



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

JESSICA MARIA LEITE DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO E DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA ANTI-
HELMÍNTICA EM POPULAÇÕES DE *Haemonchus contortus* NO
ESTADO DO CEARÁ**

FORTALEZA - CEARÁ

2017

JESSICA MARIA LEITE DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO E DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA ANTI-
HELMÍNTICA EM POPULAÇÕES DE *Haemonchus contortus* NO
ESTADO DO CEARÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Ciências Veterinárias da
Faculdade de Veterinária da Universidade
Estadual do Ceará, como requisito parcial para
a obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias. Área de Concentração:
Reprodução e Sanidade Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Leal
Bevilaqua

FORTALEZA - CEARÁ
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Santos, Jessica Maria Leite dos.

Desenvolvimento e diagnóstico da resistência anti-helmíntica em populações de *Haemonchus contortus* no Estado do Ceará [recurso eletrônico] / Jessica Maria Leite dos Santos. - 2017.

1 CD-ROM: il.; 4 ¾ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 114 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2017.

Área de concentração: Reprodução e sanidade Animal.
Orientação: Prof.^a Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua.

Coorientação: Prof. Ph.D. Jomar Patrício Monteiro.

1. *Haemonchus contortus*. 2. Anti-helmínticos. 3. Resistência. 4. Pequenos ruminantes. 5. PCR em tempo real. I. Título.

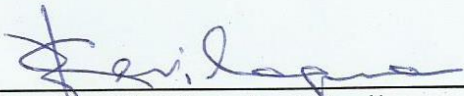
JESSICA MARIA LEITE DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO E DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA ANTI-
HELMÍNTICA EM POPULAÇÕES DE *Haemonchus contortus* NO ESTADO
DO CEARÁ

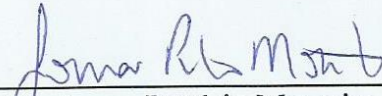
Tese apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 28/07/2017


BANCA EXAMINADORA:



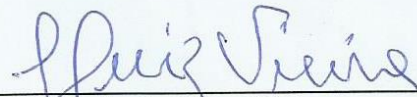
Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua
Universidade Estadual do Ceará
Orientadora



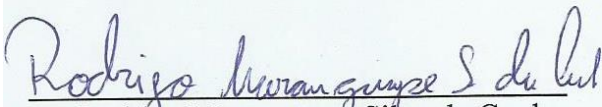
Dr. Jomar Patrício Monteiro
Embrapa Caprinos e Ovinos
Coorientador



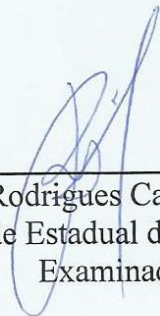
Dra. Ana Carolina Fonseca Lindoso Melo
Universidade Federal do Ceará
Examinadora



Dr. Luiz da Silva Vieira
Embrapa Caprinos e Ovinos
Examinador



Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha
Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA
Examinador



Dr. Rodrigo Rodrigues Cambraia de Miranda
Universidade Estadual do Vale do Acaraú
Examinador

*A minha mãe,
Edineide Leite dos Santos,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e a Embrapa - Caprinos e Ovinos por disponibilizarem estrutura para o desenvolvimento do projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fornecimento de bolsa de Pós-Graduação.

Agradeço imensamente a Deus por ter me guiado até aqui e por ter me dado forças para superar todas as dificuldades encontradas nesse doutorado. Obrigada Senhor por mais essa conquista!

Agradeço a minha mãe, Edineide Leite dos Santos, por todo apoio durante a minha vida acadêmica. Por ter sido mãe e pai de forma guerreira. Obrigada por todo carinho e amor dedicados a mim!

Agradeço a toda minha família por ter me apoiado, em especial ao meu irmão Hugo Fernando Leite dos Santos Belo, a minha cunhada Marcela Bezerra Tavares Santos e aos meus sobrinhos Davi Santos e Maria Alice, muito obrigada!

Ao meu companheiro João Ricardo Furtado por todo apoio, carinho, força e amor para enfrentar todos os obstáculos de um doutorado. Parte fundamental da minha conquista!

A minha orientadora, Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua, por ter me aceitado. Por toda a sua atenção, dedicação e ensinamentos durante esses 6 anos de pós-graduação.

Ao meu coorientador, Dr. Jomar Patrício Monteiro, por toda a sua paciência, dedicação e disponibilidade que foram fundamentais para a realização desse trabalho, obrigada.

Ao Dr. Luiz da Silva Viera que sempre esteve disponível para me ajudar, pelos ensinamentos, paciência e todos os conselhos que foram me dados, fundamentais para o meu desenvolvimento científico e crescimento pessoal. Obrigada por todo o apoio durante o experimento.

A todos ICs, mestrandos e doutorandos e demais membros do LABODOPAR pela cooperação no trabalho e pela amizade. Em especial a Dra. Iara Tersia Freitas Macedo, Vilemar Araújo, Wesley Lyeverton C. Ribeiro, Weibson P. P. André e Dauana Mesquita. agradeço pelo apoio no trabalho, pelas palavras sinceras, por toda amizade e carinho.

Agradeço especialmente aos ICs da Embrapa, Janice Fontenele, Daniel Ferreira, Ricardo Monteiro, Janaelia Vasconcelos, Gracielle Frota e Kimbly Aragão por toda a dedicação ao meu trabalho, vocês foram essenciais para a realização dos experimentos!

Agradeço a todos os estagiários (as) e pós-graduandos (as) da EMBRAPA pelo carinho e pelos muitos momentos de descontração. Ao Edilson Freitas, a Maximiana Mesquita e a Claudelice Rosa por toda a amizade e por sempre me ouvirem e ajudarem a levantar a cabeça e seguir em frente!

À Dona Helena e ao seu Felipe, técnicos do laboratório de parasitologia da EMBRAPA, pelo apoio técnico.

A todos os meus colegas de Pós-graduação, que me acompanharam na vida acadêmica e na vida pessoal.

Ao setor de transporte da UECE pelo fornecimento de carros para realização dos experimentos iniciais.

Aos técnicos da EMATERCE e todos os proprietários das fazendas por disponibilizarem os seus animais para realização das coletas para experimento.

Aos demais membros da banca, Dra. Ana Carolina Fonseca Lindoso Melo, Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha e Dr. Rodrigo Rodrigues Cambraia de Miranda por terem aceitado o convite e por suas contribuições.

Enfim, a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Não importa aonde você parou...
Em que momento da vida você cansou...
O que importa é que sempre é possível
necessário "Recomeçar"

(Carlos Drummond de Andrade)

RESUMO

Os nematoides gastrintestinais são um dos principais fatores limitantes na criação de pequenos ruminantes no mundo. Os benzimidazóis (BZ), as lactonas macrocíclicas (LM) e os imidazotiazóis são os anti-helmínticos mais utilizados para o controle desses parasitas. Contudo, o uso de fármacos leva inevitavelmente ao desenvolvimento de resistência anti-helmíntica (RAH). O diagnóstico de RAH é realizado principalmente por meio de métodos fenotípicos com baixa sensibilidade. Dessa forma, métodos moleculares, são necessários para melhorar a capacidade de detecção da RAH. Os objetivos desse trabalho foram avaliar o estado da RAH em nematoides gastrintestinais de ovinos no Ceará, investigar a relação entre a resistência a BZ e LM e padronizar técnica de diagnóstico de resistência molecular a levamisol (LEV) em *H. contortus*. Para tanto, o trabalho foi dividido em três experimentos. No experimento I foi realizado um levantamento da situação da resistência a BZ por meio do teste de eclosão de ovos (TEO) e da PCR em tempo real (qPCR) para identificar os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) F167Y, F200Y e E198A. No experimento II foi realizada a seleção para resistência do isolado de *H. contortus* Inbred-Susceptible Edinburgh (ISE) com doses crescentes de oxifendazol (OXF), ivermectina (IVM) e oxifendazol mais ivermectina (IVMOXF). O desenvolvimento da resistência foi avaliado por qPCR, TEO para BZ e teste de desenvolvimento larva (TDL) para ivermectina. No terceiro experimento foi realizado a qPCR para o diagnóstico de resistência a LEV, baseando-se na deleção de 63pb no gene *Hco-acr-8b* codificante para os receptores nicotínicos de acetilcolina. Foram testadas 26 populações de *H. contortus*: Kokstad (LEV resistente), ISE (LEV susceptível) e 24 populações obtidas de rebanhos no estado do Ceará. Foi realizado o TDL para LEV em cinco isolados de campo. No experimento I a concentração efetiva média para inibir 50% da eclosão de ovos (CE50) no TEO foi de 2,46 µg/mL (\pm 0,58 µg/mL) e a resistência a BZ foi detectada em todas as fazendas pesquisadas. As frequências médias de alelos resistentes nos códons F200Y, F167Y e E198A foram 34,16% (\pm 12,13%), 58,31% (\pm 18,89%) e 0,016 (\pm 0,012), respectivamente. No experimento II todos os tratamentos levaram ao aumento da frequência de alelos resistentes para os SNP F200Y e F167Y ($p < 0,05$). Os resultados *in vitro* mostraram aumento da resistência fenotípica a ambas as classes anti-helmínticas nos grupos IVM e IVMOXF, enquanto o grupo OXF desenvolveu apenas resistência para BZ. No experimento III foi observado apenas alelos resistentes no isolado Kokstad. No isolado ISE a frequência de alelos resistentes foi de 45,50%. Foi verificada uma correlação significativa entre as CE50 do TDL e a frequência de alelos resistentes. O alelo resistente no SNP F167Y em *H. contortus*

prevalece no Estado do Ceará. As evidências mostram que, embora estes SNPs possam ter algum envolvimento com a resistência a LM, não são suficientes para promover o desenvolvimento da resistência a ivermectina sozinhos. A qPCR para o diagnóstico de resistência a LEV pode ser útil para monitorar níveis de resistência em populações de *H. contortus*.

Palavras-chave: *Haemonchus contortus*. Anti-helmínticos. Resistência. Pequenos ruminantes. PCR em tempo real

ABSTRACT

Gastrointestinal nematodes are one of the main limiting factors in small ruminant production around the world. Benzimidazoles (BZ), macrocyclic lactones (ML) and imidazothiazoles are the most common anthelmintics used in control of these parasites. However, the use of these drugs inevitably induces the development of anthelmintic resistance (AHR). The diagnosis of AHR is performed mostly with phenotypic methods, which present low sensitivity. In this manner, molecular methods are necessary to improve the detection of AHR. The objectives of this study were: (1) to evaluate AHR levels in gastrointestinal nematodes of sheep in Ceará; (2) to investigate the relation between BZ and ML resistances; and (3) to standardize a molecular technique to diagnose levamisole resistance (LEV) in *H. contortus*. In order to do so, this study was divided in three experiments. In experiment I, an initial assessment of resistance to BZ was performed with egg hatch test (EHT) and real time PCR (qPCR) to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) F167Y, F200Y and E198A. In experiment II, a selection for resistance in *H. contortus* isolate Inbred-Susceptible Edinburgh (ISE) was performed with crescent doses of oxfendazole (OXF), ivermectin (IVM), and oxfendazole with ivermectin (IVMOXF). The resistance development was evaluated with qPCR, EHT for BZ and larval development test (LDT) for ivermectin. In experiment III, qPCR was used to diagnose LEV resistance, based on the deletion of 63bp in Hco-acr-8b gene that codifies nicotinic acetylcholine receptors. A total of 26 populations of *H. contortus* were tested: Kokstad (LEV-resistant), ISE (LEV-susceptible) and 24 populations obtained from flocks in Ceará State. LDT was performed for LEV in five field isolates. In experiment I, the average half maximal effective concentration (EC₅₀) in EHT was 2.46µg/mL (\pm 0.58 µg/mL) and BZ resistance was detected in all farms included in the study. Average frequencies of resistance alleles in codons F200Y, F167Y and E198A were 34.16% (\pm 12.13%), 58.31% (\pm 18.89%) and 0,016 (\pm 0,012), respectively. In experiment II, all treatments increased the frequency of resistance alleles for SNP F200Y and F167Y ($p < 0.05$). The *in vitro* results demonstrated the increase in phenotypic resistance to both anthelmintic drugs in groups IVM and IVMOXF, while OXF group developed resistance only to BZ. In experiment III, resistance alleles were only identified in Kokstad isolate. The frequency of resistance alleles in ISE isolate was 45.50%. A significant correlation between EC₅₀ of LDT and the frequency of resistance alleles was identified. Our results confirmed that the resistance to BZ is common. The resistance allele in SNP F167Y in *H. contortus* prevails in Ceará State. Provided evidences indicate that, although SNP may be involved in resistance to ML, this influence alone is not

enough to promote the development of ivermectin resistance. The use of qPCR to diagnose LEV resistance may be a useful tool to monitor resistance levels in *H. contortus* populations.

Keywords: *Haemonchus contortus*. Anthelmintics. Resistance. Small ruminants. Real time PCR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Mecanismo de ação dos benzimidazóis (BZ). Os BZ atuam por ligação à β -tubulina, impedindo polimerização adicional na extremidade de crescimento dos microtúbulos. Adaptado de Gasser e Von Samson-Himmelstjerna (2016)..... 22
- Figura 2** - Representação esquemática dos canais iônicos de cloro sob ação de lactonas macrocíclicas. Adaptado de Mottier e Lanusse (2001).. 23
- Figura 3** - Representação esquemática do receptor nicotínico de acetilcolina sob ação do levamisol. Adaptado de Mottier e Lanusse (2001)..... 24

CAPÍTULO 1

- Figure 1** - Ceará State municipalities where surveyed farms were located. Numbers by each name represent, in this order, resistant allele frequencies at SNP F200Y (%), resistant allele frequencies at SNP F167Y (%), and BZ EC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), with confidence intervals at 95% in parenthesis. Inset shows the location of Ceará State in Brazil..... 53

CAPÍTULO 2

- Figure 1** - Values of EC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) in the EHT (A) and EC50 (ng/mL) in the LDT (B) (Y-axis) performed after each treatment with crescent doses of anthelmintics in *H. contortus* isolate (X-axis)..... 75
- Figure 2** - Group IVM linear and non-linear (exponential) regression models between resistance allele frequencies at SNPs F200Y (A and C) and F167Y (B and D) (X-axis) versus EHT EC50 values ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (A and B) and LDT EC50 values (ng/mL) (C and D) (Y-axis). R^2 : Coefficient of determination for non-linear (exponential) regressions. r^2 : Coefficient of Determination for linear regressions and p-values in parentheses..... 76
- Figure 3** - Group OXF linear and non-linear (exponential) regression models between resistance allele frequencies at SNPs F200Y (A and C)

and F167Y (B and D) (X-axis) versus EHT EC50 values ($\mu\text{g/mL}$) (A and B) and LDT EC50 values (ng/mL) (C and D) (Y-axis). R^2 : Coefficient of determination for non-linear (exponential) regressions. r^2 : Coefficient of Determination for linear regressions and p-values in parentheses..... 77

Figure 4 - Group I linear and non-linear (exponential) regression models between resistance allele frequencies at SNPs F200Y (A and C) and F167Y (B and D) (X-axis) versus EHT EC50 values ($\mu\text{g/mL}$) (A and B) and LDT EC50 values (ng/mL) (C and D) (Y-axis). R^2 : Coefficient of determination for non-linear (exponential) regressions. r^2 : Coefficient of Determination for linear regressions and p-values in parentheses..... 78

CAPÍTULO 3

Figure 1 - Example of a melting curve from isolate 16 after qPCR amplification of products containing resistant (dashed line) and sensitive (continuous line) alleles. The Y-axis represents the height of the derivative peaks ($-dI/dt$) while the X-axis represents the temperatures ($^{\circ}\text{C}$) where fluorescence measures were taken..... 94

Figure 2 - Banding pattern in 1,5% agarose gel for amplified products of the indel de 63 pb of exon 3 of the Hco-acr-8 gene in *Haemonchus contortus*. 100 pb: size marker; lanes 1–3: ISE sensitive allele; lanes: 4–6: ISE resistant allele; lanes 7–9: Kokstad sensitive allele; lanes 10–12: Kokstad resistant allele; lanes 13–15: control sensitive allele; lanes 16–18: control resistant allele. The arrows indicate the two possible amplicon sizes: 227 bp indicates the presence of the insertion (indel) and the 195 bp band indicates the absence of the indel..... 95

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Table 1** - Frequency of resistant alleles for SNPs F200Y and F167Y of *H. contortus* females, males, L3 and eggs from population 9. Asterisks indicate significant changes in resistant SNP frequencies compared to egg frequencies ($P < 0.05$)..... 54
- Table 2** - Resistant allele frequencies for SNPs F167Y and F200Y before and after anthelmintic treatments in isolates of *H. contortus*. Asterisks indicate treatments with significant changes in resistant SNP frequencies in comparison to pre-treatment frequencies ($P < 0.05$). SD: standard deviation, BT: before treatment, IVM: ivermectin, OXI: oxfendazole, ABZ: albendazole..... 55

CAPÍTULO 2

- Table 1** - Frequencies of resistant alleles for F200Y e F167Y SNPs in groups IVM, OXF and IVMOXF according to the administered anthelmintic dose..... 79

CAPÍTULO 3

- Table 1** - Real time PCR primers used to detect de alelos sensíveis e resistentes para resistência a levamisol em *H. contortus*. In the primer name column, F stands for forward and R for reverse..... 96
- Table 2** - Quantitative PCR mean Cts, standard deviation, resistant allele frequencies for indel de 63 bp of exon 3 of the Hco-acr-8 gene and concentrations to inhibit 50% (EC50) of development of L3 larvae in larval development test (LDT) in *H. contortus*..... 97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
β	Beta
μg	Micrograma
μL	Microlitro
ABZ	<i>Albendazole</i>
AS-PCR	<i>Allele-specific PCR</i>
BT	<i>Before treatment</i>
BZ	Benzimidazóis
CE50	Concentração efetiva para inibir 50% da eclosão de larvas
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC50	Concentração inibitória de 50% da eclosão das larvas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHT	<i>Egg hatch test</i>
EMATERCE	Empresa de Assistência Técnica de Extensão Rural do Ceará
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FECRT	Teste de redução na contagem de ovos nas fezes
FUNCAP	Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Glu	Glutamato
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>
HCl	Ácido clorídrico
ISE	<i>Inbred-susceptible-Edinburgh</i>
IVM	Grupo tratado com ivermectina
IVMOXF	Grupo tratado com ivermectina e oxfendazol
kg	Quilograma
L1	Larva de 1º estágio
L2	Larva de 2º estágio
L3	Larva de 3º estágio
LDT	Larval development test

LEV	Levamisol
LM	Lactonas macrocíclicas
MALDT	<i>Microagar larval development test</i>
Mb	Megabytes
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
nAChRs	Receptores nicotínicos de acetilcolina
ng	Nanograma
NRC's	<i>Natural Resources Conservation Service</i>
OPG	Ovos por grama de fezes
OXF	Grupo tratado com oxfendazol
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
P-gp	Glicoproteína P
Phe	Fenilalanina
pmol	Picomoles
qPCR	PCR em Tempo Real
RAH	Resistência anti-helmíntica
RFLP-PCR	<i>Restriction fragment length polymorphism PCR</i>
RNase	Ribonuclease
SD	Standard deviation
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TDL	Teste de desenvolvimento larvar
TE	Tris EDTA
TEO	Teste de eclosão de ovos
TIAL	Teste de inibição da alimentação larvar
Tm	<i>Melting temperature</i>
TML	Teste de motilidade larvar
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano – ácido clorídrico
Tyr	Tirosina
UECE	Universidade Estadual do Ceará
WAAVP	<i>World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	<i>Haemonchus contortus</i>	21
2.2	Anti-helmínticos.....	22
2.2.1	Benzimidazóis.....	22
2.2.2	Lactonas macrocíclicas.....	22
2.2.3	Imidazotiazóis.....	24
2.3	Resistência anti-helmíntica.....	24
2.3.1	Benzimidazóis.....	26
2.3.2	Lactonas macrocíclicas.....	26
2.3.3	Imidazotiazóis.....	27
2.4	Métodos de diagnóstico de resistência anti-helmíntica.....	28
2.4.1.	Testes <i>in vivo</i>	28
2.4.2	Testes <i>in vitro</i>	29
2.4.3	Diagnóstico molecular	30
3	JUSTIFICATIVA.....	33
4	HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	34
5	OBJETIVOS.....	35
5.1	Objetivo Geral.....	35
5.2	Objetivos Específicos.....	35
6	CAPÍTULO I.....	36
7	CAPÍTULO II.....	56
8	CAPITULO III.....	88
9	CONCLUSÕES.....	99
10	PERSPECTIVAS.....	100
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
	APENDICES.....	113

1. INTRODUÇÃO

Na região Nordeste do Brasil, a ovinocaprinocultura se constitui em uma das principais fontes de proteína animal e de renda. O estado do Ceará é responsável por 12% do efetivo de ovinos e 10% do rebanho caprino nacional (IBGE, 2010). O parasitismo por nematoides gastrintestinais representam um problema sanitário e econômico importante para a cadeia produtiva de pequenos ruminantes (VADLEJCH et al., 2014), devido ao aumento de custos com tratamentos, diminuição na produção e aumento da mortalidade (FORBES et al., 2002; SECHI et al., 2010). O controle desses parasitos é realizado utilizando anti-helmínticos sintéticos de amplo espectro. Estes fármacos são classificados em diferentes classes de acordo com sua estrutura química. Os principais grupos utilizados são os benzimidazóis (BZ), as lactonas macrocíclicas (LM) e os imidazotiazóis. A utilização destes fármacos leva inevitavelmente ao desenvolvimento da resistência anti-helmíntica (RAH). No entanto, formas inadequadas de tratamento aceleram o desenvolvimento da RAH (GASSER; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, 2016).

