

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

POTENCIAL BIÓTICO DE ISOLADO SUSCETÍVEL DE *Haemonchus contortus* NA SUBSTITUIÇÃO DE POPULAÇÃO RESISTENTE A ANTI-HELMÍNTICOS EM OVINOS

MARIANNA LAURA ELIS CHOCOBAR

BOTUCATU - SP

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

POTENCIAL BIÓTICO DE ISOLADO SUSCETÍVEL DE *Haemonchus contortus* NA SUBSTITUIÇÃO DE POPULAÇÃO RESISTENTE A ANTI-HELMÍNTICOS EM OVINOS

MARIANNA LAURA ELIS CHOCOBAR

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

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante

Co-Orientador: Dr. César Cristiano Bassetto

BOTUCATU - SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Chocobar, Marianna Laura Elis.

Potencial biótico de isolado suscetível de *Haemonchus contortus* na substituição de população resistente a anti-helmínticos em ovinos / Marianna Laura Elis Chocobar.
- Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Alessandro Francisco Talamini do Amarante

Coorientador: César Cristiano Bassetto

Capes: 50502042

1. Ovinos - Doenças. 2. *Haemonchus contortus*.
3. Nematoides. 4. Doenças parasitárias. 5. Anti-helmínticos.
6. Controle de doenças transmissíveis.

Palavras-chave: Controle parasitário; Nematoides;
Parasitose; Refugia; Resistência anti-helmíntica.

Nome da Autora: Marianna Laura Elis Chocobar

Título: POTENCIAL BIÓTICO DE ISOLADO SUSCETÍVEL DE *Haemonchus contortus* NA SUBSTITUIÇÃO DE POPULAÇÃO RESISTENTE A ANTI-HELMÍNTICOS EM OVINOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante

Presidente e Orientador

Departamento de Bioestatística, Biologia Vegetal, Parasitologia e Zoologia,

Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Dra. Ana Cláudia Alexandre de Albuquerque

Membro Titular

Departamento de Bioestatística, Biologia Vegetal, Parasitologia e Zoologia,

Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Dra. Simone Cristina Méo Niciura

Membro Titular

Embrapa Pecuária Sudeste

Data da Defesa: 30 de setembro de 2022.

DEDICATÓRIA

Esta disertación está dedicada a mis padres, Víctor y Miriam, que no solamente me inculcaron el amor por el aprendizaje desde pequeña, sino que también me llenaron de privilegios al ser padres compañeros, presentes, humildes, cariñosos y solidarios. A ellos les debo cualquier título y victoria. Los amo.

Aos 28 animais que passaram esse tempo comigo e me permitiram estudá-los para obter meu título de mestre. Espero ter dado a eles uma vida cheia de cuidados, carinho e compaixão. Despeço-me deles com todo o respeito e gratidão que suas vidas merecem.

À educação pública e laica, livre de prejuízos e elitismo. À comunidade que, sem ter o privilégio de estudar na faculdade, contribui à manutenção das universidades públicas. Minha dívida eterna para eles que sustentaram minha educação ao longo destes 23 anos de ensino público.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante, por abrir as portas para mim no momento que mais precisava e por estar sempre presente em cada momento desta pesquisa. Minha profunda gratidão e admiração por sempre ser um pesquisador humilde e de excelência.

Ao meu co-orientador, Dr. César Cristiano Bassetto, por ser empático e ter uma grande paciência com esta iniciante. Por sempre saber me ensinar de forma calma, leve, precisa e com boa vontade. Pesquisador de excelência.

A Marina Paiva, minha irmã de outra mãe, outro pai e outro país. O apoio mais importante que tive, na difícil tarefa de ser migrante e principiante neste mundo acadêmico. Sem sua ajuda desinteressada esse mestrado não teria sido possível. Sou grata pela sua existência e pela sua companhia ao longo dos desafios da pandemia.

Ao meu amor, Caio Sperb, por me acompanhar todos os dias e por fazer qualquer distância parecer insignificante. Por me emprestar sua família e me tornar sentir parte dela. E, principalmente, por me entregar um amor leve, paciente, livre e respeitoso. A vida é tão colorida com a sua presença!

A mis hermanos, Lisandro y Johanna, y a mis tíos, Fabian y Alejandro, por siempre tener un tema de conversación para animarme y estar presentes, a pesar de la distancia. A mis abuelos, que se hicieron desde abajo, con humildad y esfuerzo, y abrieron los caminos del progreso para las próximas generaciones.

Aos amigos, Fernando, Mauro e Rocío, pela companhia aos finais de semana e pela amizade maravilhosa que nós temos. También a María y Ana que me hacen sentir en casa a pesar de los kilómetros.

Aos colegas do LHV, por me ensinar de tudo um pouco e por estar presentes em momentos em que precisei de ajuda. Por tantos almoços e momentos de risada e fofocas que tornaram o trabalho bem mais leve e divertido. Agradecimento especial para Hornblenda Joaquina Silva Bello e Naiara Mirelly Marinho da Silva, por terem auxiliado nas coletas e testes realizados neste experimento.

À banca do exame geral de qualificação, Dra. Fabiana Alves de Almeida e Dra. Ana Carolina de Souza Chagas, pelas excelentes e precisas considerações que contribuíram substancialmente ao desenvolvimento desta dissertação e a minha formação como pesquisadora.

À banca da defesa, Dra. Ana Claudia Alexandre de Albuquerque e Dra. Simone Cristina Méo Niciura por dedicar tempo para a leitura e correção deste manuscrito e pelas contribuições para que o artigo que será fruto desta dissertação adquira o nível de excelência que caracteriza ao LHV.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, por disponibilizar recursos financeiros e humanos para minha formação profissional e por oferecer ensino, pesquisa e extensão de excelente qualidade que beneficiam todos os estudantes e a população.

À coordenação do programa de pós-graduação em Medicina Veterinária por me dar suporte e apoio durante todo o meu mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao CNPq pelos recursos financeiros destinados para o desenvolvimento deste trabalho (processo 303624/2021-3) e pela bolsa de estudos (processo 161949/2021-5) que me permitiu fazer realidade este sonho.

Trabalho realizado com suporte financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo 2020/13972-4.

LISTA DE TABELAS

Table 1. Mean fecal egg counts (FEC) and larvae per gram (LPG) of lambs infected with a *Haemonchus contortus* isolate resistant or susceptible to commercial anti-helminthics (Groups R and S, respectively) and L3 production. Mean faecal egg counts (FEC) were performed every 14 days and larvae per gram (LPG) were calculated every 28 days, from October/21 to June/22. No significant difference was observed on U-Mann Whitney analysis between groups ($P>0.05$). 32

Table 2. Spearman's correlation between faecal egg counts (FEC) and the haematological variables (packed cell volume (PCV) and total plasma proteins (TPP) for the groups infected with an isolate of *Haemonchus contortus* susceptible (Group S) and resistant (Group R) to anthelmintics. 36

Table 3. Lethal concentration 50 (LC_{50}) and resistance factor (RF) for the anthelmintics tested by larval development test (RESISTA-Test©) using fresh faeces from lambs infected with an *Haemonchus contortus* isolate susceptible (S) and resistant (R) to anthelmintics, 160 days after experimental infection. RF values greater than 3 indicate resistance to the anthelmintic. Confidence interval (95%) in parentheses. 38

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1.** Infection of four donors and 16 experimental lambs with *Haemonchus contortus* larvae resistant (R-Red) or susceptible (S-Blue) to anthelmintics. 26
- Figure 2.** Average maximum, minimum and mean monthly temperatures (A), monthly rainfall and relative air humidity from October 2021 until August 2022 (B) in Botucatu, São Paulo State, Brazil. 29
- Figure 3.** Sheep experimentally infected with a *Haemonchus contortus* isolate resistant (red) or susceptible (blue) to commercial anthelmintics. Mean and standard error of faecal egg counts (FEC) for each group (A) and individual cumulative FEC means throughout the experiment (B). 31
- Figure 4.** Average L3/g of DM found in faecal samples and adjacent forage marked with stakes in paddocks grazed by lambs infected with *Haemonchus contortus* isolate resistant (A) or susceptible (B) to anthelmintics, for the three seasons evaluated. Arrows show the dates where fresh faeces were demarked. There were no statistical differences when $P \leq 0.05$. 34
- Figure 5.** Individual cumulative means and standard error of packed cell volume (PCV) (A) and total plasma proteins (TPP) (B) obtained at days 0, 28, 56, 140 and 238 after the infection of lambs infected with isolates of *Haemonchus contortus* Susceptible or Resistant to anthelmintics. 35
- Figure 6.** Logarithmic concentration used in the RESISTA-Test© of lambs experimentally infected with an isolate of *Haemonchus contortus* susceptible (blue) and resistant (red) to thiabendazole (A), levamisole (B), zolvix (C) and ivermectin (D). Results correspond to larval development assay performed in faecal samples taken 160 days after the experimental infection. 37

LISTA DE ANEXOS

Supplementary table 1. Fecal egg count (FEC) and hematological variables that justify anthelmintic treatments among the experimental lambs. FECRT 14 days after treatment.....	47
Supplementary figure 1. Spearman's correlation between Faecal Egg Count means (FEC) and Larvae Per Gram of Faeces (LPG) means of the groups infected with an <i>Haemonchus contortus</i> isolate resistant (A, Group R, red) and susceptible (B, Group S, blue) to anthelmintics in each of the sampling periods.	48
Supplementary figure 2. Body weight means and standard error of the lambs infected with a <i>Haemonchus contortus</i> isolate susceptible (group Susceptible) and resistant (group Resistant) to anthelmintics. There was no significant difference between groups ($P>0.05$).	49

SUMÁRIO

<i>CAPÍTULO I. Introdução, revisão de literatura e objetivos</i>	1
1. Introdução	2
2. Revisão de literatura	4
2.1. Infecção por <i>Haemonchus contortus</i>	4
2.2. Tratamento e controle das verminoses	6
2.3. A resistência anti-helmíntica (RA)	7
2.4. Identificação da resistência anti-helmíntica	8
2.5. A resistência anti-helmíntica no Brasil	9
2.6. Recuperação da eficácia dos anti-helmínticos	10
3. Objetivos	13
3.1. Objetivo geral	13
3.2. Objetivos específicos	13
4. Referências	14
<i>CAPÍTULO II. Artigo a ser submetido à revista Veterinary Parasitology</i>	21
Potential of <i>Haemonchus contortus</i> susceptible laboratory isolate to be used as a replacement for multiple anthelmintic resistant populations in sheep	22
ABSTRACT	22
1. Introduction	23
2. Material and methods	24

2.1.	Donor lambs and <i>H. contortus</i> isolates	24
2.2.	Tracer lambs and paddock contamination	25
2.3.	Experimental lambs	25
2.4.	Parasitological exams	27
2.4.1.	Faecal egg counts (FEC)	27
2.4.2.	Larvae per gram (LPG)	27
2.4.3.	Paddock contamination and free-living stages: recovery of L3 from grass and faecal pads	27
2.5.	Haematological parameters	28
2.6.	Larval development assay (RESISTA-Test®)	28
2.7.	Meteorological data	29
2.8.	Statistical analysis	30
3.	Results	30
3.1.	Parasitological analysis	30
3.2.	Haematological parameters	35
3.3.	Larval development assay (RESISTA-Test®)	36
3.4.	Body weight (BW)	38
4.	Discussion	38
5.	Conclusion	41
6.	References	41
	<i>CAPÍTULO III. Considerações finais</i>	50

Resumo

CHOCOBAR, M. L. E. **Potencial biótico de isolado suscetível de *Haemonchus contortus* na substituição de população resistente a anti-helmínticos em ovinos** – Botucatu, SP, 2022. 64p. Defesa do Mestrado Acadêmico – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

A elevada prevalência da resistência de *Haemonchus contortus* aos anti-helmínticos tornou-se uma ameaça para a ovinocultura e, neste cenário, a substituição de populações resistentes por isolados suscetíveis apresenta-se como uma estratégia promissora. Dezesesseis cordeiros foram infectados experimentalmente com 4000 larvas infectantes (L3) de um isolado de *H. contortus* resistente (Grupo R, n=8) ou suscetível (Grupo S, n=8) a anti-helmínticos, os quais foram mantidos em pastagens separadas durante 266 dias. As contagens de ovos por grama de fezes (OPG) apresentaram valores máximos 28-42 dias pós-infecção (PI) e foram diminuindo com o tempo, com semelhanças entre os grupos ($P>0,05$). Em termos de patogenicidade, ambos isolados se mostraram igualmente capazes de produzir anemia ($P=0,440$), com diferença estatística no grau de hipoproteïnemia aos 56 dias PI ($P=0,006$). As médias de L3 por grama (LPG) de fezes foram similares ($P>0,05$), tanto nas coproculturas como em amostras fecais recolhidas da pastagem, demonstrando que ambos isolados são capazes de se desenvolver *in vivo* e *in vitro* e gerar novas infecções. O grau de resistência/suscetibilidade foi avaliado por meio do Teste de Desenvolvimento Larvar (RESISTA-Test©), 160 dias PI. O isolado resistente apresentou fatores de resistência (FR) elevados ao tiabendazol (141), levamisol (822), monepantel (34) e ivermectina (196), enquanto os FR do isolado suscetível se mantiveram inferiores a três, indicando manutenção da suscetibilidade aos anti-helmínticos. As similaridades entre os grupos em todos os aspectos avaliados, e a comprovada sensibilidade aos anti-helmínticos por parte do isolado suscetível, demonstram que a substituição pode ser explorada como uma estratégia plausível no controle parasitário sustentável em criações de ovinos.

Palavras chave: Parasitose; Nematoides; Controle Parasitário; Resistência Anti Helmíntica; Refugia.

Abstract

The high prevalence of anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* is threatening sheep farming. In this context, resistant populations' replacement using susceptible isolates appears to be a promising strategy to overcome this situation. Sixteen lambs were experimentally infected with 4000 infective larvae (L3) of an *H. contortus* isolate resistant (Group R, n=8) or susceptible (Group S, n=8) to anthelmintics, which were kept in separate pastures for 266 days. Faecal egg counts (FEC) showed maximum values 28-42 days post-infection (PI) and decreased over time, with similarities between groups ($P>0.05$). In terms of pathogenicity, both isolates were equally capable of producing anemia ($P=0.440$), with statistical differences in the degree of hypoproteinemia, 56 days PI ($P=0.006$). The means of L3 per gram (LPG) of faeces were similar ($P>0.05$), both in cultures and in faecal samples collected from pasture, demonstrating that both isolates are capable of developing *in vivo* and *in vitro* and generating new infections. The degree of resistance/susceptibility was evaluated using the Larvae Development Assay (RESISTA-Test®), 160 days PI. The resistant isolate showed high resistance factors (RF) to thiabendazole (141), levamisole (822), monepantel (34) and ivermectin (196), while the RF of the susceptible isolate remained below three, indicating maintenance of susceptibility to anthelmintics. The similarities between the groups in all aspects evaluated, and the proven sensitivity to anthelmintics by the susceptible isolate, demonstrate that substitution can be explored as a plausible strategy for sustainable parasite control in sheep farms.

