

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 21/02/2019.

Interações entre as infecções por *Haemonchus* *contortus* e *Haemonchus placei* em ovinos

Michelle Cardoso dos Santos

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área
de concentração Biologia de Parasitas e
Microorganismos.

Prof. Titular Alessandro Francisco Talamini do Amarante
Orientador

BOTUCATU - SP

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Interações entre as infecções por *Haemonchus*
contortus e *Haemonchus placei* em ovinos

Michelle Cardoso dos Santos

Prof. Titular Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante
Orientador
Profa. Dra. Mônica Regina Vendrame Amarante
Co-orientadora

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Microorganismos.

Prof. Titular Alessandro Francisco Talamini do Amarante
Orientador

BOTUCATU - SP

2017

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

Santos, Michelle Cardoso dos.

Interações entre as infecções por *Haemonchus contortus* e *Haemonchus placei* em ovinos / Michelle Cardoso dos Santos.
- Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Alessandro Francisco Talamini do Amarante
Coorientador: Mônica Regina Vendrame Amarante
Capes: 21302022

1. Ovino - Doenças. 2. Biologia molecular. 3. *Haemonchus contortus*. 4. Nematoides. 5. Sistema gastrointestinal - Infecção.

Palavras-chave: Biologia molecular; Híbridos; Nematódeos gastrintestinais; Ruminantes.

Dedica

Aos meus pais, Laércio Lima dos Santos e Ivone Cardoso dos Santos e ao
meu noivo César Trevisanuto pelo incentivo, compreensão e amor.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por todas as conquistas na minha vida, por iluminar e abençoar os meus caminhos.

A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e a Fapesp (Fundação pelo Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa de doutorado no país (processo número 2012/23941-2), bolsa estágio de pesquisa no exterior - BEPE (processo número 2015/12900-1) e auxílio à pesquisa (processo número 2014/02305-6) concedidos para a realização deste trabalho.

Aos meus pais Laércio L. Santos e Ivone C. Santos e meu noivo César Trevisanuto pela compreensão e pela ajuda no cuidado com o meu experimento. Obrigada pelo incentivo, carinho e amor.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alessandro F. T. Amarante e a minha coorientadora Profa. Dra. Mônica R.V. Amarante. Sou grata pela oportunidade do meu primeiro estágio no laboratório do Prof. Alessandro em 2007. Muito obrigada pela orientação, confiança, paciência e dedicação durante a minha iniciação científica, mestrado e doutorado.

A todos os animais utilizados no estudo, os quais sempre terão meu respeito e gratidão.

Aos senhores Renato Simões e João Fogaça pelo serviço prestado.

A todos do Laboratório de Helminologia Veterinária os quais tive a oportunidade de conviver e que contribuíram na realização do experimento: Adriana M. D. Anaya, Ana Cláudia A. Albuquerque, César C. Bassetto, Fabiana A. Almeida, Gabriela F. Caetano, José H. Neves, Lucca B. Nápoli, Marina L.S.T. Piza, Marina A. Cyrino, Marina S.G. Frontana, Nadino Carvalho, Natália B. Pinto e Renan Z. C. Starling.

A oportunidade de realização do estágio de doutorado na University of Calgary, Calgary, Alberta, Canadá. Agradeço a todos os professores e pós-graduandos do programa em Host-Parasites-Interaction, aos pós-graduandos e pós-doutorandos orientados dos Professores John S. Gilleard e James Wasmuth e aos técnicos do laboratório. Agradeço em especial ao meu supervisor durante o estágio Prof. Dr. John S. Gilleard pela oportunidade, paciência,

aprendizado e sua preocupação e de sua esposa Mary Gilleard em fazer todos os alunos estrangeiros se sentirem acolhidos.

A todos do Departamento de Parasitologia, em especial aos funcionários Alessandra Ragozo, Olga Demant, Roberto Gonzales e Valdir Paniguel.

Aos professores e pesquisadores: Ary F. Junior, Lúcia H. O'Dwyer, Luciene M. M. Serra, Elizabeth M. S. Schmidt, Simone C. M. Niciura, Reinaldo J. Silva e Estevam G. L. Hoppe por prontamente aceitarem a serem membros de minha banca de qualificação e defesa.

As minhas amigas Natália G. Freitas, Karine S. Machado, Maria Regina L. Silva, Bruna P. Santos e Mariana S. Dias.

Aos amigos que fiz e tive a sorte em conviver durante o período que morei no Canadá, Samatha E. Leonard, Olivia Ustienny, Andreia Smith, Remedios Visedo, Camilla L. Madsen, Camila Meira, Thiago V. Oliveira, Paloma Araújo, Ana Paula Monteiro. Agradeço em especial as minhas irmãs de coração Camilla M. Carvalho, Giovanna C. Pegoretti, Camila A. A. Queiroz e Luciana A. Terra. Vocês foram essenciais nesse período e viver em Calgary não seria a mesma coisa sem vocês.