A RAH consiste na capacidade natural de espécies de nematoides gastrintestinais em tolerar uma dose de anti-helmínticos que seria eficaz para a maioria dos indivíduos de uma população sensível, sendo resultado de seleção natural após exposição de uma população de parasitos ao fármaco (PRICHARD, 1980; VADLEJCH et al., 2014). A RAH foi detectada pela primeira vez em *Haemonchus contortus* resistente ao tiabendazol nos Estados Unidos (DRUDGE et al., 1964). Desde então o problema se agravou e a RAH foi detectada em todo o mundo incluindo resistência a múltiplas drogas (VERÍSSIMO et al., 2012; GEURDEN et al., 2014). No Brasil, o primeiro relatos de RAH foram descritos no Sul do país (DOS SANTOS; GONÇALVES, 1967). No Nordeste brasileiro, o primeiro relato de suspeita de RAH foi em nematoides gastrintestinais de caprinos a benzimidazóis no Estado do Ceará (VIEIRA et al., 1989).

A identificação de espécies de parasitos presentes no rebanho bem como a disponibilidade de metodologias sensíveis e eficazes para diagnóstico de resistência são os requisitos principais para o sucesso de programas de controle e minimização da RAH (TAYLOR et al., 2002; DEMELER et al., 2012). Os métodos de diagnóstico de RAH basicamente podem ser divididos em três tipos: *in vivo*, *in vitro* e moleculares. As técnicas *in vivo* e *in vitro* podem ser utilizadas para todas as classes de anti-helmínticos. No entanto, os métodos moleculares estão padronizados totalmente apenas para o diagnóstico aos BZ. Considera-se que a RAH para LM e LEV esteja associada a alterações em múltiplos genes,

dificultando o estabelecimento de um único diagnóstico molecular (FORTES; MOLENTO, 2013). A complexidade do problema pode ser minimizada através de estudos que abordem os mecanismos de evolução da RAH e o desenvolvimento de técnicas moleculares para diagnóstico precoce de resistência.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus é um parasito hematófago de ciclo de vida direto de pequenos ruminantes com distribuição global (PRICHARD, 2001; BOWMAN et al., 2006). Esse nematoide se estabelece no abomaso dos animais na fase adulta e apresenta uma fase de vida livre no ambiente. O adulto possui uma lanceta perfurante que facilita a obtenção do sangue dos vasos da mucosa do abomaso. A perda de sangue começa com o desenvolvimento das larvas do quarto estágio com a anemia sendo detectável 10 e 12 dias após a infecção. Os nematoides adultos podem remover individualmente de 30 a 50 μL de sangue por dia (DARGIE; ALLONBY, 1975). A gravidade da doença no hospedeiro está relacionada ao número de larvas de *H. contortus* que se estabelecem, uma vez que existe uma forte correlação entre a perda de sangue e o número de vermes adultos (LE JAMBRE, 1995). Os sinais clínicos da infecção por *H. contortus* dependem também da variação na susceptibilidade entre os animais, do estado nutricional e da idade. A Hemoncose caracteriza-se por quadros de anemia severa com palidez da pele e das mucosas, edema submandibular e uma progressiva perda de peso. Quando a perda sanguínea excede a capacidade hematopoiética, a Hemoncose pode levar o animal a óbito (ONYIAH; ARSLAN, 2005; BOWMAN et al., 2006; GASSER; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, 2016).

H. contortus está presente na maioria dos animais do rebanho nas regiões tropicais. No estado do Ceará apresenta alta prevalência em pequenos ruminantes (VIEIRA; CAVALCANTE, 1999; MELO et al., 2009). Essa característica pode ser justificada pelo fato das fêmeas serem capazes de produzir até 10.000 ovos por dia. *H. contortus* apresentam grande variabilidade genética, seja dentro de uma população ou entre populações geograficamente separadas (PRICHARD, 2001). Embora *H. contortus* seja considerado um parasito principalmente de zonas tropicais, a adaptabilidade ecológica desse helminto proporcionada pelo alto nível de polimorfismos genético e de elevado potencial bioquímico permitiu a sua adaptação em uma ampla gama de zonas climáticas (GASSER; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, 2016). A taxa de polimorfismos nesta espécie está diretamente relacionada à migração dos nematoides, que é favorecida pelo grande comércio de pequenos ruminantes no mundo (BRASIL et al., 2012). De forma geral, o controle desses nematoides é realizado com a utilização de anti-helmínticos de amplo espectro.

2.2 Anti-helmínticos

2.2.1 Benzimidazóis (BZ)

A história desta classe de fármacos começou com a introdução do tiabendazol em 1961, sendo este o primeiro anti-helmíntico de amplo espectro de baixa toxicidade no mercado. Desde então, foi desenvolvida uma variedade de drogas que se dividem em BZ (albendazol, febendazol, flubendazol, mebendazol, oxfendazol, oxibendazol, entre outros) e pró-benzimidazóis (febantel, tiofanato, netobimim) (BROWN et al., 1961; KRÍZOVÁ-FORSTOVÁ et al., 2011).

O mecanismo de ação dos BZ deve-se à capacidade de ligação com alta afinidade à β -tubulina, subunidade proteica dos microtúbulos, inibindo a sua polimerização ao mesmo tempo em que processos de degradação na extremidade oposta do microtúbulo provocam o colapso do citoesqueleto (Figura 1) (LACEY, 1988; KOHLER, 2001). A estruturação dos microtúbulos é altamente dinâmica e participa de variadas funções vitais, incluindo a motilidade, mitose e transporte de moléculas intracelulares em todos os eucariontes. A desestruturação deste delicado equilíbrio após contato com BZ leva inevitavelmente à morte dos nematoides sensíveis (LACEY, 1988; KOHLER, 2001).

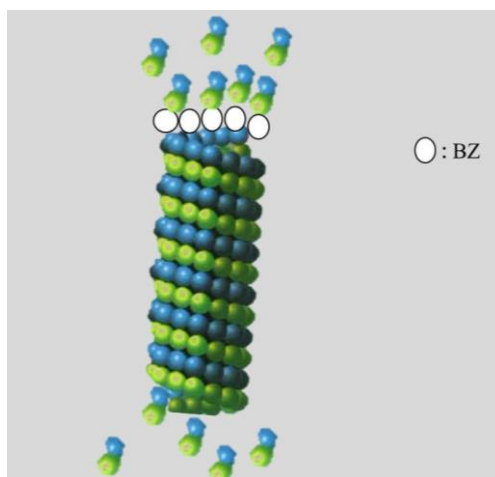


Figura 1. Mecanismo de ação dos benzimidazóis (BZ). Os BZ atuam por ligação à β -tubulina, impedindo polimerização adicional na extremidade de crescimento dos microtúbulos. Adaptado de Gasser e Von Samson-Himmelstjerna (2016).

2.2.2 Lactonas Macrocíclicas

As LM são classificadas como endectocidas, divididas em avermectinas (ivermectina,

abamectina e doramectina) e milbemicinas (moxidectina e milbemicina). Derivam de processos de fermentação de actinomicetos e possuem propriedades nematodocidas, inseticidas e acaricidas (FISHER; MROZIK, 1989; CAMPBELL, 2016). Essa variedade de funções tornou as LM um grande sucesso comercial. No Brasil, as LM foram amplamente divulgadas como a “solução” das endo e ectoparasitoses com vendas em torno de 290 milhões de reais para animais de produção (SINDAN, 2006). Estes valores demonstram a ampla utilização das LM no país para o controle de parasitos internos e externos dos animais domésticos, especialmente devido às suas diversas apresentações (KLAFKE, 2011).

As LM atuam como agonistas de elevada afinidade para a subunidade α dos canais de íons de cloro presentes em nematoides. Esses canais iônicos são compostos por cinco subunidades da proteína, três subunidades α , uma β e uma δ que são combinadas para formar um pentâmero. O ligante natural para esses canais iônicos é o glutamato (Glu), de modo que estes receptores são denominados de GluCl. Estes receptores estão localizados principalmente nas células musculares somáticas da faringe e do útero, e em neurônios associados, de modo que a exposição à ivermectina altera a mobilidade, fertilidade e alimentação. Quando as LM se ligam a estes receptores, aumenta a permeabilidade da membrana para o cloro, o que provoca a hiperpolarização da membrana da célula muscular e neural do nematoide (Figura 2). Consequentemente, ocorre uma paralisia do tipo flácida e morte do nematoide (MOTTIER; LANUSSE, 2001).

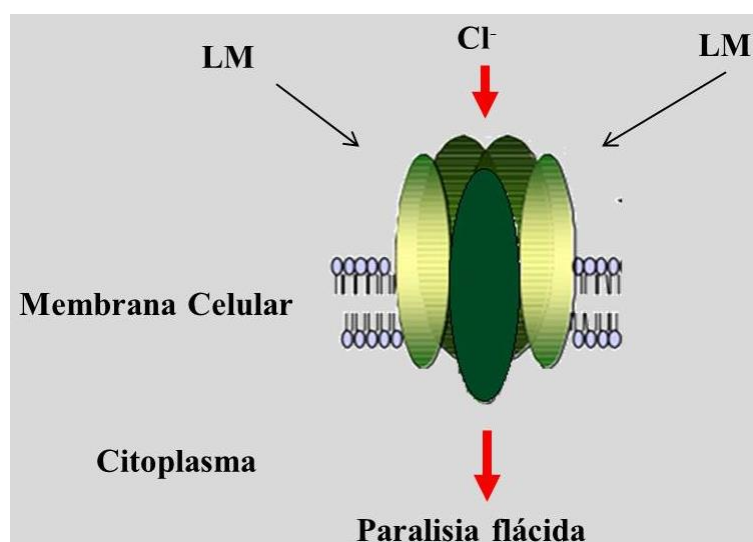


Figura 2. Representação esquemática dos canais iônicos de cloro sob ação de lactonas macrocíclicas. Adaptado de Mottier e Lanusse (2001).

2.2.3 Imidazotiazóis

Este grupo representa a segunda classe de anti-helmínticos que foram introduzidos no mercado, aproximadamente no final da década de 1960. O LEV é o fármaco mais utilizado do grupo em pequenos ruminantes. O LEV atua como agonista colinérgico sobre os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) encontrados na junção neuromuscular de nematoides. Os AChRs consistem em cinco subunidades em torno de um canal iônico central (MORENO-GUZMÁN et al., 1998). Quando ocorre a ligação do LEV a estes receptores os canais iônicos se abrem, aumenta a permeabilidade a sódio e as membranas das células musculares se despolarizam, resultando em contração muscular e paralisia espástica (MOTTIER; LANUSSE, 2001).

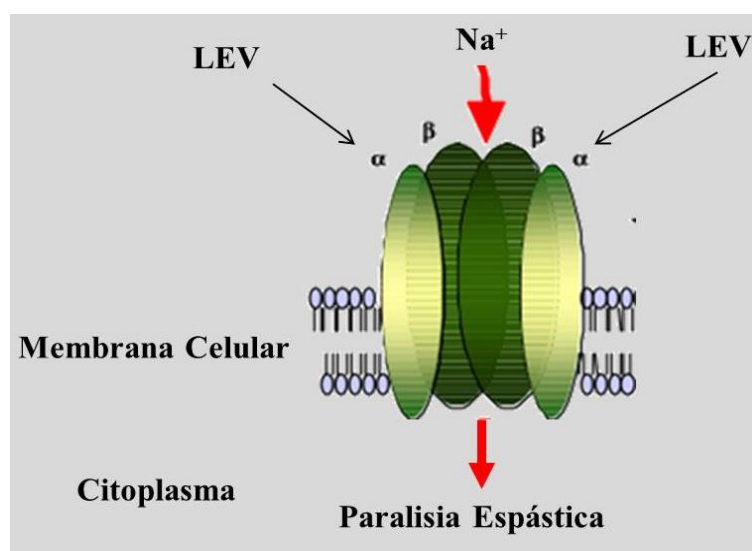


Figura 3. Representação esquemática do receptor nicotínico de acetilcolina sob ação do levamisol. Adaptado de Mottier e Lanusse (2001).

2.3 Resistência anti-helmíntica

O controle de nematoides, incluindo *H. contortus*, é realizado com a utilização de anti-helmínticos. Contudo, o uso intenso e inadequado desses fármacos, em poucas décadas acelerou o desenvolvimento de populações resistentes a todas as classes de anti-helmínticos de amplo espectro disponíveis no mercado. A RAH consiste na capacidade natural de espécies de nematoides gastrintestinais em tolerar uma dose de anti-helmínticos que seria eficaz para a maioria dos indivíduos de uma população sensível, sendo resultado de seleção natural após exposição de uma população de parasitos ao fármaco (PRICHARD, 1980; VADLEJCH et al.,

2014). A RAH já foi detectada mundialmente com ocorrências em todos os continentes, com exceção da Antártica (KAPLAN; VIDYASHANKAR, 2012, MARTÍNEZ-VALLADARES et al., 2013; BAGNALL et al., 2017; HERRERA-MANZANILLA et al., 2017).

Tendo em vista que a utilização dos anti-helmínticos sintéticos foi considerada a única forma de controle de nematoides gastrintestinais, surgiram diversas propostas de esquemas de tratamento para pequenos ruminantes. Dentre elas destacam-se o tratamento supressivo e o estratégico (PINHEIRO, 1983, EMBRAPA, 1994) que apesar de eficazes, contribuíram para o desenvolvimento de populações resistentes (MELO; BEVILAQUA, 2002; TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008). Além disso, algumas práticas comuns de manejo também favorecem o estabelecimento da RAH como a utilização prolongada do mesmo grupo de anti-helmínticos, alta frequência de tratamentos, a rápida rotação de princípios ativos e dosagens inadequadas (NICIURA et al., 2012; VADLEJCH et al., 2014). No Ceará, o uso inadequado de anti-helmínticos é o resultado de práticas como a utilização de dois a três princípios ativos e em média, três vermifugações anuais. Além disso, cerca de 48% dos criadores do Estado, tratavam todos os animais principalmente no período seco, quando a população de nematoides *in refugia* é baixa (MELO et al., 2009).

No Brasil, os primeiros relatos de resistência a anti-helmínticos foram descritos no Sul do país (DOS SANTOS; GONÇALVES, 1967). No Nordeste, o primeiro relato de suspeita de RAH foi em nematoides gastrintestinais de caprinos no Ceará (VIEIRA et al., 1989). Atualmente, a RAH para BZ, LM e LEV foi detectada em vários estados da região (RODRIGUES et al., 2007; AHID et al., 2007; BRITO et al., 2009; LIMA et al., 2010; COELHO et al., 2010; COSTA JÚNIOR et al., 2005; MELO et al., 2009, SANTOS et al., 2017).

Haemonchus contortus apresenta uma elevada capacidade de desenvolver RAH em poucos anos com o uso de drogas. Essa capacidade de sobrevivência se deve ao alto nível de variação genética em populações de parasitas sob seleção com anti-helmínticos. Os mecanismos de resistência são multifatoriais e se relacionam com uma série de alterações genéticas. Compreender esta variação genética é importante para interpretar associações aparentes de marcadores genéticos particulares com o fenótipo de resistência a fármacos e para identificar novos locais de resistência a medicamentos (PRICHARD, 2001; GILLEARD, 2013; GASSER; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, 2016).

Nesses nematoides os microtúbulos desempenham um papel importante no transporte de vesículas axonais. Eles são constituídos de dímeros de α e β -tubulina. Devido à distinção significativa de sua estrutura quaternária em nematoides, em comparação com outros

organismos, a β -tubulina foi identificada como um alvo importante para a terapia anti-helmíntica (HARDER, 2002). A composição dos receptores de glutamato e dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) é altamente complexa e específica para nematoides, como *H. contortus*, e sua especificidade os torna alvos atraentes de drogas para uma série de anti-helmínticos. Apesar da complexidade dos receptores alvo das drogas anti-helmínticas, a RAH é comum em várias regiões do mundo, a resistência induz a um aumento nos custos da produção e a necessidade de desenvolver novas estratégias de controle sustentáveis (GASSER; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, 2016). A seguir serão apresentados os mecanismos de resistência das principais classes anti-helmínticas.

2.3.1 Benzimidazóis (BZ)

Existem quatro isotipos de β -tubulina (Hco-tbb-iso-1 a 4) descritos em *H. contortus*, porém até o momento apenas o isotipo 1 é associado ao fenótipo de resistência (SAUNDERS et al., 2013). Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) localizados no gene codificante para o isotipo 1 da β -tubulina foram descritos como responsáveis pela resistência a BZ em trichostrongilídeos (KWA et al., 1994; PRICHARD et al., 2000; GHISI et al., 2007). Estes polimorfismos impedem a ligação dos BZ através de modificações estruturais na proteína (KWA et al. 1994; PRICHARD et al., 2000; GHISI et al., 2007). O primeiro SNP descrito localiza-se no códon 200 sendo uma transversão de timina por adenina que leva a tradução de tirosina (Tyr, TAC) ao invés de fenilalanina (Phe, TTC) (F200Y) (KWA et al., 1994). O segundo SNP foi descrito no códon 167 (F167Y) e consiste na mesma transversão da base e troca de aminoácidos traduzidos do F200Y (SILVESTRE; CABARET, 2002). O último SNP descrito localiza-se no códon 198 e consiste em uma transversão de adenina por citosina resultando na tradução de alanina (GCA) ao invés de glutamato (GAA) (E198A) (GHISI et al., 2007).

2.3.2 Lactonas Macrocíclicas

Estudos visando esclarecer mecanismos de resistência a LM demonstraram que o problema é mais complexo do que a situação dos BZ (GILLEARD, 2006). Alguns trabalhos indicam que resistência a LM em *H. contortus* pode estar associada a polimorfismos em alelos das subunidades glc-5 e lgc-37 dos canais de cloro-glutamato e cloro-GABA respectivamente (BLACKHALL et al., 1998; BLACKHALL et al., 2003). Substituições de

aminoácidos nesses canais podem alterar suas propriedades de ligação, resultando na redução da sensibilidade tanto ao ligante natural como ao anti-helmíntico (MCCAVERA et al., 2009).

A ivermectina (IVM) também é substrato para proteínas de transporte transmembranárias. As glicoproteínas-P (P-gp) são transportadores ABC que agem no transporte e expulsão de compostos das células, incluindo fármacos, e foram implicadas em casos de resistência múltipla (BLACKHALL et al., 1998; MOTTIER; LANUSSE, 2001; PRICHARD; ROULET, 2007; ARDELLI; PRICHARD, 2013; BYGARSKI et al., 2014). Processos de seleção para maior expressão de P-gp em isolados de *H. contortus* estão associados a elevados níveis de resistência a IVM (BLACKHALL et al., 1998; PRICHARD; ROULET, 2007) o que pode levar a identificação futura de marcadores.

Existem evidências de que alterações na β -tubulina de *H. contortus* devido à seleção com BZ também estejam envolvidas na resistência à ivermectina (MOTTIER; PRICHARD, 2008). Já foi verificado que uma região da P-gp se associa a tubulinas, porém, o significado fisiológico dessa ligação e sua associação com a resistência anti-helmíntica ainda não está definido. A seleção de células tumorais através de drogas que alteram a integridade das tubulinas foi associada a maior expressão da P-gp, que pode funcionar como um mecanismo de defesa que aumenta a expulsão de fármacos do meio intracelular. Dessa forma, é possível que a resistência a BZ esteja associada tanto a alterações na β -tubulina, quanto a uma maior expressão da P-gp o que pode criar um cenário fisiológico de múltipla resistência, neste caso tanto a BZ como a IVM (GEORGIS, 2007). Modelos moleculares demonstraram que a ivermectina interage diretamente com a tubulina de *H. contortus* mesmo em concentrações micromolares (ASHRAF et al., 2015). Também foi verificada alta frequência do SNP F200Y em indivíduos resistentes a LM que nunca foram expostos a BZ. Como a resistência a IVM foi relatada em locais onde a resistência a BZ já existia, polimorfismos na β -tubulina podem ter sido o primeiro passo para o desenvolvimento da resistência a LM (MOTTIER; PRICHARD, 2008).

2.3.3 Imidazotiazóis

Os mecanismos moleculares envolvendo a resistência a LEV em *H. contortus* ainda não estão totalmente esclarecidos (NEVEU et al., 2007). Foi verificada uma redução significativa nos níveis de transcrição de Hco-unc-29 e Hco-unc-63 em isolados resistentes de *H. contortus* (SARAI et al., 2013; WILLIAMSON et al., 2011). O transcriptoma de isolados

de *H. contortus* resistentes e sensíveis a LEV foi comparado e verificou-se uma maior expressão do fragmento transcrito HA17 nos isolados resistentes (NEVEU et al., 2007).

Formas truncadas de duas subunidades do gene do nAChR, Hco-unc-63 e Hco-acr-8 demonstraram estar presentes em populações resistentes e ausentes em isolados susceptíveis de *H. contortus* (FAUVIN et al., 2010, NEVEU et al., 2007, 2010, WILLIAMSON et al., 2011). Barrère et al. (2014) verificaram que a forma truncada do gene Hco-ACR-8, foi identificada em seis isolados resistentes de *H. contortus* a LEV e ausente em quatro isolados sensíveis. Após sequenciamento, foi verificada a ausência de 63 pares de base no exon 3 desse gene em isolados fenotipicamente resistentes ao LEV. Este resultado permitiu o desenvolvimento da primeira PCR convencional para o diagnóstico e monitoramento da resistência a levamisol em *H. contortus*

2.4 Métodos de diagnóstico de resistência anti-helmíntica

2.4.1 Testes *in vivo*

O teste de redução de contagem de ovos nas fezes (FECRT) foi o primeiro teste desenvolvido para avaliar a eficácia anti-helmíntica (PRESIDENTE, 1985) resultando em uma estimativa por comparação da contagem de ovos eliminados nas fezes (OPG) em animais tratados e não tratados, ou apenas um grupo, antes e após o tratamento (CABARET; BERRAG, 2004). A *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (WAAVP) recomenda um protocolo padronizado do FECRT para a detecção de RAH (COLES et al., 1992). Os grupos devem incluir entre 10 a 15 animais com OPG mínimo de 150 utilizando o método de McMaster (MAFF, 1986). As populações são consideradas resistentes em duas condições (i) a eficácia é inferior a 90%; (ii) a eficácia é menor que 95%, e nesse caso necessariamente o limite inferior do intervalo de confiança de 95% tem que ser menor que 90% (COLES et al., 1992). Resultados de FECRT podem sofrer interferência devido à variação da fecundidade entre as diferentes espécies de nematoides, a distribuição não uniforme dos ovos nas fezes e a contagem de OPG não refletir a carga parasitária (DEMELER et al., 2012). O FECRT é considerado o método mais prático para identificar a resistência no campo, sendo o teste mais utilizado para a detecção e monitoramento da RAH (CALVETE; URIARTE, 2013). Entretanto, o FECRT não é capaz de detectar a resistência quando menos de 25% da população de nematoides apresenta alelos resistentes (MARTIN et al., 1989).