Key words. Parasitosis; Nematodes; Parasitic Control; Anthelmintic Resistance; Refugia

CAPÍTULO I. Introdução, revisão de literatura e objetivos

1. Introdução

Haemonchus contortus é a principal espécie que parasita o abomaso de ovinos e caprinos das regiões tropicais e subtropicais (Amarante, 2015; Besier *et al.*, 2016). Seu hábito hematófago lhe confere alta patogenicidade, chegando a produzir quadros de anemia e hipoproteïnemia graves que, em certas circunstâncias, podem levar ao óbito do animal, além de gerar diminuição no desempenho produtivo, o que se traduz em importantes perdas produtivas para o setor (Gilleard, 2013; Leathwick e Besier, 2014; Amarante, 2015; Besier *et al.*, 2016; Emery *et al.*, 2016; Swarnkar e Singh, 2018; Alam *et al.*, 2020).

O fenômeno de resistência anti-helmíntica está amplamente estabelecido na ovinocultura e é particularmente relevante no caso de *H. contortus*, dado ao elevado potencial biótico da espécie (Kaplan, 2004; Gilleard, 2013; Fissiha e Kinde, 2021). No momento, o parasita apresenta resistência comprovada às principais drogas utilizadas no tratamento e controle de verminoses (Mederos *et al.*, 2014; Van den Brom *et al.*, 2015; Kotze e Prichard, 2016; Martins *et al.*, 2017).

Devido a essa problemática e ao escasso ou nulo desenvolvimento de novos princípios ativos, as estratégias de controle parasitário sustentável são alvo de pesquisa em várias regiões do mundo. Uma estratégia que se encontra em estudo há algumas décadas é a possibilidade de substituir uma população de parasitas resistentes por um isolado suscetível a anti-helmínticos, com o intuito de reverter a resistência e poder aplicar, nessa nova população, práticas que evitem o reestabelecimento de resistência (Moussavou-Boussougou *et al.*, 2006).

Estudos realizados na área já obtiveram resultados satisfatórios (Van Wyk e Van Schalwyk, 1990; Bird *et al.*, 2001; Melo, 2005; Sissay *et al.*, 2006; Moussavou-Boussougou *et al.*, 2006; Fiel *et al.*, 2017; Muchiut *et al.*, 2019 e 2022), porém, em uma pesquisa recente, George *et al.*, (2021) demonstraram que um isolado suscetível não foi capaz de se perpetuar com o decorrer do tempo, provavelmente devido à falta de adaptabilidade ao meio ambiente.

A presente pesquisa teve o intuito de comparar o potencial biótico e grau de patogenicidade de dois isolados de *H. contortus* e avaliar, pela primeira vez no Brasil, a possibilidade de substituir uma população de *H. contortus* resistente aos principais anti-helmínticos por um isolado suscetível introduzido por meio de infecção experimental em ovinos.

2. Revisão de literatura

2.1. Infecção por *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus, parasita do abomaso de pequenos ruminantes, produz grandes danos aos rebanhos como consequência dos hábitos hematófagos e histiófagos (Amarante, 2015; Besier *et al.*, 2016). Além da espécie ser considerada uma grande ameaça em países com climas tropicais e subtropicais, nos últimos anos tem sido capaz de se adaptar a diversos tipos de climas, devido à sua prolificidade e variabilidade genética, associada aos iminentes câmbios climáticos, afetando ovinos em diferentes regiões do mundo (Morgan *et al.*, 2013; Bartley *et al.*, 2021).

A partir da fase larval em quarto estágio (L4) esses parasitas são hematófagos, podendo levar a importantes quadros de anemia microcítica hipocrômica com marcada redução do volume globular, hipoproteïnemia e hipoalbuminemia (Alam *et al.*, 2020), gerando importantes perdas econômicas diretas e indiretas, como consequência da baixa produtividade e morte de animais parasitados, além de gastos com tratamentos anti-helmínticos e atenção veterinária (Gilleard, 2013; Leathwick e Besier, 2014; Amarante, 2015; Besier *et al.*, 2016; Emery *et al.*, 2016).

Assim como em outras espécies de nematódeos gastrintestinais, a forma infectante do parasita é a larva L3, que os ovinos ingerem durante o pastejo. O ciclo de vida destes parasitas se compõe de duas fases: uma de vida livre, que abrange a eclosão dos ovos para liberar as larvas L1 no ambiente e a evolução destas até dar origem à forma infectante L3, que conserva a cutícula da L2, o que lhe confere alta resistência ao ambiente; e uma de vida parasitária, que ocorre dentro do animal, onde as larvas infectantes dão origem aos espécimes adultos que irão reiniciar o ciclo de vida, ao eliminar ovos nas fezes (Amarante, 2015). Em temperaturas entre 22 a 25 °C a eclosão dos ovos e evolução da L1 até a forma infectante ocorre entre três a sete dias (Hsu e Levine, 1977). A elevada umidade do ambiente (>85%) é um fator determinante para o desenvolvimento das L3, porém, as formas infectantes em situações adversas, como período de seca (<70% de umidade), essas larvas conseguem sobreviver por longos períodos de dessecação, desde que a temperatura ambiental esteja próxima dos 17 °C e a incidência de luz UV seja baixa (O'Connor *et*

al., 2007; Besier *et al.*, 2016). Isto ocorre graças à anidrobiose, um processo biológico que visa aumentar a sobrevivência do parasita, reduzindo a atividade metabólica em momentos de baixa umidade (Lettini e Sukhedeo, 2006).

Santos *et al.* (2012) demonstraram que as L3 de *H. contortus* migram na pastagem, de acordo com a temperatura, radiação e umidade do ambiente. Assim, em momentos de maior umidade e temperatura, a migração para as partes mais altas da pastagem é mais rápida e eficiente, facilitando a ingestão por parte de um hospedeiro suscetível.

Embora alguns animais sejam capazes de desenvolver resposta imune contra a infecção e estabelecer uma relação de equilíbrio hospedeiro-parasita, a haemonchose, quando não controlada, é uma doença grave que pode levar ao óbito. Aqueles indivíduos que não conseguem desenvolver uma resposta imune eficiente apresentam os sinais clínicos típicos da doença: mucosas hipocoradas decorrente da anemia, redução do ganho de peso médio diário e edema submandibular (Besier *et al.*, 2016).

A resposta imune do hospedeiro depende, principalmente, das características genéticas do animal e encontra-se intimamente relacionada com a qualidade e quantidade dos nutrientes ingeridos. Aqueles ovinos que são alimentados com ração de boa qualidade e com níveis de proteína apropriados para cada categoria demonstram maiores níveis de resistência às infecções, comparado com animais com aportes nutricionais deficientes (Amarante *et al.*, 2004). Além da susceptibilidade individual, existem raças ovinas naturalmente mais resistentes às infecções por *H. contortus*. Estudos demonstram que os ovinos Santa Inês, raça nativa do nordeste brasileiro, apresentam uma resposta imune local rápida e eficiente contra o parasita, e, conseqüentemente, o uso desta raça em criações ovinas pode ser uma importante ferramenta no controle das verminoses (Amarante *et al.*, 2004; Albuquerque *et al.*, 2019).

Não existe uma idade específica para a manifestação de sinais clínicos da doença, porém os indivíduos mais afetados costumam ser os cordeiros recém desmamados, que ainda não desenvolveram uma resposta imune contra o parasita,

assim como as ovelhas adultas no período periparto (Amarante, 2015; Besier *et al.*, 2016).

A partir da terceira semana após a infecção inicia o consumo de sangue por parte dos parasitas, o que provoca uma queda progressiva do volume globular (Dargie e Allonby, 1975). Estudos apontam que o maior consumo de sangue por parte dos parasitas adultos ocorre entre a terceira e a sexta semana após a infecção, momento em que o parasita também atinge sua maior prolificidade (Swarnkar e Singh, 2018) e patogenicidade, como consequência da demora da medula para produzir novas células sanguíneas, agravado pela constante hemorragia abomasal (Dargie e Allonby, 1975).

2.2. Tratamento e controle das verminoses

Na atualidade, a alternativa mais amplamente utilizada para o controle das verminoses é o uso de anti-helmínticos, com diferentes abordagens (Kenyon e Jackson, 2012). Por um lado, no tratamento supressivo, altamente utilizado por produtores rurais, o rebanho completo é tratado de forma periódica, levando –ou não– em consideração a epidemiologia das verminoses (Besier, 2012). Já no tratamento seletivo, também conhecido como direcionado, os animais a serem tratados são identificados segundo diferentes parâmetros como: ganho em peso diário, coloração das mucosas, variáveis hematológicas e/ou exames coproparasitológicos (Kenyon e Jackson, 2012), evitando aplicar tratamentos naqueles indivíduos que não manifestam sinais clínicos da infecção. Embora este tipo de tratamento tenha uma maior aceitação por parte da comunidade científica, estudos recentes demonstram que o tratamento seletivo não evita o surgimento de resistência anti-helmíntica (Albuquerque *et al.*, 2017) o que, certamente, representa um problema para o controle das parasitoses.

A população de parasitas em *refugia* tem sido explorada em estratégias de controle elaboradas em diferentes continentes. O primeiro estudo do impacto da população em *refugia* no retardo do desenvolvimento de RA foi elaborado por Martin *et al.* (1981). Sob a premissa de que a população que se encontra na pastagem não é exposta aos princípios ativos utilizados no controle das verminoses, sugeriram que, “quanto maior a população de larvas em *refugia*, maior o número de gerações que

deverão ser expostas ao tratamento para que ocorra a seleção” (Martin *et al.*, 1981). No estudo, desenvolvido em seis gerações, observaram que, quanto maior o número de larvas em *refugia*, menor era o número de parasitas resistentes presentes no trato gastrointestinal. Mais recentemente, Greer *et al.*, (2020) concluíram que a população em *refugia* não é, apenas, aquela que se encontra no ambiente, senão também todas aquelas formas parasitárias nas quais não há ação dos tratamentos (como as L4 e L5) e qualquer forma parasitária presente em um hospedeiro sob o qual não é aplicado tratamento anti-helmíntico.

2.3. A resistência anti-helmíntica (RA)

Existem inúmeras definições de resistência anti-helmíntica (RA), mas, em termos gerais, esse fenômeno pode ser descrito como uma capacidade adquirida pelos parasitas de suportar doses letais de anti-helmínticos quando comparados aos demais indivíduos, sendo considerada uma característica herdável e poligênica (Fiel *et al.*, 2001).

A RA está amplamente estabelecida em rebanhos ovinos, situação que compromete severamente o controle parasitário sustentável. É sabido que *H. contortus* é um dos parasitas gastrintestinais de ovinos mais propensos a desenvolver RA, o que pode ser explicado pela diversidade genética do parasita, produto da prolificidade e capacidade de gerar novas mutações e transmiti-las à descendência (Kaplan, 2004; Gilleard, 2013). Diversos relatos de casos ao redor do mundo demonstram que *H. contortus* foi capaz de se tornar resistente a um novo princípio ativo em menos de dez anos após o lançamento no mercado (Kaplan, 2004; Mederos, 2014; Fissiha e Kinde, 2021). Atualmente, a espécie é resistente às principais drogas utilizadas no controle das verminoses em ruminantes, incluindo os benzimidazóis, imidazotiazóis, lactonas macrocíclicas e derivados do amino-acetonitrila (monepantel) (Mederos *et al.*, 2014; Van den Brom *et al.*, 2015; Kotze e Prichard, 2016; Martins *et al.*, 2017).

A aplicação de tratamento em todos os animais do rebanho ou de animais que pastejam em locais com baixa contaminação, assim como a falta de rotação de princípios ativos e a subdosagem de anti-helmínticos são as principais práticas que

levam ao surgimento de RA (Leathwick e Besier, 2014; Herrera-Manzanilla *et al.*, 2017).

Os primeiros relatos de RA ocorreram nos anos 50s-60s, onde se comprovou a resistência de *H. contortus* à fenotiazina. Novas drogas foram lançadas nas décadas seguintes e, em pouco tempo, tornaram-se ineficazes para o controle parasitário. A resistência aos benzimidazóis e levamisol foram relatadas nos anos 60 e 70, respectivamente, e às avermectinas-milbemicinas nas duas décadas seguintes. O cenário piorou após a aparição da chamada resistência múltipla às drogas (RMD) a partir dos anos 80, situação que foi agravada devido ao escasso desenvolvimento de novos princípios ativos contra os helmintos em espécies de produção (Santos e Gonçalves, 1967; Kaplan 2004). Atualmente, os exemplares de *H. contortus* com RMD representam um risco para a produção de ovinos ao redor do mundo (Kaplan, 2004; Fissiha e Kinde, 2021).

2.4. Identificação da resistência anti-helmíntica

Existem diferentes técnicas para diagnosticar um quadro de RA. Os métodos comumente utilizados são o Teste de Redução na Contagem de Ovos nas Fezes (TRCOF), com avaliações antes e depois da aplicação de um determinado tratamento, e técnicas *in vitro* como o Teste de Desenvolvimento Larvar (TDL), onde é feita a cultura de ovos até L3 em meios com diferentes concentrações de anti-helmínticos (Howell *et al.*, 2008). Se bem mais utilizado para diagnosticar quadros de RA, o TRCOF costuma apresentar vieses quando as contagens de OPG pré-tratamento são baixas, além de se tratar de um procedimento mais laborioso e caro do que o TDL. Segundo Gainza *et al.* (2021), utilizando o RESISTA-Test®, concluíram que ambas as técnicas possuem resultados similares, com a vantagem que o TDL não precisa de aplicação de tratamentos diretamente no animal, além de proporcionar resultados mais rápidos, por ser um teste *in vitro*.

Estudos desenvolvidos por diversos autores sugerem que a prevalência da RA em rebanhos ovinos é alta. Herrera-Manzanilla *et al.* (2017) trabalharam com fazendas ovinas do departamento de Tabasco, no México, e, em 100% das fazendas testadas, *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp. apresentaram resistência à ivermectina, albendazol e/ou levamisol nos testes de TRCOF. As mesmas drogas e

metodologia foram utilizadas por Martínez-Valladares *et al.*, (2013) em fazendas ovinas do noroeste da Espanha, demonstrando a presença de RA em todas as fazendas testadas. No estudo também foram realizados testes *in vitro* onde foi comprovada a ineficácia do tiabendazol em ovos (35,3%) e do levamisol (61,5%) e ivermectina (23,5%) em larvas L1.

