



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**  
**MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ANTÔNIO FRANCISCO IGOR MAGALHÃES DE MATOS**

**EFICÁCIA DA VACINA BARBERVAX<sup>®</sup> NO CONTROLE DE *Haemonchus contortus* EM  
CAPRINOS**

**FORTALEZA - CEARÁ**

**2016**

**ANTÔNIO FRANCISCO IGOR MAGALHÃES DE MATOS**

**EFICÁCIA DA VACINA BARBERVAX<sup>®</sup> NO CONTROLE DE *Haemonchus contortus* EM  
CAPRINOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Veterinárias. Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia Maria Leal  
Bevilaqua

**FORTALEZA - CEARÁ**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Matos, Antônio Francisco Igor Magalhães de.  
EFICÁCIA DA VACINA BARBERVAX NO CONTROLE DE  
Haemonchus contortus EM CAPRINOS [recurso eletrônico]  
/ Antônio Francisco Igor Magalhães de Matos. - 2016.  
1 CD-ROM: il.; 4 ¾ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do  
trabalho acadêmico com 64 folhas, acondicionado em  
caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade  
Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,  
Fortaleza, 2016.

Área de concentração: Reprodução e Sanidade Animal.  
Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dra. Claudia Maria Leal  
Bevilaqua.

Coorientação: Prof. Ph.D. Marcel Teixeira.

1. Nematóide. 2. Vacina. 3. Barbervax. 4. H11. 5.  
H-gal-Gp . I. Título.

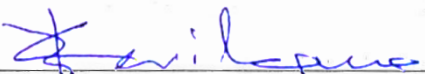
ANTÔNIO FRANCISCO IGOR MAGALHÃES DE MATOS


**EFICÁCIA DA VACINA BARBERVAX® NO CONTROLE DE *Haemonchus contortus* EM  
CAPRINOS**

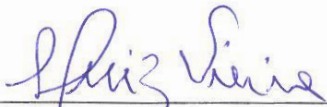
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Veterinárias. Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

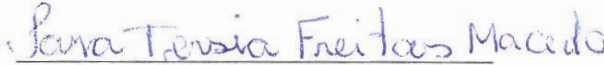
Aprovada: 09 / 12 / 2016

BANCA EXAMINADORA

  
Profª Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua  
Universidade Estadual do Ceará – UECE  
Orientadora

  
Dr. Marcel Teixeira  
Embrapa Caprinos e Ovinos  
Coorientador

  
Dr. Luiz da Silva Vieira  
Embrapa Caprinos e Ovinos  
Examinador

  
Profª Dra. Iara Tersia Freitas Macedo  
Universidade Estadual do Ceará - UECE  
Suplente

Dedico,

A todos os meus familiares, em especial a minha mãe que foi referência durante minha vida e foi essencial para que essa etapa fosse concluída.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Valdemar Camelo de Matos e Tânia Maria Magalhães de Matos pelo apoio e educação que me foi concedida durante meus anos de vida, em especial a minha mãe.

Aos meus irmãos, Ricardo Magalhães de Matos, José Mardone Magalhães de Matos e Antônia Lara Magalhães de Matos a qual convivo e são verdadeiros amigos.

A Ana Márjory pelo apoio e dedicação, sendo uma das principais incentivadoras nessa caminhada.

A minha orientadora Dra. Claudia Bevilaqua e meu coorientador Dr. Marcel Teixeira pela paciência e todo conhecimento dividido.

Ao corpo docente do curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias por todos os ensinamentos repassados.

Aos colegas bolsistas da Embrapa: Jéssica, Claudelice e Clarisse pelo o apoio durante a pós-graduação.

Aos laboratoristas da Embrapa: Felipe e Dona Helena.

Aos integrantes do LABODOPAR, pela cooperação durante esse processo: Weibson, Wesley, Vilemar, Fernanda, Ana Carolina, Gessica e Rafaela. Em especial ao Weibson pela contribuição em alguns momentos de dúvida;

Enfim, a todos vocês, meu muito obrigado!

## RESUMO

Entre as possíveis alternativas de controle do nematoide *Haemonchus contortus* está o uso de vacinas. Estudos preliminares demonstraram que proteínas integrais do trato digestivo desse nematoide possuem propriedades imunogênicas podendo ser utilizadas para imunizar animais, levando ao desenvolvimento de uma vacina comercial denominada Barbervax<sup>®</sup>. Neste trabalho, avaliamos a eficácia desta vacina no controle de de *H. contortus* em caprinos leiteiros. Para tanto, foram utilizados caprinos das raças Saneen (n=20) e Anglo Nubiano (n=20) em sistema de produção semi-intensivo. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=10) vacinados ou não para cada raça, utilizando o seguinte protocolo: três doses de pré-imunização com intervalos de 21 dias antes do desafio e doses de reforço a cada seis semanas por um período de oito meses. Amostras de fezes e sangue foram coletadas semanalmente para a contagem de ovos por grama de fezes em câmara MacMaster e coprocultura para identificação de larvas, além de avaliação do volume globular e proteínas plasmáticas totais. Ainda, foi realizada a titulação de anticorpos pelo método ELISA do período de pré-imunização e entre o intervalo dos reforços. Mensalmente a coloração da conjuntiva ocular foi avaliada pelo método Famacha<sup>®</sup>. Os dados parasitológicos e hematológicos foram submetidos à análise de variância e as médias dos grupos comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%. Os resultados foram expressos como médias aritméticas e erro padrão. Observou-se que a vacinação reduziu a produção de ovos em 69,8 e 57,4 % em média nas cabras Anglo e Saanen, respectivamente. Porém, apenas os animais vacinados da raça Anglo Nubiana obtiveram resultados superiores de volume globular, proteínas plasmáticas totais e grau Famacha bem como apresentou maior titulação de anticorpos. Os resultados demonstraram que a imunização de caprinos com Barbervax<sup>®</sup> é uma alternativa promissora para a caprinocultura.

**Palavras-chave:** Nematoide. Vacina. Barbervax. H11. H-gal-Gp.

## ABSTRACT

Among alternatives in the control of the nematode *Haemonchus contortus* the use of vaccines has been evaluated. Previous studies shown that integral gut proteins from the nematode have immunogenic properties leading to a commercial vaccine Barbervax<sup>®</sup>. In this study we purpose to evaluate the efficacy of this vaccine in the control of *H. contortus* in dairy goats. Goats Saanen (n = 20) and Anglo Nubian (n = 20) breeds in a semi-intensive production system were used for this trial, separated in in four experimental groups (n = 10) vaccinated or not vaccinated for each breed using the following protocol: three priming doses 21 days apart before the challenge and boosts doses every six weeks during eight months. Feces and blood samples were collected weekly for egg counts, coproculture and hematological evaluation . An ELISA indirect assay was used to measure antibodies against the specific glycoprotein antigen during the experiment. The anaemia score was monitored according FAMACHA method. Parasitological and hematological data were submitted to ANOVA and means compared by Tukey test with significance level of 5%). The results were expressed as arithmetic means and standard error. It was observed that vaccination reduced egg production by 69.8 and 57.4% on average in Anglo and Saanen goats, respectively. However, only immunized Anglo Nubian goats presented better hematological, Famacha scoring and significant higher antibodies compared to their controles. It was concluded that vaccination was effective in the control of *H. contortus* that can be considered a promising alternative for goat breeding.

**Keywords:** Nematode. Vaccine. Barbervax. H11. H-gal-Gp.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fecal excretion of *Haemonchus contortus* eggs (eggs per gram of feces, EPG) in two groups (vaccinated breed Anglo-nubian goats(□), control breed Anglo-nubian goats(●) and vaccine given (▼) ) and percentage (%) of efficacy of the vaccinated group per month during the experimental period. Values are means ± S.E.M. single of each animal at the end of the experimental.....35**
- Figura 2 - Fecal excretion of *Haemonchus contortus* eggs (eggs per gram of feces, EPG) in two groups (vaccinated breed Saanen goats(□), control breed Saanen goats(●) and vaccine given (▼) ) and percentage (%) of efficacy of the vaccinated group per month during the experimental period. Values are means ± S.E.M. single of each animal at the end of the experimental.....36**
- Figura 3 - Packed cell volume (PCV). Values during the experimental period in two groups (vaccinated breed Anglo-nubian goats (□), control breed Anglo-nubian goats (●) and vaccine given (▼) ). Values are means ± S.E.M./\*Statistically significant difference of group vaccinated compared with group control (P < 0.05).....38**
- Figura 4 - Total Protein. Values during the experimental period in two groups (vaccinated breed Anglo-nubian goats (□), control breed Anglo-nubian goats (●) and vaccine given (▼)). Values are means ± S.E.M./\*Statistically significant difference of group vaccinated compared with group control (P < 0.05).....39**
- Figura 5 - Antibody titre. Values during the experimental period in two groups (vaccinated breed Anglo-nubian goats (■), control breed Anglo-nubian goats (■) and vaccine given (▼)). Values are means ± S.E.M.....40**
- Figura 6 - Famacha © scores. Values during the experimental period in two groups (vaccinated breed Anglo-nubian goats (V) control breed Anglo-nubian goats (C). Values are percentage of goats with each score./\*Statistically significant difference of group vaccinated compared with group control (P < 0.05).....41**
- Figura 7 - Packed cell volume (PCV). Values during the experimental period in two groups (vaccinated breed Saanen goats (□), control breed Saanen goats (●) and vaccine given**

(▼)). Values are means ± S.E.M. ....42

**Figura 8 - Total Protein. Values during the experimental period in two groups (vaccinated breed Saanen goats (□), control breed Saanen goats (●) and vaccine given (▼)). Values are means ± S.E.M.....44**

**Figura 9 - Antibody response of the goats. Values during the experimental period in two groups (vaccinated breed Saanen goats (■), control breed Saanen goats (■) and vaccine given (▼)). Values are means ± S.E.M. ....44**

**Figura 10 - Famacha © scores. Values during the experimental period in two groups (vaccinated breed Saanen goats (V) control breed Saanen goats (C). Values are percentage of goats with each score.....45**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DF	Distrito Federal
EPG	Eggs per gram
Famacha	Faffa Malan Chart
FC	Fragments cristalizáveis
H-gal-GP	<i>Haemonchus</i> galactose glycoprotein
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgE/IgG	Imunoglobulina E e G
IL	Interleucina
kDa	Kilodalton
L1-L5	Primeiro a quinto estágio larval
MEP	Metaloendopeptidase de zinco
NRC	National Research Council
OPG	Ovos por grama de fezes
PVC	Packed cell volume
S.E	Standard error
SAS	Statistical Analysis System
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de produtos para saúde Animal
TGI	Trato gastrintestinal
Th2	Subtipo de linfócito T auxiliar
TPP	Total plasma protein

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1	PARASITISMO GASTRINTESTINAL EM CAPRINOS.....	14
2.2	<i>Haemonchus contortus</i> .....	15
2.2.1	<b>Classificação.....</b>	<b>15</b>
2.2.2	<b>Morfologia.....</b>	<b>16</b>
2.2.3	<b>Biologia.....</b>	<b>16</b>
2.2.4	<b>Patogenia.....</b>	<b>16</b>
2.2.5	<b>Epidemiologia.....</b>	<b>17</b>
2.3	PRINCIPAIS FORMAS DE CONTROLE.....	17
2.3.1	<b>Controle químico.....</b>	<b>17</b>
2.3.2	<b>Métodos alternativos.....</b>	<b>18</b>
2.4	RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA.....	19
2.5	MECANISMOS IMUNOLÓGICOS NA INFECÇÃO POR <i>Haemonchus. contortus</i> ....	20
2.6	VACINAS NO CONTROLE DE <i>Haemonchus contortus</i> .....	21
2.6.1	<b>Antígenos Naturais.....</b>	<b>21</b>
2.6.2	<b>Antígenos Ocultos.....</b>	<b>22</b>
2.6.2.1	H11.....	22
2.6.2.2	H-gal-GP.....	23
2.6.2.3	Barbervax.....	24
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>HIPOTESE CIENTIFICA.....</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
5.1	GERAL.....	28
5.2	ESPECIFICOS.....	28
<b>6</b>	<b>CAPITULO I.....</b>	<b>29</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura é considerada uma atividade agropecuária viável em regiões de clima quente, sobretudo devido à capacidade dos caprinos em se adaptar as condições adversas, a sua facilidade de manejo e capacidade de transformar alimento de baixa qualidade em proteína animal (GUIMARÃES, 2004; SOUZA et al., 2011). Além disso, os animais constituem fonte de alimento e renda para pequenas e médias propriedades, servindo como estratégia para o desenvolvimento rural (SILVA; GUIMARÃES FILHO, 2006). Atualmente o Brasil possui um rebanho de 8.851.879 cabeças de caprinos distribuídos em todo território nacional, contudo 91,6% concentra-se na região nordeste (IBGE, 2013).

Embora haja perspectivas de crescimento, alguns fatores continuam afetando sobremaneira a qualidade e a regularidade da oferta dos produtos, reduzindo a rentabilidade do setor (MCKELLAR; JACKSON, 2004). Dentre os problemas sanitários, a infecção por nematóides gastrintestinais representa um dos maiores entraves a produção, pois causa redução do peso dos animais, anemia severa podendo levar a morte (COSTA; SIMÕES; RIET-CORREA, 2011). As infecções normalmente são mistas e nematoides como *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides papillosus*, *Oesophostomum* spp e *Haemonchus contortus* são encontrados em todo país, com destaque para este último devido a maior prevalência, patogenicidade e grande número de animais parasitados (AMARANTE, 2004a, 2009).

O controle dos nematoides ainda é realizado principalmente com uso de drogas anti-helmínticas de variados grupos químicos, entre eles os benzimidazóis, imidazotiazóis, salicilanilidas, lactonas macrocíclicas e substitutos fenólicos (MOLENTO et al., 2013). Estima-se que os custos com drogas antiparasitárias no mercado internacional sejam de aproximadamente 4,05 bilhões de dólares gastos no controle de parasitas internos e externos (BUENO et al., 2008). No Brasil, os dados mais recentes mostram que o volume comercializado chega a 540 milhões de reais com parasiticidas (SINDAN, 2014). Ao longo do tempo o uso contínuo dos anti-helmínticos muitas vezes em dosagens inadequadas e com alta frequência de tratamentos acelerou o aparecimento da resistência anti-helmíntica, cujos relatos continuam sendo encontrados em diversas partes do mundo (CHANDRAWATHANI; ADNAN; WALLER, 1999; LIMA et al., 2010; MELO et al., 2003; RODRIGUES et al., 2007; TERRILL et al., 2001) inclusive no Brasil (Cintra et al., 2016). Além disso, a presença de resíduos das drogas na carne e no leite preocupa o consumidor moderno, que passou a optar por alimentos com mínimo de intervenção química e que não tenham efeitos deletérios para o meio ambiente (KNOX; TORRES-ACOSTA; AGUILAR-CABALLERO, 2006)

Uma das perspectivas para o controle das infecções parasitárias está no desenvolvimento de vacinas. Foi demonstrado que proteínas integrais do trato digestivo de *H. contortus* possuem propriedades imunogênicas podendo ser utilizadas para imunizar animais contra infecção por este parasito (KNOX et al., 2003). Após anos de tentativas de produzir um antígeno recombinante sem sucesso, descobriu-se que a dose do antígeno integral necessária para induzir a resposta imune era muito menor do que se imaginava originalmente. Simultaneamente, diversos adjuvantes foram avaliados durante os experimentos e equipamentos necessários à produção e a purificação de grandes volumes do antígeno foram desenvolvidos, dando um grande passo para a produção de uma vacina em escala comercial. A partir daí inúmeros experimentos dose-resposta foram conduzidos em ruminantes para avaliar a proteção conferida por vacinas com baixas doses do antígeno nativo (BESIER et al., 2012).