O teste controlado de eficácia anti-helmíntica é considerado o método mais confiável para detectar a RAH *in vivo*, para confirmar os resultados do teste de redução de contagem de ovos nas fezes (FECRT) e para validar ensaios *in vitro* (PAPADOPOULOS, 2008). As orientações para realização do teste foram publicadas inicialmente por WOOD et al. (1995). Resumidamente, compara-se a carga parasitária de dois grupos de animais (n=6), um tratado com o anti-helmíntico testado e outro grupo não tratado (controle). Todos os animais são necropsiados e os parasitos adultos são recuperados, identificados e contados de acordo com os grupos experimentais. Quando a eficácia for abaixo de 95%, a população de nematoides é considerada resistente. Apesar de o teste controlado ser confiável, a necessidade de eutanásia de animais dificulta a ampla utilização deste método por questões éticas e financeiras (WOOD et al, 1995; COLES et al., 2006, PAPADOPOULOS, 2008).

2.4.2 Testes *in vitro*

O teste de eclosão de ovos (TEO) foi descrito primeiramente em 1976 e reformulado em 2006, é recomendado pela WAAVP como teste padrão *in vitro* para detecção da resistência aos BZ (LE JAMBRE, 1976; COLES et al., 1992; COLES et al., 2006). Foi desenvolvido baseado nas propriedades inibidoras do desenvolvimento embrionário dos ovos e conseqüentemente da eclosão das larvas (TAYLOR et al., 2002; COLES et al., 2006). Consiste na incubação dos ovos de nematoides na presença de uma série de concentrações de tiabendazol por 24-48 horas seguido de quantificação dos ovos e larvas de primeiro estágio (COLES et al., 2006). Existem algumas variações quanto à forma de mensurar a resistência aos BZ, seja através da CE50, utilizando uma única concentração considerada discriminante (0,1 µg/mL) (COLES et al., 2006; CUDEKOVÁ et al., 2010, CALVETE et al., 2014), pelo tipo de água utilizada ou formas de diluição do tiabendazol (VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009). O TEO apresenta boa correlação com resultados obtidos no FECRT (ALVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2006) indicando que pode ser uma alternativa para este teste sendo confiável e de baixo custo (CALVETE et al., 2014). Limitações do teste incluem baixa sensibilidade, similar ao FECRT (MARTIN et al., 1989).

O teste de desenvolvimento larvar (TDL) foi desenvolvido baseando na capacidade de alguns anti-helmínticos em impedir o desenvolvimento de larvas (GILL et al., 1995). O primeiro TDL foi descrito por COLES et al. (1988), onde ovos de nematoides são incubados em meio nutritivo contendo *Escherichia coli* com resultados positivos para detecção de resistência aos BZ. A variação do teste utilizando extrato de levedura como nutriente

possibilitou a detecção da resistência aos BZ e ao LEV (TAYLOR, 1990). Finalmente, um protocolo para IVM, BZ, LEV e pirantel com adição de solução de Earle foi testado em larvas de *H. contortus*, *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus colubriformis* resultando em curvas dose-resposta para todos os anti-helmínticos (HUBERT; KERBOEUF, 1992). Outra variação da metodologia denominada de TDL em micro-ágar (do inglês MALDT, *microagar larval development test*) inclui a utilização de placas de cultura celular e matriz de ágar contendo o anti-helmíntico (LACEY et al., 1991; COLES et al. 2006). A principal desvantagem do MALDT é não permitir a contagem por microscopia invertida dos ovos e larvas diretamente nos poços das placas, necessitando de passos adicionais para chegar ao resultado final (VÁRADY et al., 2009). Tanto o TDL como o MALDT podem detectar pequenas diferenças de RAH entre populações de nematoides bem como quantificar o nível de resistência a IVM (DOLINSKÁ et al., 2013).

O teste de migração e motilidade larvar (TML) baseia-se na paralisia muscular como efeito farmacológico nos nematoides visualizada por meio de redução da migração através de uma barreira permeável (FORTES et al., 2013). A avaliação da motilidade larvar é realizada com o uso de ágar e peneiras para separação das L3 que migraram (resistentes) ou não (suscetíveis) (KOTZE et al., 2006). Esta versão é utilizada com sucesso para detectar a resistência a IVM e moxidectina em variadas espécies de parasitas nematoides de ruminantes (DEMELER et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013; FORTES et al., 2013). Porém, precisa ser aprimorado para identificação de resistência em amostras mistas de campo para que possa ser utilizado no monitoramento da RAH.

O Teste de inibição da alimentação larvar (TIAL) baseia-se em um estudo descrito para nematoides adultos e consiste na avaliação de redução da ingestão de bactérias por larvas de primeiro estágio (GEARY et al., 1993). O TIAL é pouco utilizado para o diagnóstico de resistência anti-helmíntica devido a dificuldades técnicas e a necessidade de equipamentos complexos como microscópios invertidos de fluorescência para sua realização.

2.4.3 Diagnóstico molecular

A RAH é um fenômeno hereditário resultante de alterações genéticas que são responsáveis pelo fenótipo de resistência (MORTIER; PRICHARD, 2008). Dessa forma, é possível desenvolvimento de técnicas moleculares para identificar a resistência precocemente, com o objetivo de promover mudanças no controle e traçar um panorama mundial da resistência (PAPADOPOULOS, 2008). Os métodos moleculares estão totalmente

padronizados apenas para o diagnóstico de resistência a BZ. Recentemente foi descrita a primeira PCR para o diagnóstico de resistência a levamisol (BARRÈRE et al., 2014). No entanto, para LM a resistência se caracteriza como poligênica, o que dificulta a padronização de um único método para diagnóstico molecular.

Os primeiros métodos moleculares de diagnóstico da resistência a BZ enfocaram o SNP F200Y. Com a PCR alelo específica (AS-PCR) foi possível diferenciar o genótipo resistente e sensível de *H. contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* utilizando *primers* específicos para cada alelo em reações diferentes (KWA et al., 1994). Posteriormente o teste foi modificado para *Teladorsagia circumcincta* utilizando dois pares de *primers* em uma mesma reação, um par universal e outro específico para os alelos interno ao par universal. Os fragmentos gerados, no caso de um indivíduo heterozigoto, são: um fragmento universal e dois fragmentos menores específicos para cada alelo (ELARD et al., 1999). Associada a enzimas de restrição (RFLP-PCR), podemos identificar resistência a BZ para *H. contortus*, *T. colubriformis* e *T. circumcincta* (SILVESTRE; HUMBERT, 2000, TIWARI et al., 2006). Diversos trabalhos foram publicados utilizando PCR convencional para identificação de resistência a BZ em populações de nematoides (SILVESTRE; HUMBERT, 2000; TIWARI et al., 2006; CUDEKOVÁ et al., 2010; NICIURA et al., 2012). Dentre os requerimentos necessários desta metodologia temos: equipamento de eletroforese em gel de agarose para visualizar os resultados, elevado número de nematoides individuais para obter frequências alélicas significativas e a necessidade de conhecimento prévio sobre o SNP a ser testado (GHISI et al., 2007; WALSH et al., 2007).

As técnicas de sequenciamento têm sido exploradas para o diagnóstico de resistência a BZ. A técnica de pirosequenciamento baseada no princípio de sequenciamento por síntese é uma metodologia rápida e adequada para testar vários SNP (VON SAMSON-HIMMELSTJENA et al., 2007). Um teste de pirosequenciamento específico foi estabelecido para detectar e quantificar os SNP associados à resistência a BZ em populações de *H. contortus* mantidas em laboratório e isoladas no campo. Foi verificada concordância entre os resultados da qPCR e do pirosequenciamento em diferentes laboratórios para identificação do SNP F200Y (VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009). O pirosequenciamento associado ao uso de fluoresceína para identificação de ovos de *H. contortus* apresentou uma maior sensibilidade quando comparado ao FECRT para identificação da resistência a BZ mesmo antes do tratamento (BARRÈRE et al., 2013).

A PCR em tempo real (qPCR) consiste na amplificação e detecção simultânea de produtos, permitindo calcular a proporção de cada variante alélica utilizando DNA extraído de

nematoides individualmente ou em *pool* (ALVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2005; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009). Dentre as variantes desta metodologia podemos citar a detecção do SNP F200Y em *H. contortus* utilizando a TaqMan (WALSH et al., 2007; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009) e o SYBR Green para o SNP F200Y (ALVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2005) e para os SNP F167Y, E198A E F200Y (SANTOS et al., 2014). Ressalta-se que os resultados da análise molecular da resistência a BZ refletem melhor a realidade quando pelo menos dois SNP são testados (VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009; SANTOS et al., 2017).

3. JUSTIFICATIVA

A RAH é considerada um dos principais entraves na produção de ovinos no estado do Ceará. Contudo, o seu diagnóstico na maioria das vezes é realizado apenas por meio de técnicas fenotípicas, que apresentam baixa sensibilidade, e detectam a resistência tardiamente para avaliar ou promover mudanças nas medidas de controle. O diagnóstico molecular para BZ é realizado por técnicas já padronizadas. Contudo, para LM e LEV, os mecanismos de resistência ainda não estão totalmente esclarecidos. Existem evidências de que alterações na expressão de genes específicos associadas com a presença de polimorfismos no gene codificante para β -tubulina de *H. contortus*, responsáveis pela resistência a BZ, possam levar também a resistência a LM. A resistência a LEV foi associada a uma deleção de 63 pb no gene Hco-acr-8 dos nAChR. Sendo assim, fica evidente a necessidade de avaliar a possível relação entre a resistência a LM e a BZ, padronizar métodos de diagnóstico moleculares para o diagnóstico precoce de RAH e por meio destes realizar pesquisas que investiguem a atual situação da resistência anti-helmíntica em populações de *H. contortus* de ovinos no estado do Ceará.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

A resistência anti-helmíntica persiste em populações de nematoides gastrintestinais de ovinos do estado do Ceará. Existe relação entre os mecanismos de resistência a BZ e a LM em populações de *H. contortus*. Além disso, é possível realizar o diagnóstico de resistência a LEV por meio de PCR em tempo real.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Avaliar o estado da resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de ovinos no Ceará, assim como investigar a relação entre as resistências a BZ e LM e padronizar técnica de diagnóstico de resistência molecular a LEV em *H. contortus*.

5.2 Objetivos Específicos

- Realizar um levantamento fenotípico e molecular da situação atual da resistência a BZ em nematoides gastrintestinais de ovinos no estado do Ceará;
- Determinar as frequências de alelos sensíveis e resistentes dos SNP F200Y, F167Y e E198A no gene codificante para β -tubulina de populações de *H. contortus* isolados no estado do Ceará;
- Avaliar a relação entre seleção de *H. contortus* resistentes aos BZ e resistência à LM;
- Comparar a frequência de alelos para os SNP F200Y, F167Y e E198A em populações de *H. contortus* submetidos à pressão de seleção com BZ e LM e às duas classes simultaneamente;
- Padronizar PCR em tempo real para o diagnóstico de resistência a LEV em populações de *H. contortus*
- Realizar um levantamento molecular da situação atual da resistência a LEV em nematoides gastrintestinais de ovinos no estado do Ceará;

6. CAPITULO I

Altos níveis de resistência a benzimidazóis e do SNP F167Y no isotipo 1 da β -tubulina em populações de *Haemonchus contortus* do Estado do Ceará, Brasil

**High levels of benzimidazole resistance and β -tubulin isotype 1 SNP F167Y in
Haemonchus contortus populations from Ceará State, Brazil**

Períodico: Small Ruminant Research, v. 14, p.48–52 (Publicado em Janeiro de 2017)

Qualis: B1

1 **High levels of benzimidazole resistance and β -tubulin isotype 1 SNP F167Y in**
2 ***Haemonchus contortus* populations from Ceará State, Brazil**

3
4 Jessica Maria Leite dos Santos^a; Jomar Patrício Monteiro^b; Wesley Lyevertton Correia
5 Ribeiro^a; Iara Tersia Freitas Macedo^a; José Vilemar de Araujo Filho^a; Weibson Paz Pinheiro
6 Andre^a; Paulo Ricardo Monteiro Araújo^c; Janaelia Ferreira Vasconcelos^d; Edilson Pereira de
7 Freitas^d; Ana Lourdes Fernandes Camurça-Vasconcelos^a; Luiz da Silva Vieira^b; Claudia
8 Maria Leal Bevilaqua^a

9
10 ^aPrograma de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/Universidade Estadual do Ceará ,
11 Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará - UECE, 60714-903, Fortaleza,
12 CE, Brazil

13 ^bEmbrapa – Caprinos e Ovinos - EMBRAPA, Estrada Sobral/Groaíras, 62010-970, Sobral,
14 CE, Brazil

15 ^c Instituto Superior de Teologia Aplicada - INTA, 62050-100, Sobral, CE

16 ^d Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA, 62.040-370, Sobral, CE

17 * Corresponding author: Dra. Claudia Bevilaqua.

18 Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/FAVET/UECE.

19 Av. Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi.

20 CEP 60714-903.

21 Fortaleza, Ceará, Brazil.

22 Phone: + 55 85 31019853 Fax: + 55 85 31019840

23 E-mail: bevilaqua.uece@gmail.com

24

25

26

27 **Resumo**

28 *Haemonchus contortus* é o nematoide parasito mais prevalente em áreas tropicais, e a
29 resistência anti-helmíntica é um problema global. O objetivo do presente estudo foi
30 caracterizar a resistência ao benzimidazol (BZ) em populações de nematoides
31 gastrointestinais no estado do Ceará, Brasil, por meio do teste de eclosão de ovos (TEO) e em
32 populações de *H. contortus* utilizando a reação em cadeia pela polimerase quantitativa em
33 tempo real (qPCR). A pesquisa foi realizada em 20 propriedades rurais. Amostras de fezes
34 foram coletadas em *pool* de no mínimo 40 animais de cada fazenda. Cinco mil L3 de cada
35 fazenda foram utilizadas para infectar animais livres de nematoides na Embrapa Caprinos e
36 Ovinos para o fornecimento de ovos para os testes fenotípicos e moleculares. No TEO a EC50
37 média foi de 2,46 µg/mL (\pm 0,58 µg/mL) e a resistência a BZ foi detectada em todas as
38 fazendas pesquisadas. As frequências médias de alelos resistentes nos códons F200Y e F167Y
39 foram 34,16% (\pm 12,13%) e 58,31% (\pm 18,89%), respectivamente. As frequências de alelos
40 resistentes para o F167Y foram maiores do que as do F200Y na maioria das localidades. Foi
41 também investigada a influencia da utilização específica de BZ sobre as frequências de alelos
42 resistentes. Foram selecionadas três populações de nematoides com base na prevalência de
43 SNP resistente em F200Y e F167Y da seguinte forma: maior frequência do SNP F200Y,
44 maior frequência do SNP F167Y e frequências semelhantes em ambas as posições. Os
45 tratamentos anti-helmínticos incluíram dois BZ (oxfendazol e albendazol) e ivermectina. Três
46 animais por população por tratamento foram infectados com 5.000 L3, e os ovos de
47 nematoides foram coletados para teste molecular antes e após os tratamentos com anti-
48 helmínticos. Os resultados mostraram a seleção preferencial do SNP F167Y em resposta ao
49 oxfendazol, um aumento nas frequências de SNP resistentes em geral em resposta ao
50 albendazol e pouca alteração em relação às situações de pré-tratamento em resposta à
51 ivermectina. Os resultados confirmam que a resistência BZ é alta. O alelo resistente no SNP

52 F167Y em *H. contortus* prevalece no Estado do Ceará e há evidências que esse resultado pode
53 ser devido à utilização de oxfendazol nos últimos anos.

54 Palavras-chave: PCR em tempo real; Nematoides; Ovelhas; Benzimidazol; Resistência anti-
55 helmíntica

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78 **Abstract**

79 *Haemonchus contortus* is the most prevalent parasitic nematode in tropical areas, and
80 anthelmintic resistance is a global problem. Our objective was to characterize benzimidazole
81 (BZ) resistance in gastrointestinal nematode populations in Ceará State, Brazil, using the egg
82 hatch test (EHT) and in *H. contortus* populations using quantitative real-time polymerase
83 chain reaction (qPCR). Twenty locations were surveyed, and fecal samples were collected
84 from a minimum of 40 animals from each farm and pooled. Five thousand L3 from each farm
85 were used to infect single animals at Embrapa (Brazilian Agricultural Research Company) to
86 provide a source of eggs for both phenotypical and molecular tests. The mean EHT was 2.46
87 $\mu\text{g/mL}$ ($\pm 0.58 \mu\text{g/mL}$), and BZ resistance was detected at all surveyed locations. The mean
88 resistant allelic frequencies at positions F200Y and F167Y were 34.16% ($\pm 12.13\%$) and
89 58.31% ($\pm 18.89\%$), respectively. The resistant allelic frequencies at F167Y were higher than
90 those at F200Y in most studied locations. We also investigated the possibility that specific BZ
91 utilization may influence resistant allelic frequencies. We selected three nematode populations
92 based on the resistant SNP prevalence at F200Y and F167Y as follows: higher frequency at
93 SNP F200Y, higher frequency at SNP F167Y and similar frequencies at both positions.
94 Anthelmintic treatments included two BZs (oxfendazole and albendazole) and ivermectin.
95 Three animals per population per treatment were infected with 5,000 L3, and nematode eggs
96 were collected for molecular test before and after anthelmintic treatments. The results showed
97 preferential selection of SNP F167Y in response to oxfendazole, an increase in resistant SNP
98 frequencies in general in response to albendazole and little change in relation to pre-treatment
99 situations in response to ivermectin. Our results confirm that BZ resistance is common. The
100 resistant allele at SNP F167Y in *H. contortus* prevails in Ceará State, and we provide
101 evidence that this result may be due to the utilization of oxfendazole in recent years.

102 Key-words: Real-time PCR; nematodes; sheep; benzimidazoles; anthelmintic resistance

103

104 **1. Introduction**

105

106 Gastrointestinal nematodes of the genus *Haemonchus* constitute a major cause of loss
107 for livestock production in tropical and subtropical areas. Parasites are controlled using
108 various anthelmintics, which exert selection pressure resulting in anthelmintic resistance
109 (Torres-Acosta et al., 2012). Benzimidazoles are among the most used anthelmintics in
110 Northeastern Brazil (Melo et al., 2009), and BZ resistance is a common scenario worldwide
111 (Torres-Acosta et al., 2012; Sargison, 2012). Traditional methods to detect BZ resistance
112 include the fecal egg count reduction test (FECRT) and egg hatch test (EHT), which have low
113 sensitivity (Martin et al., 1989). There are also polymerase chain reaction (PCR) tests that
114 target BZ resistance alleles in *H. contortus* through the detection of single nucleotide
115 polymorphisms (SNPs) in the β -tubulin isotype 1 gene (Tiwari et al., 2006; Barrère et al.,
116 2012; Santos et al., 2014). Resistance at SNP F200Y is more frequent (Barrère et al., 2012,
117 2013, Brasil et al., 2012; Chaudhry et al., 2015), although there are locations where resistance
118 prevails at SNP F167Y and SNP E198A (Santos et al., 2014; Redman et al., 2015). Recent
119 studies using *H. contortus* eggs isolated from sheep carrying natural mixed infections
120 concluded that pasture-collected samples can be used for genetic tests, that BZ resistance may
121 be estimated using only isotype 1 gene analysis and that molecular tests are a cost-effective
122 alternative to FECRT and EHT (Barrère et al., 2013). The objectives of this study were to
123 characterize BZ resistance in gastrointestinal nematode populations from sheep in Ceará
124 State, northeast Brazil, by using EHT and qPCR and to evaluate the influence of commonly
125 used anthelmintic treatments on resistant SNP frequencies.

126

127 **2. Materials and Methods**

128

129

130 2.1 Animal welfare

131

132 Animal maintenance was performed in accordance with internationally accepted
133 standard guidelines for experimental animal use (Protocol numbers: 1285478/2014 (UECE)
134 and 010/2015 (Embrapa)).

135

136 2.2 Populations

137

138 Parasite population samples were obtained from 20 farms in different municipalities
139 distributed throughout Ceará State (Fig. 1). All farmers answered a management practice
140 questionnaire, and feces were collected from at least 40% of the animals from each herd
141 (approximately 40 animals per farm). Samples were pooled per farm at Embrapa (Brazilian
142 Agricultural Research Company) and cultured to obtain third stage larvae (L3). At least 100
143 L3 were identified per sample by standard microscopy. One 3-month-old worm-free donor
144 sheep was orally infected with 5,000 L3 from each farm (20 sheep total) to provide parasite
145 eggs for experimental tests. The BZ susceptible *H. contortus* isolate *Inbred-susceptible-*
146 *Edinburgh* (ISE) (Roos et al., 2004) was used as a reference for susceptibility in molecular
147 tests.

148

149 2.3 Anthelmintic treatment effects on *H. contortus* SNP frequencies

150

151 Three populations were selected due to specific SNP frequency distributions:
152 population Icó (16) with higher resistant allelic frequency at SNP F167Y, population Sobral
153 (3) with higher resistant allelic frequency at SNP F200Y, and population Canindé (5) with
154 similar frequencies of resistant alleles at both loci.

155 The experimental design was a 3 by 3 combination (three populations and three
156 anthelmintic treatments) with three worm-free 3-month-old sheep per group (27 animals
157 total). Each group was infected with 5,000 L3 per animal from one parasite population and
158 subjected to a single anthelmintic treatment: oral oxfendazole (5 mg/kg), oral albendazole (5
159 mg/kg) and oral ivermectin (200 µg/kg). Feces were collected from all animals before and
160 after treatments (10 days for BZ and 14 days for ivermectin), and the eggs were recovered and
161 pooled per group for DNA extraction and molecular tests as described below.