Em um estudo desenvolvido por Howell *et al.* (2008) em 46 fazendas de ovinos nos Estados Unidos, *H. contortus* foi a espécie predominante (96%) e a mais resistente às drogas testadas: 98% dos espécimes de *H. contortus* eram resistentes aos benzimidazóis, 54% ao levamisol e 76% à ivermectina, além de 48% apresentarem RMD.

2.5. A resistência anti-helmíntica no Brasil

A produção ovina no Brasil se caracteriza pela utilização de diversos sistemas produtivos e criação de diferentes raças, adaptados às características geográficas e socioeconômicas de cada região. Em uma extensa revisão de literatura, Salgado e Santos (2016) resgataram os dados de todos os estudos feitos sobre a prevalência da RA nos rebanhos ovinos do Brasil. Aqui serão mencionadas as principais pesquisas desenvolvidas em cada região.

A região Sul concentra 30% dos ovinos do país e é o local onde foram relatados os primeiros casos de RA em pequenos ruminantes no Brasil. Santos e Gonçalves (1967) e Echevarria e Trindade (1989) relataram casos de RA ao tiabendazol e à ivermectina, respectivamente. A RA evoluiu tão rapidamente que, em 1996, alguns rebanhos apresentavam resistência ao albendazol, levamisol, closantel, fenbendazol, ivermectina, tetramisol e à combinação de disofenol e tetramisol (Thomas-Soccol *et al.*, 1996).

Ramos *et al.* (2002) desenvolveram o maior estudo de RA no Brasil, avaliando 7529 ovinos de 65 rebanhos, os quais apresentaram resistência à ivermectina (77% dos rebanhos), albendazol (65%), closantel (13%) e levamisol (15%). Outro estudo de RA foi desenvolvido por Cezar *et al.* (2010) em 5000 ovinos da raça merino naturalmente infectados. No estudo testaram o grau de resistência de *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp. e *Ostertagia* spp. aos nove anti-helmínticos disponíveis comercialmente: levamisol, moxidectina, albendazol, ivermectina, nitroxinil,

disofenol, triclorfon, closantel e uma combinação de ivermectina, levamisol e albendazol. Os resultados foram, no mínimo, alarmantes, já que nenhuma das nove formulações foi efetiva sobre nenhum dos gêneros estudados.

A produção ovina no Nordeste do Brasil consiste, majoritariamente, em pequenas propriedades rurais dedicadas à agricultura familiar de subsistência, para produção de carne e leite. A situação da RA nesta região também é grave e já foi descrita a resistência de *H. contortus* ao albendazol (90%) e ivermectina (36,6%) em 30 rebanhos de Rio Grande do Norte (Coelho *et al.*, 2010).

Já na região Sudeste, onde foi desenvolvido o presente estudo, Amarante *et al.* (1992) avaliaram a efetividade do oxfendazol, levamisol e ivermectina em nove rebanhos ovinos de São Manuel, SP, e relataram resistência a todos os princípios ativos testados. Em estudo envolvendo propriedades de 35 municípios do estado de SP, Veríssimo *et al.* (2012) identificaram práticas que contribuem para o surgimento de RA, como subdosagem, tratamentos frequentes, baixa rotação de princípios ativos, falta de diagnósticos laboratoriais, dentre outros, e, por meio do TRCOF, comprovaram a resistência à ivermectina (100% das propriedades), moxidectina (96,6%), levamisol (53,6%), closantel (92,9%) e albendazol (100%). Mais recentemente, Chagas *et al.* (2013) utilizaram 42 ovinos infectados experimentalmente com 4000 L3 de *H. contortus* e detectaram RA ao albendazol, ivermectina, moxidectina, closantel e levamisol, no entanto a sensibilidade ao triclorfon ainda era mantida.

A produção de ovinos leiteiros no Brasil encontra-se concentrada nos Estados de Rio de Janeiro (RJ) e Minas Gerais (MG). Cruz *et al.* (2010) relataram espécies com RMD em 10 rebanhos do RJ, com casos de resistência ao nitroxinil, doramectina, levamisol, ivermectina, albendazol, closantel, moxidectina e fenbendazol.

2.6. Recuperação da eficácia dos anti-helmínticos

Num cenário global onde a RA possui uma elevada prevalência e sem o surgimento de novos produtos com propriedades antiparasitárias, os produtores e médicos veterinários são forçados a adotar novas estratégias de controle parasitário. Algumas alternativas propostas para evitar a presença de RA em

rebanhos incluem a identificação e mitigação de práticas que facilitem a aparição de RA, manutenção de larvas suscetíveis em refugia, escolha apropriada e uso seletivo de anti-helmínticos e prevenção da introdução de espécies resistentes nos rebanhos (Howell *et al.*, 2008; Leathwick e Besier, 2014).

Já que a efetividade dos anti-helmínticos comerciais está cada vez mais ameaçada, uma estratégia de controle seria substituir as populações de nematoides gastrintestinais resistentes por isolados suscetíveis e estudar o comportamento destes espécimes ao longo do tempo, tanto na fase de vida parasitária como na fase de vida livre (Moussavou-Boussougou *et al.*, 2006).

Em 1986, Van Wyk e Van Schalkwyk testaram esta técnica de controle de helmintoses em ovinos, por meio de um experimento feito em seis piquetes, cinco deles contendo animais doadores parasitados por *H. contortus* resistentes aos benzimidazóis que foram substituídos, progressivamente, por animais infectados com espécimes suscetíveis, e um piquete onde foram mantidos os animais com os parasitas resistentes, utilizado como grupo controle. Em dois dos piquetes a resistência se manteve ao longo do experimento e nos três restantes os benzimidazóis se mostraram altamente eficazes para controlar as parasitoses (96 - 99%).

Estudos similares foram desenvolvidos por Bird *et al.*, (2001), Melo (2005), Sissay *et al.*, (2006), Moussavou-Boussougou *et al.*, (2006), Fiel *et al.*, (2017), Muchiut *et al.*, (2019), George *et al.*, (2021) e Muchiut *et al.*, (2022), todos apresentando resultados satisfatórios ao substituir população resistente por suscetível, demonstrando que esta técnica, em conjunto com o aproveitamento da população de parasitas em *refugia* e aplicação apropriada de tratamentos seletivos podem ser estratégias utilizadas no controle parasitário sustentável.

O processo de substituição de larvas pode ser realizado utilizando animais doadores que contaminem a pastagem com uma população suscetível, ou por meio da infecção experimental direta no rebanho. No caso dos animais doadores, a introdução do isolado suscetível em um piquete deve ser feita em duas etapas. A primeira consiste em eliminar ou reduzir o número de larvas resistentes em *refugia*, por meio do uso de anti-helmínticos eficazes e/ou descanso da pastagem -

lembrando que o período de descanso da pastagem deve ser prolongado de acordo com a época do ano (Almeida *et al.*, 2020) o que pode ser inviável em termos produtivos. As larvas susceptíveis devem ser introduzidas em uma segunda etapa, por meio do animal doador infectado experimentalmente colocado na pastagem previamente “limpa” (Muchiut *et al.*, 2018). Para a infecção experimental do rebanho, a primeira etapa consiste em aplicar tratamento para obter o status *worm free* (isto é, livre de parasitas) e, posteriormente, infectar os animais por via oral com o isolado de escolha, como descrito por Bird *et al.* (2001).

Apesar de várias pesquisas já terem demonstrado resultados satisfatórios no que diz respeito da substituição de uma população resistente por um isolado suscetível, o potencial biótico desse isolado ao longo do tempo após a substituição ainda é alvo de pesquisa. Em um experimento de três anos e meio de duração, utilizando testes *in vivo*, *in vitro* e técnicas moleculares, George *et al.* (2021) obtiveram resultados satisfatórios na substituição de populações de *H. contortus* totalmente resistentes aos benzimidazóis e ivermectina e parcialmente resistentes ao levamisol por espécimes suscetíveis a esses princípios ativos. Porém, um ano e meio após o estabelecimento da população suscetível, os parasitas apresentaram resistência à ivermectina, moxidectina, albendazol e levamisol. De acordo com os autores, provavelmente, o isolado suscetível não apresentava a mesma adaptabilidade ao meio ambiente que os espécimes resistentes, motivo pelo qual a retomada da RA ocorreu tão rapidamente.

Considerando que a RA em rebanhos ovinos é um *status quo* e não uma exceção e que novas estratégias de controle parasitário sustentável são requeridas para controlar ou reverter esse cenário, o presente estudo visou comparar o potencial biótico e grau de patogenicidade de dois isolados de *H. contortus* e avaliar a viabilidade da substituição de uma população resistente por isolado suscetível aos anti-helmínticos comerciais. No presente estudo, demonstrou-se que o isolado suscetível se mostrou com potencial biótico favorável, criando a oportunidade de sua utilização em outras pesquisas e programas que envolvam a substituição de população resistente de *H. contortus* em rebanhos de ovinos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Comparar dois isolados de *H. contortus* e avaliar a viabilidade de utilizar o isolado suscetível a anti-helmínticos na substituição de uma população resistente, como estratégia para restabelecer a sensibilidade anti-helmíntica em um rebanho ovino.

3.2. Objetivos específicos

Estudar as fases de vida livre de *H. contortus* suscetível (isolado de laboratório) e resistente (isolado de campo) a anti-helmínticos com a avaliação dos seguintes aspectos:

- Analisar a adaptabilidade ao meio ambiente do isolado suscetível de *H. contortus* e a manutenção de sua susceptibilidade aos anti-helmínticos comerciais.
- Determinar a capacidade de desenvolvimento dos estágios de vida livre de ambos isolados *in vitro* e *in vivo*.
- Avaliar o grau de patogenicidade dos dois isolados em cordeiros infectados experimentalmente.
- Acompanhar o desempenho produtivo de ambos os grupos levando em consideração o ganho de peso dos animais.

4. Referências

- ALAM, R. T. M.; HASSANEN, E. A. A.; EL-MANDRAWY, S. A. M. *Haemonchus contortus* infection in Sheep and Goats: alterations in haematological, biochemical, immunological, trace element and oxidative stress markers. *Journal of Applied Animal Research*, v. 48, n. 1, p. 357–364, 1. 2020.
- ALBUQUERQUE, A. C. A.; BASSETTO, C. C.; ALMEIDA, F. A.; HILDERSLEY, K. A.; MCNEILLY, T. N.; BRITTON, C.; AMARANTE, A. F. T. Differences in immune responses to *Haemonchus contortus* infection in the susceptible Ile de France and the resistant Santa Ines sheep under different anthelmintic treatments regimens. *Veterinary Research*, v. 50, n. 1, 29. 2019.
- ALBUQUERQUE, A. C. A. DE; BASSETTO, C. C.; ALMEIDA, F. A. DE; AMARANTE, A. F. T. Development of *Haemonchus contortus* resistance in sheep under suppressive or targeted selective treatment with monepantel. *Veterinary Parasitology*, v. 246, p. 112–117. 2017.
- ALMEIDA, F. A.; ALBUQUERQUE, A. C. A.; BASSETTO, C. C.; STARLING, R. Z. C.; LINS, J. G. G.; AMARANTE, A. F. T. Long spelling periods are required for pasture to become free of contamination by infective larvae of *Haemonchus contortus* in a humid subtropical climate of São Paulo state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 279, p. 109060. 2020.
- AMARANTE, A. F. T.; BARBOSA, M. A.; OLIVEIRA, M. A. G. DE; CARMELLO, M. J.; PADOVANI, C. R. Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e levamisol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 29, n. 1, p. 31. 1992.
- AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Veterinary Parasitology*, v. 120, n. 1–2, p. 91–106. 2004.
- AMARANTE, A. F. T. DO. Os parasitas de ovinos. [s.l.] Editora UNESP. p. 13–99. 2015
- BARTLEY, D. J.; ANDREWS, L.; MELVILLE, L. A.; MCBEAN, D.; SKUCE, P.; MORRISON, A. A. Integrating applied parasitological and molecular epidemiological

methodologies to investigate the capacity of *Haemonchus contortus* to over-winter on pasture in Scotland. *Veterinary Record*, v. 189, n. 3, 19. 2021.

BESIER, R. B. Refugia-based strategies for sustainable worm control: Factors affecting the acceptability to sheep and goat owners. *Veterinary Parasitology*, v. 186, n. 1-2, p. 2-9. 2012.

BIRD, J.; SHULAW, W. P.; POPE, W. F.; BREMER, C. A. Control of anthelmintic resistant endoparasites in a commercial sheep flock through parasite community replacement. *Veterinary Parasitology*, v. 97, n. 3, p. 221-227. 2001.

CEZAR, A. S.; TOSCAN, G.; CAMILLO, G.; SANGIONI, L. A.; RIBAS, H. O.; VOGEL, F. S. F. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 173, n. 1-2, p. 157-160. 2010.

CHAGAS, A. C. S.; KATI KI, L. M.; SILVA, I. C.; GIGLIOTI, R.; ESTEVES, S. N.; OLIVEIRA, M. C. S.; BARIONI, W., Júnior. *Haemonchus contortus*: A multiple-resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. *Parasitology International*, v. 62, n. 1, p. 1-6. 2013.

COSTA COELHO, W. A.; MENDES AHID, S. M.; VIEIRA, L. S.; SOUZA FONSECA, Z. A.; SILVA, I. P. Resistência anti-helmíntica em caprinos no município de Mossoró, RN. *Ciência Animal Brasileira*, v. 11, n. 3, 2. 2010.

CRUZ, D. G. DA; ROCHA, L. O. DA; ARRUDA, S. S.; PALIERAQUI, J. G. B.; CORDEIRO, R. C.; SANTOS, E., Junior; MOLENTO, M. B.; PAULA SANTOS, C. DE. Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 170, n. 3-4, p. 340-343. 2010.

DOLINSKÁ, M.; KÖNIGOVÁ, A.; LETKOVÁ, V.; MOLNÁR, L.; VÁRADY, M. Detection of ivermectin resistance by a larval development test-back to the past or a step forward? *Veterinary Parasitology*, v. 198, p. 154-158. 2013.

ECHEVARRIA, F. A., TRINIDADE, G. N. Anthelmintic resistance by *Haemonchus contortus* to ivermectin in Brazil: a preliminary report. *The Veterinary record*, 124(6), 147-148. 1989.

EMERY, D. L.; HUNT, P. W.; LE JAMBRE, L. F. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? International Journal for Parasitology, v. 46, n. 12, p. 755–769. 2016.