A todos que não foram citados e, que de alguma forma, contribuíram na realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Sumário

	Página
Resumo	01
Abstract.....	03
Revisão de literatura	05
1. Considerações iniciais	06
2. Gênero <i>Haemonchus</i>	07
2.1. Produção de híbridos	08
2.2. Caracterização de <i>Haemonchus contortus</i> e <i>Haemonchus placei</i>	09
2.2.1. Morfologia	09
2.2.2. Diagnóstico molecular	10
2.2.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	11
2.2.4. Marcadores moleculares	12
3. Drogas e resistência aos anti-helmínticos.....	12
3.1. Benzimidazóis	14
3.1.1. Resistência aos benzimidazóis.....	15
3.2. Imidatiazóis	16
3.2.1. Resistência aos imidatiazóis	16
3.3. Lactonas macrocíclicas (ivermectina)	17
3.3.1. Resistência as lactonas macrocíclicas (ivermectina)	17
4. Considerações	18
5. Referências bibliográficas	18
Capítulo 1	26
A panel of microsatellite markers to discriminate and study interactions between <i>Haemonchus contortus</i> and <i>Haemonchus placei</i>	27
Capítulo 2	37
Establishment of coinfection and hybridization of <i>Haemonchus contortus</i> and <i>Haemonchus placei</i> laboratory isolate in sheep	38
Abstract.....	38
1. Introduction.....	39
2. Material and Methods	40

2.1. Laboratory analyses	42
2.2. Statistical analyses	44
3. Results.....	44
3.1. Fecal egg counts (FEC)	44
3.2. Sheath tail length of infective larvae	44
3.3. Worm burden	45
3.4. Morphological and molecular analysis of the adult worms.....	46
4. Discussion.....	47
5. References.....	50
Capítulo 3	64
Hybrids production from sheep artificially infected with <i>Haemonchus placei</i> and <i>Haemonchus contortus</i> with later disappearance of <i>Haemonchus</i>	65
Abstract.....	65
1. Introduction	66
2. Material and Methods.....	67
2.1. Experimental design	68
2.2. Laboratorial analyses.....	70
2.3. Statistical analyses.....	72
3. Results.....	72
3.1 Fecal and blood evaluations.....	72
3.2. Sheath tail length of infective larvae	73
3.3. Worm burden, morphological and molecular evaluation of <i>Haemonchus</i> specimens	74
4. Discussion.....	75
5. References.....	78
Capítulo 4	97
Molecular evaluation of levamisole resistance in <i>Haemonchus contortus</i> and <i>Haemonchus placei</i> laboratory isolates.....	98
Abstract.....	98
1. Introduction	99
2. Material and Methods.....	99
2.1. Experimental design	100
2.2. Molecular evaluation of levamisole resistance.....	101

3. Results	102
4. Discussion.....	102
5. References	105
Capítulo 4	111

Resumo

Dois experimentos foram realizados no período de 2013 a 2015, em cordeiros da raça Suffolk, com objetivo de avaliar a dinâmica da infecção mista por *Haemonchus contortus* e *Haemonchus placei* em ovinos, bem como a competição e o cruzamento interespecífico com a formação de híbridos. Um cordeiro doador, livre de infecções helmínticas, recebeu infecção artificial oral única com 25.000 larvas infectantes (L3) de *H. contortus*, isolado de laboratório SpHco2, com múltipla resistência aos anti-helmínticos, enquanto um bezerro doador foi infectado via oral, em dose única, com 25.000 L3 de *H. placei*, isolado de laboratório SpHpl1, susceptível à ação do levamisol. No primeiro experimento, realizado no ano de 2013, cordeiros mantidos confinados e livres de infecções helmínticas foram inicialmente infectados com 2.000 L3 de *H. placei* no dia zero e 11 dias depois, os mesmos animais receberam 2.000 L3 de *H. contortus* (grupo parental, n=6). Coproculturas individuais dos animais do grupo parental foram utilizadas para a produção de L3, as quais foram destinadas à infecção dos animais dos grupos F1 (primeira geração filial), grupos F1-42 DPI (n=6) e F1-84 DPI (n=6), o que permitiu avaliar a produção de híbridos. Todos os animais pertencentes aos grupos: parental, F1-42 DPI e F1-84 DPI, foram eutanasiados aos 50, 42 e 84 dias pós-infecção (DPI), respectivamente, para a identificação e quantificação dos parasitas, a fim de determinar a competição interespecífica e a hibridização. Seis animais, não infectados, foram mantidos como grupo controle. No segundo experimento, desenvolvido no período de 2014 e 2015, cordeiros livres de infecções helmínticas foram infectados com 4.000 L3 de *H. placei* (n=16) ou com 4.000 L3 de *H. contortus* (n=16). Os animais foram inicialmente mantidos estabulados, para verificar o estabelecimento das infecções e depois foram alocados nas mesmas pastagens, as quais foram compartilhadas durante 357 dias. Para avaliar a evolução da infecção, dois cordeiros, de cada grupo experimental, foram eutanasiados em Fevereiro de 2014 e as eutanásias posteriores ocorreram a cada três meses, contendo três cordeiros por grupo experimental, com exceção da última eutanásia, em Fevereiro de 2015, na qual os cinco animais remanescentes de cada grupo foram eutanasiados. Animais traçadores, livres de infecções parasitárias, foram colocados na pastagem a cada três meses para avaliação da contaminação da pastagem e das espécies de nematódeos presentes. Em ambos os estudos, os animais eram pesados e nesse mesmo dia amostras de sangue e fezes eram coletadas para as análises laboratoriais. Nos dois estudos os animais foram eutanasiados para a recuperação e identificação dos parasitas. No primeiro experimento, em confinamento, houve estabelecimento da infecção por ambas as espécies, com elevadas contagens de ovos por grama de fezes (OPG). Os parasitas recuperados foram identificados morfolologicamente e