162

163 *2.4 Egg hatch test*

164

165 Eggs were recovered as previously described (Hubert and Kerboeuf, 1992). EHT was
166 performed using eggs obtained from donor animals as described above (2.2 Populations),
167 representing each farm, using thiabendazole (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in six
168 concentrations ranging from 0.05 to 1.6 µg/mL (Coles et al., 1992).

169

170 *2.5 DNA extraction*

171

172 Genomic DNA from each nematode population was extracted from 10,000 eggs
173 obtained from previously infected animals. DNA was also extracted from larvae and adult
174 males and females from population 9. In general, DNA extraction was performed as
175 previously described with the following modifications in material disruption: samples (eggs,
176 larvae or adults) were suspended in digestion buffer (0.2% SDS, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-
177 HCl, 0.4 mg/mL proteinase K, 100 µg/mL RNase, pH 8.0) and disrupted by shaking with 1
178 mm zirconia/silica beads in a Mini-BeadBeater-16 (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA)
179 (Santos et al., 2014).

180

181 2.6 Quantitative real-time PCR (qPCR)

182

183 All qPCR tests were performed in triplicate using primers specific for *H. contortus*
184 SNPs: F167Y, E198A and F200Y sensitive and resistant alleles, as previously described
185 (Santos et al., 2014). Primer annealing sites in *H. contortus* were checked for specificity in
186 comparison to other nematode species found in small ruminant flocks in Ceará State using the
187 software MUSCLE (Edgar, 2004). We estimate that, considering a genome size of 370 Mb for
188 *H. contortus* and 32 cells per egg, the amount of egg genomic DNA placed in each qPCR
189 reaction represented approximately 900 individuals (Laing et al., 2013). Field isolate 9 was
190 randomly chosen for SNP frequency comparison between DNA samples from eggs (10,000),
191 larvae (10,000) and adult males and females (20 of each).

192

193 2.7 Data analysis

194

195 EC50 determination from the EHT data used probit analysis (SPSS for Windows
196 version 22.0, IBM Corporation, Armonk, NY, USA), and nematode populations were
197 considered resistant when $EC_{50} \geq 0.1 \mu\text{g/mL}$ (Coles et al., 1992).

198 The threshold cycle (Ct) for qPCR reactions was determined by the software Realplex
199 2.2 (Eppendorf, Hamburg, Germany) using default parameters, and allele frequencies were
200 estimated as previously described (Germer et al., 2000). Parasite populations were defined as
201 resistant if the percentage of resistant *H. contortus* was above 10%, as estimated by the square
202 of resistant allelic frequencies at each locus, and assuming that populations are in Hardy-
203 Weinberg equilibrium (Barrère et al., 2013). For allelic frequency comparisons, the resistant
204 SNP frequencies before and after treatment as well as between different life stages were
205 subjected to t-tests with Welch's correction ($P < 0.05$) (Graphpad Prism Software for Windows
206 v 6.07, La Jolla, CA, USA).

207 3. Results

208

209 3.1 Flock management practices

210

211 Approximately 74% of the studied farms follow semi-intensive production practices.
212 Rotational grazing was not employed, and anthelmintic dosage was determined based on
213 visual weight estimations. Eight farmers (41.2%) reported the immediate integration of newly
214 acquired animals into the flock. Approximately 58% treat all animals 3 to 4 times per year,
215 mainly during the dry season. BZ and macrocyclic lactones were the most used anthelmintic
216 classes. Oxfendazole was the most common BZ used (69.4%). All farmers reported low
217 efficacy and have ceased BZ utilization for at least one year.

218

219 3.2 Mean nematode genera frequencies

220

221 *Haemonchus* spp. was the most predominant nematode genus (85.15%), but
222 *Trichostrongylus* spp. (10.84%), *Oesophagostomum* spp. (3.52%) and *Cooperia* spp. (0.52%)
223 were also present.

224

225 3.3 Egg hatch test (EHT)

226

227 EC50 results were above 0.1 µg/mL in all studied populations (Fig. 1). The highest
228 EC50 observed was 3.49 µg/mL for nematodes from population 16, and population 3 was the
229 lowest at 1.65 µg/mL.

230

231 3.3 Quantitative real-time PCR (qPCR)

232

233 ISE isolate allele frequencies for SNP F200Y were as expected, at 97.62% for the
234 sensitive allele and 100% for the sensitive alleles at the remaining loci. Resistant SNP
235 frequencies found in the surveyed locations are shown in Fig. 1. Resistance at SNP E198A
236 was detected in only five isolates, albeit at very low frequencies (0.02 – 0.13%). The isolates
237 from farms 3 and 20, both located in Sobral, showed the highest frequencies of resistant
238 alleles at SNP F200Y at 63.96% and 64.58.7%, respectively. The isolates from farms 7 and 12
239 showed the highest frequencies of resistant alleles at SNP F167Y at 77.49% and 78.40%,
240 respectively. All studied populations presented resistant nematode frequencies above 10%.
241 The allele frequencies for different parasite life stages from population 9 are shown in Table
242 1.

243

244 *3.4 Influence of anthelmintic treatments in H. contortus populations with differing resistant* 245 *allelic frequencies*

246

247 The results obtained for SNP allelic frequencies are shown in Table 2. Oxfendazole
248 treatment increased the resistant allelic frequencies for SNP F167Y and decreased the
249 resistant allelic frequencies for SNP F200Y. Albendazole treatment slightly increased
250 resistance in both tested SNPs, with the exception of population 3, in which the resistant
251 allelic frequencies for SNP F200Y decreased. Ivermectin treatment resulted in no change in
252 the resistant allelic frequencies for both tested SNPs.

253

254 **4. Discussion**

255

256 The presence of BZ resistance in the State of Ceará is no novelty (Vieira et al., 1989;
257 Melo et al., 2009; Santos et al., 2014); however, existing studies are limited to surveying one
258 or just a few locations. This approach is not adequate considering that Ceará (area 142,832

259 km²) is as large as or larger than many European countries. We previously reported high
260 frequencies of BZ resistance at SNP F167Y in properties within Ceará State. This profile
261 differs from other regions where resistance at SNP F200Y prevails (Barrère et al., 2012, 2013;
262 Brasil et al., 2012; Redman et al., 2015, Chaudhry et al., 2015), and the reasons for this
263 phenomenon are not clear.

264 All studied populations presented BZ resistance according to the EHT results, and we
265 maintain that the resistant allele for SNP F167Y prevails in Ceará State, expanding upon our
266 previously obtained results (Santos et al., 2014). Sheep production in Ceará State usually
267 involves very small flocks, with commerce restricted to local markets with limited animal
268 dislocation over long distances (Hermuche et al., 2013), which may explain the detected
269 patterns and their differences from other Brazilian states (Brasil et al., 2012). Local animal
270 movement may be a factor in the prevalence of resistance at SNP F167Y within the State,
271 whereas limited interstate movement appears to have kept resistance at SNP F200Y at very
272 low levels (Redman et al., 2015). It is interesting to note that population 3, located in Sobral,
273 acquired some of its animals through auctions from Embrapa, which includes in its
274 composition animals from outside the State, and in both these locations, BZ resistance
275 prevailed at SNP F200Y. Trace amounts of the resistant allele for SNP E198A were found in
276 only four isolates (0.02-0.13%), which to our knowledge is the first time this resistant SNP
277 has been found in Brazil. SNP E198A has rarely been found in *H. contortus*, with the
278 exception of some populations in India (Chaudhry et al., 2015). Furthermore, questionnaire
279 results have highlighted oxfendazole utilization was a common practice in the past five years,
280 which may have affected the selection of SNPs in the β -tubulin gene in field populations.

281 It is also important to note that even though we used samples from mixed infections,
282 with the exception of the ISE isolate, the differences observed in primer annealing sites in the
283 aligned sequences of the β -tubulin gene for different nematode species make it unlikely that
284 DNA other than *H. contortus* was amplified (results not shown). We also aimed at designing

285 the primers at intron/exon junctions because sequence variations between species are more
286 frequent at introns. Additionally, *Haemonchus* spp. frequencies observed were for the most
287 part above 85%, so even if nonspecific amplification occurred, it should not be sufficient to
288 interfere with the allelic frequencies. Resistant SNP frequency comparisons between eggs and
289 adults showed significant differences, mainly for adult males, but may be due to the low
290 number of adult individuals sampled (Table 1). This finding suggests that the qPCR results
291 for this type of study should be more reliable when using DNA obtained from a high number
292 of individuals. Nevertheless, most of the observed differences were very low in magnitude.

293 The anthelmintic treatment experiment showed that oxfendazole selected for
294 resistance at SNP F167Y in all tested populations, with a concomitant decrease in the resistant
295 allelic frequency at SNP F200Y. Likewise, a larval selection study using thiabendazole
296 observed preferential selection of resistance at SNP E198A over SNP F200Y (Kotze et al.,
297 2012). To our knowledge, this result is the first report of resistance selection for SNP F167Y,
298 and it may be possible that BZ and β -tubulin interactions differ considering different BZ
299 molecules and amino acid changes in the protein. It is also known that different BZs presented
300 varied affinities for proteins extracted from susceptible and resistant *H. contortus* strains
301 (Lubega and Prichard, 1990).

302 Albendazole increased the allelic resistance frequencies for both SNPs with the
303 exception of population 3, where resistance at SNP F200Y originally prevailed, and we
304 observed a marked increase in resistance at SNP F167Y with a slight decrease in resistance at
305 SNP F200Y. For the most part, our results are similar to previously observed situations at the
306 dosage used (5 mg/kg), and we did not test higher doses to confirm the previously reported
307 selection for SNP F200Y (Barrère et al., 2012). Furthermore, the SNP frequency alterations
308 observed in population 3, and similarly for oxfendazole, may be a result of double
309 heterozygote survival and may also be associated with the previously suggested
310 incompatibility of multiple resistance SNPs at the same allele (Barrère et al., 2012; Mottier

311 and Prichard, 2008).

312 Ivermectin showed little effect in the original SNP frequencies even though there are
313 indications of a possible relationship between resistance to ivermectin and the presence of
314 resistant polymorphisms in the β -tubulin gene (Mottier and Prichard, 2008). Further rounds of
315 selection may be necessary to observe an actual biological effect because the presence of
316 these mutations does not affect polymerization and IVM binding to β -tubulin in *H. contortus*
317 populations (Ashraf et al., 2015).

318 In conclusion, the detection of β -tubulin gene polymorphisms F200Y, F167Y and
319 E198A in eggs of *H. contortus* by qPCR using samples originating from mixed infections,
320 which is usually the case in field situations, is an efficient method for large-scale surveys for
321 BZ resistance. The resistant allele at SNP F167Y is frequent in Ceará State, but the other two
322 loci should also be considered. Here, we provide evidence that the utilization of specific BZs,
323 in this case albendazole and oxfendazole, may influence the prevalence of specific SNPs in
324 different geographic regions. Further studies are necessary to investigate the details of
325 interaction between BZs and β -tubulin isotype 1 variants. Finally, we confirm that BZ
326 resistance is widespread in Ceará and is unlikely to decrease in the next years, and farmers
327 should be made aware of such information.

328

329 **Conflicts of interest**

330

331 The authors declare that they have no conflicts of interest.

332

333 **Acknowledgements**

334

335 The authors would like to thank CNPq (projects 159094/2013-5 and 303018/2013-5)
336 and FUNCAP (project BP2-0107-00074.01.00/15) for financial support.

337

338 **References**

339 Ashraf, S., Mani, T., Beech, R., Prichard, R., 2015. Macrocyclic lactones and their
340 relationship to the SNPs related to benzimidazole resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* 201,
341 128-134.

342 Barrère, V., Keller, K., von Samson-Himmelstjerna, G., Prichard, R.K., 2013. Efficiency of a
343 genetic test to detect benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* nematodes in sheep
344 farms in Quebec, Canada. *Parasitol. Int.* 62: 464– 470.

345 Barrère, V., Alvarez, L., Suarez, G., Ceballos, L., Moreno, L., Lanusse, C., Prichard, R.K.,
346 2012. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single
347 nucleotide polymorphisms on the b-tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus*
348 *contortus*. *Vet. Parasitol.* 186, 344–349.

349 Brasil, B.S., Nunes, R.L., Bastianetto, E., Drummond, M.G., Carvalho, D.C., Leite, R.C.,
350 Molento, M.B., Oliveira, D.A., 2012. Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and
351 *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in in Brazil. *Int. J.*
352 *Parasitol.* 42, 469–479.

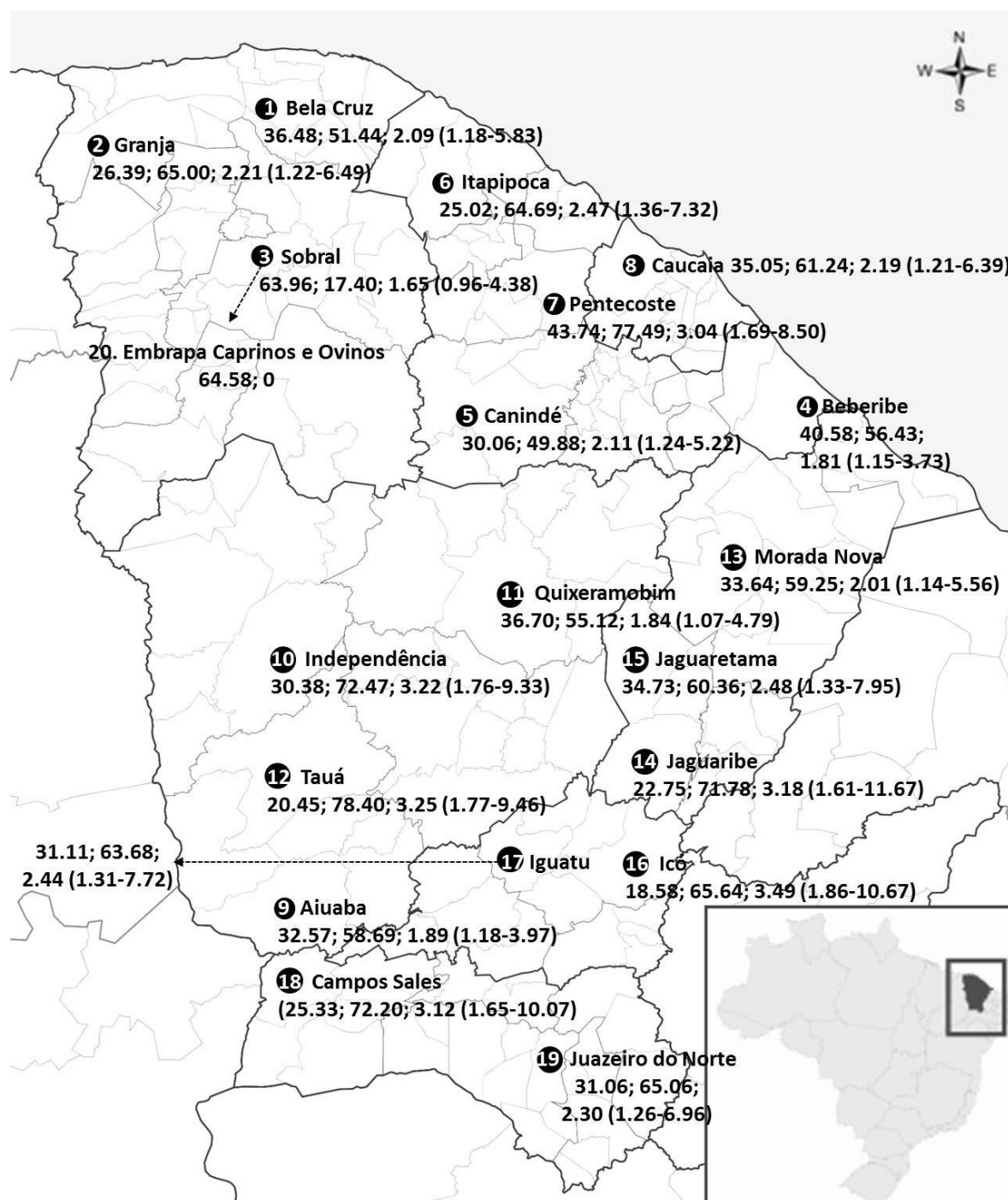
353 Chaudhry, U., Redman, E.M., Raman, M., Gilleard, J.S., 2015. Genetic evidence for the
354 spread of a benzimidazole resistance mutation across southern India from a single origin in
355 the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 45, 721-728.

356 Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J.,
357 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P)
358 methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance.
359 *Vet. Parasitol.* 44, 35 - 44.

360 Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high
361 throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.

- 362 Germer, S., Holland, M.J., Higuchi, R., 2000. High-throughput SNP allele-frequency
363 determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. *Genome Res.* 10,258–266.
- 364 Hermuche, P., Maranhão, R., Guimarães, R., Júnior, O., Gomes, R., Paiva, S., Mcmanus, C. 2013.
365 Dynamics of Sheep Production in Brazil. *ISPRS Int. J. Geo-Inf.*, v. 2, p. 665-679.
- 366 Hubert, J., Kerboeuf, D., 1992. A microlarval development assay for the detection of
367 anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet. Rec.* 130, 442-446.
- 368 Kotze, A.C., Cowling, K., Bagnall, N.H., Hines, B.M., Ruffell, A.P., Hunt, P.W., Coleman,
369 G.T., 2012. Relative level of thiabendazole resistance associated with the E198A and F200Y
370 SNPs in larvae of a multi-drug resistant isolate of *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 2,
371 92–97.
- 372 Laing, R., Kikuchi, T., Martinelli, A., Tsai, I.J., Beech, R.N., Redman, E., Holroyd, N.,
373 Bartley, D.J., Beasley, H., Britton, C., Curran, D., Devaney, E., Gilabert, A., Hunt, M.,
374 Jackson, F., Johnston, S.L., Kryukov, I., Li, K., Morrison, A.A., Reid, A.J., Sargison, N.,
375 Saunders, G.I., Wasmuth, J.D., Wolstenholme, A., Berriman, M., Gilleard, J.S., Cotton, J.A.,
376 2013. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug
377 and vaccine discovery. *Genome Biol.* 14, R88.
- 378 Lubega, G.W., Prichard, R.K., 1990. Specific interaction of benzimidazole anthelmintic with
379 tubulin: high affinity binding and benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*. *Mol.*
380 *Biochem. Parasitol.* 38, 221–232.
- 381 Martin, P.J., Anderson, N., Jarrett, R.G., 1989. Detecting benzimidazole resistance with faecal
382 egg count reduction tests and in vitro assays. *Aust. Vet. J.* 66, 236–239.
- 383 Melo, A.C.F.L., Bevilaqua, C.M.L., Reis, I.F., 2009. Resistência aos anti-helmínticos
384 benzimidazóis em nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes do semiárido
385 nordestino brasileiro. *Ciênc. Anim. Bras.* 10, 294–300.

- 386 Mottier, M.L., Prichard, R.K., 2008. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic
387 lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. *Pharmacogenet.*
388 *Genomics*. 18, 129-140.
- 389 Redman, E., Whitelaw, F., Tait, A., Burgess, C., Bartley, Y., Skuce, P.J., Jackson, F.,
390 Gilleard, J.S., 2015. The emergence of resistance to the benzimidazole anthelmintics in
391 parasitic nematodes of livestock is characterised by multiple independent hard and soft
392 selective sweeps. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 9, e0003494.
- 393 Roos, M.H., Otsen, M., Hoekstra, R., Veenstra, J.G., Lenstra, J.A., 2004. Genetic analysis of
394 inbreeding of two strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.*
395 34, 109 - 115.
- 396 Santos, J.M.L., Monteiro, J.P., Ribeiro, W.L.C., Macedo, I.T.F., Camurça-Vasconcelos, A.L.,
397 Vieira, L.S., Bevilaqua, C.M.L., 2014. Identification and quantification of benzimidazole
398 resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in Northeastern Brazil. *Vet.*
399 *Parasitol.* 199, 160–164.
- 400 Sargison, N.D., 2012. Pharmaceutical treatments of gastrointestinal nematode infections of
401 sheep – future of anthelmintic drugs. *Vet. Parasitol.* 189, 79–84.
- 402 Tiwari, J., Kumar, S., Kolte, A.P., Swarnkar, C.P., Singh, D., Pathak, K.M., 2006. Detection
403 of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using RFLP-PCR technique. *Vet.*
404 *Parasitol.* 138, 301–307.
- 405 Torres-Acosta, J.F.J., Mendoza-De-Gives, P., Aguilar-Caballero, A.J., Cuéllar-Ordaz, J.Á.,
406 2012. Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American
407 continent. *Vet. Parasitol.* 189, 89 - 96.
- 408 VIEIRA; GONCALVES, P. C. ; COSTA, C. A. F. ; BERNE, M. E. A. 1989. Atividade
409 ovicida in vitro dos benzimidazois, oxfendazole, fenbendazole, albendazole e thiabendazole
410 em nemadoteos gastrintestinais de caprinos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 24, p. 1201-
411 1209.



412

413 **Fig. 1.** Ceará State municipalities where surveyed farms were located. Numbers by each name
 414 represent, in this order, resistant allele frequencies at SNP F200Y (%), resistant allele
 415 frequencies at SNP F167Y (%), and BZ EC50 (µg/mL), with confidence intervals at 95% in
 416 parenthesis. Inset shows the location of Ceará State in Brazil.

417

418

419 **Table 1.** Frequency of resistant alleles for SNPs F200Y and F167Y of *H. contortus* females,
 420 males, L3 and eggs from population 9. Asterisks indicate significant changes in resistant SNP
 421 frequencies compared to egg frequencies ($P < 0.05$).

