

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/09/2024.

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 anthelmintics (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 <i>Veterinary Parasitology</i></i>	21
<i>Potential of <i>Haemonchus contortus</i> susceptible laboratory isolate to be used as a replacement for multiple anthelmintic resistant populations in sheep</i>	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.

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