molecularmente, comprovando o sucesso da infecção. As reações em cadeia da polimerase (PCR) com os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) espécies-específicos demonstraram a presença de *H. contortus* e *H. placei* em todos os grupos experimentais (grupo parental, F1-42 DPI e F1-84 DPI) e de oito híbridos (3,6% do total de parasitas avaliados), os quais foram recuperados dos grupos F1-42 DPI e F1-84 DPI. No segundo experimento também houve estabelecimento da infecção por ambas as espécies, com elevadas contagens de OPG e redução do volume globular nas coletas iniciais. As medidas das L3, bem como as análises morfológicas e moleculares de exemplares adultos, dos animais experimentais e traçadores demonstraram a eliminação da infecção por *H. placei* ao longo do tempo. Dois helmintos foram classificados como híbridos com a utilização dos mesmos *primers* espécies-específicos. No último estudo realizado, avaliou-se a mutação no gene da resistência ao levamisol por PCR convencional. Os primers utilizados propiciaram amplificação apenas das amostras oriundas de *H. contortus*. De 20 exemplares adultos de *H. contortus* provenientes do cordeiro doador, 85% (n=17) mostraram-se homozigotos resistentes e 15% (n=3), heterozigotos. Dos animais experimentais descritos no experimento 1, foram avaliados 126 exemplares de *H. contortus*, dos quais 97,6% (n=123) foram classificados como homozigotos resistentes e 2,4% (n=3) como heterozigotos. Em conclusão, demonstramos que ocorreu o estabelecimento de infecções mistas por *H. contortus* e *H. placei* em ovinos e, o acasalamento interespecífico pode resultar em descendentes híbridos. Contudo, quando ovinos infectados com *H. contortus* ou *H. placei* compartilharam as mesmas pastagens a competição interespecífica promoveu a extinção de *H. placei* (parasita oriundo de bovinos), com a permanência no rebanho apenas da população de *H. contortus*, espécie que possui os ovinos como hospedeiro preferencial. Em adição, os pares de primers de resistência ao levamisol não apresentaram bandas de amplificação com as amostras de DNA de exemplares de *H. placei*, contudo, o isolado de laboratório SpHco2 (*H. contortus*) apresentou resistência ao levamisol.

Abstract

Two trials were performed from 2013 until 2015 in Suffolk sheep breed, these studies aimed to evaluate the dynamics of mixed infection by *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* in sheep, as well as interspecific competition and mating with the hybrid production. Initially, one worm-free donor lamb received orally, in a single dose, artificial infection with 25,000 infective larvae (L3) of *H. contortus*, laboratory isolate SpHco2, while the donor calf was infected orally, in a single dose, with 25,000 of *H. placei*, laboratory isolate SpHpl1. In the first trial, performed in 2013, worm-free lambs kept indoors received initially 2,000 L3 of *H. placei* on day zero and, 11 days later the same animals were infected with 2,000 L3 of *H. contortus* (parental group, n=6). Individual fecal cultures from parental animals were performed and were used to L3 production, which was used to the infection of the animals from F1 group (first filial generation), groups F1-42 DPI (n=6) and F1-84 DPI (n=6), which allowed the hybrid production. All animals from groups: parental, F1-42 DPI and F1-84 DPI were euthanized 50, 42 and 84 days post-infection (DPI), respectively, for the identification and quantification of the parasites in order to determine the interspecific competition and hybridization. Six animals remained as a non-infected control. On the second trial, developed in 2014 and 2015, worm-free lambs were infected with 4,000 L3 of *H. placei* (n=16) or 4,000 L3 of *H. contortus* (n=16). These animals were initially kept indoors to confirm the establishment of the infections and then the animals were allocated to the same pastures, which were shared for 357 days. To evaluate the progression of the infection, two animals for each experimental group were euthanized in February 2014 and the subsequent euthanasia occurred every three months, with three animals from each experimental group, except on the last euthanasia, in February 2015 in which the remaining five animals from each group were euthanized. Worm-free tracer animals were introduced in the pasture every three months to evaluate the pasture contamination and nematode species present. In both studies, the animals were weighed and blood and feces samples were collected on the same day to laboratory analysis. In both trials, the animals were euthanized for the parasites recovery and identification. In the first trial, in the feedlot, there was observed the establishment of the infection for both species, with high fecal egg counts (FEC). The parasites recovered were identified by morphological and molecular techniques, proving the success of the infection. Polymerase chain reaction (PCR) reactions with the oligonucleotide (primers) species-specific showed the presence of *H. contortus* and *H. placei* in all experimental groups (groups parental, F1-42 DPI and F1-84 DPI) and eight hybrids (3.6% of the total of parasites