Neste contexto, é evidente que uma medida preventiva capaz de reduzir a contaminação das pastagens e a carga parasitária dos animais acarretaria em um grande benefício para a cadeia produtiva de pequenos ruminantes. Porém, até o momento os estudos têm sido concentrados em ovinos, e pouca atenção tem sido dada aos sistemas de produção de caprinos. Logo, e considerando as diferenças fisiológicas entre estas espécies, é importante que medidas de controle recém-lançadas sejam também avaliadas nesta espécie (MEDEIROS et al., 2008).

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 PARASITISMO GASTRINTESTINAL EM CAPRINOS**

A doença causada por parasitas gastrintestinais assume elevada importância na produção de caprinos e ovinos em todo o mundo, já que é um problema limitante para as cadeias produtivas podendo até mesmo inviabilizar a atividade (PERRY; RANDOLPH, 1999; RINALDI; VENEZIANO; CRINGOLI, 2007). Isso se deve as lesões causadas na mucosa digestiva, a espoliação sanguínea, disfunções na absorção dos nutrientes, diarreia sanguinolenta e anemia que vão determinar uma maior ou menor gravidade dependendo do grau infecção. Como consequência, há redução no consumo de alimentos e no ganho de peso e rendimento de carcaça, bem como queda na produção de leite e em situações mais graves baixa fertilidade e alta mortalidade (LAGARES, 2008).

Alguns fatores são determinantes nos efeitos do parasitismo, como a espécie e carga parasitária ao qual o animal é exposto no ambiente (SANTOS; SILVA; AMARANTE, 2012). Fatores ligados ao hospedeiro como idade, estado nutricional, estresse fisiológico e estado sanitário

influenciam na resposta contra as infecções. Do mesmo modo, fatores externos influenciam a cargas parasitária, como as condições climáticas e tipo de gramínea que determinam uma maior ou menor sobrevivência de larvas nas pastagens, o comportamento do animais ao pastejar, alta taxa de lotação e o uso inadequado de drogas anti-helmínticas (WALLER, 2006; YOSHIHARA; MINHO; YAMAMURA, 2013).

Apesar das mesmas espécies de nematoides ocorrerem em ovinos e caprinos, as infecções diferem entre esses hospedeiros. Existe maior frequência da doença em caprinos e este fato pode estar associado ao hábito de alimentação dessa espécie, que por preferirem alimentar-se de arbustos, não foram muito expostos às infecções durante sua domesticação, sendo assim não conseguiram estabelecer uma resposta tão eficiente contra os parasitos. (TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008). Nesta espécie, as categorias mais sensíveis são cabritos e cabras em peri-parto. Os animais jovens devido sua imunidade não estar estabelecida por infecções anteriores, e as fêmeas próxima do parto por haver uma redução na resposta imune celular e anticorpos por influência hormonal, isso faz com que as larvas sobrevivam no trato gastrintestinal (TGI). Consequentemente, ocorrerá aumento na produção de ovos dos nematoides, que serão eliminados nas fezes (KHAN et al., 2010; SILVA; FAGUNDES; FONSECA, 2011).

No Brasil, as principais espécies de nematoides são mais frequentes nas pastagens durante os meses mais úmidos e de temperaturas amenas, sendo fonte contínua de larvas infectantes aos animais em pastejo. Dentre as espécies mais comuns encontram-se os nematoides do abomaso *Trichostrongylus axei* e *H. contortus*, este último de maior importância na produção de pequenos ruminantes por ser mais patogênico sendo o maior causador de prejuízos aos rebanhos nacionais. Ainda, no TGI de caprinos destacam-se *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides papillosus*, *Cooperia* spp. e *Bunostomum trigonocephalum* que parasitam o intestino delgado; *Oesophagostomum columbianum*, *Trichuris* sp., *Skrjabinema* sp. presentes no intestino grosso (AMARANTE, 2009; SANI; GRAY; BAKER, 2004).

## 2.2 *Haemonchus contortus*

### 2.2.1 Classificação

*Haemonchus contortus* é classificado de acordo com sua taxonomia da seguinte maneira:

- Filo: Nematelminthes
  - Classe: Nematoda
    - Ordem: Strongylida
      - Superfamília: Trichostrongyloidea

- Família: Trichostrongylidae

- Gênero: *Haemonchus*

- Espécie: *Haemonchus contortus* Rudolf, 1803

### 2.2.2 Morfologia

Os nematoides adultos possuem comprimento entre 2-3 cm e são identificados facilmente no abomaso. As fêmeas adultas possuem ovários em espirais de cor branca que envoltos pelo intestino repleto de sangue dão aspecto de poste de barbeiro sendo conhecido por isso como “Barberworm” (URQUHART; ACEDO, 2001). Microscopicamente a fêmea caracteriza-se por possuir um apêndice vulvar, o macho possui um lobo dorsal assimétrico e espículo com ganchos. Em ambos é possível observar um lobo dorsal assimétrico e uma pequena lanceta no interior da sua cápsula bucal (LICHTENFELS; PILITT; HOBERG, 1994; URQUHART; ACEDO, 2001)

### 2.2.3 Biologia

O ciclo biológico de *H. contortus* é direto, dividido em fases de vida livre e parasitária. As fêmeas são ovíparas com alta prolificidade e após a reprodução liberam seus ovos no interior do abomaso, sendo excretados posteriormente junto com as fezes dando assim início fase de vida livre. A eclosão dos ovos e o desenvolvimento das larvas ocorre no bolo fecal, e sob condições ideais de temperatura (18-26°C) e umidade (80-100%), as larvas sofrem mudas que são acompanhadas de troca da cutícula (L1 a L3). As larvas em desenvolvimento se alimentam de bactérias com exceção do estágio de larva infectante (L3), que além de adquirir uma nova cutícula mantém a bainha anterior para proteção e, portanto, não se alimenta. Este processo pode levar de 5-7 dias, dependendo das condições ambientais, podendo prolongar-se por semanas ou até meses, em climas muito quentes ou muito frios (BOWMAN et al., 2010). Nas horas mais amenas do dia a larva infectante (L3) migra nas pastagens para as partes superiores do capim, quando são ingeridas pelos animais durante o pastejo. Após a ingestão ocorre o desembainhamento no rúmen e as larvas sofrem duas mudas (L4 e L5) em íntima aposição as glândulas gástricas no abomaso (ONYIAH; ARSLAN, 2005). Antes da muda final os parasitos desenvolvem uma lanceta bucal perfurante que permite obter sangue dos vasos sanguíneos presentes na mucosa tornando-se hematófagos. O período pré-patente em caprinos é de duas a três semanas (URQUHART; ACEDO, 2001).



#### 2.2.4 Patogenia

A hemonose clínica é caracterizada por anemia hemorrágica aguda, em consequência do hábito hematófago do parasito e a incapacidade do hospedeiro de compensar a perda de sangue. Um único nematoide é capaz de se alimentar de cerca de 0,05 mL/dia e ainda causar micro hemorragias na mucosa abomasal, de forma que se um hospedeiro tivesse uma carga parasitaria de 5.000 adultos a perda de sangue poderia chegar a 250mL/dia (URQUHART; ACEDO, 2001). Como consequência da espoliação sanguínea tem-se redução do volume globular e das proteínas plasmáticas totais, provocando sinais clínicos como edema submandibular e anemia observada claramente na mucosa ocular dos animais (BOWMAN et al., 2010; ONYIAH; ARSLAN, 2005).

#### 2.2.5 Epidemiologia

No Brasil os rebanhos possuem alta prevalência de *H. contortus* que representa mais de 80% da carga parasitária de caprinos e ovinos (CHARLES, 1995; SOUZA et al., 2013, SANTOS, 2017). Dessa forma, é considerada o nematoide mais importante das regiões tropicais e subtropicais, onde as condições climáticas são favoráveis ao seu desenvolvimento (AMARANTE, 2009; SILVA; BEVILAQUA; RODRIGUES, 2003). Nos períodos úmidos e quentes as fêmeas de *H. contortus* se alimentam de maior quantidade de sangue, sendo capazes de produzir até 10.000 ovos por dia, o que eleva a população de parasitos nas pastagens (PRICHARD, 2001). Durante a estação seca o ambiente se torna desfavorável para o desenvolvimento dos estágios de vida livre dos nematoides, havendo pouca ou nenhuma larva nas pastagens, portanto, durante esse período a maior parte da população se concentra no hospedeiro (WANG, et al., 2014).

Na necropsia podem estar presentes de 1.000-20.000 nematoides no conteúdo e mucosa abomasal. No nordeste brasileiro, *H. contortus* é a espécie mais prevalente onde se pode observar grande quantidade de lesões hemorrágicas e conteúdo castanho escuro devido à presença de sangue (DOMKE et al., 2013; GONZÁLEZ-GARDUÑO; MENDOZA-DE GIVES; TORRES-HERNÁNDEZ, 2013; URQUHART; ACEDO, 2001).

### 2.3 PRINCIPAIS FORMAS DE CONTROLE

#### 2.3.1 Controle químico

O controle químico constitui o método convencional de controle da verminose e utiliza as drogas anti-helmínticas de acordo com o risco da doenças que está relacionado a época do ano e o

manejo do rebanho. Neste contexto, o **controle curativo** baseia-se no tratamento dos animais que apresentam sintomatologia e mortes em ocasião da verminose aguda. O **controle tático** visa aplicação de anti-helmintico em situações de risco atípicas como mudanças climáticas inesperadas, introdução de animais novos ao rebanho, períodos de estresse fisiológico como estação de monta e periparto. Diferentemente, o **controle supressivo** é aplicado a todos os animais do rebanho ao mesmo tempo, buscando-se reduzir a carga parasitária e a contaminação do ambiente. Neste caso os tratamentos são realizados de 14-28 dias com drogas de curta duração afim de eliminar os parasitos antes do período final da pré-patência (REIS, 2004; TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008). Da mesma forma o **controle estratégico** visa interromper o ciclo de vida dos parasitos, porém é realizado de acordo com a epidemiologia de cada região e fundamenta-se em tratar os animais em períodos que antecedem as épocas de maior incidência de verminose nos rebanhos. Esse protocolo parte do princípio que a maioria dos nematoides concentram-se no hospedeiro em períodos que as condições do ambiente são desfavoráveis para a sua sobrevivência nas pastagens, e tomando como exemplo a região Nordeste os animais recebem três tratamentos com intervalos médios de dois meses no período seco e mais um tratamento em meados do período chuvoso (COSTA; VIEIRA, 1984). Ambos, controle supressivo e estratégico não são mais recomendados por acelerarem o aparecimento da resistência anti-helmintica (REIS, 2004). Recentemente, uma metodologia eficaz na redução dos tratamentos químicos tem sido o **controle seletivo ou alvo-seletivo**, cujo mais aceito denominado de Famacha<sup>®</sup> avalia a coloração da mucosa ocular dos animais para estimar o risco de Haemonchosis e a necessidade de tratamento (VAN WYK; MALAN; BATH, 1997).

### 2.3.2 Métodos alternativos

Os métodos alternativos de controle em geral visam reduzir as infecções e a contaminação ambiental evitando ao máximo o uso de drogas anti-helmínticas (WALLER, 1994). Entre esses destacam-se as estratégias de manejo das pastagens, seleção de animais para resistência e manejo nutricional. O **pastejo alternado e rotacionado** de pequenos ruminantes e bovinos parte do princípio da especificidade parasitária dos nematoides e seus hospedeiros, onde a maioria das larvas infectantes para caprinos e ovinos quando ingeridas por bovinos são incapazes de estabelecer infecção, conseqüentemente sendo destruídas (FERNANDES et al., 2004). Ao mesmo tempo a ação de **fungos nematófagos** administrados por via oral demonstra redução nas contagens de ovos nas fezes de ovinos, tendo potencial como método biológico no controle parasitário (JESUS et al., 2013). Igualmente, alguns **produtos vegetais** possuem efeito no controle de nematoides gastrintestinais com resultados

promissores (ASSIS et al., 2003; GIRÃO et al., 1998; IGARASHI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 1997).

## 2.4 RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA

A principal forma de controle da verminose é ainda o uso de drogas anti-helmínticas (BIZIMENYERA et al., 2006). Esse fato é agravado pela falta de conhecimento técnico, que resulta no uso incorreto e na crescente diminuição da eficácia das drogas (MOLENTO et al., 2004). Consequentemente, os parasitos são capazes de resistir à doses cada vez maiores de diferentes anti-helmínticos que anteriormente eram letais. Isso ocorre porque o tratamento anti-helmíntico frequente gera uma pressão de seleção sobre as populações de nematoides que estão no hospedeiro, característica com habilidade hereditária (ALMEIDA, 2005; VIEIRA, 2003). O primeiro relato de resistência em nematoides de caprinos foi descrito no Texas, Estados Unidos (THEODORIDES; SCOTT; LADERMAN, 1970). No Brasil, suspeitou-se inicialmente de nematoides gastrintestinais resistentes em caprinos no estado do Ceará (VIEIRA, 1986). Em estados do Nordeste brasileiro diversos estudos diagnosticaram populações de nematoides resistentes aos benzimidazóis (BARRETO, 2002; BISPO et al., 2002; CHARLES; POMPEU; MIRANDA, 1989; MELO et al., 2003; VIEIRA; CAVALCANTE, 1999). Populações de nematoides resistentes à ivermectina foram detectadas na Bahia, Rio Grande do Sul, Ceará e Alagoas (BEVILAQUA, CABARET, SANTOS, 2015; SANTOS et al., 2017).

Os mecanismos ligados à resistência das diferentes classes anti-helmínticas são distintos, dentre os mais frequentes, como os benzimidazóis esse mecanismo está atrelado ao seu mecanismo de ação, a inibição na formação de microtúbulos, organelas que tem papel importante nos processos celulares. Com isso, as drogas causam alterações nas células intestinais do intestino do nematoide e consequentemente levando-os a morte (MARTIN, 1997; KÖHLER, 2001). Na resistência aos benzimidazóis, há uma redução dos sítios de afinidade da droga nas subunidades proteicas dos microtúbulos. Estudos demonstram que há uma seleção de alelos específicos, ocorrendo mutação na troca de aminoácidos como a fenilalanina pela tirosina em gene da  $\beta$ -tubulina de isolados de *H. contortus*. (GEARY et al., 1999). De outra forma, fármacos como a ivermectina são classificados como lactonas macrocíclicas e consideradas de amplo espectro. As drogas desse grupo possuem mecanismo de ação ao causar paralisia deletéria ao abrir os canais de cloro com portão glutamato. A resistência ligada a ivermectina está nas associações entre alelos que codificam o canal cloro com portão glutamato. Bem como, estudos revelam que há o envolvimento de outro alvo bioquímico ligado a resistência desse grupo, o efluxo da droga mediada pelas glicoproteínas-P que são proteínas

transmembranares responsáveis pelo transporte das drogas por entre as membranas das células (BLACKHALL et al., 1998).