FIEL, C., ANZIANI, O., SUAREZ, V., VÁZQUEZ, R., EDDI, C., ROMERO, J., STEFFAN, P. Resistencia antihelmíntica en bovinos: causas, diagnóstico y profilaxis. Revista Veterinaria Argentina. (171), pp. 21-33. 2001.

FIEL, C. A.; STEFFAN, P. E.; MUCHIUT, S. M.; FERNÁNDEZ, A. S.; BERNAT, G.; RIVA, E.; LLOBERAS, M. M.; ALMADA, A.; HOMER, D. An attempt to replace an ivermectin-resistant *Cooperia* spp. population by a susceptible one on grazing pastures based on epidemiological principles and refugia management. Veterinary Parasitology, v. 246, p. 53–59. 2017.

FISSIHA, W.; KINDE, M. Z. Anthelmintic Resistance and Its Mechanism: A Review. Infection and Drug Resistance, v. 14, p. 5403–5410. 2021.

GAINZA, Y. A.; SANTOS, I. B. DOS; FIGUEIREDO, A.; SANTOS, L. A. L. DOS; ESTEVES, S. N.; BARIONI-JUNIOR, W.; MINHO, A. P.; CHAGAS, A. C. DE S. Anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* from sheep flocks in Brazil: concordance of in vivo and in vitro (RESISTA-Test©) methods. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 30, n. 2, 2021.

GAINZA Y.A.; SANTOS, I. B. DOS; FIGUEIREDO, A.; AMARANTE, A.F.T.; ESTEVES, S. N.; BARIONI-JUNIOR, W.; CHAGAS, A. C. DE S. Improvement of an in vitro test for *Haemonchus contortus* resistance diagnosis in small ruminant (RESISTA-Test©). Boletim de pesquisa e desenvolvimento, São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2020.

GEORGE, M. M.; VATTA, A. F.; HOWELL, S. B.; STOREY, B. E.; MCCOY, C. J.; WOLSTENHOLME, A. J.; REDMAN, E. M.; GILLEARD, J. S.; KAPLAN, R. M. Evaluation of changes in drug susceptibility and population genetic structure in *Haemonchus contortus* following worm replacement as a means to reverse the impact of multiple-anthelmintic resistance on a sheep farm. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, v. 15, p. 134–143. 2021.

GILLEARD, J. S. *Haemonchus contortus* a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. *Parasitology*, v. 140, n. 12, p. 1506–1522, 2. 2013.

GREER, A. W.; VAN WYK, J. A.; HAMIE, J. C.; BYARUHANGA, C.; KENYON, F. Refugia-Based Strategies for Parasite Control in Livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 36, n. 1, p. 31–43. 2020.

HERRERA-MANZANILLA, F. A.; OJEDA-ROBERTOS, N. F.; GONZÁLEZ-GARDUÑO, R.; CÁMARA-SARMIENTO, R.; TORRES-ACOSTA, J. F. J. Gastrointestinal nematode populations with multiple anthelmintic resistance in sheep farms from the hot humid tropics of Mexico. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, v. 9, p. 29–33. 2017.

HOWELL, S. B.; BURKE, J. M.; MILLER, J. E.; TERRILL, T. H.; VALENCIA, E.; WILLIAMS, M. J.; WILLIAMSON, L. H.; ZAJAC, A. M.; KAPLAN, R. M. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the southeastern United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 233, n. 12, p. 1913–1919. 2008.

KAPLAN, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*, v. 20, n. 10, p. 477–481. 2004.

KENYON, F.; JACKSON, F. Targeted flock/herd and individual ruminant treatment approaches. *Veterinary Parasitology*, v. 186, n. 1–2, p. 10–17. 2012.

KOTZE, A. C.; PRICHARD, R. K. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*. In: *Haemonchus contortus* and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends. [s.l.] Elsevier. p. 397–428. 2016.

LEATHWICK, D. M.; BESIER, R. B. The management of anthelmintic resistance in grazing ruminants in Australasia—Strategies and experiences. *Veterinary Parasitology*, v. 204, n. 1–2, p. 44–54. 2014.

LETTINI, S.E., SUKHEDEO, V.K., Anhydrobiosis increases survival of trichostrongyle nematodes. *J. Parasitol.* 92. 1002-1009. 2006.

MARTIN, P.; LEJAMBRE, L.; CLAXTON, J. The impact of refugia on the development of thiabendazole resistance in *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, v. 11, n. 1, p. 35–41, 1981.

MARTÍNEZ-VALLADARES, M.; MARTÍNEZ-PÉREZ, J. M.; ROBLES-PÉREZ, D.; CORDERO-PÉREZ, C.; FAMULARO, M. R.; FERNÁNDEZ-PATO, N.; CASTAÑÓN-ORDÓÑEZ, L.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A. The present status of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematode infections of sheep in the northwest of Spain by in vivo and in vitro techniques. *Veterinary Parasitology*, v. 191, n. 1–2, p. 177–181. 2013.

MARTINS, A. C.; BERGAMASCO, P. L. F.; FELIPPELLI, G.; TEBALDI, J. H.; MORAES, M. F. D.; TESTI, A. J. P.; LAPERA, I. M.; HOPPE, E. G. L. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep: fecal egg count reduction tests and randomized controlled trials. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 38, n. 1, p. 231. 2017.

MEDEROS, A. E.; RAMOS, Z.; BANCHERO, G. E. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. *Parasites and Vectors*, v. 7, n. 1. 2014.

MELO, A. C. F. L. Caracterização do nematóide de ovinos, *Haemonchus contortus*, resistente e sensível a anti-helmínticos benzimidazóis, no estado do Ceará, Brasil. 2005

MORGAN, E. *et al.*, Global Change and Helminth Infections in Grazing Ruminants in Europe: Impacts, Trends and Sustainable Solutions. *Agriculture*, v. 3, n. 3, p. 484–502. 2013.

MOUSSAVOU-BOUSSOUGOU, M.-N.; SILVESTRE, A.; CORTET, J.; SAUVE, C.; CABARET, J. Substitution of benzimidazole-resistant nematodes for susceptible nematodes in grazing lambs. *Parasitology*, v. 134, n. 4, p. 553–560. 2006.

MUCHIUT, S.; FIEL, C.; LIRÓN, J. P.; LLOBERAS, M.; CERIANI, C.; LORENZO, R.; RIVA, E.; BERNAT, G.; CARDOZO, P.; FERNÁNDEZ, S.; STEFFAN, P. Population replacement of benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* with susceptible strains: Evidence of changes in the resistance status. *Parasitology Research*. 2022.

MUCHIUT, S. M.; FERNÁNDEZ, A. S.; LLOBERAS, M.; STEFFAN, P. E.; LUQUE, S. E.; CARDOZO, P. A.; BERNAT, G. A.; RIVA, E.; FIEL, C. A. Recovery of fenbendazole efficacy on resistant *Haemonchus contortus* by management of parasite refugia and population replacement. *Veterinary Parasitology*, v. 271, p. 31–37. 2019.

MUCHIUT, S. M.; FERNÁNDEZ, A. S.; STEFFAN, P. E.; RIVA, E.; FIEL, C. A. Anthelmintic resistance: Management of parasite refugia for *Haemonchus contortus* through the replacement of resistant with susceptible populations. *Veterinary Parasitology*, v. 254, p. 43–48. 2018.

O'CONNOR, L. J.; KAHN, L. P.; WALKDEN-BROWN, S. W. The effects of amount, timing and distribution of simulated rainfall on the development of *Haemonchus contortus* to the infective larval stage. *Veterinary Parasitology*, v. 146, n. 1–2, p. 90–101. 2007.

RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; ÁVILA, V. S. DE; COUTINHO, G. C.; SOUZA, A. P. DE. Resistência de parasitos gastrintestinais de ovinos a alguns anti-helmínticos no estado de Santa Catarina, Brasil. *Ciência Rural*, v. 32, n. 3, p. 473–477. 2002.

SALGADO, J. A.; SANTOS, C. DE P. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 25, n. 1, p. 3–17. 2016.

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.

SANTOS, V. T., GONÇALVES, P. C. Verificação de estirpe resistente de *Haemonchus* resistente ao thiabendazole no Rio Grande do Sul (Brasil). *Revista da FZVA*; 9: 201–209. 1967

SILVA, L. S. A. DA; FRAGA, A. B.; SILVA, F. DE L. DA; GUIMARÃES BEELEN, P. M.; OLIVEIRA SILVA, R. M. DE; TONHATI, H.; BARROS, C. DA C. Growth curve in Santa Inês sheep. *Small Ruminant Research*, v. 105, n. 1–3, p. 182–185. 2012.

SISSAY, M. M.; ASEFA, A.; UGGLA, A.; WALLER, P. J. Anthelmintic resistance of nematode parasites of small ruminants in eastern Ethiopia: Exploitation of refugia to restore anthelmintic efficacy. *Veterinary Parasitology*, v. 135, n. 3–4, p. 337–346. 2006.

SOCOL, V. T.; SOTOMAIOR, C.; SOUZA, F. P.; CASTRO, E. A.; PESSÔA SILVA, M. C.; MILCZEWSKI, V. Occurrence of resistance to anthelmintics in sheep in Paraná State, Brazil. *Veterinary Record*, v. 139, n. 17, p. 421–422. 1996.

SWARNKAR, C., SINGH, D. Haematological variations in visually anaemic sheep naturally infected with *Haemonchus contortus* in farm conditions at arid Rajasthan. Indian Journal of Animal Sciences, 88, pp. 34-38. 2018.

TORRES-ACOSTA, J. F. J.; MENDOZA-DE-GIVES, P.; AGUILAR-CABALLERO, A. J.; CUÉLLAR-ORDAZ, J. A. Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. Veterinary Parasitology, v. 189, n. 1, p. 89-96. 2012.

UENO, H., GONÇALVES, P. C. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. Japan International Cooperation Agency. 1998

VAN DEN BROM, R.; MOLL, L.; KAPPERT, C.; VELLEMA, P. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. Veterinary Parasitology, v. 209, n. 3-4, p. 278-280. 2015.

VAN WYK, J. A.; VAN SCHALKWYK, P. C. A novel approach to the control of anthelmintic-resistant *Haemonchus contortus* in sheep. Veterinary Parasitology, v. 35, n. 1-2, p. 61-69. 1990.

VERÍSSIMO, C. J. *et al.*, Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. Veterinary Parasitology, v. 187, n. 1-2, p. 209-216. 2012.

CAPÍTULO II. Artigo a ser submetido à revista Veterinary Parasitology

Após as considerações da banca de defesa, o artigo será corrigido e submetido à publicação no periódico científico "Veterinary Parasitology", no formato "Original research papers".

Normas da revista:

<https://www.elsevier.com/journals/veterinary-parasitology/0304-4017/guide-for-authors>

Potential of *Haemonchus contortus* susceptible laboratory isolate to be used as a replacement for multiple anthelmintic resistant populations in sheep

Abstract

The high prevalence of anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* is threatening sheep farming. In this context, resistant populations' replacement using susceptible isolates appears to be a strategy to overcome this situation. The aim of the present study was to evaluate the *fitness* of a susceptible *H. contortus* laboratory isolate in comparison with a multiresistant field isolate. Sixteen worm-free lambs were experimentally infected with 4000 infective larvae (L3) of *H. contortus* anthelmintic-resistant field isolate (Group R, n=8) or a laboratory isolate susceptible to anthelmintics (Group S, n=8). Groups were placed in separate clean pastures, where they were kept for 19 sampling periods (266 days). Faecal egg counts (FEC) showed maximum values between 21 and 42 days post-infection (PI) and decreased over time, with no statistical differences between groups ($P>0.05$). Both isolates showed similar pathogenicity: lambs infected with both isolates showed decrease in packed cell volume and total plasma protein values in the beginning of the study coinciding with the highest FECs. Production of L3 were similar for both groups, when evaluating faecal cultures kept *in vitro* or L3 recovered from pasture samples and from faecal pats collected from the paddocks, which suggests that both isolates have the same potential of development in the environment and *in vitro*. The degree of resistance/susceptibility to thiabendazole (TIA), levamisole (LEV), monepantel (MON) and ivermectin (IVE) was evaluated using the Larval Development Assay (RESISTA-Test®) 160 days PI. The resistant isolate showed high resistance factor (RF) to TIA (141), LEV (822), MON (34) and IVE (196), while the RF of the susceptible isolate remained below three, which indicates high susceptibility to all drugs tested. The similarities between the isolates regarding biotic potential and pathogenicity, together with the demonstrated sensitivity to anthelmintics of the susceptible isolate, demonstrate that a replacing technique can be explored as an efficient strategy for sustainable parasite control in sheep.

Key words. Parasitosis; Nematodes; Parasitic Control; Anthelmintic Resistance; Refugia

1. Introduction

Haemonchus contortus is the main species that parasitize sheep abomasum in tropical regions, causing health problems due to its hematophagic behaviour that may lead to anaemia, hypoproteinaemia, edema and even death in animals without protective immune response (Gilleard, 2013; Leathwick and Besier, 2014; Amarante, 2015; Besier *et al.*, 2016; Emery *et al.*, 2016).

Compromising sheep production worldwide, anthelmintic resistance (AR) is an acquired and hereditary capacity of a parasite population to decrease its sensibility to one or more anti-helminthic drugs (Fiel *et al.*, 2001; Fissiha and Kinde, 2021). Nowadays, AR in sheep is widely distributed throughout Brazil (Salgado and Santos, 2016) and some parasites, including *H. contortus*, have shown multiple drug resistance (MDR).

As AR is now a *status quo* in sheep production, new ways to deal with this issue in a more sustainable approach have been investigated around the world. One of the methods, tested for the first time by Van Wyk and Van Schalkwyk (1990), is worm substitution, which aims to recover anthelmintic effectiveness by replacing a resistant nematode population through artificial infection with a susceptible isolate. This technique has been tested several times showing different rates of success (Bird *et al.*, 2001; Melo, 2005; Sissay *et al.*, 2006; Moussavou-Boussougou *et al.*, 2006; Fiel *et al.*, 2017; Muchiut *et al.*, 2019; George *et al.*, 2021; Muchiut *et al.*, 2022).

George *et al.* (2021) had a high rate of success when replacing a resistant *H. contortus* population with a susceptible laboratory isolate of *H. contortus* in a sheep flock. However, after using targeted selective treatments, within 1.5 years post-replacement, the population reverted to a resistant phenotype. In this case, the hypotheses for the rapid reversion to resistance suggested that the susceptible isolate had a lack of genetic diversity and was poorly adapted to the environment, being very sensitive to climate changes in natural conditions.

As new sustainable parasite control methods are highly required in sheep and in order to determine if worm replacement represents a sustainable and effective way to recover anthelmintic susceptibility in sheep, we evaluated the *fitness* of a laboratory *H. contortus* susceptible isolate under artificial and natural conditions of infection as well as its pathogenic potential in comparison with a field-resistant isolate.