evaluated), which were recovered from F1-42 DPI and F1-84 DPI groups. In the second trial, there was also the establishment of the infection for both species, with high FEC and low packed cell volume levels in the initial collections. Measurements of the L3 as well as morphological and molecular evaluation of the adult specimens, of the experimental and tracer sheep demonstrate the elimination of the *H. placei* over time. Two helminths were identified as hybrids using the same species-specific primers. On the last experiment, the mutation for levamisole resistance gene was evaluated by conventional PCR. These primers provided amplification only in *H. contortus* specimens. Of 20 adult specimens of *H. contortus* from the donor lamb 85% (n=17) showed homozygous resistant and 15% (n=3), heterozygous. From experimental animals described in trial 1 were evaluated 142 *H. contortus* specimens and 97.6% (n=123) were homozygous resistant and 2.4% (n=3) as heterozygous. In conclusion, the establishment of mixed infections by *H. contortus* and *H. placei* in sheep occurs, and the interspecific mating can produce F1 with hybrids offspring. Nonetheless, when sheep infected with *H. contortus* and *H. placei* shared the same pastures, interspecific competition promotes the extinction of *H. placei* (parasite from cattle) with the presence of only *H. contortus*, specie that has the sheep as preferred host. In addition, the primers pairs to levamisole resistance did not present amplification bands with DNA samples of *H. placei* - however, the SpHco2 laboratory isolate (*H. contortus*) showed molecular resistance to levamisole.

Revisão de Literatura

1. Considerações iniciais

As infecções por nematódeos gastrintestinais são o mais grave problema na produção de ovinos, promovendo perda na produtividade do rebanho, acometendo principalmente as categorias jovens e as fêmeas no periparto (Rocha et al., 2004; 2005).

O controle desses helmintos baseia-se principalmente no tratamento com anti-helmínticos, porém o uso indiscriminado dessas drogas, ao longo dos anos, tornou essa estratégia ineficiente, tendo como consequência a seleção de populações de parasitas com resistência às drogas comerciais (revisado por Gilleard, 2006; Almeida et al., 2010; Salgado e Santos, 2016).

Visando favorecer sua sobrevivência, os parasitas resistentes aos anti-helmínticos apresentam mutações gênicas que podem, eventualmente, se tornar fixas nas gerações seguintes (Aguayo-Ortiz et al., 2013). Pode-se utilizar como exemplo o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no códon F200Y, os genes que codificam a β -tubulina sofrem mutação em sua sequência e as proteínas codificadas pelos genes perdem a afinidade aos benzimidazóis (Silvestre e Humbert, 2002; Brasil et al., 2012; Chaudhry et al., 2015a; Redman et al., 2015).

Em virtude da ineficácia dos tratamentos, diferentes metodologias no manejo dos animais de interesse zootécnico podem ser empregadas, como por exemplo, o pastejo misto entre ovinos e bovinos (Amarante et al., 1997; Fernandes et al., 2004; Rocha et al., 2008). Essa metodologia pode ser utilizada para a descontaminação da pastagem, embora possa favorecer a ocorrência de infecções cruzadas (Fernandes et al., 2004; Rocha et al., 2008).

Haemonchus contortus têm os ovinos como hospedeiro preferencial, enquanto *Haemonchus placei* apresenta predileção por bovinos (Hoberg et al., 2004), no entanto, relatos sobre infecções mistas (*H. contortus* e *H. placei*) em ovinos e bovinos já foram reportados em diversos locais do mundo (Amarante et al., 1997; Jacquiet et al., 1998; Achi et al., 2003; Hoberg et al., 2004; Rocha et al., 2008; Gasbarre et al., 2009; Khalafalla et al., 2011). As infecções mistas interespecíficas podem promover a produção de híbridos, contudo, esses parasitas podem apresentar baixa eficiência reprodutiva (Le Jambre, 1979; 1981).

Desta maneira, no presente estudo, utilizaram-se as técnicas moleculares de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional com oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para: a identificação das espécies de *H. contortus* e *H. placei*, a detecção da resistência à levamisole nessas espécies, bem como o sequenciamento de marcadores microssatélites para a caracterização molecular de *Haemonchus* spp.

4. Considerações

A avaliação morfológica para a diferenciação das espécies de *Haemonchus* consiste na técnica mais acessível, contudo, a identificação dos espécimes pode ser dificultada pela sobreposição das medidas entre *H. contortus* e *H. placei*, impossibilitando a distinção das espécies e, conseqüentemente, de indivíduos híbridos. Mediante o exposto, o presente estudo utilizou as técnicas moleculares como o sequenciamento de microssatélites para a identificação das espécies de *H. contortus* e *H. placei*, a PCR convencional para a identificação das espécies de, bem como de híbridos, e ainda para a caracterização molecular da resistência ao levamisole.