## 2.5 MECANISMOS IMUNOLÓGICOS NA INFECÇÃO POR *Haemonchus contortus*.

A resposta imunológica é estimulada por dois mecanismos encontrados nas infecções por parasitos. A imunidade inata, existente desde o nascimento do animal, que envolve neutrófilos, macrófagos, eosinófilos. Esta imunidade não possui memória, mas age em minutos ou poucas horas após o contato com o parasito. Ao longo do tempo essa resposta não é aumentada após reinfecções. A resposta imune adquirida é ampliada durante a vida do animal, e é capaz de identificar e criar uma resposta contra várias moléculas consideradas antígenos. Seu desenvolvimento é lento, de dias até semanas, possuindo memória, conseqüentemente é mais eficiente nas reinfecções (TIZARD, 2008)

A maioria dos hospedeiros albergam poucos parasitos, causando apenas doença leve e subclínica, mas alguns abrigam uma elevada quantidade de nematoides podendo levar a uma doença letal aguda (AMARANTE, 2004b). Os helmintos são parasitos obrigatórios adaptados, ou seja, para sua sobrevivência são dependentes em ocupar determinado espaço em seu hospedeiro, dessa forma, ocorreu na sua evolução, por necessidade, conseguir superar ou fugir das respostas imunes. Os fatores inatos envolvidos não incluem apenas efeitos relacionados ao animal, como idade, sexo e principalmente os antecedentes genéticos do hospedeiro, mas também a presença de outros parasitos e influências ambientais (TIZARD, 2008). Assim, ovelhas apresentaram elevadas contagens de ovos nas fezes de nematoides durante o período de parto e início da lactação, coincidindo com a primavera (PINTO et al., 2008).

As helmintoses são um desafio para o sistema imunológico, normalmente, nematoides adultos presentes nos tecidos são atacados por respostas inflamatórias específicas utilizando células sentinelas como mastócitos, macrófagos e células dendríticas. Os eosinófilos e mastócitos são células de defesas de predileção contra as helmintoses (BALIC; BOWLES; MEEUSEN, 2000; MELNEK et al., 2014). As respostas mediadas por linfócitos Th2 também agem em respostas aos helmintos, devido a esse fato, os níveis de IgE, mecanismos mediados por citocinas e os elevados números de eosinófilos são encontrados em animais parasitados. Esses eosinófilos são atraídos pelos quimioatrativos liberados pela degranulação de mastócitos, papel também desempenhado por citosinas como a IL-5 mobilizando a medula óssea a liberá-los na circulação (BALIC; BOWLES; MEEUSEN, 2000). Utilizando receptores FC os eosinófilos se ligam aos parasitas, liberando os grânulos na cutícula do nematoide.

Enquanto nas mucosas desses nematoides liberam várias proteínas, promovendo respostas inatas, outros antígenos estimulam altos níveis de IgE pela resposta de linfócitos Th2. Interleucinas como IL-13 e IL-33 induzem a expulsão de nematoides adultos acompanhadas de células como mastócitos, eosinófilos e elevados níveis séricos de IgG1 específicas contra o parasito (TIZARD, 2008).

Apesar de existirem mecanismos de defesa por meio dos hospedeiros que resistem às infecções, estas defesas não são totalmente eficazes. Os helmintos que se adaptam podem sobreviver de forma efetiva mesmo na presença de sistema imunológico funcional do animal (ANTHONY et al., 2007). Os parasitos se tornaram progressivamente menos antigênicos conforme evoluíram na presença de um sistema imunológico funcional. A seleção natural favorece a sobrevivência dos parasitos com reduzida antigenicidade, ou seja, *H. contortus* é menos antigênico em ovelhas, do que em hospedeiros acidentais (TIZARD, 2008).

## 2.6 VACINAS NO CONTROLE DE *Haemonchus contortus*.

### 2.6.1 Antígenos Naturais

Durante o processo de infecção gastrointestinal, o parasito em contato com as mucosas do hospedeiro elimina diversos antígenos de origem excretória/secretória, essas estruturas são chamadas de antígenos naturais. Consequentemente, o hospedeiro produz defesas contra esses antígenos mediados por anticorpos (ARUNKUMAR, 2012).

Produtos oriundos de *H. contortus* vêm sendo analisados como potencial na imunização de ovinos. Estudos com esses antígenos induziram forte resposta humoral e celular (ARUNKUMAR, 2012; SCHALLIG; VAN LEEUWEN; HENDRIKX, 1994). Moléculas isoladas de diversas partes do nematoide são candidatas promissoras em ensaios de vacinações contra *H. contortus* (RATHORE et al., 2006). Outros estudos demonstraram que a imunização pode induzir resposta imune protetora reduzindo contagens de ovos por grama nas fezes (OPG) e carga parasitária (BAKKER et al., 2004; SCHALLIG; VAN LEEUWEN; CORNELISSEN, 1997).

Piedrafita et al. (2012) realizaram ensaios de vacinação com extratos de larvas de *H. contortus*. Em doses mais elevadas do antígeno, resultou em diminuições significativas de 61% na contagem de ovos nas fezes e uma redução de 69% na carga parasitária. No entanto, as informações sobre o purificado isolado é relativamente escasso. Recentemente, Fawzi et al. (2014) utilizando uma proteína somática a partir de adultos *H. contortus* (Hc23) de baixo peso molecular, quando formulada com hidróxido de alumínio e adjuvante bacteriano provocou reduções significativas na contagem de ovos nas fezes 70,67% e 85,64%, respectivamente. No mesmo estudo, houve uma redução de 67,1% e

86% nas contagens da carga parasitária. Deve notar-se, contudo, que estes valores referem-se a reduções comparadas com um grupo de desafio não imunizado, em vez dos grupos controles administrado apenas com o adjuvante. Mas os resultados oferecem alguma esperança para o uso dessas proteínas como antígenos no controle da haemoncose.

## 2.6.2 Antígenos Ocultos

O antígeno é definido como oculto quando o reconhecimento pelo hospedeiro não ocorre após a infecção. Geralmente os hospedeiros não são expostos a proteínas oriundas de intestino de parasitos não invasivos, tais como os nematoides gastrintestinais. Entretanto, nos parasitos hematófagos a superfície do intestino é uma potencial estrutura para receber anticorpos após alimentação de sangue. As imunoglobulinas são capazes de causar danos e/ou neutralizar as enzimas que atuam no processo digestório dos helmintos adultos, conseqüentemente poderão causar alterações nas estruturas do parasito acarretando na morte por inanição (KNOX et al., 2003). A confirmação que antígenos oriundos do intestino de *H. contortus* possuíam alto poder imunogênico ocorreu há aproximadamente 20 anos (MUNN et al., 1993a, 1993b; SMITH; SMITH, 1993; SMITH, 1993; TAVERNOR et al., 1992a, 1992b).

### 2.6.2.1 H11

O complexo H11 com massa molecular de 110 kDa é expressado exclusivamente nas microvilosidades intestinais de *Haemonchus*, está ausente em outras partes do seu tubo digestivo e outros tecidos (MUNN et al., 1993a). H11 é definida como uma família de aminopeptidases microsômicas por clonagem de cDNA e análise da sequência (SMITH et al., 1997). Um imunógeno altamente eficaz que reduz a produção de ovos eliminados nas fezes em mais de 90%, e a carga parasitaria em mais de 75%, em desafios com *H. contortus* (NEWTON; MUNN, 1999). A proteção está intimamente ligada com títulos de IgG sistêmicos específicos para H11 (MUNN et al., 1997).

O antígeno H11 possui ação desejável em diferentes categorias de ovinos, demonstrando ser um imunógeno eficaz em cordeiros (MUNN et al., 1993b; TAVERNOR et al., 1992a). Eficaz em uma variedade de raças de ovinos e contra nematoides resistentes a anti-helmínticos (NEWTON; MUNN, 1999). É o antígeno com maior proteção identificado até o momento, resultados demonstrados por Smith et al. (1993a), utilizando o antígeno H11 em uma forma de aproximadamente 95% de pureza, proporcionaram reduções significativas de 94,6 % na produção de ovos nas fezes e de 90% na carga parasitaria de vermes adultos. No continente africano animais imunizados com H11 enriquecida com

adjuvante (0,1% Thesit) tiveram redução de 88% do número de *H. contortus*, sendo que a redução na quantidade de parasitos fêmeas foi de 94%. No mesmo estudo foi possível provar que a imunização com antígenos H11 isolados de parasitos no Reino Unido (SMITH et al., 1993b), tinha efeito contra os nematoides presentes na África do Sul (MUNN et al., 1993b). A imunização também foi eficaz em ovelhas durante o periparto, Andrews et al. (1995) demonstraram redução de 98,5% na contagem de ovos nas fezes.

#### 2.6.2.2 H-gal-GP (“*Haemonchus* galactose – containing glycoprotein complex”)

A molécula nativa H-gal-Gp com peso molecular estimado em cerca de 1.000 kDa, é composta por vários peptídeos, foi purificada a partir de extratos de proteínas de membrana integral do intestino de *H. contortus* adultos, utilizando lectinas com especificidade para N-acetilgalactosamina. A imunização de cordeiros desafiados com *H. contortus* reduziu em até 72% a carga parasitaria e 93% a eliminação de ovos nas fezes (SMITH; SMITH; MURRAY, 1994). A proteção foi correlacionada com títulos de anticorpos sistêmicos (SMITH et al., 1999). Em outro estudo após fracionamento da molécula H-Gal-GP verificou-se que as subunidades não foram efetivas na imunização contra *H. contortus* (SMITH; SMITH, 1996). Nessa intensa busca pelo principal desencadeador da imunidade conferida pela H-gal-Gp, Smith et al.(2000) isolaram uma molécula denominada de H-sialgal-GP. Após imunizar ovinos observaram que os resultados foram semelhantes à molécula integral, reduzindo a eliminação de ovos nas fezes (OPG) em 86% e parasitos adultos em 52%. Estes resultados diferem dos encontrados após a mesma molécula ser enriquecida pelas proteínas p46 e p52 que reduziu 78% do OPG, mas foi capaz de reduzir a carga parasitária em apenas em 33%. Estes resultados são significativamente inferiores aos obtidos tanto com H-gal-GP ou H-sialgal-GP (SMITH; SMITH; PETTIT, 2000).

Outro estudo com a H-gal-Gp identificou um componente importante deste complexo antigénico, uma família de quatro metaloendopeptidases de zinco, designadas de MEP 1-4. Várias combinações destes MEPs foram avaliadas em ensaios de imunização com ovinos desafiados com *H. contortus*. Em duas experiências com uma combinação de todas as quatro MEPs separadas do restante do complexo, reduziu significativamente o OPG em 45 e 50%, um efeito não significativamente diferente do que o conferido com a imunização com H-gal-GP. Da mesma forma, MEP3 sozinho reduziu OPG em cerca de 33%, sendo a MEP3 o membro mais eficaz desta família de metaloendopeptidases. No entanto, não houve proteção significativa quando as ovelhas foram imunizadas com formas recombinantes expressas em bactérias de MEP 1, o que sugere que os epítomos

conformacionais das MEPs são necessárias para a imunidade (SMITH et al., 2003a). Smith et al. (2003b) descreveram uma nova aspartil protease identificada como um componente da H-gal-GP. Entretanto, esta molécula quando separada do restante do complexo não proporcionou proteção significativa, o que reforçou a importância dos epítomos para o potencial imunogênico do complexo H-gal-Gp.

Em estudos recentes Cachat et al. (2010) elaboraram um coquetel recombinante de antígenos contendo versões de MEP1, MEP3, MEP4 e PEP1, expressos como proteínas solúveis em células de *Escherichia coli*, ao mesmo tempo comparado com o complexo H-gal-GP na forma natural. Os níveis elevados de anticorpos no soro dos animais foram detectados em ambos os grupos. No entanto, a imunidade protetora foi apenas observada no grupo imunizado com H-gal-GP na forma natural.

#### 2.6.2.3 Barbervax<sup>®</sup>

Barbervax<sup>®</sup> é a primeira vacina de subunidade disponível comercialmente para o controle de *H. contortus*. É composta por glicoproteínas integrais da membrana do intestino do nematoide adulto denominadas H11 e H-gal-Gp. O primeiro estudo com esses antígenos foi realizado na Luisiana (EUA) onde ovelhas infectadas naturalmente após imunização obtiveram altas concentrações séricas de anticorpos e redução significativa nas contagens de ovos nas fezes (KABAGAMBE et al., 2000). Dos antígenos candidatos para vacinas contra *Haemonchus* até hoje estudados, apenas H-gal-Gp e H11 conferiram proteção consistente em ensaios experimentais com eficiência comparável aos convencionais tratamentos anti-helmínticos (SMITH; ZARLENGA, 2006). Na Austrália, observou-se que cordeiros desafiados naturalmente reduziram após a vacinação substancialmente a mortalidade, o número de tratamentos com anti-helmínticos e a contaminação da pastagem com larvas infectantes de *H. contortus* (LeJAMBRE; WINDON; SMITH, 2008).

Barbervax<sup>®</sup> teve sua licença de fabricação espedida em outubro de 2014 pela Australian Pesticide and Veterinary Medicine Authority após comprovação de eficácia em doze ensaios de campo com ovelhas da raça Merino. Para cumprir os regulamentos locais de biossegurança a Barbervax<sup>®</sup> é produzido a partir de *Haemonchus* colhidos em escala industrial a partir de ovelhas doadoras no Laboratório Albany do Departamento de Agricultura e Alimentação da Austrália Ocidental. A realização da primeira vacina no mundo para um nematoide de ovinos, portanto, baseou-se em inovações na tecnologia de processamento, produzindo a vacina de forma rentável, reproduzível e segura.



Em ensaios realizados no Brasil com esta vacina, ovelhas mestiças Bergamácia foram vacinadas com 5 e 50 µg de antígenos associados. A vacinação utilizando 5 µg de antígenos resultou em títulos de anticorpos dez vezes maiores, além da redução significativa do número de nematoides adultos e com eficácia 72% na redução do OPG (BASSETO et al., 2014). Embora sua eficácia já esteja bem estabelecida em ovinos, poucos estudos foram realizados com caprinos. Recentemente, Meier, Torgerson e Hertzberg (2016) obtiveram os primeiros resultados com a Barbervax<sup>®</sup> em machos caprinos, submetidos a dois diferentes protocolos de imunização, um grupo (V4) foi vacinado em intervalos de 4 semanas, enquanto outros dois grupos (V6 e V6 em pastos separados) foram vacinados em intervalos de 6 semanas, obtendo redução de parasitos adultos de 89, 65 e 47%, respectivamente.

### 3 JUSTIFICATIVA

É de consenso geral que o parasito de maior importância e impacto econômico para a produção de caprinos e ovinos no Brasil é *H. contortus*. O desenvolvimento de populações resistentes aos anti-helmínticos faz com que as opções de tratamento sejam cada vez mais restritas, até mesmo inviabilizando economicamente a criação em algumas situações. Ademais existe uma demanda crescente para que o uso de compostos químicos no tratamento dos animais seja reduzido. Nesta condição, é evidente que uma medida profilática capaz de reduzir os níveis de contaminação no ambiente e a carga parasitária trará um benefício altamente significativo para a produção de caprinos. Dados da literatura mostram que há resultados eficazes com vacinas contra nematoides baseado em antígenos expressos na superfície intestinal de *H. contortus*. No entanto, pesquisas que atestem essa nova ferramenta de controle precisam ser realizadas nos diferentes hospedeiros desse nematoide e regiões geográficas na tentativa de comprovar sua eficácia. Dessa forma, é fundamental que um estudo controlado seja conduzido a fim de estabelecer, nas condições locais, a melhor forma de utilização da vacina Barbervax<sup>®</sup> e sua eficácia em caprinos leiteiros.