2. Material and methods

The procedures involving were in accordance with international ethical standards and were approved by the School of Veterinary Medicine and Animal Science – São Paulo State University ethics committee under protocol 0132/2021.

The experiment took place between November 23th 2021 and August 16th 2022 at the experimental area of the Parasitology Sector of Institute of Biosciences – São Paulo State University (22°53'16"S e 48°29'57"W, altitude 884 m) located in the city of Botucatu, São Paulo state, Brazil, where the predominant climate is humid subtropical, characterized by warm, rainy summers and dry winters (Alvares *et al.*, 2014). The average monthly accumulated precipitation is higher (260.7 mm) in January and lower (38.2 mm) in August, with February being the hottest month and July, the coldest. The average monthly temperature ranges from 17.1 to 23.2 °C (Escobedo *et al.*, 2011).

2.1. Donor lambs and *H. contortus* isolates

Four male Ile de France donor lambs of 60 to 90 days of age and an average weight of 19.3 kg were infected with a resistant or susceptible isolate of *H. contortus* in order to obtain enough larvae to infect the experimental lambs.

On their arrival, the donor lambs were treated with a combination of levamisole phosphate (9.4 mg/kg of body weight (BW), Ripercol®, Zoetis), monepantel (2.5 mg/kg BW, Zolvix®, Elanco) and albendazole (20 mg/kg BW, Valbazen®, Zoetis) for three consecutive days (Albuquerque *et al.*, 2022). Fourteen days after the anthelmintic treatment, the Willis test was performed to confirm the *worm free* status (Ueno and Gonçalves, 1998) and afterwards each lamb (two for each isolate) was orally infected with 5500 L3 of the resistant or the susceptible *H. contortus* isolate.

The resistant field isolate was obtained by faecal cultures from samples taken from a young lamb naturally infected. Its faecal cultures yielded only *H. contortus* larvae, which were used to infect the donor lambs. The laboratory susceptible isolate was from Rio Grande do Sul State (Echevarria *et al.*, 1991) and was obtained by thawing larvae preserved in liquid nitrogen since March 2002. This isolate showed 100% sensitivity to ivermectin and levamisole treatment and 98.9%

sensitivity to albendazole (Echevarria *et al.*, 1991) and had never been exposed to monepantel.

After patency period, 21 days, fresh faeces were collected to perform faecal cultures to obtain fresh L3 to infect the experimental lambs.

2.2. Tracer lambs and paddock contamination

Infected lambs occupied the experimental paddocks until seven months before the beginning of the present study and showed <500 faecal egg counts by the time the last experiment ended (Bello *et al.*, 2022). In a recent study performed at the experimental area, Almeida *et al.* (2020) have found that GIN infective larvae may survive up to six to 12 months in the environment, depending on climate factors such as temperature and humidity. In order to track down possible paddock contamination, four female Santa Ines and Dorper tracer lambs, of 60 – 90 days of age, grazed each paddock for 84 consecutive hours before being switch to the next paddock, until completing all of them, for a total of 14 days.

After grazing period, tracer lambs were kept indoors and Willis and larvae per gram of faeces (LPG) tests (see section 2.4.2) (Ueno and Gonçalves, 1998) were performed once a week for 28 days to detect GIN infections. All Willis tests turned out negative and only three *H. contortus* larvae were identified at the last sampling period.

2.3. Experimental lambs

Thirteen Santa Ines and three Dorper x Santa Ines male lambs, with 60 to 90 days of age and average BW of 15.6 kg were submitted to the same anthelmintic treatment scheme described in section 2.1. to obtain *worm free* status before being experimentally infected orally with 4000 *H. contortus* L3.

From their arrival to 28 days after the artificial infection, the lambs were kept in concrete stalls, cleaned every day with pressurized water. During this period, the animals were fed once a day with increasing amounts of commercial feed (Coopermota®, 16.5% protein) until 2% BW was reached, and had *ad libitum* access to *Cynodon* spp. hay and tap water.

All lambs were divided into Group R (Resistant, n=8, lambs 1 – 8) and Group S (Susceptible, n=8, lambs 9 - 16), according to its weight, and orally infected with

4000 *H. contortus* infective larvae of the susceptible (laboratory) or resistant (field) isolates, respectively (**Figure 1**).

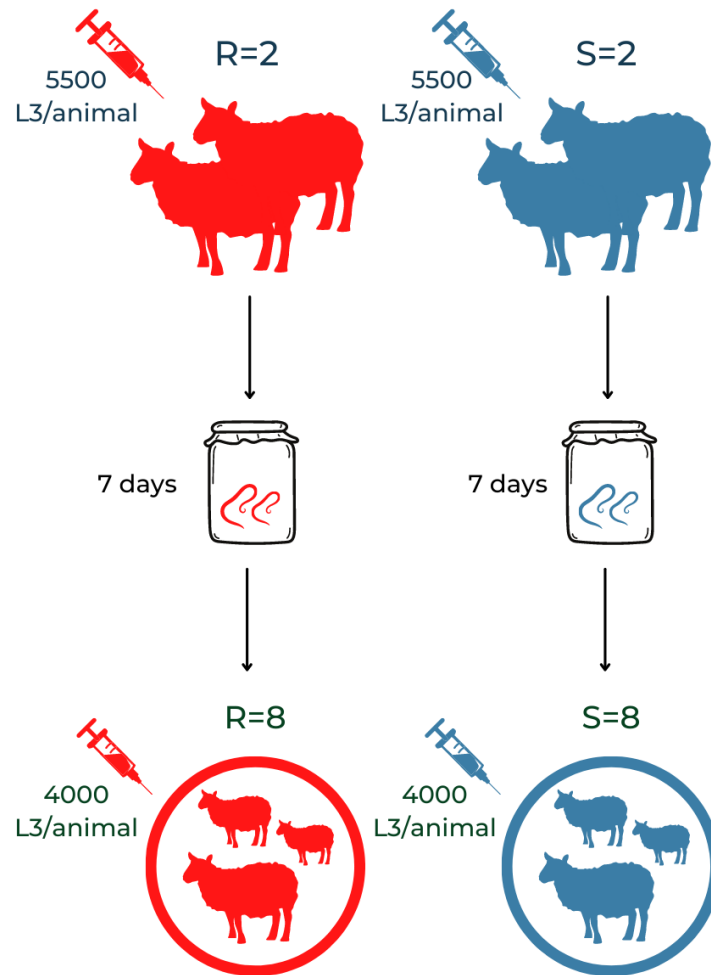


Figure 1. Infection of four donors and 16 experimental lambs with *Haemonchus contortus* larvae resistant (R-Red) or susceptible (S-Blue) to anthelmintics.

Experimental lambs were kept in pens from October 5th to November 23rd 2021 and afterwards were maintained in the experimental grazing area from days 28 to 238 PI, rotating every 28 days through two different paddocks for each group.

From day 28 to day 84 PI, the animals were fed once a day with an amount of commercial feed that corresponded to 2.5% of their BW (at the beginning with Coopermota[®]) with 16,5% of crude protein (CP), and after day 55 PI with 16% CP (ADM[®]). From days 85 PI and until the end of the experiment, the amount was adjusted to 1.5% BW, until the end of the experiment. Throughout the stay in the

paddocks, lambs had *ad libitum* access to *Urochloa decumbens* grass and clean fresh water.

Eight animals (four of each group) were removed from the experiment 154 days after the infection due to the dry season and lack of forage. We select to eliminate from the trial those animals of each group that were presenting the lowest values of FEC.

2.4. Parasitological exams

2.4.1. Faecal egg counts (FEC)

Faecal samples were collected directly from each lamb rectum every 14 days to perform FEC (Ueno and Gonçalves, 1998). As the majority of the lambs were Santa Ines, which is considered a resistant breed (Amarante, 2004; Albuquerque et al, 2019), 4 g of faeces and 56 ml of NaCl saturated solution ($d=1.2$) were used to increase the technique sensitivity (correction factor 1 egg = 50 eggs per gram).

2.4.2. Larvae per gram (LPG)

Individual faecal cultures were performed every 28 days using 3 g of fresh faeces mixed with 3 g of substrate (sterilized equine faeces). Humidity was adjusted using deionized water. Wet filter paper was placed on each Petri dish to avoid sample drying and all plates were kept on an incubator for six days. After that period, the content was filtered through gauze and poured into a goblet filled with deionized water (26°C). The filter paper was also placed inside each goblet to ensure that all L3 were retrieved. Each goblet was kept in the incubator for 24h.

The supernatant was poured and the bottom content was placed into a falcon tube for LPG determination (Ueno and Gonçalves, 1998) counting the average larvae on ten drops of 10µl each and then calculating the amount of larvae in 1ml, recovered from 3g of faeces.

Hatching percentage was calculated by multiplying the mean L3 retrieved by 100 and dividing the result by the mean FEC values.

2.4.3. Paddock contamination and free-living stages: recovery of L3 from grass and faecal pads

Fresh faeces found in the paddocks were demarcated using a total of 24 stakes (12 per group). This demarcation occurred on three occasions, covering the four

climatic seasons (spring/summer, autumn and winter). Faeces were collected 14, 28, 56 and 84 days after demarcation (i.e. 56, 70, 98, 126, 140, 154, 182, 210, 224, 238, 266 and 294 days PI). In each sampling period, three stakes were collected, from the top, middle and bottom of the paddock and both demarked faeces and adjacent forage were collected, with the latter being taken from the front and both sides of each stakes.

L3 retrieving was performed using Baermann's method (Ueno and Gonçalves, 1998), placing each grass or faecal sample on a gauze and submerging it on deionized water, poured inside a goblet. Twenty-four hours later, larvae were recovered from the bottom of the goblet, identified and counted (Ueno and Gonçalves, 1998).

As for the gauze content, it was placed on an incubator for seven days at 60°C for drying in order to weigh the samples and determine the amount of L3 per gram of dry matter (DM).

2.5. Haematological parameters

Every 14 days, 5 ml of blood was collected through jugular puncture into Vacutainer® tubes with EDTA. Packed cell volume (PCV) and total plasma proteins (TPP) were evaluated through micro centrifugation (5 min/15000 g, Fanem 211®) and manual refractometer (SPR-N, Atago®), respectively.

2.6. Larval development assay (RESISTA-Test®)

In order to assess the maintenance of resistance and susceptibility status, a larval development assay (Resista-Test®) was performed 160 days after the experimental infection. Fresh faeces from both groups were collected in plastic bags and properly identified. The eggs were immediately recovered and seeded in a 96-well plate, as described by Gainza *et al.* (2021). Several concentrations of thiabendazole (TBZ) (Sigma-Aldrich T8904), levamisole (LEV) (Sigma-Aldrich 31742), ivermectin aglycone (IVM-A) (Bioaustralis BIA-I1151) and Zolvix (ZOL) (Elanco™) were tested on each plate. After incubation the larvae (L1, L2 and L3) were counted.

2.7. Meteorological data

Temperature (maximum and minimum) and humidity data was obtained from the meteorological station of Fazenda Experimental Lageado, belonging to UNESP – Campus de Botucatu. Information regarding precipitation levels was collected daily at the experimental area (**Figures 2A and 2B**).

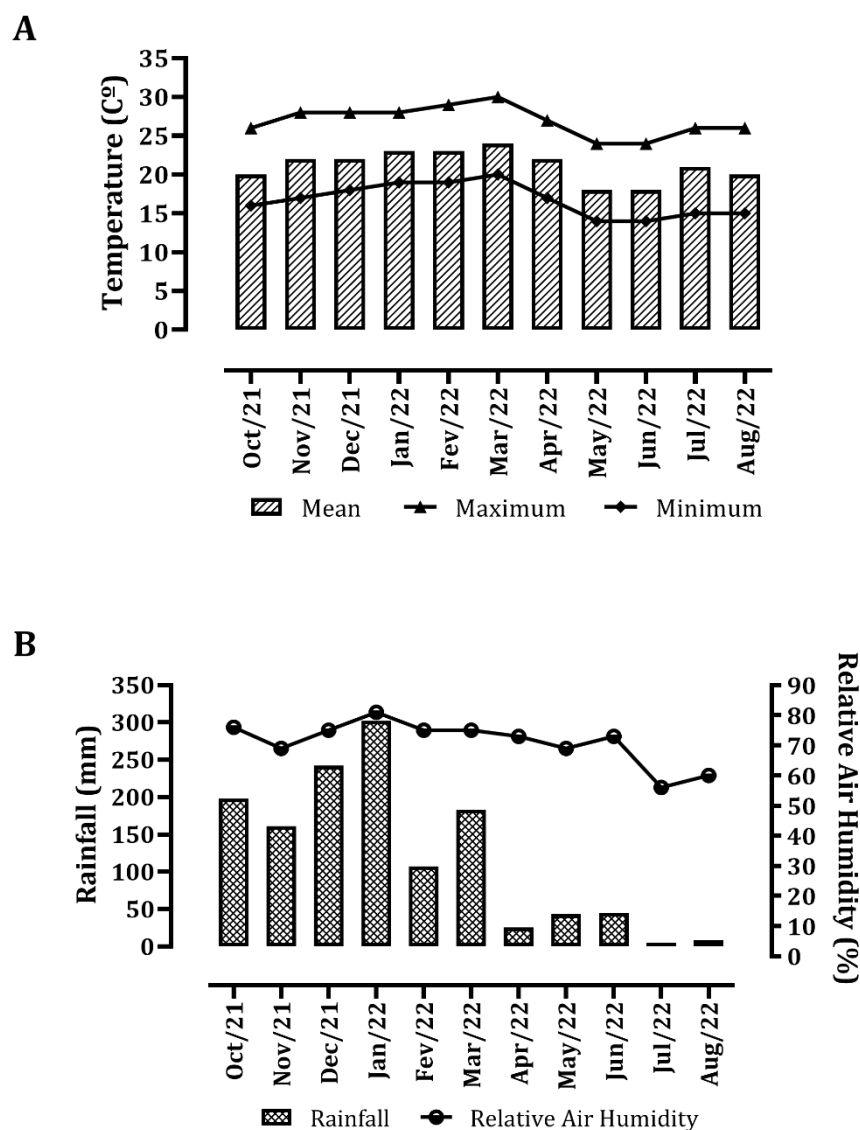


Figure 2. Average maximum, minimum and mean monthly temperatures (A), monthly rainfall and relative air humidity from October 2021 until August 2022 (B) in Botucatu, São Paulo State, Brazil.