Population 9	F200Y	F167Y
	Resistant allele (%)	Resistant allele (%)
Males	25.45*	60.47*
Females	32.26	56.31*
L3	33.07	57.28
Eggs	32.56	58.69

422
423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439 **Table 2.** Resistant allele frequencies for SNPs F167Y and F200Y before and after anthelmintic treatments in isolates of *H. contortus*. Asterisks
 440 indicate treatments with significant changes in resistant SNP frequencies in comparison to pre-treatment frequencies ($P < 0.05$). SD: standard
 441 deviation, BT: before treatment, IVM: ivermectin, OXI: oxfendazole, ABZ: albendazole.
 442

Population (Farm)	Resistant allele F167Y (% ± SD)				Resistant allele F200Y (% ± SD)			
	BT	IVM	OXI	ABZ	BT	IVM	OXI	ABZ
Canindé (5)	49.88 (1.26)	46.79 (4.85)	72.22 (15.66)*	56.08(1.94)*	30.06 (1.57)	30.79 (1.76)	18.07 (10.32)*	34.22 (1.16)*
Icó (16)	65.64(2.68)	60.50 (2.39)*	75.08 (1.61)*	67.27(2.90)	18.58 (1.04)	21.84 (0.75)*	15.35 (1.53)*	19.96 (5.87)
Sobral (3)	17.40 (3.70)	16.68 (2.80)	27.73 (8.33)*	26.41(1.23)*	63.96 (2.68)	65.47(0.67)	45.19 (3.78)*	60.69 (3.71)

7. CAPITULO II

Seleção dos SNP F200Y e F167Y do gene codificante para o isotipo 1 da β -tubulina em *Haemonchus contortus* por tratamentos com ivermectina e oxfendazol com diferentes impactos na resistência anti-helmíntica

Haemonchus contortus β -tubulin isotype 1 gene F200Y and F167Y SNPs are both selected by ivermectin and oxfendazole treatments with differing impacts on anthelmintic resistance.

Períodico: International Journal for Parasitology (Submetido em junho de 2017)

Qualis: A1

1 ***Haemonchus contortus* β -tubulin isotype 1 gene F200Y and F167Y SNPs are both**
2 **selected by ivermectin and oxfendazole treatments with differing impacts on**
3 **anthelmintic resistance**

4

5 Jessica Maria Leite dos Santos^a; Janaelia Ferreira Vasconcelos^b; Gracielle Araújo Frota^b;
6 Wesley Lyeverton Correia Ribeiro^a; Weibson Paz Pinheiro André^a; Luiz da Silva Vieira^c;
7 Marcel Teixeira^c; Claudia Maria Leal Bevilaqua^a; Jomar Patrício Monteiro^{c*}

8

9 ^aPrograma de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/Universidade Estadual do Ceará,
10 Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Av. Dedé Brasil, 1700, CEP
11 60714-903, Fortaleza, CE, Brazil

12 ^bUniversidade Estadual Vale do Acaraú—UVA, Sobral, CE, Brazil

13 ^cEmpresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Caprinos e Ovinos, Estrada Sobral/Groaíras,
14 km 04. Caixa Postal 145, CEP: 62010-970, Sobral, CE, Brazil

15

16 * Corresponding author: Dr. Jomar Patrício Monteiro.

17 Embrapa Caprinos e Ovinos

18 Estrada Sobral/Groaíras, Km 4

19 Sobral, Ceará, Brazil

20 62010-970.

21 Phone: + 55 885 31127576 Fax: + 55 88 31127455

22 E-mail: jomar.monteiro@embrapa.br

23

24

25

26 **Resumo**

27

28 O parasitismo por *Haemonchus contortus* é um dos principais fatores limitantes da produção
29 de ruminantes em áreas tropicais. Os benzimidazoles (BZ) e as lactonas macrocíclicas (LM)
30 são as classes anti-helmínticas mais utilizadas no controle de nematoides gastrointestinais.
31 Existe evidência científica considerável de uma possível relação entre a resistência anti-
32 helmíntica à BZ e ML. Este estudo teve como objetivo caracterizar a dinâmica da resistência
33 anti-helmíntica em um isolado suscetível a *H. contortus* sob pressão de seleção para BZ e ML
34 individualmente ou em combinação e determinar o papel dos SNPs no isotipo 1 da β -tubulina
35 nestas situações. Um total de 12 ovelhas da raça somalis foram infectadas com 5.000 larvas
36 de terceiro estágio do isolado de *H. contortus* Inbred-Susceptible Edinburgh (ISE). Após o
37 estabelecimento da infecção, os animais foram distribuídos em três grupos (n = 4), cada um
38 tratado com doses crescentes de oxfendazol (OXF), ivermectina (IVM) e oxfendazol mais
39 ivermectina (IVMOXF). Um grupo controle com animais não tratados foi mantido durante
40 todo o experimento. Após cada tratamento, os ovos foram coletados e PCR em tempo real foi
41 realizada para identificar os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) F167Y, F200Y e
42 E198A. Além disso, foi realizado o teste de eclosão de ovos (TEO) para BZ e teste de
43 desenvolvimento larval (TDL) para ivermectina. Todos os tratamentos levaram ao aumento da
44 frequência de alelos resistentes para os SNP F200Y e F167Y (p <0,05). Os resultados *in vitro*
45 mostraram aumento da resistência fenotípica a ambas as classes anti-helmínticas nos grupos
46 IVM e IVMOXF, enquanto o grupo OXF desenvolveu apenas resistência para BZ.
47 Finalmente, fornecemos evidências de que, embora os SNP do gene codificante para o isotipo
48 1 da β -tubulina possam ter algum envolvimento com a resistência ao LM, eles não são
49 suficientes para promover o desenvolvimento da resistência.

50 Palavras-chave: resistência; *Haemonchus contortus*; Ivermectina; Polimorfismos

51 **Abstract**

52

53 Parasitism by *Haemonchus contortus* is one of the main limiting factors in small ruminant
54 production in tropical areas. Benzimidazoles (BZ) and macrocyclic lactones (ML) are the
55 most used anthelmintic classes in gastrointestinal nematodes control. There is considerable
56 scientific evidence of a possible relation between the anthelmintic resistance to BZ and ML.
57 This study aimed to characterize the dynamics of anthelmintic resistance in an *H. contortus*
58 susceptible isolate under selection pressure for BZ and ML alone or in combination and the
59 role of isotype 1 β -tubulin gene SNPs in these situations. A total of 12 Somali sheep were
60 infected with 5,000 third stage larvae of *H. contortus* Inbred-Susceptible Edinburgh (ISE)
61 isolate. Once infection was established, animals were distributed in three groups (n=4), each
62 treated with crescent doses of oxfendazole (OXF), ivermectin (IVM) and oxfendazole plus
63 ivermectin (IVMOXF). An additional control group with untreated animals was maintained
64 during the entire experiment. After each treatment, eggs were collected and real-time PCR
65 was performed to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) F167Y, F200Y and
66 E198A, in addition to egg hatch test (EHT) for BZ and larval development test (LDT) for
67 ivermectin resistance. All treatments led to increased resistance allelic frequencies at SNPs
68 F200Y and F167Y ($p < 0.05$). *In vitro* results showed increased phenotypic resistance against
69 both anthelmintic classes in groups IVM and IVMOXF while group OXF only developed
70 resistance against BZ. Finally, we provide evidence that while isotype 1 β -tubulin gene SNPs
71 may have some involvement with ML resistance, they are not enough develop it by
72 themselves.

73

74 Keywords: Resistance; *Haemonchus contortus*; ivermectin; polymorphisms

75

76 1. Introduction

77

78 *Haemonchus contortus* is the most pathogenic helminth of small ruminants chiefly due
79 to the common occurrence and potential for heavy mortality rates in small ruminants from
80 endemic zones (Besier et al., 2016). Animal losses vary greatly between regions, years and
81 seasons, depending on environmental conditions and the effectiveness of control measures
82 that has relied on the use of anthelmintic drugs such as benzimidazoles (BZ) and macrocyclic
83 lactones (ML). As a consequence, the continuous use of these drugs has inevitably led to the
84 development of resistant *H. contortus* populations worldwide (Papadopoulos et al., 2012;
85 Zhang et al., 2016; Ramünke et al., 2016; Lambert et al., 2017).

86 BZ resistance in *H. contortus* has been associated to three different single nucleotide
87 polymorphisms (SNPs) in the isotype-1 β -tubulin gene at codons 167 (TTC to TAC; F167Y)
88 (Silvestre and Cabaret, 2002), 198 (GAA to GCA; E198A) (Ghisi et al., 2007) and 200 (TTC
89 to TAC; F200Y) (Kwa et al., 1994). The identification and quantification of these mutations
90 is the basis for the molecular diagnosis of BZs resistance in currently available molecular tests
91 (Silvestre and Humbert, 2002; Winterrowd et al., 2003; Walsh et al., 2007; Santos et al.,
92 2017; Ramünke et al., 2016).

93 The identification of the genetic basis for ML resistance is an ongoing effort and, so
94 far, the results have not been enough to identify the polymorphisms associated with resistance
95 which would allow the development of molecular tests (Gilleard, 2006). It has been shown
96 that ML interacts with glutamate-gated chloride channel (GluCl) proteins leading to paralysis
97 and alterations in these genes may be associated with resistance to ML (Njue et al., 2003
98 Lynagh and Lynch, 2012). There are also interactions with P-glycoproteins, ABC transporters
99 involved in drug resistance, with changes in gene expression in resistant isolates of *H.*
100 *contortus* (Williamson et al., 2011). Ivermectin resistance is also associated with

101 morphological changes such as shortening of amphidial neuron dendrites with microtubule
102 disorganization (Freeman et al., 2003). Recently, mutations in the *H. contortus* *dyf-7* gene,
103 necessary for amphid neuron development, were associated with ML resistance (Urdaneta-
104 Marquez et al., 2014). It is known that ivermectin interacts with tubulin (Ashraf et al., 2015a,
105 2015b), selects for tubulin SNPs previously associated with BZ resistance (Mottier and
106 Prichard, 2008), interacts with P-glycoprotein which also interacts with tubulin and that
107 observed morphological alterations in ivermectin resistant parasites also somewhat involve
108 tubulin. However, the mechanism in which tubulin polymorphisms are related to ivermectin
109 resistance remains unclear.

110 Thus, the purpose of this work was to evaluate the development of BZ and ML
111 phenotypic resistances and its effects on SNPs in the isotype 1 β -tubulin gene during a time
112 course study with increasing anthelmintic doses starting with a susceptible *H. contortus*
113 isolate.

114

115 **2. Materials and methods**

116

117 *2.1 Animal welfare*

118

119 Animal maintenance was performed in accordance with internationally accepted
120 standard guidelines for experimental animal use (Protocol numbers: 1285478/2014-UECE
121 and 010/2015-CNPC).

122

123

124

125

126 2.2 *Haemonchus contortus* isolate

127

128 The *H. contortus* isolate used in this study was Inbred-susceptible Edinburgh (ISE)
129 that is originally susceptible to BZ and ML (Roos et al., 2004).

130

131 2.3 *Experimental design*

132

133 Twelve Three to six months old male Somali sheep were infected with 5,000 L3 of
134 ISE. The animals from each group were confined in isolated pens with slatted floors and
135 given autoclaved forage and ration following NRC's requirements (NRC, 2007) and water *ad*
136 *libitum*. Infection establishment was confirmed by eggs per gram (EPG) counts using the
137 modified McMaster technique (Ueno and Gonçalves, 1998). Male sheep (n=12) were
138 assigned by fecal egg counts into four experimental groups (n=4) submitted to different
139 drench regimen as follow: Group I (OXF) treated orally with oxfendazole; Group II (IVM)
140 treated orally with ivermectin; Group III (IVMOXF) treated orally with a combination of
141 ivermectin and oxfendazole; Group IV (control) not treated. All groups received crescent
142 doses of anthelmintic as follows: 30, 45, 60, 75 and 100% of the recommended dose every 45
143 days. The recommended dose was 200µg ivermectin /kg of body weight (BW) and 5mg
144 oxfendazole/kg BW.

145 Eggs were collected from each group 10 days after treatment and used for third-stage
146 larvae (L3) culture. Each animal was reinfected with 5,000 L3 obtained from the respective
147 group after treatment to mirror reinfection from the pasture in the natural environment
148 (Roberts and O'Sullivan, 1950). Phenotypic and genotypic changes were monitored using,
149 respectively, *in vitro* tests (larval development test (LDT) and egg hatch test (EHT)) and real
150 time PCR (qPCR) for SNPs F167Y, F200Y and E198A in the isotype 1 β -tubulin gene.

151 2.4. *Egg hatch test (EHT)*

152

153 Eggs were recovered as previously described (Hubert and Kerboeuf, 1992). EHT was
154 performed using eggs obtained from each group of animals after treatment, using
155 thiabendazole (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in six concentrations ranging from 0.05
156 to 1.6 µg/mL. After incubation for 48 hours, the numbers of unhatched eggs and L1 (first
157 stage larvae) in each well was determined using an inverted microscope (Coles et al., 1992).

158

159 2.5 *Larval development test (LDT)*

160

161 Eggs suspension (~100 eggs/100 µL/well), 80 µL of nutritive medium (*Escherichia*
162 *coli*, yeast extract and amphotericin-B) and distilled water were added to a final volume of
163 250 µL per well on a 24-well microplate according to Hubert and Kerboeuf (1992). The plates
164 were identified, sealed with PVC film, and incubated at 27±1 °C for 24 h to obtain L1
165 followed by the addition of 250 µL of ivermectin solution (Ivomec[®], Merial) in each well to
166 obtain the final range of ivermectin concentrations (0.024 to 50 ng/mL). All concentrations
167 were tested in six replicates including the negative control with water. The plates were
168 incubated for six days and L1, L2, and L3 in each plate well were identified and counted
169 under an inverted microscope (Varady et al., 2009).

170

171 2.6 *DNA extraction and Real time PCR*

172

173 Feces were collected from each experimental group and gDNA was extracted from
174 10,000 recovered eggs obtained from a pool sample. DNA extraction and qPCR tests were
175 performed as previously described (Santos et al., 2017). All qPCR tests were performed in

176 triplicate using primers specific for *H. contortus* SNPs: F167Y, E198A and F200Y sensitive
177 and resistant alleles. Reactions contained 12.5 µl 2× Fast Start Universal SYBR Green Master
178 Mix (Roche, West Sussex, UK), 0.3 pmol/µl of each primer (forward and reverse) 25 ng of
179 DNA and water for a total volume of 25 µl.

180

181 2.7 Data analysis

182

183 The BZ and ML resistance evaluations were performed through the EHT and LDT,
184 respectively. The effective concentrations to inhibit 50% (EC50) of larvae hatching and
185 development of L3 were calculated using a probit analysis (SPSS for Windows version 22.0,
186 IBM Corporation, Armonk, NY, USA). The nematode populations were considered resistant
187 to BZ when $EC_{50} \geq 0.1 \mu\text{g/mL}$ (Coles et al., 1992).

188 Threshold cycles and allelic frequencies were estimated as previously described
189 (Germer et al., 2000; Santos et al., 2017). Comparisons between the F200Y, F167Y
190 frequencies and treatments were performed using two-way ANOVA with Bonferroni post-test
191 ($P < 0.05$). Specific significant differences between allelic frequencies and treatments were
192 performed using one-way ANOVA with Bonferroni post-test ($P < 0.05$). Associations
193 between LDT, EHT and SNP frequencies were done using Spearman's correlation coefficient.
194 Dependency between variables was checked through both linear and non-linear (exponential)
195 regression models (Graphpad Prism Software for Windows v 6.07, La Jolla, CA, USA).

196

197 3. Results

198

199 3.1 In vitro tests

200

201 EHT data in Fig. 1A shows increased EC50 values for the IVM (0.073 to 0.817
202 $\mu\text{g}/\text{mL}$), OXF (0.070 to 1.193 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and IVMOXF (0.075 to 0.712 $\mu\text{g}/\text{mL}$) groups.
203 Considering the experimental dosage regimen, BZ resistance was detected in groups OXF and
204 IVMOXF at the 45% dose onwards while IVM only showed BZ resistance after the 60%
205 dose.

206 LDT data in Fig. 1B shows increased EC50 values for the IVM (1.970 to 9.100
207 ng/mL) and IVMOXF (1.920 to 7.742 ng/mL groups) while the OXF group values remained
208 essentially unchanged throughout the experiment.

209

210 3.2 Real time PCR

211

212 Before the selection process, the experimental animals were infected with *H. contortus*
213 larvae that presented only 2.14% of resistant alleles for SNP F200Y and 100% of alleles
214 sensitive to SNPs F167Y and E198A. Table 1 present changes in resistant alleles frequencies
215 for SNPs F200Y and F167Y in groups IVM, OXF and IVMOXF after each treatment. Both
216 IVM and OXF showed higher selection for SNP F167Y while the combination treatment
217 presented higher resistance increases in F200Y in comparison to F167Y. Only sensitive
218 alleles were observed for SNP E198A throughout the experiment. Groups treated with BZ
219 showed higher general increases in resistance allelic frequencies than IVM. Resistance allelic
220 frequencies remained unchanged in the control group throughout the experiment.

221 Regression analysis results for groups IVM, OXF and IVMOXF are presented
222 respectively in figures 2, 3 and 4. Linear regression analysis was significant for group IVM
223 considering resistant SNP F200Y frequencies and EHT results ($p < 0.01$). Groups OXF and
224 IVMOXF also showed significant regression results for F167Y frequencies and EHT data. R-
225 squared values for significant regression models were above 0.85 for the linear models and

226 above 0.90 for the non-linear ones. It was also noted that linear regression analysis for groups
227 IVM and IVMOXF considering respectively F200Y and F167Y frequencies and LDT results
228 showed p-values of 0.014 for the former and 0.011 for the latter with similar R-squared
229 values. Spearman's correlation coefficient were above 0.94 with p-values below 0.01 for all
230 above mentioned associations with the exception of group IVM for F200Y frequencies and
231 phenotypic data (p=0.0167) and IVMOXF F167Y and LDT data (p=0.0167).

232

233 **4. Discussion**

234

235 All treated groups developed resistance to BZ in EHT but only ivermectin treated ones
236 presented an increase in EC50 in LDT. Groups OXF and IVM presented an initial
237 predominance of resistance in SNP F200Y perhaps due to its higher frequency in the initial
238 susceptible population (2.14%). Resistance at SNP F167Y is probably present at frequencies
239 below the detection level of the used test in the ISE isolate while E198A is probably not
240 present since it was not detected at any stage of this experiment. Our results suggest that
241 phenotypic tests did not detect resistance at single locus allelic frequencies up to 15% (Table
242 1 and Fig. 1) and this information could be used to determine a cut-off for early resistance
243 detection that should elicit actions in the field to curb its rise. Previous estimations for *T.*
244 *colubriformis* and *H. contortus* established cut-offs for resistance at 5% for a single allele in
245 the case of the former based on sequencing technical matters and 10% for resistant parasites
246 frequencies in case of the latter, where resistant parasites would be double heterozygous and
247 resistant homozygous (Barrère et al., 2013; Esteban-Ballesteros et al., 2017). From our data,
248 resistance was phenotypically detected in the population once frequencies for a single locus
249 were above 50%. Once this "leap" happened, for example F200Y frequencies in groups OXF
250 and IVMOXF, the other locus F167Y presented values in close association with resistance

251 rise (Fig. 3 and 4). The same happened with group IVM but the role of the SNPs was inverted
252 and so F167Y suddenly rises above 50% and F200Y presented a gradual rise associated with
253 resistance (Fig. 2). The distribution of F200Y frequencies in relation to EHT data using both
254 related and unrelated *H. contortus* isolates was previously analyzed and similar patterns were
255 observed where resistant isolates showed frequencies above 50% and susceptible isolates
256 presented frequencies around 8-15% (Čudeková et al., 2010).

257 In addition to the development of generalized resistance, the use of ivermectin induced
258 an increase in the frequency of resistant alleles for SNPs F200Y and F167Y. In a similar
259 manner, increased resistance frequencies at SNPs F200Y and F167Y were observed in
260 individuals resistant to ML which have never been exposed to BZ (Eng et al., 2006; Mottier
261 and Prichard, 2008). However, with the increase of anthelmintic dosage SNP F167Y
262 prevailed in the single drug treatment groups at the end of the experiment. It is worth noting
263 that resistance SNP selection in group IVM tended to remain stable for the first and second
264 rounds while selection was stronger in groups using oxfendazole in agreement with
265 previously observed results with just one round of selection using the full ivermectin dose
266 (Santos et al., 2017). It is known that ivermectin binds to tubulin and this interaction is not
267 affected by aminoacid changes in the protein caused by gene mutations (Ashraf et al., 2015a,
268 2015b). Tubulin SNP selection may be a secondary event happening after an initial selection
269 of factors directly associated with ivermectin resistance such as P-glycoprotein expression
270 changes, SNP selection for the *dyf-7* gene or glutamate-gated chloride channels (Williamson
271 et al., 2011; Urdaneta-Marquez et al., 2014). These targets interact with tubulin directly,
272 indirectly or lead to changes in the cytoskeleton (Giusetto et al., 1998; Hanus et al., 2004;
273 Georges, 2007) but the precise manner in which this interaction happens and the role of
274 tubulin SNPs still remains unclear.

275 Resistance SNP frequencies in OXF group started at higher levels for SNP F200Y in
276 the initial treatments but SNP F167Y eventually prevailed at the same time that the previous
277 one declined confirming our previous results (Santos et al., 2017). Similarly, selection of
278 particular tubulin SNPs have been reported in L3 motility tests after thiabendazole exposure.
279 Resistance at SNPs F200Y and E198A start roughly at the same level for the original
280 Wallangra isolate but as increasing thiabendazole concentrations are used, resistance at
281 E198A rises at the same time that F200Y decreases (Kotze et al., 2012). The association
282 between SNPs F200Y and F167Y as double heterozygotes may promote an elevated
283 resistance level. These parasites survived doses up to three times the recommended amount
284 (Barrère et al., 2012).