#### **4 HIPÓTESE CIENTÍFICA**

Caprinos leiteiros respondem efetivamente a imunização com glicoproteínas integrais da membrana do intestino de *H. contortus*, levando a uma redução significativa do número de ovos eliminados nas fezes, sem a necessidade de recorrer ao tratamento químico.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a eficácia da vacina Barbervax<sup>®</sup> contra *H. contortus* em caprinos leiteiros.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficácia da vacinação em caprinos leiteiros das raças Anglo Nubiana e Saanen contra *H. contortus*.
- Avaliar a resposta vacinal por meio da redução nas contagens de ovos por grama de fezes e títulos de anticorpos de caprinos imunizados.
- Avaliar influência da vacina nos parâmetros de volume globular, proteínas plasmáticas totais e Famacha<sup>®</sup> de cabras leiteiras imunizadas.

## 6 CAPÍTULO 1

### **Immunization of Dairy Goats with integral gut membrane glycoproteins of *Haemonchus contortus***

Imunização de Caprinos Leiteiros com glicoproteínas integrais da membrana intestinal de *Haemonchus contortus*

Periódico: Small Ruminants Research  
(Submetido em novembro de 2016)  
Qualis: B1

Immunization of Dairy Goats with integral gut membrane glycoproteins of *Haemonchus contortus*

Antônio Francisco Igor Magalhães de Matos<sup>1</sup>, Claudelice Oliveira Rosa Nobre<sup>2</sup>, Jomar Patrício Monteiro<sup>3</sup>, Claudia Maria Leal Bevilaqua<sup>1</sup>, David Smith<sup>4</sup>, Marcel Teixeira<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Ceará, Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Estadual Vale do Acaraú, Mestrado em Zootecnia, Sobral, Ceará, Brazil

<sup>3</sup>EMBRAPA Caprinos e Ovinos, Sobral, Ceará, Brazil

<sup>4</sup>Moredun Research Institute, Penicuik, Midlothian, Scotland

\* Corresponding author:

Marcel Teixeira

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral/Groáíras, Km 4

CEP: 62010-970

Sobral, Ceará, Brazil

Phone: + 55 88 31127400 Fax: + 55 88 31127455

E-mail: marcel.teixeira@embrapa.br

## Abstract

It is generally agreed that *Haemonchus contortus* is the most important parasite of small ruminants. However goats are generally more susceptible to this parasite which is a major cause of mortality in tropical regions. Alternatives to anthelmintic utilization are constantly being sought after especially after rise of multiple anthelmintic resistance. Here we present results of a trial designed to evaluate Barbervax<sup>®</sup>, a vaccine containing gut proteins from *Haemonchus contortus*, in the control of haemonchosis in dairy goats. In this study female Saanen (n=20) and Anglo Nubian (n=20) goats aged six months were assigned by body weight and fecal egg counts into four experimental groups (n=10) (vaccinated or non-vaccinated). Barbervax<sup>®</sup> was injected subcutaneously, starting with three priming doses 21 days apart followed by boosts every 6 weeks. All animals grazed on the same bushland area and were subjected to natural and artificial worm infection. Mean efficacy over the trial period was 69.8±11.7% and 57.4±17.6% for the Anglo Nubians and Saanens, respectively. Significant differences in PCV, TP and FAMACHA<sup>®</sup> values were also observed but only in the Anglo Nubians. It was concluded that the vaccine could be useful for young dairy goats, but it would be interesting to see if management activities could improve the observed efficacy. Furthermore, the vaccine does not generate chemical residues and could be very interesting for *Haemonchus* control during milk production.

**Keywords:** Nematode. Goats. Vaccine. H11. H-gal-Gp.

## Introduction

*Haemonchus contortus* is considered the most significant small ruminant parasite globally, but goats are generally considered more susceptible to this parasite which is a major cause of mortality in tropical regions (Amarante, 2014).

Anthelmintics have been for decades the primary strategy for the control of *Haemonchus* infection, however resistance against all chemical classes continue to be documented around the world (Kotze and Prichard, 2016; Playford et al., 2014; Van den Brom et al., 2015) and in Brazil (Cintra et al., 2016).

Many preceding investigations into alternatives to anthelmintic control of *Haemonchus* have been made (Kearney et al., 2016). Research towards vaccines for worm parasites has been carried out for a number of decades; however it is especially important now when drench resistance has compromised the effectiveness of present control methods.

Preliminary trials demonstrated that high levels of protection against *Haemonchus* could be induced in sheep using gut membrane proteins from the nematode as antigen and a commercial vaccine called Barbervax<sup>®</sup> was launched in October 2014 in Australia. So far Barbervax<sup>®</sup> is registered only for sheep and has been used successfully in more than 200,000 lambs in New South Wales.

Production of Barbervax<sup>®</sup> in Western Australia has been scaled up to millions of doses per annum, sufficient to export the vaccine to others countries, although in many cases studies proving efficacy and safety will be necessary prior to registration. Barbervax<sup>®</sup> has already been trialed in many parts of the world in different biological / epidemiological situations as well as in different ruminant hosts (Bassetto et al., 2011).

A few years ago, a collaborative initiative between the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) and the Moredun Research Institute was started to evaluate Barbervax<sup>®</sup> with the aim of reducing reliance on anthelmintics in Brazil. Field studies were carried out in Corriedale



sheep (Souza et al., 2011) at Embrapa's South Livestock research facility and in Bergamacia sheep near Botucatu, São Paulo State (Bassetto et al., 2014). More recently a successful field trial was conducted at Embrapa's Goat and Sheep station in Santa Ines hair sheep (Teixeira, personal communication). Here we present data from a trial design to evaluate the efficacy of Barbervax<sup>®</sup> in dairy goats.

## Materials and Methods

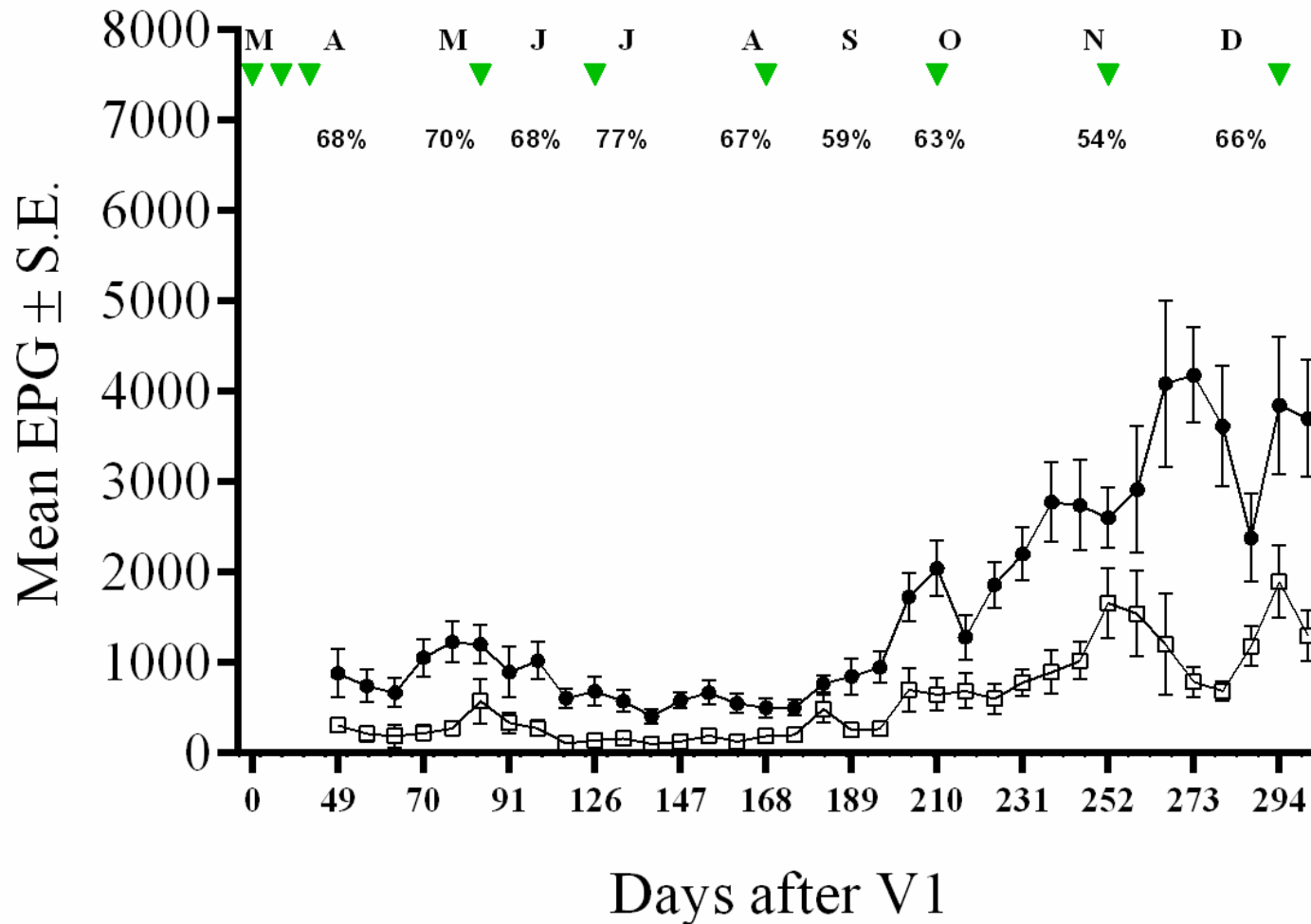
The trial was carried out at Embrapa Goats and Sheep, a research facility of the Brazilian Agricultural Research Corporation located in Sobral, Ceara State. Female Saanen (n=20) and Anglo Nubian (n=20) goats aged six months were assigned by body weight and fecal egg counts into two experimental groups (n=10): vaccinated and non-vaccinated. Barbervax was injected subcutaneously starting with three priming doses 21 days apart followed by boosts every 6 weeks in total of six doses during 8 months. All 40 goats grazed together on the same bushland area and were subjected to natural worm infection for six months. Before mating, goats were confined in pens and given forage and ration following NRC's requirements (NRC 1981). In order to maintain parasite challenge, penned animals were infected orally with 2,000 *H. contortus* L3 larvae. Fecal and blood samples were collected weekly. Fecal egg counts (EPG) were performed using a McMaster chamber (Roberts and O'sullivan, 1950) and coproculture followed the technique of Ueno and Gonçalves (1988). Packed cell volume (PCV) and total plasma protein (TPP) were respectively determined by centrifugation in capillary tubes and an ocular refractometer (Jain, 1993), anemiy levels were also monitored using the Famacha<sup>®</sup> score (Van Wyk and Bath, 2002). Anti Barbervax<sup>®</sup> antibodies were monitored using an Elisa test (Bassetto et al., 2011).

Significant differences between parasitological and serological parameters were obtained by analysis of variance using SAS (version 9.2). Data from EPG counts was transformed into  $\log(x + 1)$  before analysis. Significant differences between groups were tested with Tukey's test at 5% significance. Results are expressed as arithmetic means and standard deviation of the transformed data.

## **Results**

Both breeds of vaccinated goats had significant reductions in egg counts in comparison to non-vaccinated controls over the trial period (Fig. 1 and 2).

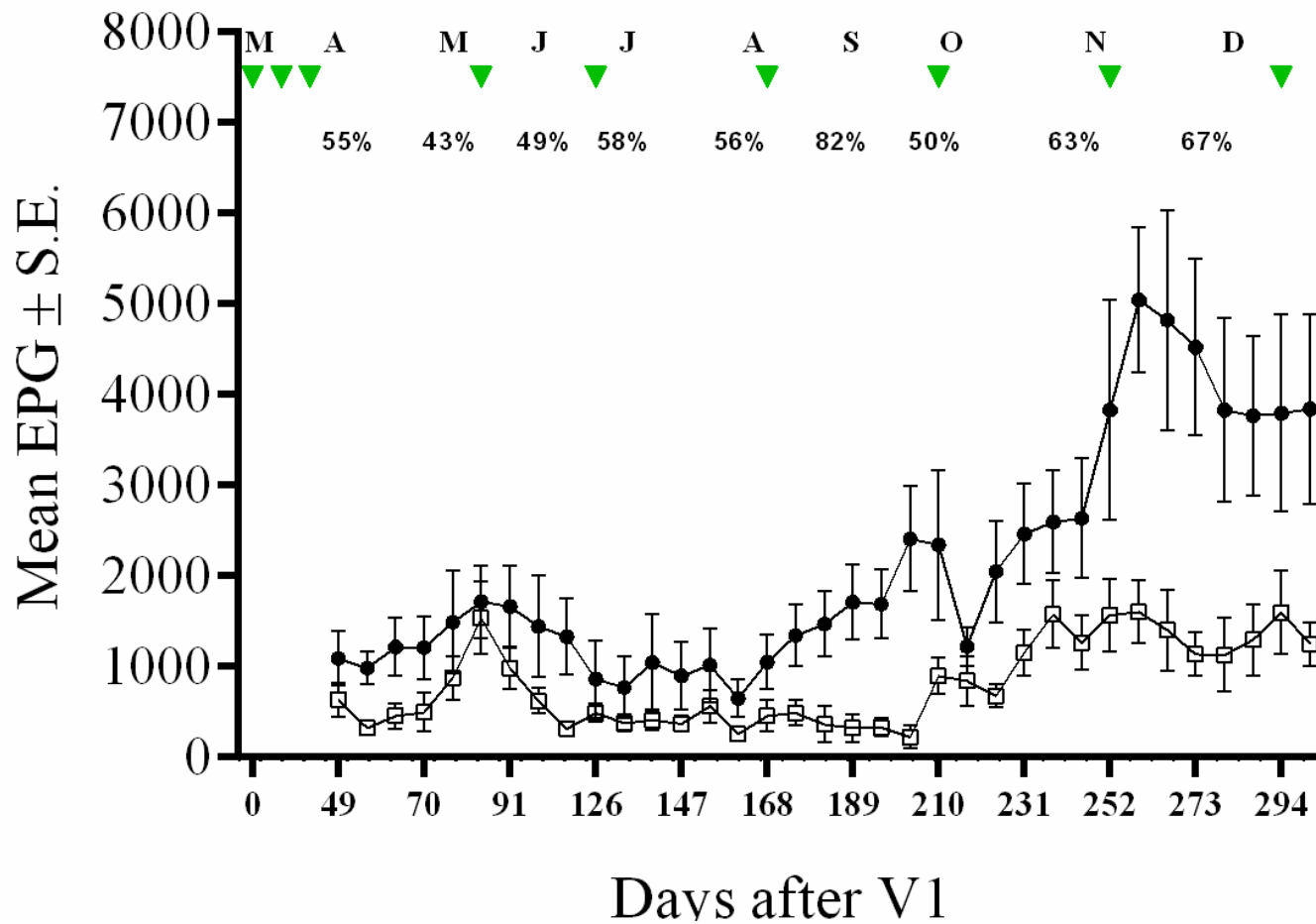
# *Haemonchus* spp. eggs counts



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Fig 1.** Fecal excretion of *Haemonchus contortus* eggs (eggs per gram of feces, EPG) in two groups (vaccinated breed Anglo-nubian goats(□), control breed Anglo-nubian goats(•) and vaccine given (▼) ) and percentage (%) of efficacy of the vaccinated group per month during the experimental period. Values are means ± S.E.M. single of each animal at the end of the experimental.