5. Referências bibliográficas

- Achi, Y.L., Zinsstag, J., Yao, K., Yeo, N., Dorchies, P., Jacquet, P., 2003. Host specificity of *Haemonchus* spp. for domestic ruminants in the savanna in northern Ivory Coast. **Vet. Parasitol.** 116, 151-158.
- Asharaf, S., Beech, R.N., Hancock, M.A., Prichard, R.K., 2015. Ivermectin binds to *Haemonchus contortus* tubulins and promotes stability of microtubules. **Int. J. Parasitol.** 45, 647-654.
- Aguayo-Ortiz, R., Méndez-Lucio, O.; Romo-Mancillas, A., Castillo, R., Yépez-Muliab, I., Medina-Franco, J.L., Hernández-Campos, A., 2013. Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel β -tubulin binding site model. **J. Mol. Graph. Model.** 45, 26-37.
- Almeida, J.L., 1935. Revisão do gênero *Haemonchus* Cobb, 1989 (Nematoda: Trichostrongylidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 30, 57-114.
- Almeida, F.A., Garcia, K.C.O.D., Torgerson, P.R., Amarante, A.F.T., 2010. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitol. Int.** 59, 622-625.
- Amarante, A.F.T., Bangola Junior, J., Amarante, M.R.V, Barbosa, M.A., 1997 Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil. **Vet. Parasitol.** 73, 89-104.
- Amarante, A.F.T., 2011. Why is important to correctly identify *Haemonchus* species? **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 20, 263-268.
- Anthony, R.M., Rutitzky, L.I., Urban Jr., J.F., Stadecker, M.J., Gause, W.C., 2007. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nat. Rev. Immunol.** 7, 975-987.
- Balic, A., Cunningham, C.P., Meeusen, E.N.T., 2006. Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. **Parasite Immunol.** 28,

- 107-115.
- Barrère, V., Keller, K., von Samson-Himmelstjerna, G., Prichard, R.K., 2013. Efficiency of a genetic test to detect benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* nematodes in sheep farms in Quebec, Canada. **Parasitol. Int.** 62, 464-470.
- Barrère, V., Beech, R.N., Charvet, C.L., Prichard, R.K., 2014. Novel assay for the detection and monitoring of levamisole resistance in *Haemonchus contortus*. **Int. J. Parasitol.** 44, 235-241.
- Beech, R.N., Skuce, P., Bartley, D.J., Martion, R.J., Prichard, R.K., Gilleard, J.S., 2011. Anthelmintic resistance: markers for resistance or susceptibility? **Parasitology**. 138, 160-174.
- Besier, R.B., Kahn, L.P., Sargison, N.D., van Wyk, J.A., 2016. Diagnosis, treatment and management of *Haemonchus contortus* in small ruminants. **Adv. Parasitol.** 93, 181-238.
- Blackburn, H.D., Rocha, J.L., Figueiredo, E.P., Berne, M.E., Vieira, L.S., Cavalcante, A.R., Rosa, J.S., 1991. Interaction of parasitism and nutrition and their effects on production and clinical parameters in goats. **Vet. Parasitol.** 40, 99-112.
- Blouin, M.S., Yowell, C.A., Courtney, C.H., Dame, J.B., 1995. Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. **Genetics**. 141, 1007-1014.
- Brasil, B.S.A.F., Nunes, L.R., Bastianetto, E., Drummond, M.G., Carvalho, D.C., Leite, R.C., Molento, M.B., Oliveira, D.A.A., 2012. Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. **Int. J. Parasitol.** 42, 469-479.
- Campbell, W.C., 2016. Lessons from the history of ivermectin and other antiparasitic agents. **Annu. Rev. Anim. Biosci.** 4, 1-14.
- Chagas, A.M., Sampaio Junior, F.D., Pacheco, A., Cunha, A.B., Cruz, J.S., Scofield, A., Góes-Cavalcante, G., 2016. F200Y polymorphism of the β -tubulin isotype 1 gene in *Haemonchus contortus* and sheep flock management practices related to anthelmintic resistance in eastern Amazon. **Vet. Parasitol.** 226, 104-108.
- Changeux, J.P., 2010. Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. **Nat. Rev. Neurosci.** 11, 389-401.
- Chaudhry, U., Redman, E.M., Abbas, M., Muthusamy, R., Ashraf, K., Gilleard, J.S., 2015a. Genetic evidence for hybridisation between *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* in natural field populations and its implications for interspecies transmission of anthelmintic resistance. **Int. J. Parasitol.** 45, 149-159.

- Chaudhry, U., Redman, E.M., Raman, M., Gilleard, J.S., 2015b. Genetic evidence for the spread of a benzimidazole resistance mutation across southern India from a single origin in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. **Int. J. Parasitol.** 45, 271-728.
- Cintra, M.C.R., Teixeira, V.N., Nascimento, L.V., Sotomaior, C.S., 2016. Lack of efficacy of monepantel against *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Vet. Parasitol.**, 30, 4-6.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruysse, J., 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Vet. Parasitol.** 136, 167-185.
- Čudeková, P., Várady, M., Dolinská, M., Königová, A., 2010. Phenotypic and genotypic characterisation of benzimidazole susceptible and resistant isolates of *Haemonchus contortus*. **Vet. Parasitol.** 172, 155-159.
- 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.
- Dorris, M., Viney, M.E., Blaxter, M.L., 2002. Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes. **Int. J. Parasitol.** 32, 1507-1517.
- Downing, K.H., 2000. Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 16, 89-111.
- Duarte, E.R., Silva, R.B., Vasconcelos, V.O., Nogueira, F.A., Oliveira, N.J.F., 2012. Diagnóstico do controle e perfil de sensibilidade de nematódeos de ovinos ao albendazol e ao levamisol no norte de Minas Gerais. **Pesq. Vet. Bras.** 32, 147-152.
- Dumontet, C., Jordan, M.A., 2010. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. **Nat. Rev. Drug Discov.** 9, 790-803.
- Emery, D.L., Hunt, P.W., Le Jambre, L.F., 2016. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? **Int. J. Parasitol.** 46, 755-769.
- Eng, J.K.L., Blackhall, W.J., Osei-Atweneboana, M.Y., Bourguinat, C., Galazzo, D., Beech, R.N., Unnasch, T.R., Awadzi, K., Lubega, G.W., Prichard, R.K., 2006. Ivermectin selection on β -tubulin: Evidence in *Onchocerca volvulus* and *Haemonchus contortus*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 150, 229-235.
- Fernandes, L.H., Seno, M.C.Z., Amarante, A.F.T., Souza, H., Belluzzo, C.E.C., 2004. Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.** 56, 733-740.