285 With the combined use of both drugs, frequency of resistant alleles was overall higher
286 for SNP F200Y. However, SNP F167Y presented a significant growth in all steps of
287 selection. It appears that resistance at both SNPs attained equilibrium with similar frequencies
288 at least up to the point that changes were monitored in this experiment. A previous report
289 regarding gastrointestinal nematodes displaying multiple resistance generated by
290 indiscriminate use of several anthelmintics in alternation led to general treatment failures even
291 when three classes (BZ, ML and an imidazothiazole) were used in combination (Cezar et al.,
292 2010). Furthermore, alternation between BZ and LM regimens is a common practice in small
293 ruminant farms which may increase selective pressure for resistance to BZ (Ashraf et al.,
294 2015a) or at least hinder the reduction in resistant allele's incidence in a given resistant *H.*
295 *contortus* population. This, in agreement with the obtained data reinforces the idea that BZ
296 and ML either in combination or in alternation may not be a good alternative to control
297 parasite population or manage resistance.

298 In conclusion, groups IVM and IVMOXF presented very similar patterns of resistance
299 increments for both anthelmintic classes while group OXF showed a stronger rise in BZ

300 resistance only. Ivermectin selection for SNPs F200Y and F167Y will predispose nematodes
301 to BZ resistance and the utilization of these SNPs for ML resistance diagnosis must consider
302 the previous anthelmintic classes used in field cases as β -tubulin SNP selection appear to be a
303 secondary effect of LM utilization. The clear role of tubulin SNPs in LM resistance remains
304 elusive but the alternation between BZ and LM in the field may contribute the maintenance of
305 high levels of these SNPs in resistant populations and should also consider the previous
306 history of ivermectin utilization. However, additional investigations are required to determine
307 the long-term implications for the sustainable use of the ML and BZ against populations of *H.*
308 *contortus*.

309

310 **Conflicts of interest**

311

312 The authors declare that they have no conflicts of interest.

313

314 **Acknowledgements**

315

316 The authors would like to thank CNPq (projects 159094/2013-5 and 303018/2013-5) and
317 FUNCAP (project BP2-0107- 00246.01.00/15) for financial support and Embrapa Caprinos e
318 Ovinos for infrastructure support.

319

320 **References**

321

322 Ashraf, S., Beech, R.N., Hancock, M.A., Prichard, R.K., 2015a. Ivermectin binds to
323 *Haemonchus contortus* tubulins and promotes stability of microtubules, *Int. J. Parasitol.* 45,
324 647–654.

- 325 Ashraf, S., Mani, T., Beech, R., Prichard, R., 2015b. Macrocyclic lactones and their
326 relationship to the SNPs related to benzimidazole resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* 201,
327 128–134.
- 328 Barrère, V., Alvarez, L., Suarez, G., Ceballos, L., Moreno, L., Lanusse, C., Prichard, R. K.,
329 2012. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single
330 nucleotide polymorphisms on the beta-tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus*
331 *contortus*. *Vet. Parasitol.* 186, 344–349.
- 332 Barrère, V., Keller, K., von Samson-Himmelstjerna, G., Prichard, R.K., 2013. Efficiency of a
333 genetic test to detect benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* nematodes in sheep
334 farms in Quebec, Canada. *Parasitol. Int.* 62, 464–470.
- 335 Besier, R.B., Kahn, L.P., Sargison, N.D., Van Wyk, J.A., 2016. The diagnosis, treatment and
336 management of *Haemonchus contortus* in small ruminants. In: Gasser, R., Samson-
337 Himmelstjerna, G.V. (Eds.), *Haemonchus contortus* and Haemonchosis Past, Present and
338 Future Trends. 93,181-238.
- 339 Cezar, A.S., Toscan, G., Camillo, G., Sangioni, L.A., Ribas, H.O., Vogel, F.S., 2010. Mul-
340 tiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in
341 southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 173, 157-160.
- 342 Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H. M., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A., Waller,
343 P. J., 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP)
344 Methods for the Detection of Anthelmintic Resistance in Nematodes of Veterinary
345 Importance. *Vet. Parasitol.* 44, 35–44.
- 346 Čudeková, P., Várady, M., Dolinská, M., Königová, A., 2010. Phenotypic and genotypic
347 characterization of benzimidazole susceptible and resistant isolates of *Haemonchus contortus*.
348 *Vet. Parasitol.* 172, 155–159.

- 349 Eng, J.K.L., Blackhall, W.J., Osei-Atweneboana, M.Y., Bourguinat, C., Galazzo, D., Beech,
350 R.N., Unnasch, T.R., Awadzi, K., Lubega, G.W., Prichard, R.K., 2006. Ivermectin selection
351 on β -tubulin: evidence in *Onchocerca volvulus* and *Haemonchus contortus*. Mol. Biochem.
352 Parasitol. 150, 229-235.
- 353 Esteban-Ballesteros, M., Rojo-Vázquez, F. A., Skuce, P. J., Melville, L., González-Lanza, C.,
354 Martínez-Valladares, M., 2017. Quantification of resistant alleles in the β -tubulin gene of
355 field strains of gastrointestinal nematodes and their relation with the faecal egg count
356 reduction test. BMC Vet Res. 13, 71.
- 357 Freeman, A.S., Nghiem, C., Li, J., Ashton, F.T., Guerrero, J., Shoop, W.L., Schad, G.A.,
358 2003. Amphidial structure of ivermectin resistant and susceptible laboratory and field strains
359 of *Haemonchus contortus*. Vet Parasitol., 110, 217–226.
- 360 Georges, E., 2007. The P-glycoprotein ABCB1 linker domain encodes high-affinity binding
361 sequences to α and β -tubulins. Biochemistry, v. 46, p.7337–7342
- 362 Germer, S., Holland, M.J., Higuchi, R., 2000. High-throughput SNP allele-frequency
363 determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. Genome Res. 10, 258–266.
- 364 Ghisi, M.; Kaminsky, R.; Mäser, P. 2007. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus*
365 *contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in
366 nematodes. Vet Parasitol., 144, 313–320.
- 367 Gilleard, J. S. 2006. Understanding anthelmintic resistance: the need for genomics and
368 genetics. Int J Parasitol, 36, 1227-1239.
- 369 Giustetto, M., Kirsch, J., Fritschy, J. M., Cantino, D., Sassoe-Pognetto, M., 1998.
370 Localization of the clustering protein gephrin at GABAergic synapses in the main olfactory
371 bulb of the rat. J. Comp. Neurol. 395, 231-244.
- 372 Hanus, C., Vannier, C., Triller, A., 2004. Intracellular association of glycine receptor with
373 gephrin increases its plasma membrane accumulation rate. J. Neurosci. 24, 1119–1128.

- 374 Hubert, J.; Kerboeuf, D., 1992. A microlarval development assay for the detection of
375 anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet. Rec.* 130, 442-446.
- 376 Kotze, A.C., Cowling, K., Bagnall, N.H., Hines, B.M., Ruffell, A.P., Hunt, P.W., Coleman,
377 G.T., 2012. Relative level of thiabendazole resistance associated with the E198A and F200Y
378 SNPs in larvae of a multi-drug resistant isolate of *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.*
379 *Drugs Drug Resist.* 2, 92–97.
- 380 Kwa, M. S., Veenstra, J. G., Roos, M. H., 1994. Benzimidazole resistance in *Haemonchus*
381 *contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in β -tubulin isotype 1.
382 *Mol Biochem Parasitol.* 63, 299-303.
- 383 Lambert, S.M., Nishi, S.M., Mendonça, L.R., da Silva Souza, B.M.P., da Silva Julião, F., da
384 Silva Gusmão, P., de Almeida, M.A.O., 2017. Genotypic profile of benzimidazole resistance
385 associated with SNP F167Y and F200Y beta-tubulin gene in Brazilian populations of
386 *Haemonchus contortus* of goats. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* 8, 28–34.
- 387 Lynagh, T., Lynch, J.W., 2012. Ivermectin binding sites in human and invertebrate Cys-loop
388 receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 432-441.
- 389 Mottier, M., Prichard, R.K., 2008. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic
390 lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*.
391 *Pharmacogenetics Genomics.* 18, 129–140.
- 392 Njue, A.I., Prichard, R.K., 2003. Cloning two full-length beta-tubulin isotype cDNAs from
393 *Cooperia oncophora*, and screening for benzimidazole resistance-associated mutations in two
394 isolates. *Parasitology*, 127, 579–588.
- 395 Papadopoulos, E., Gallidis, E., Ptochos, S., 2012. Anthelmintic resistance in sheep in Europe:
396 a selected review. *Vet. Parasitol.* 30, 85–88.
- 397 Ramünke, S., Melville, L., Rinaldi, L., Hertzberg, H., Waal, T., von Samson-Himmelstjerna,
398 G., Cringoli, G., Mavrot, F., Skuce, F., Krücken, J., Demeler, J., 2016. Benzimidazole

399 resistance survey for *Haemonchus*, *Teladorsagia* and *Trichostrongylus* in three European
400 countries using pyrosequencing including the development of new assays for
401 *Trichostrongylus*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 6, 230-240.

402 Roberts, F.H.S., O'Sullivan, J.P., 1950. Methods for egg counts and larval cultures for
403 strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. Aust J Exp Agric. 1, 99.

404 Roos, M.H., Otsen, M., Hoekstra, R., Veenstra, J.G., Lenstra, J.A., 2004. Genetic analysis of
405 inbreeding of two strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. Int. J. Parasitol.
406 34, 109–115.

407 Santos, J. M. L., Monteiro, J. P., Ribeiro, W. L.C., Macedo, I. T. F., Araújo-Filho, J. V.,
408 Andre, W. P. P., Araújo, P. R. M., Vasconcelos, J. F., Freitas, E. P., Camurça-Vasconcelos,
409 A. L. F., Vieira, L. S., Bevilaqua, C. M. L, 2017. High levels of benzimidazole resistance and
410 β -tubulin isotype 1 SNP F167Y in *Haemonchus contortus* populations from Ceará State,
411 Brazil. Small Rumin. Res. 146, 48–52.

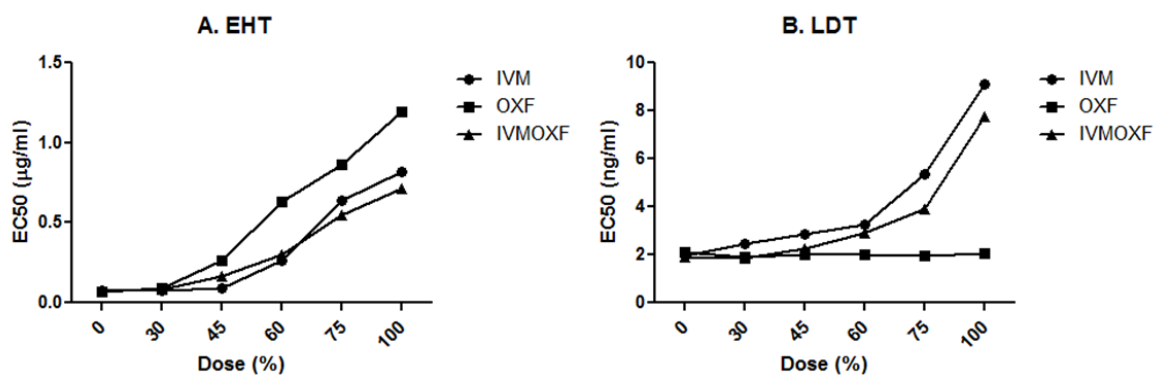
412 Silvestre, A., Cabaret, J., 2002. Mutation in position 167 of isotype 1 β -tubulin gene of
413 Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance. Mol. Biochem. Parasitol. 120,
414 297-300.

415 Silvestre, A.; Humbert, J. F., 2002. Diversity of benzimidazole-resistance alleles in
416 populations of small ruminant parasites. Int. J. Parasitol. 32, 321-328.

417 Ueno, H., Gonçalves, V.C., 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes.
418 Japan International Cooperation Agency, Tóquio.

419 Urdaneta-Marquez, L., Bae, S.H., Janukavicius, P., Beech, R., Dent, J., Prichard, R., 2014. A
420 dyf-7 haplotype causes sensory neuron defects and is associated with macrocyclic lactone
421 resistance worldwide in the nematode parasite *Haemonchus contortus*. Int. J. Parasitol. 44,
422 1063–1071.

- 423 Varady, C. J., Letková, V., Kovác, G., 2009. Comparison of two versions of larval
424 development test to detect anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.*
425 160, 267-271.
- 426 Walsh, T.K., Donnan, A.A., Jackson, F., Skuce, P., Wolstenholme, A.J., 2007. Detection and
427 measurement of benzimidazole resistance alleles in *Haemonchus contortus* using real-time
428 PCR with locked nucleic acid Taqman probes. *Vet. Parasitol.* 144, 304–312.
- 429 Williamson, S.M., Storey, B., Howell, S., Harper, K.M., Kaplan, R.M., Wolstenholme, A.J.,
430 2011. Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence
431 polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem.*
432 *Parasitol.* 180, 99–105.
- 433 Winterrowd, C.A., Pomroy, W.E., Sangster, N.C., Johnson, S.S., Geary, T.G., 2003.
434 Benzimidazole resistant β -tubulin alleles in a population of parasitic nematodes (*Cooperia*
435 *oncophora*) of cattle. *Vet. Parasitol.* 117, 161–172.
- 436 Zhang, Z., Gasser, R.B., Yang, X., Yin, F., Zhao, G., Bao, M., Pan, B., Huang, W., Wang, C.,
437 Zou, F., Zhou, Y., Zhao, J., Fang, R., Hu, M., 2016. Two benzimidazole resistance-associated
438 SNPs in the isotype-1 β -tubulin gene predominate in *Haemonchus contortus* populations from
439 eight regions in China. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 6, 199–206.
- 440
- 441
- 442



443
 444 **Fig. 1.** Values of EC50 ($\mu\text{g/mL}$) in the EHT (A) and EC50 (ng/mL) in the LDT (B) (Y-axis)
 445 performed after each treatment with crescent doses of anthelmintics in *H. contortus* isolate
 446 (X-axis).

447 .

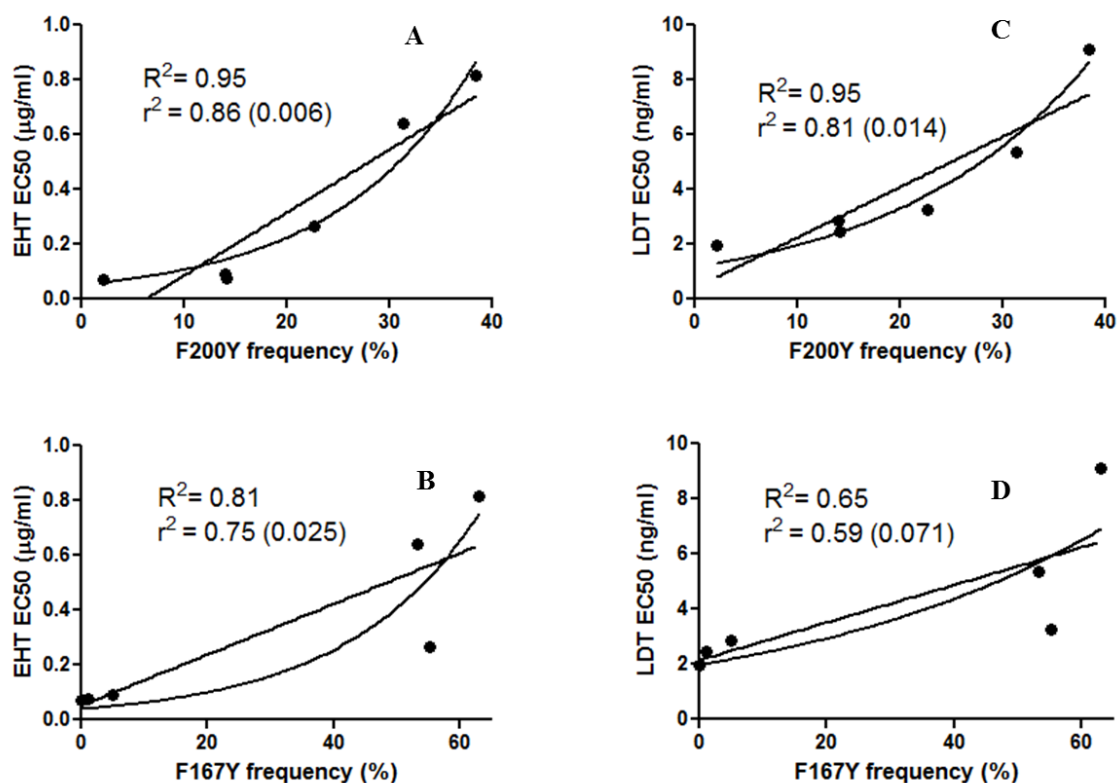
448

449

450

451

452



453

454 **Fig. 2.** Group IVM linear and non-linear (exponential) regression models between resistance

455 allele frequencies at SNPs F200Y (A and C) and F167Y (B and D) (X-axis) versus EHT

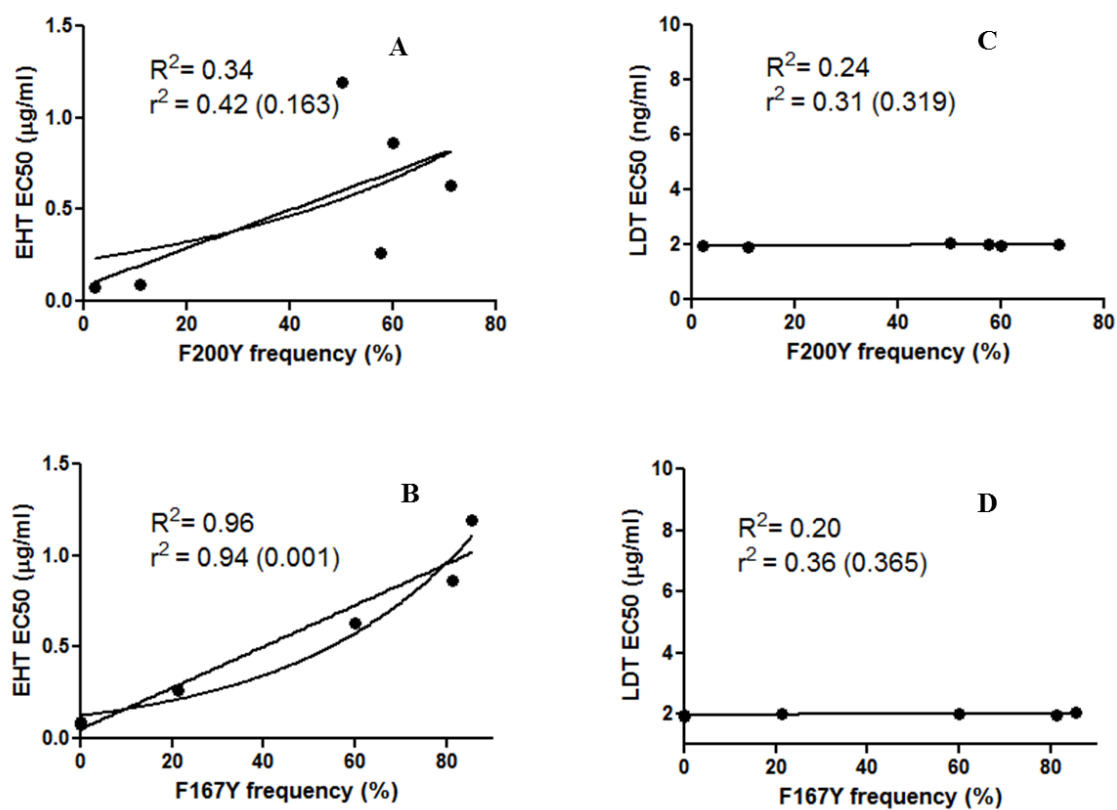
456 EC50 values ($\mu\text{g/mL}$) (A and B) and LDT EC50 values (ng/mL) (C and D) (Y-axis). R^2 :457 Coefficient of determination for non-linear (exponential) regressions. r^2 : Coefficient of

458 Determination for linear regressions and p-values in parentheses.

459

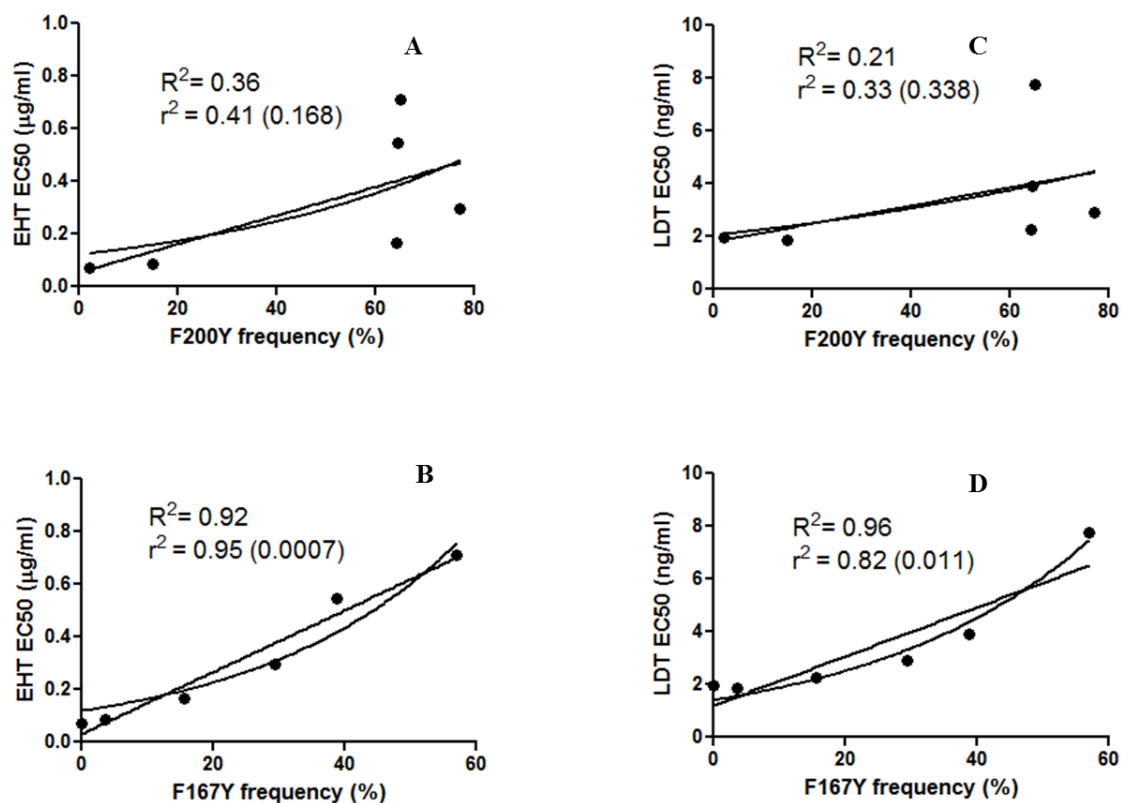
460

461



462

463 **Fig. 3.** Group OXF linear and non-linear (exponential) regression models between resistance
 464 allele frequencies at SNPs F200Y (A and C) and F167Y (B and D) (X-axis) versus EHT
 465 EC50 values (µg/mL) (A and B) and LDT EC50 values (ng/mL) (C and D) (Y-axis). R^2 :
 466 Coefficient of determination for non-linear (exponential) regressions. r^2 : Coefficient of
 467 Determination for linear regressions and p-values in parentheses.