# *Haemonchus* spp. eggs counts

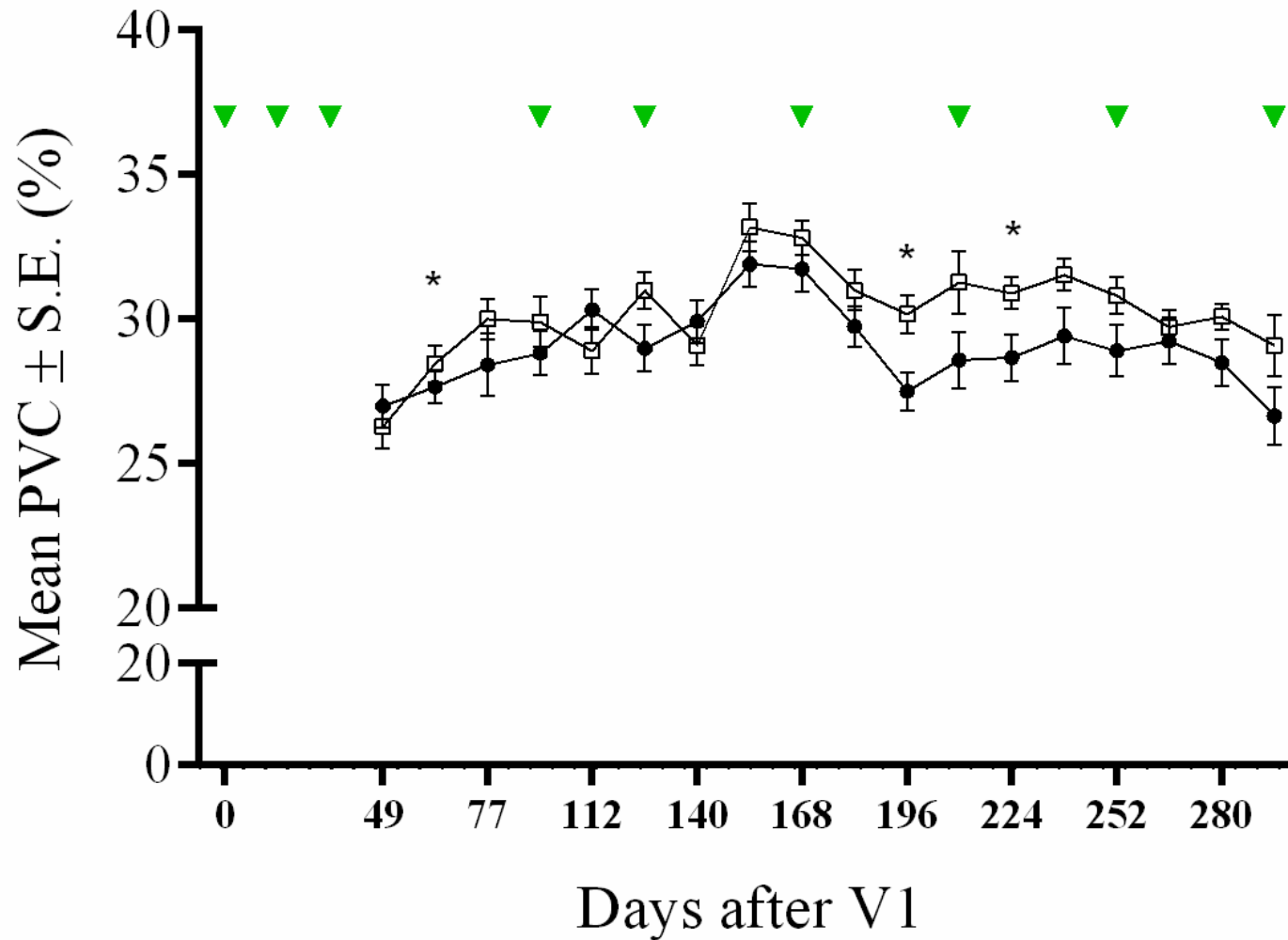


Fonte: Elaborado pelo autor.

**Fig 2.** Fecal excretion of *Haemonchus contortus* eggs (eggs per gram of feces, EPG) in two groups (vaccinated breed Saanen goats(□), control breed Saanen goats(•) and vaccine given (▼) ) and percentage (%) of efficacy of the vaccinated group per month during the experimental period. Values are means ± S.E.M. single of each animal at the end of the experimental.

The mean efficacy over the trial period was  $69.8 \pm 11.7\%$  and  $57.4 \pm 17.6\%$  for the Anglo Nubians and Saanens, respectively. Significant differences in PCV, TP and Famacha<sup>®</sup> values were also observed but only in the Anglo Nubians. This was borne out to some extent by the ELISA data (Fig. 3 and 4).

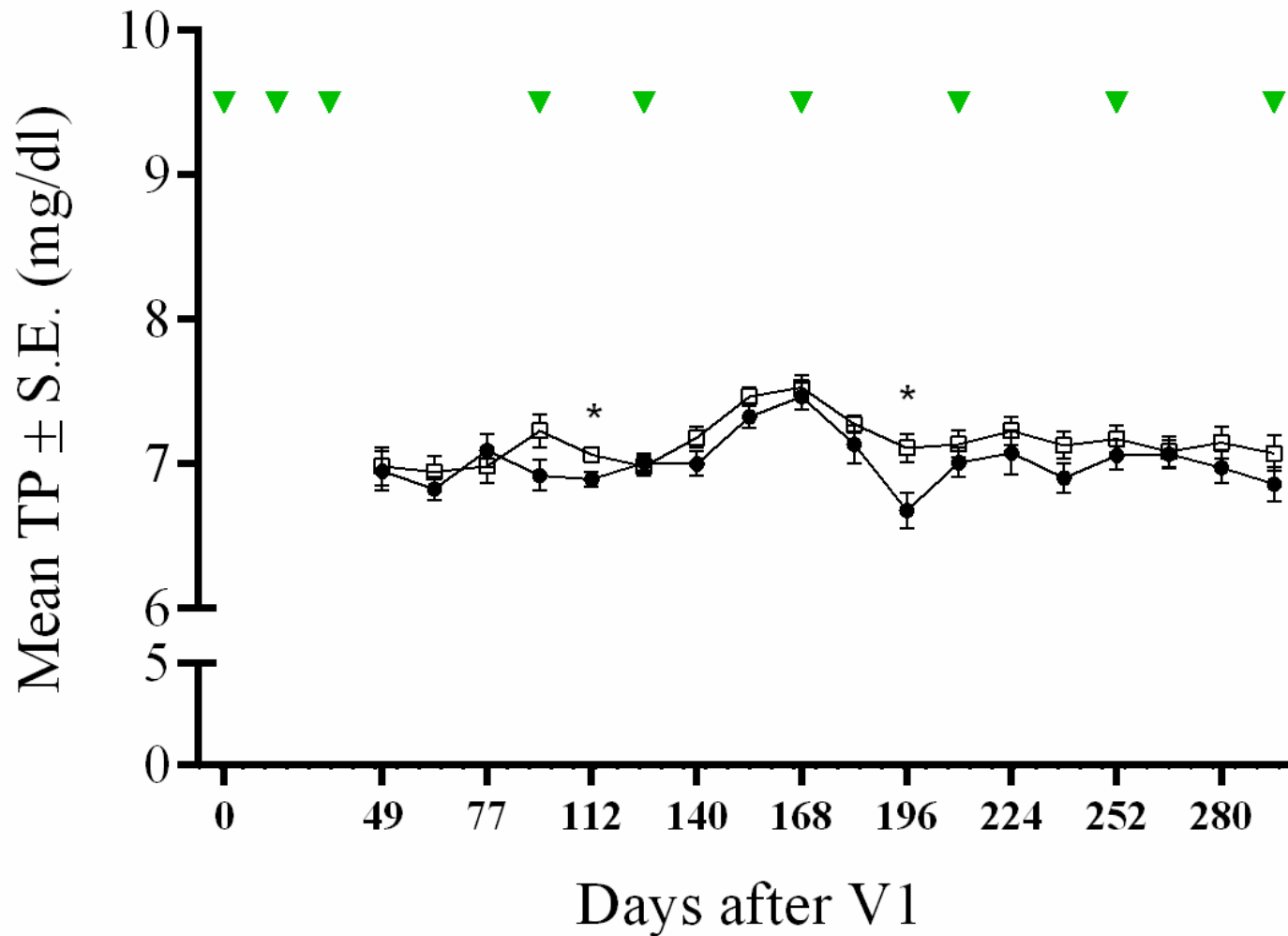
# Packed cell volume



Fonte: Elaborado pelo autor.

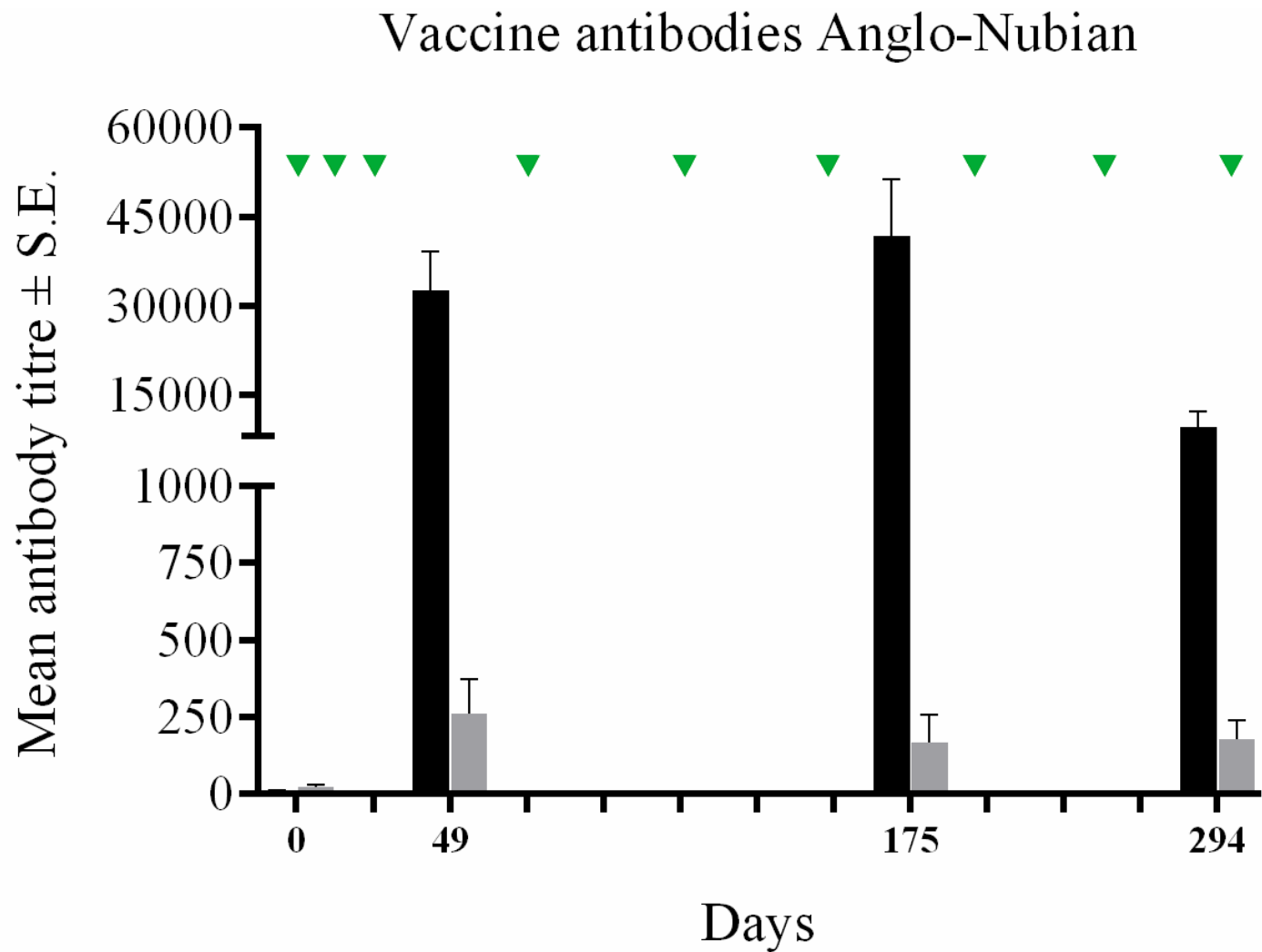
**Fig 3.** Packed cell volume (PCV). Values during the experimental period in two groups (vaccinated breed Anglo-nubian goats (□), control breed Anglo-nubian goats (●) and vaccine given (▼)). Values are means  $\pm$  S.E.M./\*Statistically significant difference of group vaccinated compared with group control ( $P < 0.05$ ).

# Total protein



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Fig 4.** Total Protein. Values during the experimental period in two groups (vaccinated breed Anglo-nubian goats (□), control breed Anglo-nubian goats (●) and vaccine given (▼)). Values are means ± S.E.M./\*Statistically significant difference of group vaccinated compared with group control (P < 0.05).

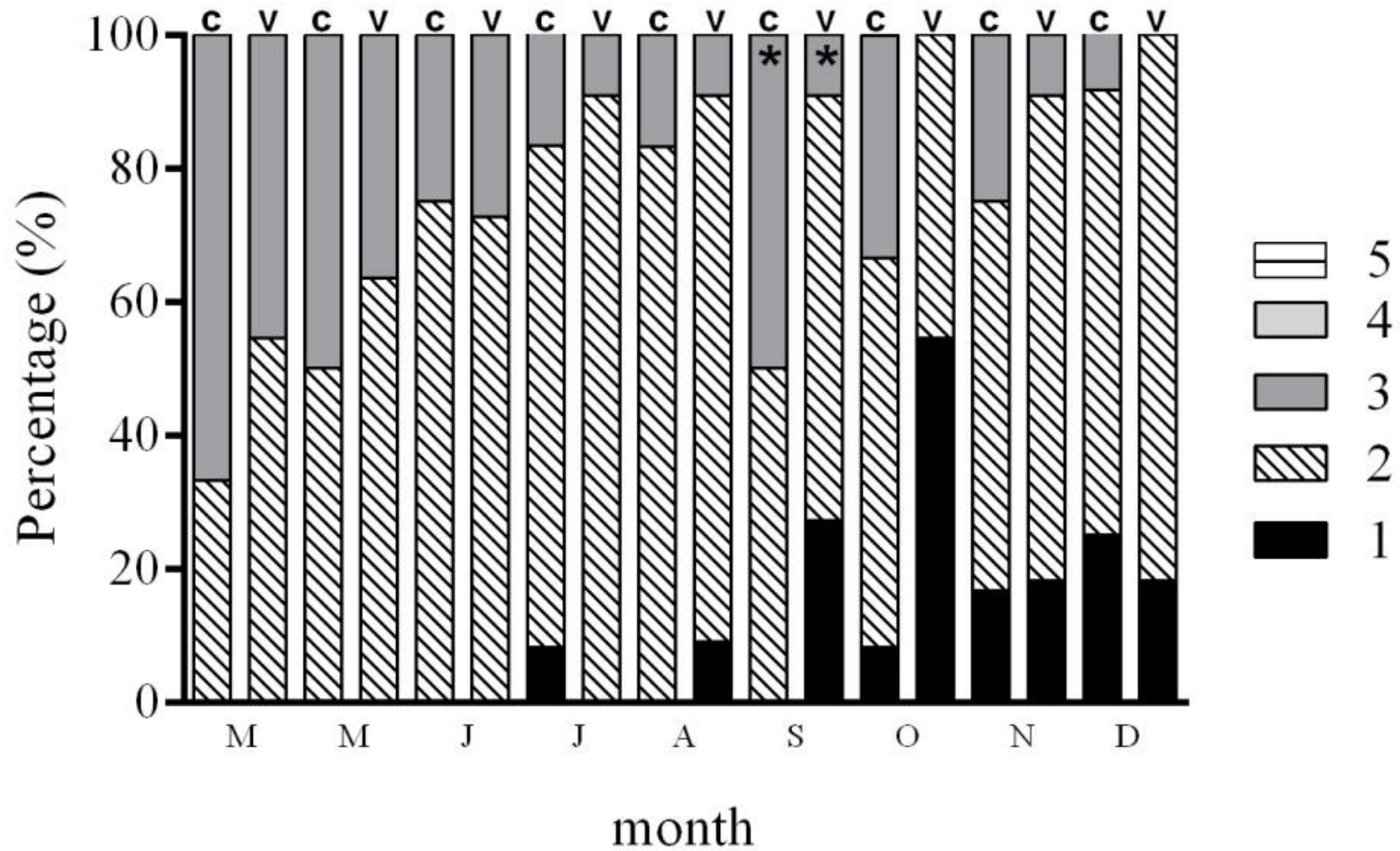


Fonte: Elaborado pelo autor.