- Gasser, R.B., 1999. PCR-based technology in veterinary parasitology. **Vet. Parasitol.** 84, 229-258.
- Gasbarre, L.C., Smith, L.L., Lichtenfels, J. R., Pilitt, P.A., 2009. The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the US. **Vet. Parasitol.** 166, 281-285.
- Gennari, S.M., Bressan, M.C., Rogero, J.R, Maclean, J.M., Duncan, J.L., 1991. Pathophysiology of *Haemonchus placei* infection in calves. **Vet. Parasitol.** 38, 163-172.
- Gibbons, L.M., 1979. Revision of the genus *Haemonchus* Cobb, 1898 (Nematoda: Trichostrongylidae). **Syst. Parasitol.** 1, 3-24.
- Gilleard, J.S., 2006. Understanding anthelmintic resistance: The need for genomics and genetics. **Int. J. Parasitol.** 36, 1227-1239.
- Gilleard, J.S., Redman, E., 2016. Genetic diversity and population structure of *Haemonchus contortus*. **Adv. Parasitol.** 93, 31-68.
- Hoberg, E.P, Lichtenfels, J.R., Gibbons, L., 2004. Phylogeny for species of *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongyloidea): Considerations of their evolutionary history and global biogeography among camelidae and pecora (Artiodactyla). **J. Parasitol.** 90, 1085-1102.
- Hoekstra, R., Criado-Fornelio, A., Fakkeldij, J., Bergman, J., Roos, M.H., 1997. Microsatellites of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*: polymorphism and linkage with a direct repeat. **Mol. Bioch. Parasitol.** 89, 97-107.
- Humbert, J.F., Cabaret, J., Elard, L., Leignel, V., Silvestre, A., 2001. Molecular approaches to studying benzimidazole resistance in trichostrongylid nematode parasites of small ruminants. **Vet. Parasitol.** 101, 405-414.
- Jacquet, P., Cabaret, J., Cheikh, D., Thiam, E. 1997. Identification of *Haemonchus* species in domestic ruminants based on morphometrics of spicules. **Parasitol. Res.** 83, 82-86.
- Jacquet, P., Cabaret, J., Thiam, E., Cheikh, D., 1998. Host range and the maintenance of *Haemonchus* spp. in an adverse arid climate. **Int. J. Parasitol.** 28, 253-261.
- Kantartzi, S.K., 2013. **Microsatellites: Methods and Protocols**, Humana Press, Totowa, 339p.
- Khalafalla, R.E., Elseify, M.A., Elbahi, N.M., 2011. Seasonal prevalence of gastrointestinal nematode parasites of sheep in Northern region of Nile Delta, Egypt. **Parasitol. Res.** 108, 337–340.
- Kotze, A.C., Hunt, P.W., Skuce, P., von Samson-Himmelstjerna, G., Martin, R.J., Sager, H., Krücken, J., Hodgkinson, J., Lespine, A., Jex, A.R., Gilleard, J.S., Beech, R.N., Wolstenholme, A.J., Demeler, J., Robertson, A.P., Charvet, C.L., Neveu, C., Kaminsky,