468

469 **Fig. 4.** Group IVMOXF linear and non-linear (exponential) regression models between

470 resistance allele frequencies at SNPs F200Y (A and C) and F167Y (B and D) (X-axis) versus

471 EHT EC50 values (µg/mL) (A and B) and LDT EC50 values (ng/mL) (C and D) (Y-axis). R^2 :472 Coefficient of determination for non-linear (exponential) regressions. r^2 : Coefficient of

473 Determination for linear regressions and p-values in parentheses.

474

475

476

477

478

479

480

481

482 **Table 1.** Frequencies of resistant alleles for F200Y e F167Y SNPs in groups IVM, OXF and IVMOXF according to the administered
 483 anthelmintic dose.

Dose (%)	IVM		OXF		IVMOXF	
	Resistant allele (% ± SD)		Resistant allele (% ± SD)		Resistant allele (% ± SD)	
	F200Y	F167Y	F200Y	F167Y	F200Y	F167Y
0	2.15 ± 0.14 ^A	0.00 ^A	2.15 ± 0.14 ^A	0.00 ^A	2.15 ± 0.14 ^A	0.00 ^A
30	14.07 ± 0.69 ^{aB}	1.18 ± 0.20 ^{bA}	10.95 ± 1.09 ^{aB}	0.00 ^{bA}	15.05 ± 2.60 ^{Ab}	3.63 ± 0.88 ^{bB}
45	14.06 ± 0.71 ^{aB}	4.91 ± 0.45 ^{bA}	57.73 ± 1.38 ^{aC}	21.17 ± 1.62 ^{bB}	64.14 ± 1.96 ^{aC}	15.57 ± 1.30 ^{bC}
60	22.61 ± 1.23 ^{aC}	55.15 ± 6.64 ^{bB}	71.13 ± 3.01 ^{aD}	60.07 ± 2.21 ^{bC}	76.93 ± 2.18 ^{aD}	29.46 ± 2.28 ^{bD}
75	31.36 ± 3.68 ^{aD}	51.77 ± 4.89 ^{bB}	59.97 ± 0.68 ^{aE}	81.18 ± 3.53 ^{bD}	64.63 ± 1.05 ^{aE}	38.71 ± 0.96 ^{bE}
100	38.37 ± 0.95 ^{aE}	63.05 ± 2.62 ^{bC}	50.12 ± 2.37 ^{aF}	85.56 ± 0.82 ^{bE}	65.03 ± 2.15 ^{aE}	56.99 ± 1.73 ^{bF}

502
 503 Small letters indicate comparisons on the same column. Different small letters in the same column indicate significant differences in comparison to
 504 the measurement directly above it (p<0.05).

505 Capital letters indicate comparisons on the same line. Different capital letters indicate significant differences between values on the same line
 506 (p<0.05).

507
 508

8. CAPITULO III

Diagnóstico molecular da resistência ao levamisol em populações de *Haemonchus contortus*

Molecular diagnosis of levamisole resistance in populations of *Haemonchus contortus*

Períodico: Veterinary Parasitology (a ser submetido)

Qualis: A2

1 **Molecular diagnosis of levamisole resistance in populations of *Haemonchus contortus***

2

3 Jessica Maria Leite dos Santos^a; Janaelia Ferreira Vasconcelos^b; Gracielle Araújo Frota^b;
4 Edilson Pereira de Freitas^b; Marcel Teixeira^c; Luiz da Silva Vieira^c; Claudia Maria Leal
5 Bevilaqua^a; Jomar Patrício Monteiro^c

6

7 ^aPrograma de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/Universidade Estadual do Ceará,
8 Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Av. Dedé Brasil, 1700, CEP
9 60714-903, Fortaleza, CE, Brazil

10 ^bUniversidade Estadual Vale do Acaraú—UVA, Sobral, CE, Brazil

11 ^cEmpresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Caprinos e Ovinos, Estrada Sobral/Groaíras,
12 km 04. Caixa Postal 145, CEP: 62010-970, Sobral, CE, Brazil

13

14 * Corresponding author: Dr. Jomar P. Monteiro.

15 Embrapa Caprinos e Ovinos

16 Estrada Sobral/Groaíras Km 04

17 Sobral, Ceará, Brazil

18 62010970

19 Phone: + 55 88 31127576 Fax: + 55 88 31127455

20 E-mail: jomar.monteiro@embrapa.br

21

22

23

24

25

26 **Resumo**

27

28 O parasitismo por *Haemonchus contortus* é um dos principais fatores limitante na criação de
29 pequenos ruminantes no mundo. Apesar de diversos trabalhos evidenciarem a necessidade de
30 um manejo integrado, o controle desses parasitos tem sido realizado essencialmente com o
31 uso anti-helmínticos sintéticos. Para classe de derivados sintéticos dos imidazotiazóis, o
32 levamisol (LEV), o mecanismo de resistência em populações de *H. contortus* ainda não está
33 totalmente esclarecido. Recentemente, a resistência foi associada a uma deleção de 63pb no
34 gene Hco-acr-8b de receptores nicotínicos de acetilcolina. O objetivo desse trabalho foi
35 padronizar uma técnica de PCR em tempo real (qPCR) para o diagnóstico de resistência a
36 levamisol em populações de *H. contortus*. Foram testados 25 populações de *H. contortus*:
37 Kokstad (LEV resistente), a Inbred-susceptible-Edinburgh, o ISE (LEV susceptível) e 23
38 populações obtidas de rebanhos localizados em diferentes municípios no estado do Ceará,
39 Nordeste do Brasil. Foi realizado o teste de desenvolvimento larvar (TDL) em cinco isolados
40 de campo. As reações de PCR em tempo real (qPCR) continham SYBR Green Master Mix,
41 0,3 pmol/ μ L de cada primer, 50 ng de DNA e água, com volume total de 25 μ L. Foram
42 observados apenas alelos resistentes no isolado Kokstad. No isolado ISE a frequência de
43 alelos associados à resistência foi de 45,50%. Foi verificada uma correlação significativa
44 entre as concentrações efetivas para inibir 50% (EC50) do desenvolvimento das larvas de
45 terceiro estágio (L3) no TDL e a frequência de alelos resistentes na qPCR. Essa metodologia
46 pode ser útil para monitorar níveis de resistência em populações de campo de *H. contortus*.
47 No entanto, não deve ser descartada a possibilidade do envolvimento de outros genes dos
48 receptores de nicotínicos de acetilcolina no desenvolvimento da resistência a levamisol em
49 populações de *H. contortus*.

50 Palavras-chave: PCR em tempo real; levamisol; resistência; nematoides; ovinos

51 Abstract

52 Parasitism by *Haemonchus contortus* is one of the main limiting factors in small
53 ruminant production around the globe. Although several studies demonstrated the necessity of
54 an integrated control system, these parasites have been controlled essentially with synthetic
55 anthelmintic drugs. The resistance mechanism against the class of imidazothiazole synthetic
56 derivatives, such as levamisole, in *Haemonchus contortus* have not yet been fully described.
57 Recently, resistance was associated with a 63bp deletion in the Hco-acr-8b gene that codifies
58 nicotinic acetylcholine receptors. This study aimed to standardize a real time PCR (qPCR)
59 protocol for the diagnosis of resistance to levamisole in populations of *H. contortus*. A total of
60 25 populations of *H. contortus*: Kokstad (levamisole resistant), the Inbred-susceptible-
61 Edinburgh (ISE) (levamisole susceptible) and 23 populations obtained from flocks located in
62 different localities of Ceará, Brazil. Larval development tests (LDT) were performed in five
63 field isolates. Only the resistant allele was identified in the Kokstad isolate. Both alleles were
64 detected in the ISE isolate. A significant correlation was verified among the effective
65 concentrations to inhibit 50% (EC50) of development infective larvae (L3) in LDT and the
66 frequency of resistance alleles in qPCR. This methodology may be useful to monitor
67 levamisole resistance in field populations of *H. contortus*. However, it should not be
68 discarded that other genes may be involved with the development of levamisole resistance in
69 *H. contortus*.

70

71 Key words: real-time PCR; levamisole; resistance; Nematodes; Sheep

72

73

74

75

76 1. Introduction

77

78 *Haemonchus contortus* is a trichostrongyloid nematodes that threatens productivity in
79 small ruminant farming, mainly in tropical and subtropical countries (Besier et al., 2016).
80 Despite continuous efforts for the development of effective alternative control methods for
81 these parasites, anthelmintic drugs are still the main choice of treatment (Kaplan and
82 Vidyashankar, 2012).

83 Populations of *H. contortus* resistant to all classes of anthelmintics have been
84 described in the world (Almeida et al., 2010; Peña-Espinoza et al., 2014; Lambert et al.,
85 2017). However, the development of resistance against synthetic derivatives of
86 imidazothiazole, such as the levamisole, appears to be slower in *H. contortus* in comparison
87 to benzimidazoles and macrocyclic lactones due to the low frequency of use. Levamisole can
88 still be considered a useful tool to control parasitic populations that are resistant to other drugs
89 (Tyrrell and Le Jambre, 2010). In this manner, the identification of molecular mechanisms of
90 resistance and markers may help to promote sustainable treatment with this drug on the field
91 (Fauvin et al., 2010).

92 Levamisole acts on the nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) found in the
93 neuromuscular junction in nematodes, resulting in neuromuscular depolarization and spastic
94 paralysis. Acetylcholine receptors consist of five subunits arranged around a central ionic
95 channel (Martin, 1997) and there is evidence associating gene expression changes of in
96 nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits with resistance (Sarai et al., 2013).

97 In *Caenorhabditis. elegans*, more than 16 nAChR genes were identified promoting
98 resistance to levamisole, including three α subunits (UNC-38, UNC-63, LEV-8) and two
99 non- α subunits (UNC-29, LEV-1) (Fauvin et al., 2010). In *H. contortus*, the gene Hco-acr-8
100 codifies an α subunit in the ionic channel, which is a component of an acetylcholine receptor

101 that is sensitive to levamisole (L-AChR1). Resistant isolates showed overexpression of a
102 truncated mRNA for this gene (*Hco-acr-8b*) (Fauvin et al., 2010; Williamson et al., 2011;
103 Sarai et al., 2013) and a 63 bp deletion was detected within exon 3b of *Hco-acr-8* gene in
104 resistant isolates (Barrère et al., 2014). This was the first report of a possible DNA marker for
105 the detection of resistance to levamisole. Based on this information, this study aimed to use
106 real time PCR (qPCR) to diagnose levamisole resistance in populations of *H. contortus*.

107

108 2. Material and methods

109

110 2.1 Animal welfare

111 Animal maintenance was performed in accordance with internationally accepted
112 standard guidelines for experimental use of animals (Ethics Committee Authorization
113 Protocol number 005/2016).

114

115 2.2 Isolates of *Haemonchus contortus*

116

117 The *H. contortus* Inbred-susceptible Edinburgh (ISE) isolate was used as reference of
118 susceptibility as it is susceptible to all main classes of anthelmintics. The ISE expressed the
119 truncated mRNA *Hco-ACR-8b* and the susceptible *Hco-acr-8* alleles (Otsen et al., 2001; Roos
120 et al., 2004; Neveu et al., 2010; Barrère et al., 2014). The Kokstad isolate was used as
121 reference of resistance since it is resistant to levamisole, expressed the truncated mRNA *Hco-*
122 *ACR-8b* and does not carry the susceptible *Hco-acr-8* allele (Fauvin et al., 2010; Neveu et al.,
123 2010; Barrère et al., 2014).

124 DNA from gastrointestinal parasite populations from 18 farms in different
125 municipalities distributed throughout Ceará State (Brazil) was available in our laboratory

126 (Santos et al., 2017). In addition to these populations, a new field collection of five
127 populations was carried out in the municipalities of Sobral, Crateús, Independência, Tauá and
128 Ipueiras (Ceará State, Brazil). Feces were collected from at least 40% of the animals from
129 each flock totalling approximately 20 animals per farm. Samples were pooled per farm and
130 cultured to obtain L3. At least 100 L3 were identified per sample by standard microscopy.
131 One 3-month-old worm-free donor sheep was orally infected with 5,000 L3 from each farm (5
132 sheep total) to provide parasite eggs for *in vitro* testing for resistance to levamisole, larval
133 development test (LDT) and qPCR.

134

135 2.8 Larval development test (LDT)

136

137 The dilutions of tetramisole hydrochloride (Sigma-Aldrich) in water ranged between
138 0.03 and 3.12 µg/mL. Aliquots of the suspension containing approximately 100 eggs/100µL
139 were added to each well of a 24-well microplate with 80µL of nutritive medium (*Escherichia*
140 *coli*, yeast extract and amphotericin-B) and distilled water to a final volume of 250 µL/well
141 (Hubert and Kerboeuf, 1992). Plates were incubated at 27±1 °C for 24 h to obtain first stage
142 larvae (L1) and the drug was added at the appropriate concentrations to a final volume of 500
143 µL/well. Plates were incubated for seven days, after which L1, L2 and L3 in each well were
144 counted using optical microscopy. All concentrations and negative control (distilled water)
145 were tested in six replicates (Chagas et al., 2016).

146

147 2.6 Primers

148

149 Primers were designed considering a general annealing temperature of 56°C using the
150 Primer3 Plus program (Untergasser et al., 2007) based on sequences obtained from GenBank

151 (accession numbers: HF964251.1; HP963764.1; GU168770.1; EU6785.1) (Table 1). Primers
152 were designed to identify resistant and sensitive alleles based on the presence/absence of the
153 63 bp indel in Hco-acr-8 exon 3b (Table 1). The assay was designed to generate amplicons of
154 227 bp and 195 bp for susceptible and resistant alleles, respectively .

155

156 *2.7 Real time PCR (qPCR)*

157

158 Genomic DNA was extracted from 10,000 eggs obtained from infected animals as
159 previously described (Santos et al., 2017). Quantitative PCR assays used DNA extracted from
160 one pool per farm and in triplicate for each pool. Reactions contained 12.5 μ l 2 \times Fast Start
161 Universal SYBR Green Master Mix (Roche, West Sussex, UK), 0.3 pmol/ μ l of each primer
162 (forward and reverse) (Table 1), 50 ng of DNA and water for a total volume of 25 μ l. Negative
163 controls used water instead of DNA. Amplification conditions for both alleles were: 95 $^{\circ}$ C for
164 10 min. and 35 cycles of 95 $^{\circ}$ C for 15 s and 56 $^{\circ}$ C for 30 s. Melting curve analysis was applied
165 to detect primer dimers. Amplified products were visualized on a 1.5% agarose gel
166 electrophoresis to check for nonspecific amplicons. The primers were also tested in reactions
167 containing serial dilutions of DNA to determine the amplification efficiency in each assay.
168 The amplification efficiency of each target was determined according to the equation $E =$
169 $10^{(-1/S)} - 1$, where S was the slope of the standard curve generated from tenfold serial
170 dilutions of parasite DNA (2.5 to 250 ng/reaction).

171

172 *2.8 Data analysis*

173

174 The effective concentrations development of 50% L3 (EC50) in LDT were calculated
175 using probit analysis (SPSS for Windows version 8.0, IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

176 The threshold cycle (Ct) for qPCR reactions was determined by the software Realplex
177 2.2 (Eppendorf, Hamburg, Germany) and allele frequencies were estimated as previously
178 described (Germer et al., 2000).

179 Spearman rank correlation coefficients between the frequency of resistance alleles and
180 EC50 values were determined to examine the association between the two tests conducted
181 (Graphpad Prism Software for Windows v 6.07, La Jolla, CA, USA).

182

183 **3. Results**

184

185 LDT EC50 values varied from 0.020 µg/mL to 0.149 µg/mL (Table 2). Spearman
186 rank correlation coefficient indicated a positive correlation of 1.0 between the frequency of
187 resistance alleles and EC50 ($p < 0.05$).

188 Real time PCR results showed resistance allele frequencies as high as 82.02% for
189 population 17 (table 2). Both reference isolates showed results according to expectations for
190 resistant allele frequencies, the Kokstad isolate had 100% resistant alleles and the ISE isolate
191 had 45.50% resistant alleles. Melting curve analysis resulted in only one well defined peak
192 per reaction indicating that only one PCR product was amplified (fig. 1). Only one band was
193 visualized after agarose gel electrophoresis of all amplified products (fig. 2). The efficiency
194 values of the amplifications in serial dilutions for sensitive and resistant alleles were 96.06%
195 and 97.10%, respectively.

196

197 **4. Discussion**

198

199 This study presents for the first time a qPCR assay to detect resistance to levamisole in
200 DNA obtained from pooled samples of *H. contortus* eggs, based in the detection of the 63bp

201 indel in the Hco-acr-8 gene in resistant isolates (Barrère et al., 2014). In this study, the
202 levamisole resistant *H. contortus* isolate Kokstad only presented the truncated form of the
203 Hco-acr-8 gene and this result is similar to what have been previously verified and alleles of
204 levamisole sensitivity and resistance were identified in the susceptible *H. contortus* isolate
205 ISE. Barrère et al. (2014) reported that the presence of the 63bp indel was more frequently
206 observed in susceptible isolates. This finding was also observed in the sensitive isolates CRA
207 (Barrère et al., 2014) and McMaster (Chagas et al., 2016). The results suggest that although
208 the isolate is susceptible, there may be individuals in the population that present
209 characteristics associated with a predisposition towards resistance to levamisole. It is likely
210 that resistance to levamisole as characterized by this molecular system is recessive and the
211 presence of a susceptible allele may be enough to confer a susceptible phenotype as
212 previously described (Barrère et al., 2014). This could be clarified by gene expression studies
213 using both resistant and susceptible isolates.

214 We verified a significantly positive correlation between EC50 values of LDT and
215 resistance allele frequencies in qPCR for the five field populations evaluated in phenotypic
216 test. However, Chagas et al. (2016) did not confirm the 63bp indel in Hco-acr-8, as a
217 molecular marker for resistance, in *H. contortus* in Embrapa2010 and Embrapa2014 isolates,
218 which were phenotypically resistant in LDT. Different mechanisms involving other genes, as
219 the presence of a truncated transcript Hco-unc-63b described by Neveu et al. (2010), Hco-
220 unc-38 (Kopp et al., 2009) or Hco-unc-29 (Sarai et al., 2013), may contribute to the resistance
221 to levamisole in some *H. contortus* isolates. In *Ancylostoma caninum*, elevated resistance
222 levels were correlated with the reduction of expression of mRNAs Aca-unc-29, Aca-unc-38
223 and Aca-unc-63 (Kopp et al., 2009). These observations suggest that resistance to levamisole
224 is most probably a complex trait involving more than a single gene (Williamson et al., 2011).

225 *H. contortus* populations from Ceará State, previously characterized for benzimidazole
226 resistance, showed resistant allele frequencies higher than 50% in 14 out of 19 populations .
227 Previous levamisole utilization was reported in 89.5% of these farms although in lower
228 frequencies in comparison to benzimidazoles and macrocyclic lactones. In addition,
229 management practices performed in these farms tend to augment the development of
230 resistance (Santos et al., 2017).

231 The qPCR technique presented high efficiency for the diagnosis of the 63bp deletion
232 in the exon 3b sequence of Hco-acr-8 gene. We verified that the absence of the indel is
233 correlated with the phenotype of levamisole resistance in populations of *H. contortus* isolated
234 in the Northeastern region of Brazil. This methodology may be useful to monitor resistance
235 levels in field populations. However, the possible involvement of other nicotinic acetylcholine
236 receptor genes in the development of resistance to levamisole in populations of *H. contortus*
237 cannot be discarded.

238

239 **Conflicts of interest**

240

241 The authors declare that they have no conflicts of interest.

242

243 **Acknowledgements**

244

245 The authors would like to thank CNPq (projects 159094/2013-5 and 303018/2013-5)
246 for financial support and Embrapa Caprinos e Ovinos for infrastructure support.

247

248

249

250 **References**

- 251
- 252 Almeida, F.A., Garcia, K.C., Torgerson, P.R., Amarante, A.F., 2010. Multiple resistance to
253 anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in
254 Brazil. *Parasitol. Int.* 59, 622–625.
- 255 Barrère, V., Beech R.N., Charvet, C.L., Prichard, R.K., 2014. Novel assay for the detection
256 and monitoring of levamisole resistance in *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 44, 235–
257 241.
- 258 Besier, R.B., Kahn, L.P., Sargison, N.D., Van Wyk, J.A., 2016. The diagnosis, treatment and
259 management of *Haemonchus contortus* in small ruminants. In: Gasser, R., Samson-
260 Himmelstjerna, G.V. (Eds.), *Haemonchus contortus* and Haemonchosis Past, Present and
261 Future Trends. vol. 93, pp. 181e238.
- 262 Chagas, A.C.S., Domingues, L.F., Gaínza, Y.A., Barioni-Júnior, W., Esteves, S.N., Niciura,
263 S.C.M., 2015. Target selected treatment with levamisole to control the development of
264 anthelmintic resistance in a sheep flock. *Parasitol.* 115, 1131-1139.
- 265 Fauvin, A., Charvet, C., Issouf, M., Cortet, J., Cabaret, J., Neveu, C., 2010. cDNA-AFLP
266 analysis in levamisole-resistant *Haemonchus contortus* reveals alternative splicing in a
267 nicotinic acetylcholine receptor subunit. *Mol. Biochem. Parasitol.* 170, 105–107.
- 268 Germer, S., Holland, M.J., Higuchi, R., 2000. High-throughput SNP allele-frequency
269 determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. *Genome Res.*, 10, 258–266.
- 270 Hubert J., Kerboeuf D. 1992. A microlarval development assay for the detection of
271 anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet. Rec.* 130, 442-446.
- 272 Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N., 2012. An inconvenient truth: global worming and
273 anthelmintic resistance. *Vet Parasitol*, 186, 70-78.