2.8. Statistical analysis

Data were submitted to analysis of variance (ANOVA) for repeated measures at several time points using the General Linear Model (GLM) of the Statistical Analysis System (SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA). Means are presented in the results as the arithmetic means $\pm$ standard error (SE). Least Square Means were compared by Tukey's Test at the 5% significance level. Data that did not meet the normality premise (FEC, LPG) was analysed using Wilcoxon's non-parametric test (U-Mann Whitney). Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Spearman's correlation coefficients were calculated to assess the association between FEC and haematological variables (PCV and TPP).

The RESISTA-Test© results were analysed using logit dose-response by the Probit model (using the Minitab 18 Statistical Software) to determine the LC_{50} value, which represents the anthelmintic concentrations at which 50% of larval development is inhibited. The degree of parasitic resistance for each group and each anthelmintic were expressed by the resistance factor (RF), calculated as the LC_{50} values of the studied isolate (i.e. the laboratory and field isolates used to infect the lambs) divided by the LC_{50} of a known susceptible isolate, in this case the laboratory isolate from the donors lambs; RF above three demonstrate drug resistance (Dolinská *et al.*, 2013).

3. Results

3.1. Parasitological analysis

Faecal egg counts (FEC) reached the highest values between 21 and 42 days post-infection, with maximum average values of 11463 EPG and 9369 EPG in the susceptible and resistant groups, respectively. Immediately after reaching their maximum values, FEC showed a marked reduction in both groups. Then, FECs started oscillating until the end of the experiment, as new natural infections occurred among the groups (**Figure 3A**). Santa Ines lambs number 3 (group R) and 13 (group S) showed high resistance to *H. contortus* infection with no eggs detected in most of their samplings. Conversely, Dorper crossbreed lambs (lambs 2, group R and 9, group S) showed high susceptibility to the infection, with high FECs, and required several anthelmintic treatments over the experiment period (**Supplementary table 1**). In **Figure 3B**, Dorper crossbreed lambs are the lambs

with the highest overall averages in each group. FEC means showed statistical difference only at day 140 PI ($P=0.029$).

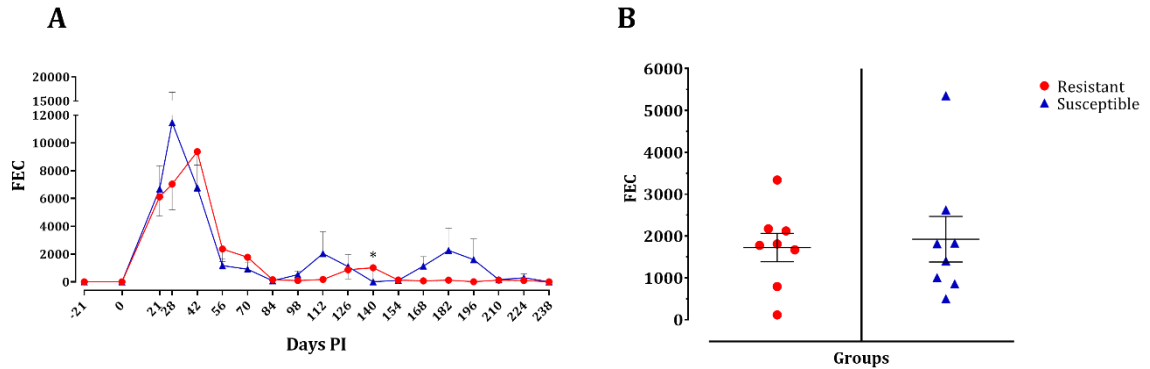


Figure 3. Sheep experimentally infected with a *Haemonchus contortus* isolate resistant (red) or susceptible (blue) to commercial anthelmintics. Mean and standard error of faecal egg counts (FEC) for each group (A) and individual cumulative FEC means (B).

In addition, LPG counts means behaved quite similar along the experiment between the groups (**Table 1**), despite some exceptions shown at day 182 PI, without causing a statistical variation. Positive correlation coefficients between FEC and LPG was found in both groups (**Supplementary figure 1**).

Table 1. Mean faecal egg counts (FEC) and larvae per gram (LPG) of lambs infected with a *Haemonchus contortus* isolate resistant or susceptible to commercial anti-helminthics (Groups R and S, respectively). Mean faecal egg counts (FEC) were performed every 14 days and larvae per gram (LPG) were calculated every 28 days, from October/21 to June/22.

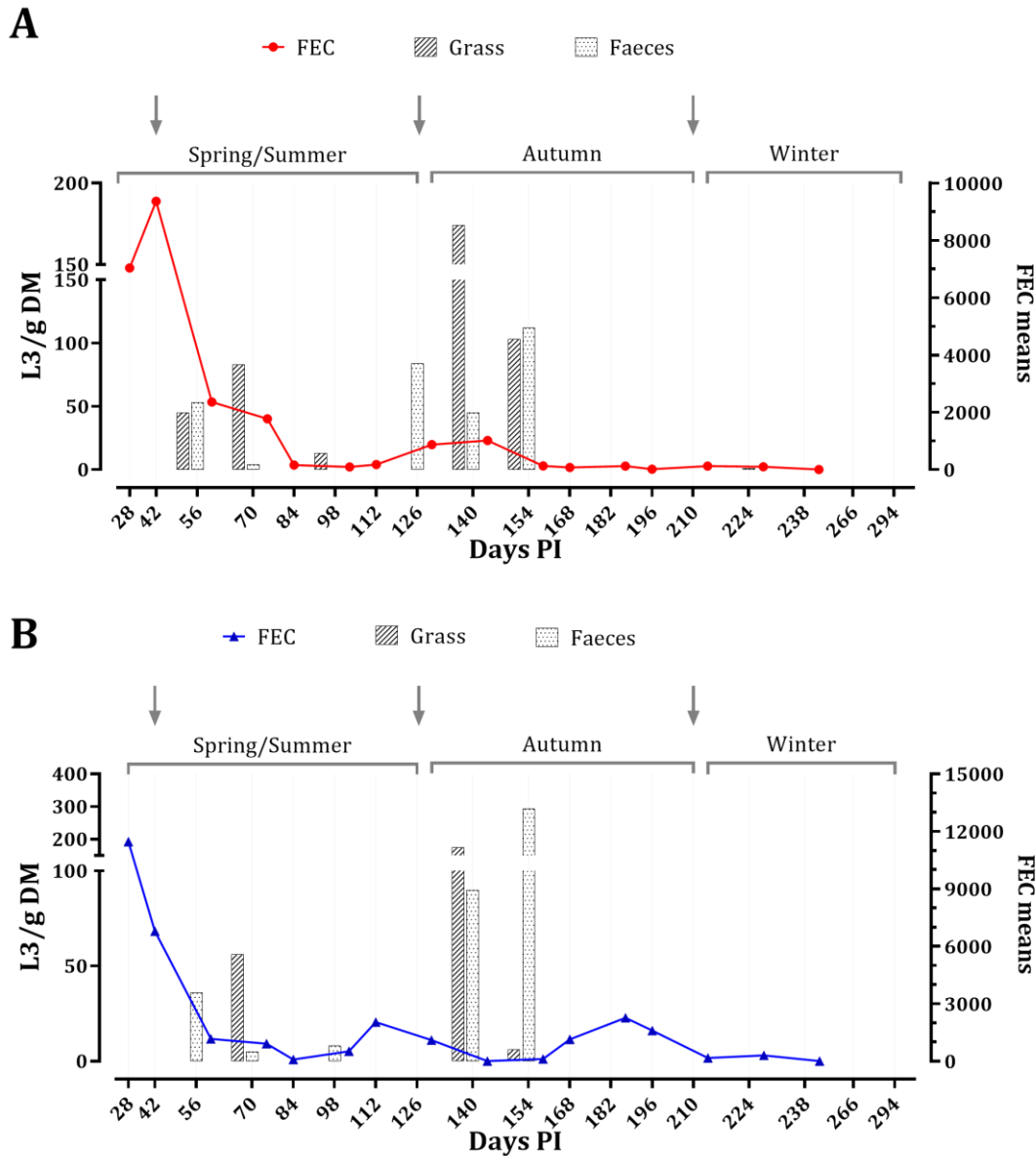
Days PI	FEC Mean±SE			LPG Mean±SE			L3 development (%)		
	Group R	Group S	P-value	Group R	Group S	P-value	Group R	Group S	P-value
-21	6±6 (0-50)	12±12 (0-100)	0.662	-	-	-	-	-	-
0	0±0 (0-0)	0±0 (0-0)	-	-	-	-	-	-	-
21	6125±1396 (0-11100)	6681±1663 (1750-15450)	0.802	-	-	-	-	-	-
28	7038±1853 (0-16100)	11463±5383 (1700-47600)	0.438	-	-	-	-	-	-
42	9369±2861 (0-24250)	6781±1636 (950-13850)	0.253	4408±1797 (0-15167)	4071±1684 (187-11667)	0.500	47%	60%	0.286
56	2363±912 (50-8400)	1169±497 (0-3950)	0.155	-	-	-	-	-	-
70	1775±1006 (0-7550)	913±463 (0-3800)	0.479	200 ±106 (0-833)	295 ±174 (0-1467)	0.320	11.3%	32.3%	0.164
84	156±112 (0-900)	81±60 (0-500)	0.454	-	-	-	-	-	-
98	94±74 (0-600)	519±263 (0-2200)	0.090	44 ±42 (0-337)	304 ±129 (0-1060)	0.055	46.8%	58.6%	0.069

112	175±141 (0-1150)	2034±1563 (0-12900)	0.099	-	-	-	-	-	-
126	875±665 (0-5400)	1100±866 (0-7100)	0.394	234 ±183 (0-1500)	352 ±202 (0-1700)	0.321	26.7%	32%	0.157
140	1019±920 (0-7450)	6±6 (0-50)	0.029	-	-	-	-	-	-
154	131±131 (0-1050)	113±69 (0-550)	0.210	37±30 (0-243)	94±70 (0-567)	0.406	28.2%	83.2%	0.117
168	75±75 (0-300)	1138±678 (50-2850)	0.073	-	-	-	-	-	-
182	125±95 (0-400)	2263±1603 (0-6800)	0.329	225 ±174 (0-733)	1884±1114 (67-4667)	0.172	180%	83.2%	0.329
196	13±13 (0-50)	1600±1486 (0-6050)	0.218	-	-	-	-	-	-
210	125±75 (0-300)	163±163 (0-650)	0.437	65 ±38 (0-133)	184±181 (0-727)	0.500	52%	113%	0.437
224	100±100 (0-400)	300±284 (0-1150)	0.318	-	-	-	-	-	-
238	0±0 (0-0)	0±0 (0-0)	0.500	2±2 (0-7)	0±0 (0-0)	0.239	200%	-	0.500

Minimum and maximum values are in parenthesis. Variables not evaluated are represented with a hyphen. There was significant group means difference when $P < 0.05$ by the U-Mann Whitney test.

L3 production = estimated percentage of eggs that gave origin to third stage larvae.

1 The highest recovery of infective larvae from faeces and forage occurred
 2 during autumn (days 140 to 210 PI) while the opposite situation occurred during
 3 spring-summer (days 28 to 126 PI). During winter (days 224 to 294), the recovery
 4 of larvae from faecal samples and adjacent forage was practically null (**Figure 4**).



5

6 **Figure 4.** Average L3/g of dry matter (DM) found in faecal samples and adjacent forage marked with
 7 stakes in paddocks grazed by lambs infected with *Haemonchus contortus* isolate resistant (A) or
 8 susceptible (B) to anthelmintics, for the three seasons evaluated. Arrows show the dates where fresh
 9 faeces were demarcated. There were no statistical differences between group means ($P > 0.05$).

3.2. Haematological parameters

PCV showed similar changes in both groups over time, with minimum values 28 days post-infection with a progressive increase in PCV and TPP as the number of FEC dropped substantially. Packed cell volume (PCV) values between the groups did not show significant differences throughout the experiment ($P=0.440$) but the time*group interaction was significant ($P=0.005$) (**Figure 5A**). When comparing total plasma proteins (TPP) values a significant difference ($P=0.006$) was found but, only at 56 days PI. There was no time*group interaction ($P=0.465$), although values varied over time ($P<0.001$) (**Figure 5B**).

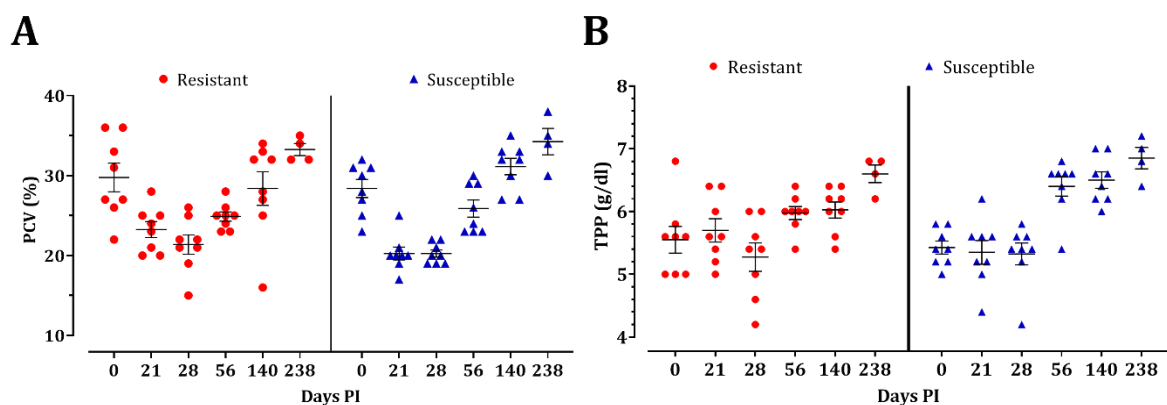


Figure 5. Means and standard error of packed cell volume (PCV) (A) and total plasma proteins (TPP) (B) obtained at days 0, 28, 56, 140 and 238 after the infection of lambs infected with isolates of *Haemonchus contortus* Susceptible or Resistant to anthelmintics. Symbols represent individual values.

Lambs that showed diminished PCV and TPP values were treated with anthelmintic to avoid mortality. The FEC reduction (FECR) was determined 14 days after each treatment (**Supplementary table 1**).

Considering the period with the highest values of EPG (21 to 84 DPI), there was negative correlation coefficients between FEC x PCV and FEC x TPP in most of the sampling periods (**Table 2**) both in the susceptible and resistant groups.

Table 2. Spearman's correlation coefficients between faecal egg counts (FEC) and the haematological variables (packed cell volume (PCV) and total plasma proteins (TPP)) for the groups infected with an isolate of *Haemonchus contortus* susceptible (Group S) and resistant (Group R) to anthelmintics.