- R., Rufener, L., Alberich, M., Menez, C., Prichard, R.K., 2014. Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions. **Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.** 4, 164-184.
- Kotze, A.C., Prichard, R.K., 2016. Anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*: History, mechanisms and diagnosis. **Adv.Parasitol.** 93, 397-428.
- Kowal, J., Wyrobisz, A., Nosah, P., Kucharski, M., Kaczor, U., Skalska, M., Sendor, P., 2016. Benzimidazole resistance in the ovine *Haemonchus contortus* from southern Poland – coproscopical and molecular findings. **Ann Parasitol.** 62,119-123.
- Kumsa, B., Tolera, A., Abebe, R., 2008. Vulvar morphology and sympatry of *Haemonchus* species in naturally infected sheep and goats of Ogaden region, eastern Ethiopia. **Vet. Arhiv.** 78, 331-342.
- Le Jambre, L.F., 1979. Hybridization studies of *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) and *H. placei* (Place, 1893) (Nematoda: Trichostrongylidae). **Int. J. Parasitol.** 9, 455-463.
- Le Jambre, L.F., Royal, W.M., 1980. Meiotic abnormalities in backcross lines of hybrid *Haemonchus*. **Int. J. Parasitol.** 10, 281-286.
- Le Jambre, L.F., 1981. Hybridization of Australian *Haemonchus placei* (Place, 1893), *Haemonchus contortus cayugensis* (Das & Whitlock, 1960) and *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) from Louisiana. **Int. J. Parasitol.** 11, 323-330.
- Le Jambre, L.F., 1993. Molecular variation in trichostrongylid nematodes from sheep and cattle. **Acta Trop.** 53, 331-343.
- Le Jambre, L.F., 1995. Relationship of blood loss to worm numbers, biomass and egg production in *Haemonchus contortus* infected sheep. **Int. J. Parasitol.** 25, 269-273.
- Lichtenfels, J.R., Pilitt, P.A., Hoberg, E.P., 1994. New morphological characters for identifying individual specimens of *Haemonchus* spp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) and a key to species in ruminants of North America. **J. Parasitol.** 80, 107-119.
- Martin, R.J., 1997. Modes of action of anthelmintic drugs. **Vet. J.** 154, 11-34.
- Martin, R.J., Robertson, A.P., Buxton, S.K., Beech, R.N., Charvet, C.L., Neveu, C., 2012. Levamisole receptors: a second awakening. **Trends Parasitol.** 28, 289-296.
- McKeand, J. B., 1999. Molecular diagnosis of parasitic nematodes. **Parasitology.** 117, 87-96.
- Niciura, S.C.M., Veríssimo, C.J., Gromboni, J.G., Rocha, M.I.P., Mello, S.S., Barbosa, C.M.P., Chiebao, D.P., Cardoso, D., Silva, G.S., Otsuk, I.P., Pereira, J.R., Ambrosio, L.A., Nardon, R.F., Ueno, E.H., Molento, M.B., 2012. F200Y polymorphism in the β -tubulin gene in field isolates of *Haemonchus contortus* and risk factors of sheep flock

- management practices related to anthelmintic resistance. **Vet. Parasitol.** 190, 608-612.
- Nisbet, A.J., Meeusen, E.N., González, J.F., Piedrafita, D.M., 2016. Immunity to *Haemonchus contortus* and vaccine development. **Adv. Parasitol.** 93, 353-396.
- Nishi, S.M., Richtzenhain, L.J., Gennari, S.M., 2002. Níveis de IgG séricos em bezerros experimentalmente infectados pelo *Haemonchus placei*. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** 39, 107-110.
- O'Connor, L. J., Walkden-Brown, S.W., Kahn, L.P., 2006. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. **Vet. Parasitol.** 142, 1-15.
- Prichard, R., 1994. Anthelmintic resistance. **Vet. Parasitol.** 54, 259-268.
- Prichard, K.R., 2001. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trends Parasitol.** 17, 445-453.
- Redman, E., Packard, E., Grillo, V., Smith, J., Jackson, F., Gilleard, J.S., 2008. Microsatellite analysis reveals marked genetic differentiation between *Haemonchus contortus* laboratory isolates and provides a rapid system of genetic fingerprinting. **Int. J. Parasitol.** 38, 111-122.
- Redman, E., Sargison, N., Whitelaw, F., Jackson, F., Morrison, A., Bartley, D.J., Gilleard, J.S., 2012. Introgression of ivermectin resistance genes into a susceptible *Haemonchus contortus* strain by multiple backcrossing. **PLoS Pathog.** 8, 1-10.
- Redman, E., Whitelaw, F., Tait, A., Burgess, C., Bartley, Y., Skuce, P.J., Jackson, F., Gilleard, J.S., 2015. The emergence of resistance to the benzimidazole anthelmintics in parasitic nematodes of livestock is characterised by multiple independent hard and soft selective sweeps. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 9, 1-24.
- Rocha, R.A., Amarante, A.F.T., Bricarello, P.A., 2004. Comparison of the susceptibility of Santa Inês and Ile de France ewes to nematode parasitism around parturition and during lactation. **Small Rum. Res.** 55, 65-75.
- Rocha, R.A., Amarante, A.F.T., Bricarello, P.A., 2005. Resistance of Santa Ines and Ile de France suckling lambs to gastrointestinal nematode infections. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 14, 17-20.
- Rocha, R.A., Bresciani, T.F.M., Barros, L.H., Fernandes, M.B., Amarante, A.F.T., 2008. Sheep and cattle alternately: Nematode parasitism and pasture descontamination. **Small Rum. Res.** 75, 135-143.
- Roeber, F., Jex, A.R., Gasser, R.B., 2013. Next-generation molecular-diagnostic tools for gastrointestinal nematodes of livestock, with an emphasis on small ruminants: A turning point? **Adv. Parasitol.** 83, 267-333.