**Fig 5.** Antibody titre. Values during the experimental period in two groups (vaccinated breed Anglo-nubian goats (■), control breed Anglo-nubian goats (■) and vaccine given (▼)). Values are means  $\pm$  S.E.M.



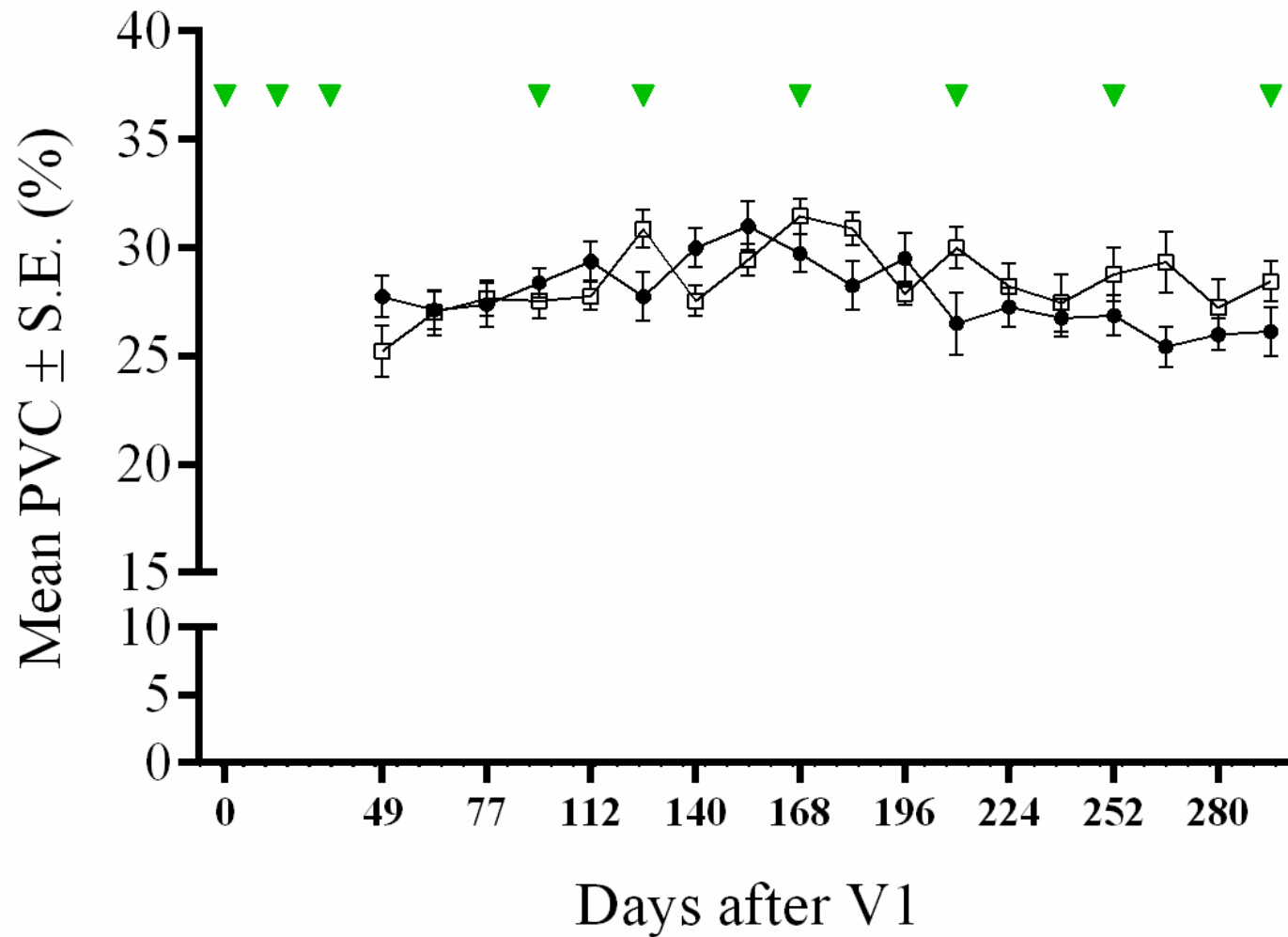
# Famacha<sup>©</sup> scores



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Fig 6.** Famacha © scores. Values during the experimental period in two groups (vaccinated breed Anglo-nubian goats (V) control breed Anglo-nubian goats (C). Values are percentage of goats with each score./\*Statistically significant difference of group vaccinated compared with group control ( $P < 0.05$ ).

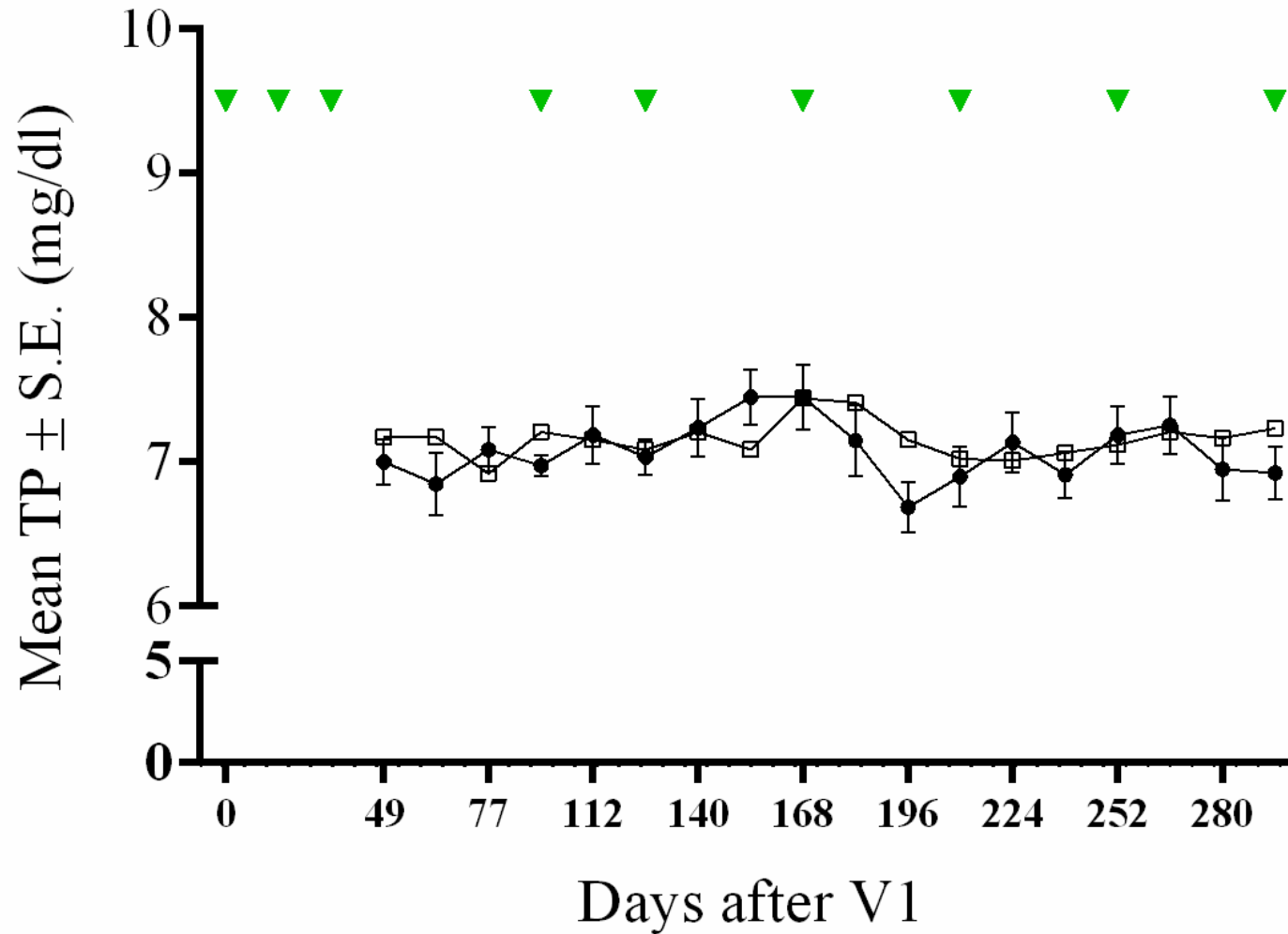
## Packed cell volume



Fonte: Elaborado pelo autor.

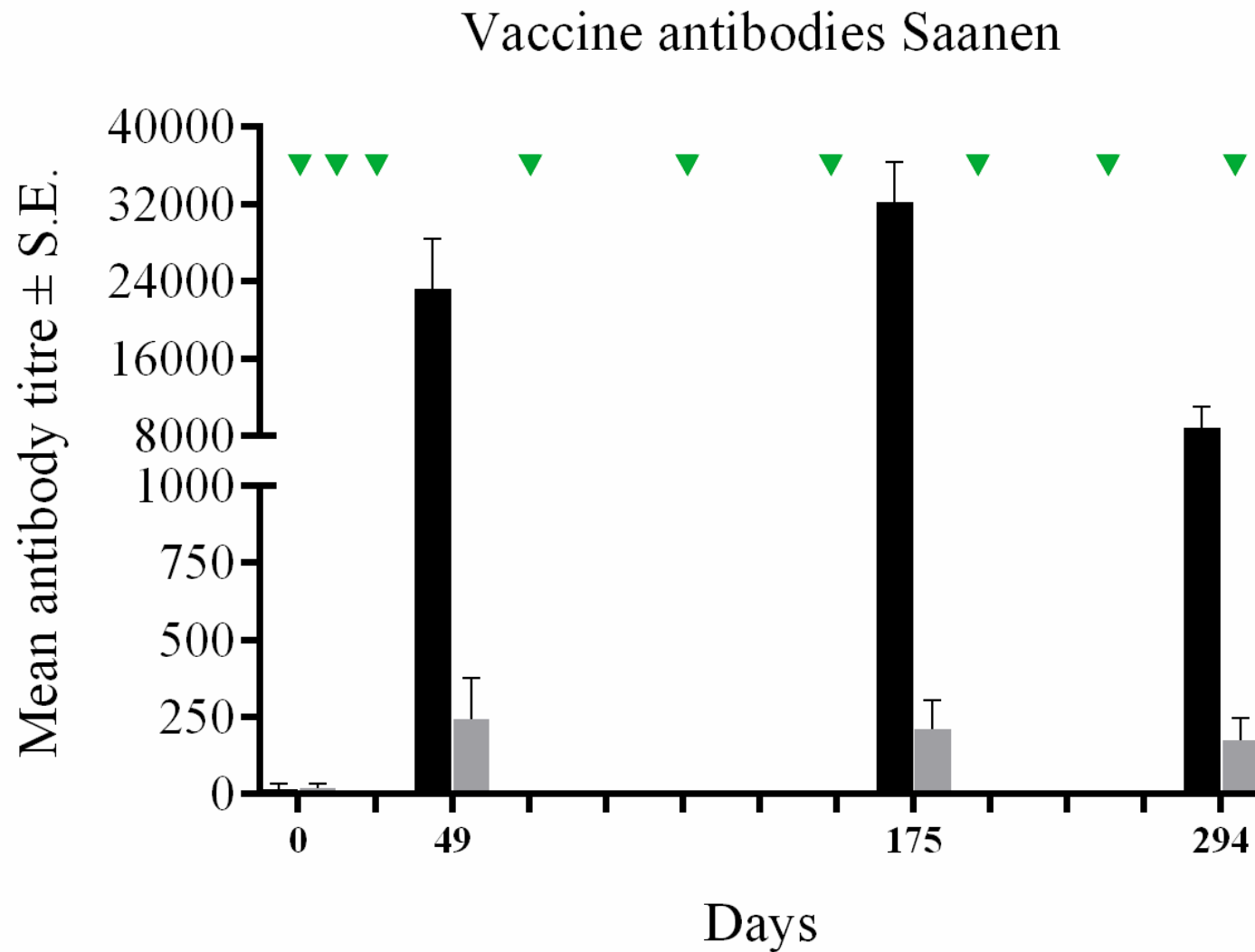
**Fig 7.** Packed cell volume (PCV). Values during the experimental period in two groups (vaccinated breed Saanen goats (□), control breed Saanen goats (●) and vaccine given (▼)). Values are means ± S.E.M.

# Total protein



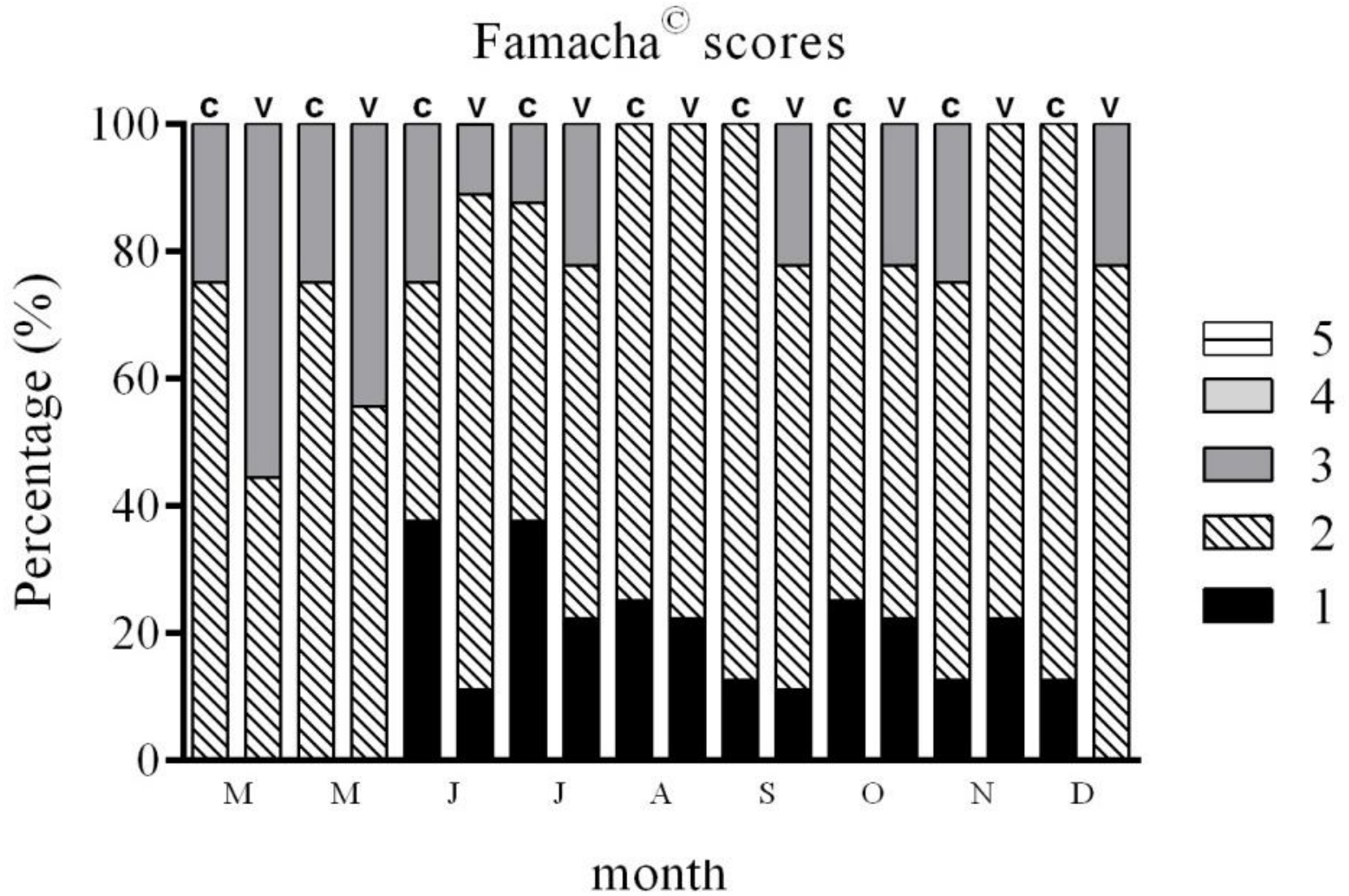
Fonte: Elaborado pelo autor.