Days PI	PCV*FEC		TPP*FEC	
	R	S	R	S
21	-0.265	-0.812	-0.023	-0.381
28	-0.727	-0.445	-0.806	-0.503
42	-0.843	-0.313	-0.635	0.184
56	-0.037	-0.835	0.338	-0.342
70	-0.240	-0.503	-0.383	0.14
84	-0.414	-0.072	-0.610	-0.183

Days PI=Days post-infection; PCV*FEC=Correlation between faecal egg counts and packed cell volume; TPP*FEC=Correlation between faecal egg counts and total plasma proteins.

3.3. Larval development assay (RESISTA-Test®)

The larval development assay confirmed with accuracy the anthelmintic resistance status of both isolates: the RF values for the susceptible isolate were below 3 and the contrary was observed for the resistant isolate with RF varying from 34 to 822 (**Table 3**).

Although all anthelmintics proved to be efficient against the susceptible isolate, thiabendazole needed higher concentrations to be able to inhibit 50% of L3 production (**Figure 6A**). The minimum doses of ivermectin tested already managed to inhibit, on average, the development of 98.5% of the L3, and the LC₅₀ was found between the logarithms -6.985 and -1.079, which is why it was not represented in **Figure 6D**.

As for the resistant group, the *H. contortus* field isolate proved to be highly resistant to all four anthelmintics tested (**Table 3**), requiring high concentrations to inhibit the development of L3, with levamisole showing the highest RF (**Figure 6B**).

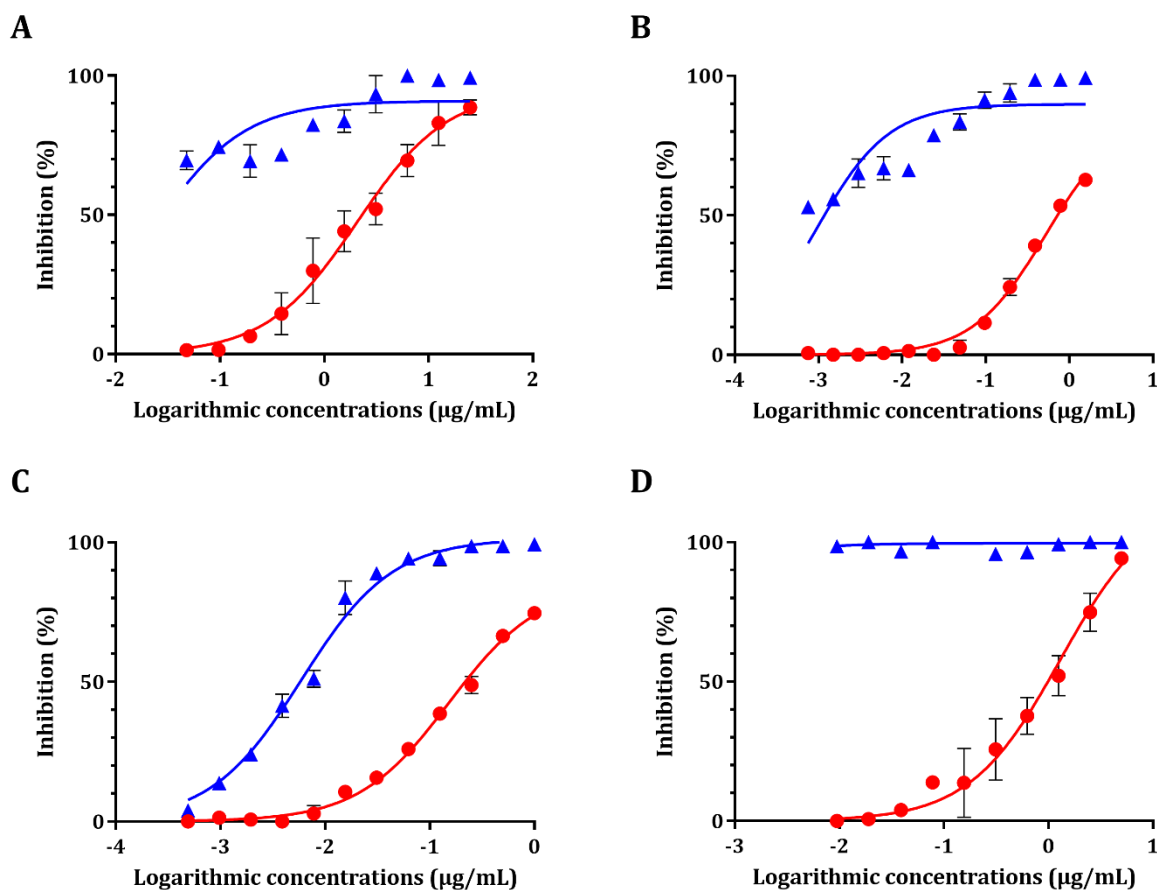


Figure 6. Logarithmic concentration used in the RESISTA-Test© of lambs experimentally infected with an isolate of *Haemonchus contortus* susceptible (blue) and resistant (red) to thiabendazole (A), levamisole (B), monepantel (C) and ivermectin (D). Results correspond to larval development assay performed in faecal samples taken 160 days after the experimental infection.

Table 3. Lethal concentration 50 (LC₅₀) and resistance factor (RF) for the anthelmintics tested by larval development test (RESISTA-Test©) using eggs taken from fresh faeces of lambs infected with an *Haemonchus contortus* isolate susceptible (S) and resistant (R) to anthelmintics, 160 days after experimental infection.

Anthelmintics	LC ₅₀ (µg/ml)		RF	
	R	S	R	S
Thiabendazole	2.072 (1.426 – 3.012)	0.023 (0.012 – 0.044)	141	0.7
Levamisole	0.521 (0.408 – 0.666)	0.0009 (0.0006 – 0.001)	822	1.1
Monepantel	0.153 (0.131 – 0.179)	0.006 (0.005 – 0.007)	34	0.9
Ivermectin	1.301 (0.813 – 2.081)	9.292e-005 (1.04e-007 – 0.083)	196	0

Confidence interval (95%) in parentheses.

RF values greater than 3 indicate resistance.

3.4. Body weight (BW)

Average BW showed no significant difference between groups ($P=0.544$) (**Supplementary figure 2**). Resistant and susceptible groups started the experiment with a mean weight of 16.1 kg and 15.8 kg and gained, on average, 42.3 kg and 37.7 kg, respectively, throughout the experiment.

4. Discussion

Although, individually, some animals showed greater difficulties to cope with the infection, FEC means of both groups were similar in all sampling periods, which demonstrate that the susceptible isolate was viable after thawing and amplification in donor lambs and was able to establish in new hosts after the experimental infection. Additionally, the susceptible isolate was perfectly capable of evolving to L3 and causing natural infections in susceptible hosts, which was proven by the

lambs reinfection after receiving treatment during the period in the field. Thus, experimental infection as a way of replacing the resistant population with a susceptible isolate is a viable option, as demonstrated by Bird *et al.*, (2001), Melo (2005) and George *et al.*, (2021), Van Wyk and Van Schalkwyk (1990), Moussavou Boussougou *et al.* (2006), Fiel *et al.* (2017) and Muchiut *et al.* (2019; 2022).

The highest FEC occurred between the 28th and 42th day PI, while PCV and TPP presented the lowest values 21-28 days after infection, coinciding with the beginning of the patent period of *H. contortus* infection (Santos *et al.*, 2014; Besier *et al.*, 2016) . At the early stage post-artificial infection, the reduction in PCV and TPP is attributable both to the blood-sucking activities of developing larvae and young adults and to a latency in the response of the host's erythropoietic system (Dargie and Allonbys, 1975).

Nutritional conditions allowed the animals to achieve the expected growth curve described for the Santa Ines breed (da Silva *et al.*, 2012), despite the heavy infection in the beginning of the trial. The amount of feed provided daily until 84 days PI, led to a quick and effective immune response (Amarante, 2004) and also provided sufficient levels of nutrients to guarantee a proper erythropoiesis, causing the remission of clinical signs (Dargie and Allonbys, 1975). This, along with the use of a more resistant breed, Santa Inês (Albuquerque *et al.*, 2019; Lins *et al.*, 2022), dismissed the need of anthelmintics to control the infection in most of the lambs.

Nevertheless, six animals (three from group R and three from group S) needed treatment with anthelmintics. Among them, animal number 2 (Group R) and animal number 9 (Group S), both crossbred with a predominantly Dorper phenotype, required more than one treatment against haemonchosis over the trial, demonstrating that these animals were more susceptible to the parasite as a consequence of racial background (Mugambi *et al.*, 1997; Starling *et al.*, 2019). The negative correlation between FEC and haematological variables showed that, regardless of the experimental group, individual susceptibility plays an important role in the development of haemonchosis clinical signs (Amarante *et al.*, 2004; Besier *et al.*, 2016, Albuquerque *et al.*, 2019, Starling *et al.*, 2019).

Two animals infected with the susceptible isolate were treated with albendazole and showed a FECR% of 90.9% and 96.9%. This observation leads to the assumption that the laboratory isolate is in severe risk to become resistant to benzimidazoles,

compromising its *status* of “susceptible isolate”, if anthelmintic treatments with this drugs are used without criteria.

The absence of differences among groups, with regards to daily weight gain and haematological variables, shows that, when using the laboratory isolate to replace a resistant population, animals won't be exposed to a more life threatening parasite than a typical field isolate.

There was no significant difference between groups when analysing the samples (faeces and herbage) taken from paddocks. Environmental conditions are an extremely important factor for survival and development of free-living stages up to L3 in the pasture (Hsu and Levine, 1977; Besier *et al.*, 2016). During autumn (days 140 to 210 PI) low solar radiation along with lower levels of precipitation, and mild temperatures, provided the ideal environment for egg and larvae development while, during spring/summer, days 28 to 126 PI, the recovery of L3 was substantially lower, even though both groups showed its maximum FEC counts. In winter, both the recovery of infective larvae and FEC means were close to zero. Also, during this season, low temperatures and drought might also have been influencing factors for the low larvae recovery, as this weather is less favourable for the development and migration of *H. contortus* (Santos *et al.*, 2012), although there are already reports of the species' adaptation to this type of weather (Morgan *et al.*, 2013; Bartley *et al.*, 2021).

Our study demonstrates that substitution through experimental infection might be effective. Additionally, the susceptible isolate was capable of developing new natural infections, suggesting that is also possible to establish replacement through donor lambs, as previously demonstrated by Van Wyk and Van Schalkwyk (1990), Moussavou-Boussougou *et al.*, (2006), Fiel *et al.*, (2017), and Muchiut *et al.*, (2019; 2022).

The replacement of the resistant population with a susceptible one associated with approaches to keep the susceptible population in *refugia* in both the pasture (Fiel *et al.*, 2001) and in the animals (Greer *et al.*, 2020), might perpetuates the effectiveness of anthelmintics in the herd. However, using a susceptible isolate to replace a resistant population, George *et al.* (2021) raised concerns about the ability and fitness of their isolate to develop in the environment, as it had been adapted to laboratory conditions through several generations. In their study the *Haemonchus*

population showed a reversal of anthelmintic resistance 1.5 years after the replacement of resistant worms by a susceptible isolate. In the present trial, the RESISTA-Test© results obtained 160 days after infection showed that the sensitivity of the susceptible isolate to the tested anthelmintics remained high. With RF close to one, the laboratory isolate not only showed the expected susceptibility to the action of anthelmintic drugs, but demonstrated that no cross contamination occurred along the experiment, also proving that is viable to introduce a susceptible isolate into a non-contaminated pasture and both isolates can co-exist successfully as long as lambs graze different paddocks. However, further studies are necessary at farm conditions in the long term to validate this approach in our environment.

5. Conclusion

Both the susceptible-laboratory isolate and the field-resistant isolate presented similar fitness. Lambs showed similar degree of infection and the infective larvae production was similar *in vitro* and in the field. Therefore, the replacement appears to be a promising strategy for sustainable parasite control and, along with responsible practices about the use of drugs, it can be a strategy for reversing the problem of anthelmintic resistance in sheep flocks.

6. References

- Albuquerque, A.C.A., Bassetto, C.C., Almeida, F.A., Hildersley, K.A., McNeilly, T.N., Britton, C., Amarante, A.F.T., 2019. Differences in immune responses to *Haemonchus contortus* infection in the susceptible Ile de France and the resistant Santa Ines sheep under different anthelmintic treatments regimens. Vet. Res. 50. 104. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0722-3>
- Albuquerque, A.C.A., Almeida, F.A., Bassetto, C.C., Lins, J.G.G., Amarante, A.F.T., 2022. Influence of breed and parasite challenge on the immune response to naturally acquired intestinal nematode infection in sheep. J. Helminthol. 96. 27. <https://doi.org/10.1017/s0022149x21000821>
- Almeida, F.A., Albuquerque, A.C.A., Bassetto, C.C., Starling, R.Z.C., Lins, J.G.G., Amarante, A.F.T., 2020. Long spelling periods are required for pasture to become

free of contamination by infective larvae of *Haemonchus contortus* in a humid subtropical climate of São Paulo state, Brazil. Vet. Parasitol. 279. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109060>

Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., de Moraes Gonçalves, J.L., Sparovek, G., 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. Meteorol. Zeitschrift. 22(6). 711–728. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>

Amarante, A.F.T., 2015. Os parasitas de ovinos (pp. 13–99). Ed. Unesp. <https://doi.org/10.7476/9788568334423>

Bartley D.J., Andrews L., Melville L., McBean D., Skuce P., Morrison A.A., 2021. Integrating applied parasitological and molecular epidemiological methodologies to investigate the capacity of *Haemonchus contortus* to over-winter on pasture in Scotland. Vet. Rec. 137. <https://doi.org/10.1002/vetr.137>

Besier, R.B., Kahn, L.P., Sargison, N.D., Van Wyk, J.A., 2016. The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. In R. B. Gasser and G. Von Samson-Himmelstjerna (Eds.), *Haemonchus contortus* and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends. Academic Press. pp. 95–143. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.022>

Bird, J., Shulaw, W.P., Pope, W.F., Bremer, C.A., 2001. Control of anthelmintic resistant endoparasites in a commercial sheep flock through parasite community replacement. Vet. Parasitol. 97(3). 221–227. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00406-x](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00406-x)

da Silva, L.S.A., Fraga, A.B., da Silva, F.L., Guimarães Belen, P.M., de Oliveira Silva, R.M., Tonhati, H., Barros, C.C., 2012. Growth curve in Santa Inês sheep. Small Rum. Res. 105(1–3). 182–185. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.11.024>

Dargie J.D., Allonby E.W., 1975. Pathophysiology of Single and Challenge Infections of *Haemonchus contortus* in Merino Sheep: Studies on Red Cell Kinetics and the “Self-Cure” Phenomenon. Int. J. Parasitol. 5. 147–157. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(75\)90021-1](https://doi.org/10.1016/0020-7519(75)90021-1)

Dolinská, M., Königová, A., Letková, V., Molnár, L., Várady, M., 2013. Detection of ivermectin resistance by a larval development test-back to the past or a step forward? *Vet. Parasitol.* 198. 154-158.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.043>

Echevarria, F.A.M., Armour, J.L., Duncan, J.L., 1991. Efficacy of some anthelmintics on an ivermectin-resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. Parasitol.* 39(3-4). 279-284. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(91\)90044-v](https://doi.org/10.1016/0304-4017(91)90044-v)

Escobedo, J.F., Gomes, E.N., Oliveira, A.P., Soares, J., 2011. Ratios of UV, PAR and NIR components to global solar radiation measured at Botucatu site in Brazil. *Renew. Energy.* 36(1). 169-178. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2010.06.018>

Fiel, C., Anziani, O., Suárez, V., Vázquez, R., Eddi, C., Romero, J., Steffan, P., 2001. Resistencia antihelmíntica en bovinos: causas, diagnóstico y profilaxis. *Vet. Arg.* 171. 21-33.