- Salgado, J.A., Santos, C.P., 2016. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 25, 3-17.
- Sangster, N.C., Gill, J., 1999. Pharmacology of anthelmintic resistance. **Parasitol. Today**, 15, 141-146.
- Santiago, M.A.M., 1968. *Haemonchus* Cobb, 1898 (Nematoda: Trichostrongylidae). **Contribuição ao estudo da morfologia, biologia e distribuição geográfica das espécies parasitas de ovinos e bovinos no Rio Grande do Sul**. 89f. Tese (Livres-Docência) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- Santos, M.C., Silva, B.F., Amarante, A.F.T., 2012. Environmental factors influencing the transmission of *Haemonchus contortus*. **Vet. Parasitol.** 188, 277-284.
- Santos, M.C., Xavier, J.K., Amarante, M.R.V., Bassetto, C.C., Amarante, A.F.T., 2014a. Immune response to *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* in sheep and its role on parasite specificity. **Vet. Parasitol.** 203, 127-138.
- Santos, M.C., Amarante, M.R.V., Silva, M.R.L., Amarante, A.F.T., 2014b. Differentiation of *Haemonchus placei* from *Haemonchus contortus* by PCR and by morphometrics of adult parasites and third stage larvae. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 23, 495-500.
- Sarai, R.S., Kopp, S.R., Knox, M.R., Coleman, G.T., Kotze, A.C., 2015. In vitro levamisole selection pressure on larval stages of *Haemonchus contortus* over nine generations gives rise to drug resistance and target site gene expression changes specific to the early larval stages only. **Vet. Parasitol.** 211, 45-53.
- Silva, B.F., Amarante, M.R.V., Kadri, S.M., Carrijo-Mauad, J.R., Amarante, A.F.T. 2008. Vertical migration of *Haemonchus contortus* third stage larvae on *Brachiaria decumbens* grass. **Vet. Parasitol.** 158, 85-92.
- Silvestre, A., Humbert, J.F., 2000. A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites. **Exp. Parasitol.** 95, 271-276.
- Silvestre, A., Humbert, J.F., 2002. Diversity of benzimidazole-resistance alleles in populations of small ruminant parasites. **Int. J. Parasitol.** 32, 921-928.
- Stevenson, L. A.; Chilton, N. B.; Gasser, R. B., 1995. Differentiation of *Haemonchus placei*, from *H. contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) by the ribosomal DNA second internal transcribed spacer. **Int. J. Parasitol.** 25, 483-488.
- Sutherst, R.W., Comins, H.N., 1979. The management of acaricide resistance in the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae), in Australia. **Bull. Entomol. Res.** 69, 519-537.

- Taman, A., Azab, M., 2014. Present-day anthelmintics and perspectives on future new targets. **Parasitol. Res.** 113, 2425-2433.
- van der Brom, R., Moll, L., Kappert, C., Vellema, P., 2015. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. **Vet. Parasitol.** 30, 278-280.
- van Wyk, J.A., Mayhew, E., 2013. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. **Onderstepoort J. Vet. Res.** 80, 1-14.
- von Samson-Himmelstjerna, G., 2006. Molecular diagnosis of anthelmintic resistance. **Vet. Parasitol.** 136, 99-107.
- von Samson-Himmelstjerna, G., Blackhall, W.J., McCarthy, S., Skuce, P. J., 2007. Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes. **Parasitology.** 134, 1077-1086.
- von Samson-Himmelstjerna, G., Walsh, T.K., Donnan, A.A., Carriè, F.J., Skuce, P.J., Rohn, K., Wolstenholme, J., 2009. Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing. **Parasitology.** 136, 349-358.
- Zarlenga, D.S., Stringfellow, F., Nobary, M., Lichtenfels, J.R., 1994. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from three species of *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongyloidea) and identification of PCR *primers* for rapid differentiation. **Exp. Parasitol.** 78, 28-36.
- Zarlenga, D. S.; Chute, M. B.; Gasbarre, L. C.; Boyd, P. C., 2001. A multiplex PCR assay for differentiating economically important gastrointestinal nematodes of cattle. **Vet. Parasitol.**, 97, 199-209.
- Zarlenga, D.S., Hober, E.P., Tuo, W., 2016. The Identification of *Haemonchus* species and diagnosis of haemonchosis. 93, 145-180.

Considerações finais

As técnicas moleculares são mais específicas para a diferenciação dessas espécies e podem ser utilizadas para a identificação de híbridos interespecíficos, bem como na avaliação de fluxo gênico.

A biologia molecular pode ser empregada como ferramenta para a avaliação dos genes candidatos, que estão relacionados à resistência anti-helmíntica, e esses estudos vêm sendo amplamente difundidos nos últimos dez anos.

Os presentes estudos contribuíram para a compreensão do comportamento de infecções mistas em ovinos. No primeiro capítulo foi observado que os marcadores moleculares avaliados podem ser aplicados para a diferenciação das espécies *H. contortus* e *H. placei*. Nos capítulos 2 e 3 observamos a ocorrência do estabelecimento de infecções mistas (*H. contortus* + *H. placei*) em ovinos com a produção de híbridos em condições de infecção controlada, em confinamento, ou em condições de reinfecções, em pastagem. No capítulo 2 também foi observado que quando a competição interespecífica é possível houve a eliminação de *H. placei* (parasita específico de bovinos) em menos de 12 meses, em condições de pastejo somente com ovinos.

Ao avaliarmos o gene de resistência ao levamisol, o isolado utilizado no estudo SpHco2 (*H. contortus*) apresentou elevado grau de resistência à ação do levamisol, contudo, o primer avaliado não apresentou banda de amplificação ao ser utilizado com o isolado SpHp11 (*H. placei*). Contudo, mais pesquisas são necessárias para avaliar o fluxo dos genes que conferem resistência ao levamisole sua expressão e introgressão.