**Fig 8.** Total Protein. Values during the experimental period in two groups (vaccinated breed Saanen goats (□), control breed Saanen goats (●) and vaccine given (▼)). Values are means ± S.E.M.



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Fig 9.** Antibody response of the goats. Values during the experimental period in two groups (vaccinated breed Saanen goats (■), control breed Saanen goats (■) and vaccine given (▼)). Values are means  $\pm$  S.E.M.



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Fig 10.** Famacha © scores. Values during the experimental period in two groups (vaccinated breed Saanen goats (V) control breed Saanen goats (C)). Values are percentage of goats with each score.

## Discussion

In the present trial we started the course of vaccine when the goats were 6 months old and it was clear that both breeds benefited as the main effect of Barbervax<sup>®</sup> is to reduce *Haemonchus* egg output, thus reducing larval contamination on the pasture and the subsequent degree of challenge. It is important to bear in mind that all the goats in the current trial were deliberately grazed together so that vaccinates and controls were equally exposed to the same challenge. However, this meant that vaccinates did not enjoy the epidemiological benefit of grazing separately from the controls and thus the true efficacy of the vaccine was underestimated. Furthermore, our results also suggest that different goat breeds may respond differently to the vaccine as Anglo Nubians presented a more efficient response than Saanen goats.

But how good does an *Haemonchus* vaccine have to be to be used as a valuable tool in the control of helminth parasites in small ruminant? A simulation model (Dobson et al., 2011) was modified to predict the effectiveness of Barbervax<sup>®</sup> vaccination in comparison to existing anthelmintic-based control strategies used in the New England region in Australia, in terms of number of drenches, mortality and the development of anthelmintic resistance. Simulations indicated that a vaccine providing 65% protection was as effective as or better at controlling *H. contortus* than a conventional anthelmintic treatment program (Besier et al., 2015). In practice, protection is expected to be considerably better.

Barbervax<sup>®</sup> is only registered for sheep and its efficacy is well-established in this species (Andrews et al., 1995, 1997; Kabagambe et al., 2000; LeJambre et al., 2008; Smith et al., 1994). However, not much is known about its applicability in goats, which would be great since a vaccine does not have withdrawal period. In a trial performed in Switzerland, Meier et al. (2016) observed similar results in male goats subjected to immunization with the same vaccine and protocol of the present study, while using a 4-week-intervals protocol grazed together or 6-week-intervals kept

separately, reductions in egg counts were around 89 and 47% respectively, compared with the controls. An experimental vaccine made from H11/H-gal-GP antigens provided 96% reduction in the egg counts of goats in the United States but in concentrations 20x higher and with a 7-days-intervals protocol (Olcott, 2006).

The vaccination schedule employed in the current trial was deliberately extreme and therefore uneconomic. It was used simply to determine whether Barbervax<sup>®</sup> could be of any use for dairy goats at pasture. Now that question has been answered and more refined schedules could be tested such as giving boosts only after rain or when egg counts reach a pre-determined threshold, so that the vaccine could be used in association with management activities in a more practical way.

## **Acknowledgements**

The authors thank the funding agencies CNPQ - National Council of Scientific and Technological Development by Project was approved (process No. 442510 / 2014-4) in the Universal Call MCTI / CNPq N° 14/2014 - Track A (Brasilia - DF, Brazil); and Moredun Research Institute (Midlothian, BL, Scotland).

## **Refences**

- Amarante, A.F.T., 2014. Sustainable worm control practices in South America. *Small Rumin Res* 118, 56–62. doi:10.1016/j.smallrumres.2013.12.016
- Andrews, S.J., Hole, N.J.K., Munn, E.A., Rolph, T.P., 1995. Vaccination of sheep against haemonchosis with H11, a gut membrane-derived protective antigen from the adult parasite: Prevention of the periparturient rise and colostral transfer of protective immunity. *Int J Parasitol* 25, 839–846. doi:10.1016/0020-7519(94)00221-9

- Andrews, S.J., Rolph, T.P., Munn, E. a., Taylor, M. a., 1997. Duration of protective immunity against ovine haemonchosis following vaccination with the nematode gut membrane antigen H11. *Res Vet Sci* 62, 223–227. doi:10.1016/S0034-5288(97)90194-6
- Bassetto, C.C., Picharillo, M.É., Newlands, G.F.J., Smith, W.D., Fernandes, S., Siqueira, E.R., Amarante, a. F.T., 2014. Attempts to vaccinate ewes and their lambs against natural infection with *Haemonchus contortus* in a tropical environment. *Int J Parasitol* 44, 1049–1054. doi:10.1016/j.ijpara.2014.07.007
- Bassetto, C.C., Silva, B.F., Newlands, G.F.J., Smith, W.D., Amarante, A.F.T., 2011. Protection of calves against *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* after immunization with gut membrane proteins from *H. contortus*. *Parasite Immunol* 33, 377–381. doi:10.1111/j.1365-3024.2011.01295.x
- Besier, B., Kahn, L., Dobson, R., Smith, D., 2015. Barbervax - a new strategy for *Haemonchus* management. Proceedings of the Australian Veterinary Association (AVA) Annual Conferences, Pan Pacific (NZVA and AVA) Veterinary Conference 2015, Combined proceedings, pp. 168-174.
- Cintra, M.C.R., Teixeira, V.N., Nascimento, L.V., Sotomaior, C.S., 2016. Lack of efficacy of monepantel against *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil, *Veterinary Parasitology*. doi:10.1016/j.vetpar.2015.11.013
- Dobson, R.J., Barnes, E.H., Tyrrell, K.L., Hosking, B.C., Larsen, J.W.A., Besier, R.B., Love, S., Rolfe, P.F., Bailey, J.N., 2011. A multi-species model to assess the effect of refugia on worm control and anthelmintic resistance in sheep grazing systems. *Aust Vet J* 89, 200–208. doi:10.1111/j.1751-0813.2011.00719.x
- Jain, N.C., 1993. Examination of the blood and bone marrow. *Essentials Vet Hematol* 1–18.



- Kabagambe, E.K., Barras, S.R., Li, Y., Peña, M.T., Smith, W.D., Miller, J.E., 2000. Attempts to control haemonchosis in grazing ewes by vaccination with gut membrane proteins of the parasite. *Vet Parasitol* 92, 15–23. doi:10.1016/S0304-4017(00)00272-7
- Kearney, P.E., Murray, P.J., Hoy, J.M., Hohenhaus, M., Kotze, A., 2016. The “Toolbox” of strategies for managing *Haemonchus contortus* in goats: What’s in and what’s out. *Vet Parasitol* 220, 93–107. doi:10.1016/j.vetpar.2016.02.028
- Kotze, A.C., Prichard, R.K., 2016. Chapter Nine – Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. *Adv Parasitol* 93, 397–428. doi:10.1016/bs.apar.2016.02.012
- LeJambre, L.F., Windon, R.G., Smith, W.D., 2008. Vaccination against *Haemonchus contortus*: Performance of native parasite gut membrane glycoproteins in Merino lambs grazing contaminated pasture. *Vet Parasitol* 153, 302–312. doi:10.1016/j.vetpar.2008.01.032
- Meier, L., Torgerson, P.R., Hertzberg, H., 2016. Vaccination of goats against *Haemonchus contortus* with the gut membrane proteins H11/H-gal-GP. *Vet Parasitol* 229, 15–21. doi:10.1016/j.vetpar.2016.08.024
- NRC, 1981. Subcommittee on Goat Nutrition. Nutrient requirements of goats. National Academy of Sciences, Washington.
- Olcott, D.D., 2006. Effect of vaccination of goats with h-gal-gp and h11 antigens From intestinal membrane cells of *Haemonchus contortus*.
- Playford, M.C., Smith, A.N., Love, S., Besier, R.B., Kluver, P., Bailey, J.N., 2014. Prevalence and severity of anthelmintic resistance in ovine gastrointestinal nematodes in Australia (2009–2012). *Aust Vet J* 92, 464–471. doi:10.1111/avj.12271

- Roberts, F.H.S., O'sullivan, P.J., 1950. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Crop Pasture Sci* 1, 99–102.
- Smith, W.D., Smith, S.K., Murray, J.M., 1994. Protection studies with integral membrane fractions of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol* 16, 231–241. doi:10.1111/j.1365-3024.1994.tb00345.x
- Souza, C.J.H., Benavides, M.V., Smith, W.D., Moraes, J.C.F., 2011. Evaluation of low dose immunization with gut membrane glycoproteins of *Haemonchus contortus* against nematode infection in grazing lambs. *Proceedings of the 23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*.
- Ueno, H., Gonçalves, P.C., 1988. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. Japan International Cooperation Agency.
- Van den Brom, R., Moll, L., Kappert, C., Vellema, P., 2015. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. *Vet Parasitol* 209, 278–280. doi:10.1016/j.vetpar.2015.02.026
- Van Wyk, J.A., Bath, G.F., 2002. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Vet Res* 33:509–29. doi: 10.1051/vetres:2002036

## 7 CONCLUSÕES

A vacinação de caprinos leiteiros com Barbervax<sup>®</sup> conferiu proteção parcial contra o nematoide *Haemonchus contortus* ao reduzir significativamente as contagens de ovos nas fezes de ambas as raças estudadas. Porém, nas condições experimentais os caprinos da raça Anglo Nubiana responderam melhor a vacinação comparado aos Saanen, devido a sua melhor resposta hematológica e humoral.

## **8 PERSPECTIVAS**

Os resultados deste trabalho demonstram que a vacina Barbervax<sup>®</sup> é uma alternativa interessante para o controle da haemoncose em caprinos leiteiros e que poderá ser utilizada de forma estratégica associada a outros métodos de controle principalmente em períodos de grande incidência de haemoncose, conferindo menor contaminação das pastagens e conseqüentemente uma menor carga parasitária dos animais. Além de contribuir para o controle, pode reduzir a necessidade de tratamentos anti-helmínticos bem como os resíduos de drogas na carne e no leite. No entanto, são ainda necessários estudos mais refinados e que possam avaliar a viabilidade econômica da vacina nos sistemas de produção de caprinos leiteiros do Brasil.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, W. V. F. **Uso de plantas medicinais no controle de helmintos gastrintestinais de caprinos naturalmente infectados**. Patos, PB. 2005. 85f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2005.
- AMARANTE, A. F. T. Controle da verminose gastrointestinal no sistema de produção de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPECIALIDADES EM MEDICINA VETERINÁRIA, 1., 2004, Paraná. **Anais...** Paraná: [s.n.], 2004a. p. 253 - 263.
- AMARANTE, A. F. T. Resistência genética a helmintos gastrintestinais. In: V SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., 2004, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: [s.n.], 2004b. p. 1 – 10.
- AMARANTE, A.F.T. Nematoides gastrintestinais em ovinos. In: CAVALCANTE, A.C.R.; VIEIRA, L.S.; CHAGAS, A.C.S.; MOLENTO, M.B., editores técnicos. **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 603p.
- ANDREWS, S. J. et al. Vaccination of sheep against haemonchosis with H11, a gut membrane-derived protective antigen from the adult parasite: Prevention of the periparturient rise and colostral transfer of protective immunity. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 7, p. 839–846, Jul. 1995.
- ANTHONY, R. M. et al. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nature Rev Immunol**, v. 7, n. 12, p. 975–987, Dec. 2007.
- ARUNKUMAR, S. Immunoprotection in sheep against *Haemonchus contortus* using its thiol-purified excretory/secretory proteins. **Veterinary Research Forum**, v. 3, n. 4, p. 239–244, 20 Nov. 2012.
- ASSIS, L. M. et al. Ovicidal and larvicidal activity in vitro of *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**. v. 117, p. 43–49, 2003.
- BAKKER, N. et al. Vaccination against the nematode *Haemonchus contortus* with a thiol-binding fraction from the excretory/secretory products (ES). **Vaccine**, v. 22, n. 5-6, p. 618–628, Jan. 2004.

BALIC, A.; BOWLES, V. M.; MEEUSEN, E. N. . The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. **Advances in Parasitology**. v. 45, p. 181–241, 2000.

BARRETO, M. A. Resistência anti-helmintica em rebanhos caprinos no Estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA (CONBRAVET). 29., 2002, Gramado. **Anais...** Gramado: [s.n.], 2002. p.5.

BASSETTO, C. C. et al. Attempts to vaccinate ewes and their lambs against natural infection with *Haemonchus contortus* in a tropical environment. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 14, p. 1049–1054, 2014.

BESIER, B. et al. Towards a commercial vaccine against *Haemonchus contortus* - a field trial in western Australia. In: PROCEEDINGS OF THE AUSTRALIAN SHEEP VETERINARIANS CONFERENCE, 1., 2012, Canberra. **Anais...** Canberra: [s.n.], 2012. p. 14–18.

BEVILAQUA, C. M. L.; CABARET, J.; SANTOS, J. M. L. In: **Controle de helmintos de ruminantes no Brasil**. Jundiaí: Paco Editorial, 2015. 314p.

BISPO, M. J. et al. Avaliação do tratamento anti-helmíntico com Oxfendazole e Ivermectina em rebanho caprino do Instituto Xingó – Município de Piranhas - Alagoas. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12., 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: [s.n.], 2002. p.7.

BIZIMENYERA, E. S. et al. In vitro activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary parasitology**, v. 142, n. 3-4, p. 336–43, 20 Dec. 2006.

BLACKHALL W. J.; POULIOT, J. F.; PRICHARD, R. K., et al. *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectinand moxidectin-selected strains. **Experimental Parasitology**, v.190, p.42-48, 1998.

BOWMAN, D.D. et al. **Georgis Parasitologia Veterinária**. 9. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

BUENO, M. S. et al. O controle da verminose em sistema intensivo de produção de ovinos para abate. In: ALTERNATIVAS DE CONTROLE DA VERMINOSE EM PEQUENOS RUMINANTES, 1., 2008, Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa: [s.n.], 2008. p. 35-50.