Fiel, C.A., Steffan, P.E., Muchiut, S.M., Fernández, A.S., Bernat, G., Riva, E., Lloberas, M. M., Almada, A., Homer, D., 2017. An attempt to replace an ivermectin-resistant *Cooperia* spp. population by a susceptible one on grazing pastures based on epidemiological principles and refugia management. *Vet. Parasitol.* 246. 53-59.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.08.026>

Gainza, Y.A., Santos, I.B. dos, Figueiredo, A., Santos, L.A.L. dos, Esteves, S.N., Barioni-Junior, W., Minho, A.P., Chagas, A.C.S., 2021. Anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* from sheep flocks in Brazil: Concordance of in vivo and in vitro (RESISTA-Test©) methods. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 30(2). <https://doi.org/10.1590/s1984-296120201093>

Gainza Y.A., Santos, I. B. Dos, Figueiredo, A., Amarante, A.F.T., Esteves, S.N., Barioni-Junior, W., Chagas, A.C.S., 2020. Improvement of an in vitro test for *Haemonchus contortus* resistance diagnosis in small ruminant (RESISTA-Test©). *Boletim de pesquisa e desenvolvimento, São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste.*

George, M.M., Vatta, A.F., Howell, S.B., Storey, B.E., McCoy, C.J., Wolstenholme, A.J., Redman, E.M., Gilleard, J.S., Kaplan, R.M., 2021. Evaluation of changes in drug susceptibility and population genetic structure in *Haemonchus contortus* following

worm replacement as a means to reverse the impact of multiple-anthelmintic resistance on a sheep farm. *Int. J. Parasitol.: Drugs Drug Resist.* 15. 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.02.004>

Gilleard, J.S., 2013. *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. *Parasitol.* 140(12). 1506–1522. <https://doi.org/10.1017/s0031182013001145>

Greer, A.W., Van Wyk, J.A., Hamie, J.C., Byaruhanga, C., Kenyon, F., 2020. Refugia-Based strategies for parasite control in livestock. *Vet. Clin. N. Am. - Food Anim. Pract.* 36(1). 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.11.003>

Hsu, C.K., and Levine, N.D., 1977. Degree-day concept in development of infective larvae of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* under constant and cyclic conditions. *Am. J. Vet. Res.* 38(8). 1115–1119.

Leathwick, D.M., Besier, R.B., 2014. The management of anthelmintic resistance in grazing ruminants in Australasia—Strategies and experiences. *Vet. Parasitol.* 204(1–2). 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.022>

Lins, J.G.G., Almeida, F.A., Albuquerque, A.C.A., Britton, C., Amarante, A.F.T., 2022. Early-onset immune response to *Haemonchus contortus* infection in resistant Santa Ines suckling lambs compared with susceptible Ile de France. *Vet. Parasitol.* 307–308. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109734>

Melo, A.C.F.L., 2005. Caracterização do nematóide de ovinos, *Haemonchus contortus*, resistente e sensível a anti-helmínticos benzimidazóis, no estado do Ceará, Brasil. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/914000>

Morgan, E.R., Charlier, J., Hendrickx, G., Biggeri, A., Catalan, D., Von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Müller, E., Van Dijk, J., Kenyon, F., Skuce, P., Höglund, J., O’Kiely, P., Van Ranst, B., De Waal, T., Rinaldi, L., Cringoli, G., Hertzberg, H., Torgerson, P., Wolstenholme, A., Vercruysse, J., 2013. Global Change and Helminth Infections in Grazing Ruminants in Europe: Impacts, Trends and Sustainable Solutions. *Agriculture.* 3. 484–502. <https://doi.org/10.3390/agriculture3030484>

Moussavou-Boussougou, M.N., Silvestre, A., Cortet, J., Sauve, C., Cabaret, J., 2006. Substitution of benzimidazole-resistant nematodes for susceptible nematodes in grazing lambs. *Parasitol.* 134(4). 553–560.

<https://doi.org/10.1017/s0031182006001697>

Muchiut, S.M., Fernández, A.S., Lloberas, M., Steffan, P.E., Luque, S.E., Cardozo, P.A., Bernat, G.A., Riva, E., and Fiel, C.A., 2019. Recovery of fenbendazole efficacy on resistant *Haemonchus contortus* by management of parasite refugia and population replacement. *Vet. Parasitol.* 271. 31–37.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.06.003>

Muchiut, S.M., Fernández, A.S., Steffan, P.E., Riva, E., Fiel, C.A., 2018. Anthelmintic resistance: Management of parasite refugia for *Haemonchus contortus* through the replacement of resistant with susceptible populations. *Vet. Parasitol.* 254. 43–48.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.004>

Muchiut, S., Fiel, C., Lirón, J.P., Lloberas, M., Ceriani, C., Lorenzo, R., Riva, E., Bernat, G., Cardozo, P., Fernández, S., Steffan, P., 2022. Population replacement of benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* with susceptible strains: Evidence of changes in the resistance status. *Parasitol. Res.* <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07582-9>

Mugambi, J.M., Bain, R.K., Wanyangu, S.W., Ihiga, M.A., Duncan, J.L., Murray, M., Stear, M. J., 1997. Resistance of four sheep breeds to natural and subsequent artificial *Haemonchus contortus* infection. *Vet. Parasitol.* 69(3–4). 265–273.

[https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(96\)01128-4](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(96)01128-4)

Salgado, J.A., Santos, C.P., 2016. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 25(1). 3–17. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612016008>

Santos, M.C., Silva, B.F., Amarante, A.F.T., 2012. Environmental factors influencing the transmission of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 188(3–4) 277–284.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.056>

Santos, M.C., Xavier, J.K., Amarante, M.R.V., Bassetto, C.C., Amarante, A.F.T., 2014. Immune response to *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* in sheep and its

role on parasite specificity. Vet. Parasitol. 203 (1-2). 127-138.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.048>

Sissay, M.M., Asefa, A., Ugglä, A., Waller, P.J., 2006. Anthelmintic resistance of nematode parasites of small ruminants in eastern Ethiopia: Exploitation of refugia to restore anthelmintic efficacy. Vet. Parasitol. 135(3-4). 337-346.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.09.005>

Starling, R.Z.C., Almeida, F.A., Viana, M.V.G., Castilhos, A.M., Amarante, A.F.T., 2019. Losses caused by gastrointestinal nematode infections in Dorper lambs under two nutritional status. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 28(4) 652-660.
<https://doi.org/10.1590/s1984-29612019084>

Taylor, E.L., 1939. Technique for the estimation of pasture infestation by strongyloid larvae. Parasitol. 31. 473-478.

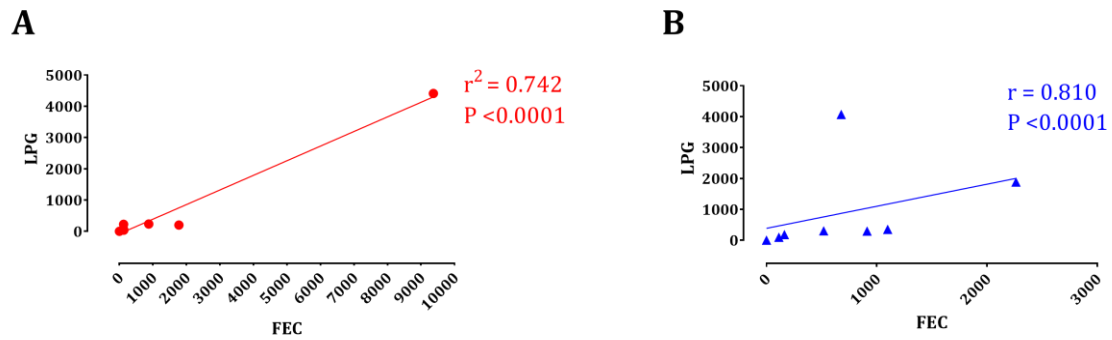
Ueno, H., Gonçalves, P.C., 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. Japan International Cooperation Agency.

Van Wyk, J.A., Van Schalkwyk, P.C., 1990. A novel approach to the control of anthelmintic-resistant *Haemonchus contortus* in sheep. Vet. Parasitol. 35(1-2). 61-69. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(90\)90116-s](https://doi.org/10.1016/0304-4017(90)90116-s)

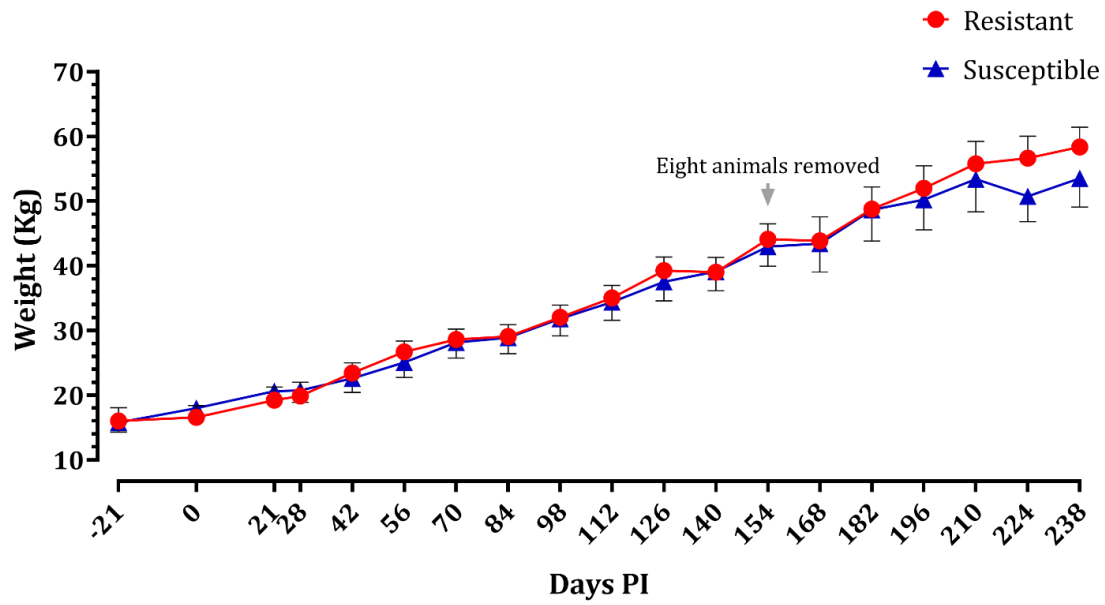
Supplementary table 1. Faecal egg count (FEC) and haematological variables that justified anthelmintic treatments among the experimental lambs.

Days PI	Lamb	Group	FEC-BT	PCV (%)	TPP (g/dl)	Drug	FEC-AT	FECR%
29	9	S	47600	19	4.2	A	4350	90.9%
37	10	S	19150	13	4.8	A	600	96.9%
42	2	R	24250	18	4.2	M, A, L	400	98.3%
70	1	R	7550	15	5.0	M, A, L	50	99.3%
84	2	R	900	13	5.0	M, A, L	50	94.4%
112	9	S	12900	19	4.6	M	0	100%
140	2	R	7450	16	6.0	M, A, L	1050	85.9%

Days PI=Days after infection; FEC-BT=Fecal egg count before treatment; FEC-AT= Fecal egg count after treatment; FECR%=Fecal egg count reduction percentage 14 days post-treatment. A=Albendazole; M=Monepantel; L=Levamisole



Supplementary figure 1. Spearman's correlation between Faecal Egg Count means (FEC) and Larvae Per Gram of Faeces (LPG) means of the groups infected with an *Haemonchus contortus* isolate resistant (A, Group R, red) and susceptible (B, Group S, blue) to anthelmintics in each of the sampling periods.



Supplementary figure 2. Body weight means and standard error of the lambs infected with a *Haemonchus contortus* isolate susceptible (group Susceptible) and resistant (group Resistant) to anthelmintics. There was no significant difference between groups ($P > 0.05$).

CAPÍTULO III. Considerações finais

A situação da RA no Brasil é crítica e compromete severamente o crescimento da produção ovina, afetando a economia regional e o desenvolvimento humano. Neste cenário, a implementação de estratégias que contribuam para a reversão da RA se tornam necessárias e as pesquisas em torno ao controle parasitário sustentável são essenciais.

Em linhas gerais, este estudo apresentou resultados similares com as pesquisas desenvolvidas por outros autores e trouxe, pela primeira vez, dados sobre a possibilidade de efetuar a substituição de uma população resistente por um isolado suscetível em climas subtropicais úmidos.

Os resultados deste experimento são altamente satisfatórios, demonstrando não somente que o isolado avaliado possui potencial biótico favorável para ser utilizado como um substituto de *H. contortus* resistentes, mas também que é capaz de se comportar de forma similar com o isolado resistente em termos de estabelecimento da infecção, desenvolvimento in vivo e in vitro e capacidade de produzir sinais clínicos.

O isolado utilizado é capaz de gerar a infecção nos animais tanto de forma experimental quanto em condições naturais, sendo possível fazer a substituição tanto por infecção via oral de animais *worm free* como por meio da contaminação de pastagens limpas com o uso de animais doadores infectados.

Uma vez estabelecida a infecção, e com o intuito de perpetuar a eficácia dos anti-helmínticos no rebanho, recomenda-se a aplicação criteriosa de tratamentos seletivos apenas em animais altamente parasitados, que apresentem anemia e outros sinais clínicos de haemoncose, e que estes sejam imediatamente eliminados do rebanho, pois os vermes remanescentes após o tratamento podem contribuir para o rápido reaparecimento da resistência anti-helmíntica.

Recomenda-se também o uso de raças mais resistentes e a seleção dos indivíduos com melhor resposta imunológica como reprodutores