals**

#### *1) Statement of human rights*

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

**Ethical approval:** “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

#### *2) Statement on the welfare of animals*

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

**Ethical approval:** “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

### **Research Data Policy**

A submission to the journal implies that materials described in the manuscript, including all relevant raw data, will be freely available to any researcher wishing to use them for non-commercial purposes, without breaching participant confidentiality.

The journal strongly encourages that all datasets on which the conclusions of the paper rely should be available to readers. We encourage authors to ensure that their datasets are either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main manuscript or additional supporting files whenever possible. Please see Springer Nature’s information on recommended repositories.

- List of Repositories
- Research Data Policy

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may be used where appropriate.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

- DataCite

Where a widely established research community expectation for data archiving in public repositories exists, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory. Persistent identifiers (such as DOIs and accession numbers) for relevant datasets must be provided in the paper

For the following types of data set, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory:

<b>Mandatory deposition</b>	<b>Suitable repositories</b>
Protein sequences	Uniprot
DNA and RNA sequences	Genbank DNA DataBank of Japan (DDBJ) EMBL Nucleotide Sequence Database (ENA)
DNA and RNA sequencing data	NCBI Trace Archive NCBI Sequence Read Archive (SRA)
Genetic polymorphisms	dbSNP dbVar European Variation Archive (EVA)
Linked genotype and phenotype data	dbGAP The European Genome-phenome Archive (EGA)
Macromolecular structure	Worldwide Protein Data Bank (wwPDB) Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB) Electron Microscopy Data Bank (EMDB)
Microarray data (must be MIAME compliant)	Gene Expression Omnibus (GEO) ArrayExpress
Crystallographic data for small molecules	Cambridge Structural Database

For more information:

- [Research Data Policy Frequently Asked Questions](#)

Data availability

The journal encourages authors to provide a statement of Data availability in their article. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found, including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. Data availability statements can also indicate whether data are available on request from the authors and where no data are available, if appropriate. Data Availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

- 1. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
- 2. The datasets generated during and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
- 3. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.
- 4. Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
- 5. All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available:

- [Data availability statements](#)

This service provides advice on research data policy compliance and on finding research data repositories. It is independent of journal, book and conference proceedings editorial offices and does not advise on specific manuscripts.

- [Helpdesk](#)



## **After acceptance**

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

### **Copyright transfer**

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

- Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

### **Offprints**

Offprints can be ordered by the corresponding author.

### **Color illustrations**

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

### **Proof reading**

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

### **Online First**

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

### **Open Choice**

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer

provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- Open Choice

*Copyright and license term – CC BY*

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

### **English Language Editing**

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

- Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
- Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below.
- [English language tutorial](#)
- [Nature Research Editing Service](#)
- [American Journal Experts](#)

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