CACHAT, E. et al. Attempts to immunize sheep against *Haemonchus contortus* using a cocktail of recombinant proteases derived from the protective antigen, H-gal-GP. **Parasite Immunology**, v. 32, n. 6, p. 414–419, 2010.

CHANDRAWATHANI, P.; ADNAN, M.; WALLER, P. J. Anthelmintic resistance in sheep and goat farms on Peninsular Malaysia. **Veterinary Parasitology**, v. 82, n. 4, p. 305–310, 1999.

CHARLES, T. P. Disponibilidade de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais parasitas de ovinos deslanados no semi-árido pernambucano. **Ciência Rural**, v. 25, p. 437–442, 1995.

CHARLES, T. P.; POMPEU, J.; MIRANDA, D. B. Efficacy of three broad-spectrum anthelmintics against gastrointestinal nematode infections of goats. **Veterinary Parasitology**, v. 34, n. 1-2, p. 71–75, Nov. 1989.

COSTA, C. A. F.; VIEIRA, L. DA S. **Controle de nematódeos gastrintestinais de caprinos e ovinos no estado do Ceará**. EMBRAPA-CNPC. Comunicado Técnico, 1984.

COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 65–71, 2011.

DOMKE, A. V. M. et al. Prevalence of gastrointestinal helminths, lungworms and liver fluke in sheep and goats in Norway. **Veterinary parasitology**, v. 194, n. 1, p. 40–8, 1 May 2013.

FAWZI, E. M. et al. Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* infection with a somatic protein (Hc23) from adult helminths. **International journal for parasitology**, v.44, n.7, p. 429–36, 2014.

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

GEARY, T. G.; SANGSTER, N. C.; THOMPSON, D. P. Frontiers in anthelmintic pharmacology. **Veterinary Parasitology**, v.84, p.275-295, 1999.

GIRÃO, E. . et al. **Avaliação de plantas medicinais com efeito anti-helmintico para caprinos**. Teresina: Embrapa Meio-Norte: 1998.

GONZÁLEZ-GARDUÑO, R.; MENDOZA-DE GIVES, P.; TORRES-HERNÁNDEZ, G. Variability in the fecal egg count and the parasitic burden of hair sheep after grazing in nematode infected paddocks. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 469–475, 2013.

GUIMARÃES, V. P. **Curva de lactação, efeitos ambientais e genéticos sobre o desempenho produtivo de cabras leiteiras**. 2004. 87f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Zootecnia) – Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

IBGE. **Sistema de Recuperação Automática (SIDRA)**. Disponível em: <<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/>>>. Acesso em: 13 oct. 2016.

IGARASHI, M. et al. Efeito do neem (*Azadirachta Indica*) no controle de nematódeos gastrintestinais em ovinos suplementados a pasto no período seco. **Revista Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, 2013.

JESUS, A. P. et al. Controle biológico da verminose ovina com o uso de fungos nematófagos. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UENP, 3., 2013, Cornélio Procópio. **Anais...** Cornélio Procópio: Universidade Estadual do Norte do Paraná, 2013. p. 12.



KABAGAMBE, E. K. et al. Attempts to control haemonchosis in grazing ewes by vaccination with gut membrane proteins of the parasite. **Veterinary Parasitology**, v.92, p.15-23, 2000.

KHAN, M. N. et al. Gastrointestinal helminthiasis: Prevalence and associated determinants in domestic ruminants of district Toba Tek Singh, Punjab, Pakistan. **Parasitology Research**, v. 107, n. 4, p. 787–794, 2010.

KÖHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. **Journal for Parasitology**, v.31. p.336-345, 2001.

KNOX, D. P. et al. The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 11, p. 1129–1137, 2003.

KNOX, M. R.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; AGUILAR-CABALLERO, A. J. Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 385–393, 2006.

LAGARES, A. F. B. F. **Parasitoses de pequenos ruminantes na região da Cova da Beira**. 2008. 115f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2008.

LeJAMBRE, L. F.; WINDON, R. G.; SMITH, W. D. Vaccination against *Haemonchus contortus*: Performance of native parasite gut membrane glycoproteins in Merino lambs grazing contaminated pasture. **Veterinary Parasitology**, v.153, p.302-312, 2008.

LICHTENFELS, J. R.; PILITT, P. A; HOBERG, E. P. New morphological characters for identifying individual specimens of *Haemonchus* spp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) and a key to species in ruminants of North America. **The Journal of parasitology**, v. 80, n. 1, p. 107–119, 1994.

LIMA, W. C. et al. Nematoides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 30, n. 12, p. 1003–1009, 2010.

MARTIN, R. J. Modes of action of anthelmintic drugs. **The Veterinary Journal**, v. 154, n. 1, p. 11-34, 1997.

MCKELLAR, Q. A.; JACKSON, F. Veterinary anthelmintics: Old and new. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 10, p. 456–461, 2004.

MEDEIROS, L. F. D. et al. Reações fisiológicas de caprinos das raças Anglo-Nubiana e Saanen. **Boletim de Indústria Animal**, v. 65, n. 1, p. 7–14, 2008.

MEIER, L.; TORGERSON, P. R.; HERTZBERG, H. Vaccination of goats against *Haemonchus contortus* with the gut membrane proteins H11/H-gal-GP. **Veterinary Parasitology**, v. 229, p. 15–21, 2016.

MELNEK, F. M. C. et al. Relação entre a parasitose por nematódeos e a eosinofilia em ovinos da região de Umuarama - PR. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 1, n. 2, p. 72, 2014.

MELO, A. C. F. L. et al. Nematódeos resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 339–344, 2003.

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

MOLENTO, M. B. et al. Alternativas para o controle de nematoídeos gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 2, p. 253–263, 2013.

MUNN, E. A et al. The potential value of integral membrane proteins in the vaccination of lambs against *Haemonchus contortus*. **International journal for parasitology**, v. 23, n. 2, p. 261–269, 1993a.

MUNN, E. A et al. Vaccination against *Haemonchus contortus* with denatured forms of the protective antigen H11. **Parasite immunology**, v. 19, n. 6, p. 243–248, 1997.

MUNN, E. A. et al. Vaccination of merino lambs against haemonchosis with membrane-associated proteins from the adult parasite. **Parasitology**, v. 106, n. 01, p. 63–66, 1993b.

NEWTON, S. .; MUNN, E. . The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. **Parasitology Today**, v. 15, n. 3, p. 116–122, Mar. 1999.

OLIVEIRA, D. B. et al. Atividade anti-helmíntica da babaneira (*Musa* sp.) em caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 15., 1997, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Parasitologia, 1997. p. 267.

ONYIAH, L. C.; ARSLAN, O. Simulating the development period of a parasite of sheep on pasture under varying temperature conditions. **Journal of Thermal Biology**, v. 30, n. 3, p. 203–211, Apr. 2005.

PERRY, B. D.; RANDOLPH, T. F. Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 145–168, 1999.

PIEDRAFITA, D. P. et al. Field vaccination of sheep with a larval-specific antigen of the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, confers significant protection against an experimental challenge infection. **Vaccine**, v. 30, n. 50, p. 7199–204, 26 Nov. 2012.

PINTO, J. M. S. et al. Relação entre o periparto e a eliminação de ovos de nematóides gastrintestinais em cabras anglo nubiana naturalmente infectadas em sistema semi-extensivo de produção. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. supl 1, p. 138–143, 2008.

PRICHARD, R. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 9, p. 445–453, Sep. 2001.

RATHORE, D. K. et al. Identification of a 66 kDa *Haemonchus contortus* excretory/secretory antigen that inhibits host monocytes. **Veterinary parasitology**, v. 138, n. 3-4, p. 291–300, 15 Jun. 2006.

REIS, I. F. **Controle de nematóides gastrintestinais em pequenos ruminantes: método estratégico versus FAMACHA**. 2004. 80 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2004.

RINALDI, L.; VENEZIANO, V.; CRINGOLI, G. Dairy goat production and the importance of gastrointestinal strongyle parasitism. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 8, p. 745–746, 2007.

RODRIGUES, A. B. et al. Sensibilidade dos nematoides gastrintestinais de caprinos a anti-helminticos na mesorregião do Sertão Paraibano. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 162–166, 2007.

SANI, R. A.; GRAY, G. D.; BAKER, R. L. Worm Control for Small Ruminants in Tropical Asia. **ACIAR Monograph**, p. 113, 2004.

SANTOS, M. C.; SILVA, B. F.; AMARANTE, A. F. T. Environmental factors influencing the transmission of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 3-4, p. 277–284, 2012.

SCHALLIG, H. D. F. H.; VAN LEEUWEN, M. A. W.; CORNELISSEN, A. W. C. A. Protective immunity induced by vaccination with two *Haemonchus contortus* excretory secretory proteins in sheep. **Parasite Immunology**, v. 19, n. 10, p. 447–453, 1 Oct. 1997.

SCHALLIG, H. D. F. H.; VAN LEEUWEN, M. A. W.; HENDRIKX, W. M. L. Immune responses of Texel sheep to excretory/secretory products of adult *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, v. 108, n. 03, p. 351–357, 1994.

SINDICATO DAS INDÚSTRIAS DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL. **Mercado Veterinário**, 2014. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8>>. Acesso em: 02 oct. 2016.

SILVA, P. C. G. DA; GUIMARÃES FILHO, C. **Eixo tecnológico da ecorregião nordeste. Agricultura familiar na dinâmica da pesquisa agropecuária**. Embrapa Informação Tecnológica, p. 109–161, 2006.

SILVA, J. B.; FAGUNDES, G. M.; FONSECA, A. H. Dynamics of gastrointestinal parasitoses in goats kept in organic and conventional production systems in Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 98, n. 1-3, p. 35–38, 2011.

SILVA, W. W.; BEVILAQUA, C. M. L.; RODRIGUES, M. D. E. L. D. E. A. Variação sazonal de nematóides gastrintestinais em caprinos traçadores no semi-Árido paraibano - Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 75, p. 71–75, 2003.

SMITH, S. K. et al. Further immunization and biochemical studies with a protective antigen complex from the microvillar membrane of the intestine of *Haemonchus contortus*. **Parasite immunology**, v. 21, n. 4, p. 187–99, 1999.

SMITH, S. K.; SMITH, W. D. Immunisation of sheep with an integral membrane glycoprotein complex of *Haemonchus contortus* and with its major polypeptide components. **Research in veterinary science**, v. 60, n. 1, p. 1–6, 1996.

SMITH, T. S. et al. Purification and evaluation of the integral membrane protein H11 as a protective antigen against *Haemonchus contortus*. **International journal for parasitology**, v. 23, n. 2, p. 271–280, 1993a.

SMITH, T. S. et al. Purification and evaluation of the integral membrane protein H11 as a protective antigen against *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 271–280, Apr. 1993b.

SMITH, T. S. et al. Cloning and characterization of a microsomal aminopeptidase from the intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1338, n. 2, p. 295–306, Apr. 1997.

SMITH, W. D. Protection in lambs immunised with *Haemonchus contortus* gut membrane proteins. **Research in veterinary science**, v. 54, n. 1, p. 94–101, 1993.

SMITH, W. D. et al. Relative protective properties of three membrane glycoprotein fractions from *Haemonchus contortus*. **Parasite Immunology**, v. 22, n. 2, p. 63–71, 2000.

SMITH, W. D. et al. Aspartyl proteases from the intestinal brush border of *Haemonchus contortus* as protective antigens for sheep. **Parasite Immunology**, v. 25, n. 11-12, p. 521–530, 2003a.

SMITH, W. D. et al. Metalloendopeptidases from the intestinal brush border of *Haemonchus contortus* as protective antigens for sheep. **Parasite Immunology**, v. 25, n. 6, p. 313–323, 1 Jun. 2003b.

SMITH, W. D.; SMITH, S. K. Evaluation of aspects of the protection afforded to sheep immunised with a gut membrane protein of *Haemonchus contortus*. **Research in veterinary science**, v. 55, n. 1, p. 1–9, 1993.

SMITH, W. D.; SMITH, S. K.; MURRAY, J. M. Protection studies with integral membrane fractions of *Haemonchus contortus*. **Parasite Immunology**, v. 16, n. 5, p. 231–241, 1 May 1994.

SMITH, W. D.; SMITH, S. K.; PETTIT, D. Evaluation of immunization with gut membrane glycoproteins of *Ostertagia ostertagi* against homologous challenge in calves and against *Haemonchus contortus* in sheep. **Parasite immunology**, v. 22, n. 5, p. 239–47, 2000.

SMITH, W. D.; ZARLENGA, D. S. Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 347–359, 2006.

SOUZA, M. DE F. DE et al. Seasonal distribution of gastrointestinal nematode infections in sheep in a semiarid region, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 351–359, 2013.

SOUZA, B. B. et al. Efeito do clima e da dieta sobre os parâmetros fisiológicos e hematológicos de cabras da raça saanen em confinamento no sertão paraibano. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**, v. 6, n. 1, p. 77–82, 2011.

TAVERNOR, A. S. et al. Vaccination of young Dorset lambs against haemonchosis. **Parasite immunology**, v. 14, n. 6, p. 645–655, 1992a.

TAVERNOR, A. S. et al. Immune response of Clun Forest sheep to vaccination with membrane glycoproteins from *Haemonchus contortus*. **Parasite immunology**, v. 14, n. 6, p. 671–675, 1992b.

TERRILL, T. H. et al. Anthelmintic resistance on goat farms in Georgia: Efficacy of anthelmintics against gastrointestinal nematodes in two selected goat herds. **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 4, p. 261–268, 2001.

THEODORIDES, V. J.; SCOTT, G. C.; LADERMAN, M. Efficacy of parbendazole against gastrointestinal nematodes in goats. **Journal veterinary**, v. 31, n. 5, p. 857–863, 1970.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária - Uma introdução**. 8. ed. São Paulo: Elsevier, 2008.

TORRES-ACOSTA, J. F. J.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 77, n. 2-3, p. 159–173, Jul. 2008.

URQUHART, G. M.; ACEDO, C. S. **Parasitología veterinaria**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2001.

VAN WYK, J. A.; MALAN, F. S.; BATH, G. F. Rampant anthelmintic resistance in sheep in South Africa – What are the opinions? In: WORKSHOP OF MANAGING ANTHELMINTIC RESISTANCE IN ENDOPARASITES, 16., 1997, Sun City. **Anais...** Sun City: World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 1997. p. 51 – 63.

VIEIRA, L. S. **Atividade ovicida in vitro e in vivo dos benzimidazóis; oxfendazole, fenbendazole, albendazole e thiabendazole em nematódeos gastrintestinais de caprinos**. 1986. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1986.

- VIEIRA, L. S. **Alternativas de controle da verminose gastrintestinal dos pequenos ruminantes.** EMBRAPA-CNPC, p. 29, 2003.
- VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.19, n. 3-4, p. 99-103, 1999.
- WALLER, P. J. Workshop summary: sustainable production systems. **Veterinary Parasitology**, v. 54, p. 305–307, 1994.
- WALLER, P. J. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, n. 3-4, p. 277–289, 2006.
- WANG, Tong et al. Moisture requirements for the migration of *Haemonchus contortus* third stage larvae out of faeces. **Veterinary parasitology**, v. 204, n. 3, p. 258-264, 2014.
- YOSHIHARA, E.; MINHO, A. P.; YAMAMURA, M. H. Efeito anti-helmíntico de taninos condensados em nematódeos gastrintestinais de ovinos (*Ovis aries*). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6-12, p. 3935–3950, 2013.