- 274 Kopp, S.R., Coleman, G.T., Traub, R.J., McCarthy, J.S., Kotze, A.C., 2009. Acetylcholine
275 receptor subunit genes from *Ancylostoma caninum*: altered transcription patterns associated
276 with pyrantel resistance. *Int. J. Parasitol.* 39, 435–441.
- 277 Lambert, S.M., Nishi, S.M., Mendonça, L.R., da Silva Souza, B.M.P., da Silva Julião, F., da
278 Silva Gusmão, P., de Almeida, M.A.O., 2017. Genotypic profile of benzimidazole resistance
279 associated with SNP F167Y and F200Y beta-tubulin gene in Brazilian populations of
280 *Haemonchus contortus* of goats. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* 8, 28–34.
- 281 Martin, R.J., 1997. Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet. J.* 154, 11–34.
- 282 Neveu, C., Charvet, C.L., Fauvin, A., Cortet, J., Beech, R.N., Cabaret, J., 2010. Genetic
283 diversity of levamisole receptor subunits in parasitic nematode species and abbreviated
284 transcripts associated with resistance. *Pharmacogenet Genomics*, 20, 414–425.
- 285 Otsen, M., Hoekstra, R., Plas, M.E., Buntjer, J.B., Lenstra, J.A., Roos, M.H., 2001. Amplified
286 fragment length polymorphism analysis of genetic diversity of *Haemonchus contortus* during
287 selection for drug resistance. *Int. J. Parasitol.* 31, 1138–1143.
- 288 Peña-Espinoza, M., Thamsborg, S.M., Demeler, J., Enemark, H.L., 2014. Field efficacy of four
289 anthelmintics and confirmation of drug-resistant nematodes by controlled efficacy test and
290 pyrosequencing on a sheep and goat farm in Denmark. *Vet. Parasitol.* 206, 208–215.
- 291 Roos, M.H., Otsen, M., Hoekstra, R., Veenstra, J.G., Lenstra, J.A. 2004. Genetic analysis of
292 inbreeding of two strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.*
293 34, 109–115,
- 294 Santos, J. M. L., Monteiro, J. P., Ribeiro, W. L.C., Macedo, I. T. F., Araújo-Filho, J. V.,
295 Andre, W. P. P., Araújo, P. R. M., Vasconcelos, J. F., Freitas, E. P., Camurça-Vasconcelos,
296 A. L. F., Vieira, L. S., Bevilaqua, C. M. L, 2017. High levels of benzimidazole resistance and
297 β -tubulin isotype 1 SNP F167Y in *Haemonchus contortus* populations from Ceará State,
298 Brazil. *Small Rumin. Res.* 146, 48–52.

299 Sarai, R., Kopp, S., Coleman, G., Kotze, A.C., 2013. Acetylcholine receptor subunit and P-
300 glycoprotein transcription patterns in levamisole susceptible and resistant *Haemonchus*
301 *contortus*. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 3, 51–58.

302 Tyrrell, K.L., Le Jambre L.F., 2010. Overcoming macrocyclic lactone resistance in
303 *Haemonchus contortus* with pulse dosing of levamisole. Vet Parasitol, 168, 278–283.

304 Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J.A.M., 2007.
305 Primer3plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Res., 35, 71–74.

306 Williamson, S.M., Storey, B., Howell, S., Harper, K.M., Kaplan, R.M., Wolstenholme, A.J.,
307 2011. Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence
308 polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. Mol. Biochem.
309 Parasitol. 180, 99–105.

310

311

312

313

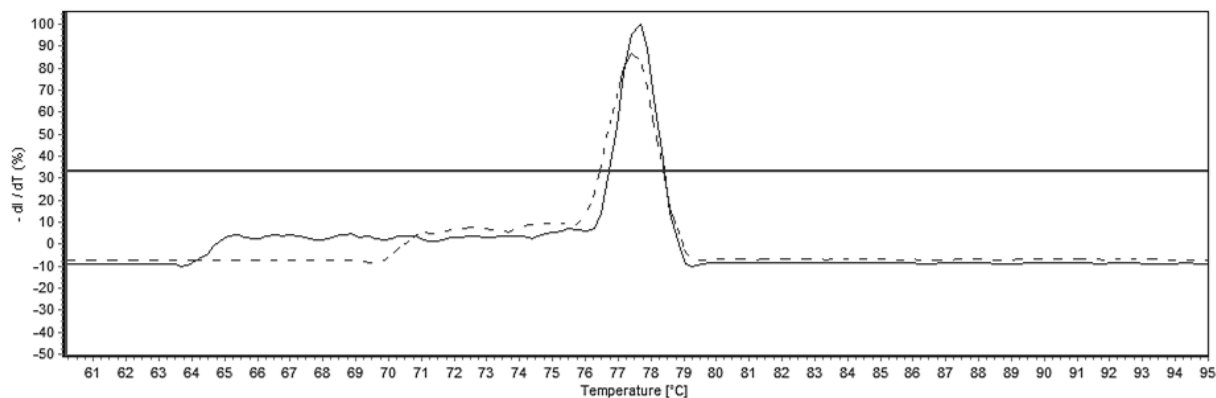
314

315

316

317

318



319

320 **Fig. 1.** Example of a melting curve from isolate 15 after qPCR amplification of products
321 containing resistant (dashed line) and sensitive (continuous line) alleles. The Y-axis
322 represents the height of the derivative peaks ($-dI/dT$) while the X-axis represents the
323 temperatures ($^{\circ}\text{C}$) where fluorescence measures were taken.

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336



337
338

339 **Fig. 2.** Banding pattern in 1,5% agarose gel for amplified products of the indel de 63 bp of
 340 exon 3 of the Hco-acr-8 gene in *Haemonchus contortus*. 100 bp: size marker; lanes 1–3: ISE
 341 sensitive allele; lanes: 4–6: ISE resistant allele; lanes 7–9: Kokstad sensitive allele; lanes 10–
 342 12: Kokstad resistant allele; lanes 13–15: control sensitive allele; lanes 16–18: control
 343 resistant allele. The arrows indicate the two possible amplicon sizes: 227 bp indicates the
 344 presence of the insertion (indel) and the 195 bp band indicates the absence of the indel.

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355 **Table 1.** Real time PCR primers used to detect de alelos sensíveis e resistentes para
 356 resistência a levamisol em *H. contortus*. In the primer name column, F stands for forward and
 357 R for reverse.

Primer	Sequence 5'– 3'	Allele	Size product (bp)
LevSusR2	CGGCGATATAACAGCAGTTAAC	sensitive	227
LevResR2	ATCTTTGACAGTAATCAGCGTTG	resistant	195
LevF2	TAACCTTACCTATACACCCGTCT	both	

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374 **Table 2.** Quantitative PCR mean Cts, standard deviation, resistant allele frequencies for indel
 375 de 63 pb of exon 3 of the Hco-acr-8 gene and concentrations to inhibit 50% (EC50) of
 376 development of L3 larvae in larval development test (LDT) in *H. contortus*.

377

Population (Farm ^a)	Ct ^b ± SD of each allele		Resistant allele (%)	LDT EC50 µg/mL (95% CI)
	Sensitive	Resistant		
ISE	24.63 ± 0.12	24.37 ± 0.19	45.50	-
Kokstad	-	24.57 ± 0.23	100	-
1	29.31 ± 0.17	27.17 ± 0.38	81.47	-
2	29.73 ± 0.13	30.23 ± 0.26	41.48	-
3	29.97 ± 0.12	30.03 ± 0.61	49.02	-
4	29.76 ± 0.16	29.52 ± 0.45	54.26	-
5	31.06 ± 0.38	30.21 ± 0.19	64.37	-
6	27.18 ± 0.12	26.23 ± 0.10	65.89	-
7	27.59 ± 0.18	27.42 ± 0.58	52.86	-
8	29.53 ± 0.71	28.94 ± 0.42	60.03	-
9	27.52 ± 0.21	27.09 ± 0.23	57.45	-
10	26.34 ± 0.38	27.37 ± 0.02	32.77	-
11	27.79 ± 0.45	29.20 ± 0.06	27.34	-
12	27.79 ± 0.45	29.20 ± 0.06	54.95	-
13	25.55 ± 0.06	24.86 ± 0.06	61.62	-
14	26.11 ± 0.61	24.27 ± 0.17	78.13	-
15	27.83 ± 0.17	27.69 ± 0.51	52.42	-
16	32.6 ± 0.28	30.41 ± 0.15	82.02	-
17	28.50 ± 0.52	26.45 ± 0.18	80.55	-

18	26.41 ± 0.14	27.21 ± 0.25	36.48	-
19	29.91 ± 0.62	29.01 ± 0.20	65.06	0.063 (0.023-0.166)
20	30.83 ± 0.52	29.27 ± 0.16	74.63	0.083 (0.038-0.178)
21	29.02 ± 0.03	27.87 ± 0.25	68.89	0.072 (0.035-0.148)
22	31.28 ± 0.37	29.45 ± 0.70	30.72	0.020 (0.014-0.027)
23	31.92 ± 0.36	33.10 ± 0.43	78.05	0.149 (0.109-0.207)

378 ^a 1: Bela Cruz, 2:Granja, 3: Beberibe, 4:Canindé, 5:Itapipoca, 6:Aiuaba, 7:Pentecoste, 8:Caucaia, 9:Independência, 10:Quixeramobim,
379 11:Tauá (farm 1), 12: Morada Nova; 13: Jaguaribe; 14: Jaguaretama, 15: Icó, 16: Iguatu, 17: Campos Sales, 18: Juazeiro do Norte, 19:
380 Sobral, 20: Crateús, 21: Independência, 22: Ipueiras, 23: Tauá (farm 2).

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

9. CONCLUSÕES

- A detecção de polimorfismos de genes de β -tubulina F200Y, F167Y e E198A em ovos de *H. contortus* por qPCR usando amostras provenientes de infecções mistas é um método eficiente para pesquisas em larga escala para resistência a BZ. O alelo resistente no SNP F167Y é o mais frequente no Estado do Ceará. A utilização de BZs específicos, neste caso albendazol e oxfendazol, influenciaram a prevalência de SNPs específicos. Além disso, a resistência à BZ é generalizada no estado do Ceará.
- Os grupos de animais infectados com ISE submetidos ao tratamento com ivermectina e oxifendazol combinado com ivermectina apresentaram padrões muito semelhantes de aumentos de resistência para ambas às classes anti-helmínticas, enquanto o grupo tratado apenas com oxifendazol apresentou um nível maior de resistência para BZ. A seleção de Ivermectina para SNPs F200Y e F167Y predispôs os nematoides à resistência BZ. O papel dos SNPs da β -tubulina na resistência à LM permanece evasivo, mas a alternância entre BZ e LM no campo pode contribuir com a manutenção de altos níveis desses SNP em populações resistentes.
- A técnica qPCR apresentou alta eficiência para o diagnóstico da deleção de 63 pb na sequência do exon 3 do gene *Hco-acr-8b*. Foi verificada que a ausência de um indel está correlacionada com o fenótipo da resistência ao levamisol no isolado de Kokstad e em populações de *H. contortus* isoladas no estado do Ceará, Nordeste do Brasil. Esta metodologia pode ser útil para monitorar níveis de resistência em novas formas de controle.

10. PERSPECTIVAS

- Estudos adicionais são necessários para investigar os detalhes da interação entre os diferentes tipos de BZs e os polimorfismos no gene codificante para o isotipo 1 da β -tubulina;
- São necessárias investigações adicionais para determinar as implicações a longo prazo para o uso sustentável do ML e BZ contra populações de *H. contortus*;
- É fundamental investigar o possível envolvimento de outros genes do receptor nicotínico de acetilcolina para o desenvolvimento de resistência a levamisol em populações de *H. contortus*.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHID, S. M. M. et al.. Eficácia anti-helmíntica em rebanho caprino no Estado de Alagoas, Brasil. **Acta Veterinaria Brasileira**, v.1, p. 56-59, 2007.

ALMEIDA, G. D. et al. Veterinary Parasitology Ivermectin and moxidectin resistance characterization by larval migration inhibition test in field isolates of *Cooperia* spp . in beef cattle , Mato Grosso do Sul , Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 191, n. 1-2, p. 59–65, 2013.

ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, M. A. et al. Anthelmintic resistance in trichostrongylid nematodes of sheep farms in Northwest Spain. **Parasitology Research**, v. 99, n. 1, p. 78–83, 2006.

ALVAREZ-SÁNCHEZ, M. A. et al. Real time PCR for the diagnosis of benzimidazole resistance in trichostrongylids of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 291-298, 2005.

ARDELLI, B.F., PRICHARD, R.K. Inhibition of p-glycoprotein enhances sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to ivermectin. **Veterinary Parasitology**, v. 191, P. 264–275, 2013.

ASHRAF, S. et al. Ivermectin binds to *Haemonchus contortus* tubulins and promotes stability of microtubules. **International Journal for Parasitology**, v. 45, p. 647-54. 2015.

BAGNALL, N. H. et al. Mutations in the Hco-mptl-1 gene in a field-derived monepantel-resistant isolate of *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 7, n. 2, p. 236–240, 2017.

BARRÈRE, V. et al. Efficiency of a genetic test to detect benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* nematodes in sheep farms in Quebec. Canada. **Parasitology International**, v. 62, p. 464– 470, 2013.

BARRÈRE, V. et al. Novel assay for the detection and monitoring of levamisole resistance in *Haemonchus contortus*. v. 44, p. 235–241, 2014.

BLACKHALL, W. et al. *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin and moxidectin-selected strains. **Experimental Parasitology**, v. 90, p. 42-48, 1998.

BLACKHALL, W.J. et al. Selection at a g-aminobutyric acid receptor gene in *Haemonchus contortus* resistant to avermectins/milbemycins. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v.131, p.137–145, 2003.

BOWMAN D.D. et al.. Parasitologia Veterinária de Georgis. 8ª ed. Editora Malone, Tamboré. 422p, 2006.

BRASIL, B.S.A.F. et al. Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 42, p. 469–479, 2012.

BRITO, D.R.B. et al. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da microrregião do Alto Mearim e Grajaú, no estado do Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 967-974, 2009.

BROWN, H. D. et al. Antiparasitic drugs. iv. 2-(4'-thiazolyl)-benzimidazole: a new anthelmintic. **Journal of the American Chemical Society**, v. 83, p. 1764-1765, 1961.

BYGARSKI, E.E., et al. Resistance to the macrocyclic lactone moxidectin is mediated in part by membrane transporter p-glycoproteins: implications for control of drug resistant parasitic nematodes. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. v. 4, p. 143–151, 2014.

CABARET, J.; BERRAG, B. Faecal egg count reduction test for assessing anthelmintic efficacy: average versus individually based estimations. **Veterinary parasitology**, v. 121, p. 105-113, 2004.

CALVETE, C. et al. Variability of the egg hatch assay to survey benzimidazole resistance in nematodes of small ruminants under field conditions. **Veterinary Parasitology**. V. 203, Pages 102–113, 2014.

CALVETE, C., URIARTE, J., Improving the detection of anthelmintic resistance: evaluation of faecal egg count reduction test procedures suitable for farm routines. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p. 438–452, 2013.

CAMPBELL, W.C. Lessons from the history of ivermectin and other antiparasitic agents. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, p. 1-14, 2016.

COELHO, W.A.C. et al. Resistência anti-helmíntica em caprinos no Município de Mossoró, RN. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, p. 589-599, 2010.

COLES G.C. et al. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 167–185, 2006.

COLES G.C. et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, p. 35-44. 1992.

COLES, G.C. et al. A larval development test for detection of anthelmintic resistant nematodes. **Research in Veterinary Science**, v. 45, p. 50–53, 1988.

COSTA JÚNIOR, G. S. et al. Efeito de vermifugação estratégica, com princípio ativo à base de ivermectina na incidência de parasitos gastrintestinais no rebanho caprino da UFPI. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 6, p. 279-286, 2005.

CUDEKOVÁ, P. et al.. Phenotypic and genotypic characterisation of benzimidazole susceptible and resistant isolates of *Haemonchus contortus*. **Veterinary parasitology**, v. 172, p. 155–159, 2010.

DARGIE, J.D., ALLONBY, E.W., 1975. Pathophysiology of single challenge infections of *Haemonchus contortus* (In “Merino sheep: studies on red cell kinetics and the ‘self-cure’ phenomenon”). **International Journal for Parasitology**, v. 5, p. 147-157, 1975.

DEMELER, J., et al. Adaptation and evaluation of three different in vitro tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle. **Veterinary parasitology**, v. 170, p. 61–70, 2010.

DEMELER, J., et al. Evaluation of the egg hatch assay and the larval migration inhibition assay to detect anthelmintic resistance in cattle parasitic nematodes on farms. **Parasitology International**, v. 61, p. 614–618. 2012.

DOLINSKÁ, M. et al. 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.

DOS SANTOS, V. T.; GONÇALVES, P. C. Variação de estirpes de *Haemonchus* resistentes ao thiabendazole no Rio Grande do Sul. **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária**, v. 9, p. 201-209, 1967.

DOS SANTOS, V. T.; GONÇALVES, P. C. Verificação de estirpe resistente de *Haemonchus* resistente ao thiabendazole no Rio Grande do Sul (Brasil). **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária**, v. 9, p. 201-209, 1967.

DRUDGE, J.H. et al. Field studies on parasite control in sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 25, p. 1512-1518, 1964.

ELARD, L. et al. PCR diagnosis of benzimidazole susceptibility or resistance in natural populations of the small ruminant parasite, *Teladorsagia circumcincta*. **Veterinary Parasitology**, v. 80, p. 231–237, 1999.

EMBRAPA. Recomendações tecnológicas para produção de caprinos e ovinos no Estado do Ceará. **EMBRAPA/CNPC**. Circular técnica nº9, 58p, 1994.

FAUVIN, A. et al. cDNA-AFLP analysis in levamisole-resistant *Haemonchus contortus* reveals alternative splicing in a nicotinic acetylcholine receptor subunit. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 170, p. 105–107, 2010.

FISHER, M. H.; MROZIK, H. Chemistry in Ivermectin and Abamectin In: CAMPBELL, W.C. (Ed.) Ivermectin and Abamectin. New York: Springer, 1989. p. 1-23.

FORBES, A. B. et al. Sub-clinical parasitism in spring-born, beef suckler calves: epidemiology and impact on growth performance during the first grazing season. **Veterinary Parasitology**, v.104, p. 339-344, 2002.

FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33, p. 1391-1402, 2013.

FORTES, F.S. et al. Evaluation of resistance in a selected field strain of *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin using the Larval Migration on Agar Test. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 183-187, 2013.

GASSER R.B., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G. *Haemonchus contortus* and Haemonchosis: Past, Present and Future Trends. **Advances in Parasitology**. v. 93, 2016.
GEARY, T.G. et al.. *Haemonchus contortus*: ivermectin-induced paralysis of the pharynx. **Experimental Parasitology**, v. 77, p. 88–96, 1993.

GEORGES, E. The P-glycoprotein ABCB1 linker domain encodes high-affinity binding sequences to a-and b-tubulins. **Biochemistry**, v. 46, p.7337–7342, 2007.

GEURDEN, T., et al.. Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastrointestinal nematodes in France, Greece and Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 17, p. 59-66, 2014.

GHISI, M. et al. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p.313–320, 2007.

GILL, J.H. et al. Avermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus* effects of ivermectin resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 25, p. 463–470, 1995.

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

GILLEARD, J. S. Understanding anthelmintic resistance: the need for genomics and genetics, **International Journal for Parasitology**, v.36, p.1227-1239, 2006.

HARDER, A., Chemotherapeutic approaches to nematodes: current knowledge and putlook. **Parasitology Research**, v. 88, P. 271-277. 2002.

HERRERA-MANZANILLA, F. A. et al. 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, n. April, p. 29–33, 2017.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Record**, v. 130, p. 442-446, 1992.

IBGE. 2010. Censo agropecuário 2010, Disponível em http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ce&tema=pecuaria2010. Access in: 08/02/ 2016.

KAPLAN, R. M.; VIDYASHANKAR, A. N. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 70-78, 2012.

KLAFKE, G. M. Diagnóstico e mecanismos de resistência a ivermectina em *Rhipicephalus (boophilus) microplus* (acari: ixodidae). Tese de doutorado. Programa de Pós- Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 177p, São Paulo – SP, 2011.

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

KOTZE, A.C. et al. A modified larval migration assay for detection of resistance to macrocyclic lactones in *Haemonchus contortus*, and drug screening with Trichostrongylidae parasites. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 294–305. 2006.

KŘÍŽOVÁ-FORSTOVÁ, V. et al. Factors affecting pharmacokinetics of benzimidazole anthelmintics in food-producing animals: the consequences and potential risks. **Research in veterinary science**, v. 91, n. 3, p. 333–41, dez. 2011.

KWA, M. S. et al. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in β -tubulin isotype 1. **Molecular Biochemistry Parasitology**, v. 63, p. 299-303, 1994.

LACEY, E. et al. A larval development assay for the simultaneous detection of broad spectrum anthelmintic resistance. In: Boray, J.C., Martin, P.J., Roush R.T. (Eds.), Resistance of Parasites to Antiparasitic Drugs. MSDAGVET, Rahway, pp. 177–184, 1991.

LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. **International Journal for Parasitology**, v. 18, n. 7, p. 885-936, 1988.

LE JAMBRE, L.F. Egg hatch as an in vitro assay of thiabendazole resistance in nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 2, p. 385–391. 1976.

LE JAMBRE, L.F. Relationship of blood loss to worm numbers, biomass and egg production in *Haemonchus contortus* infected sheep. **International Journal for Parasitology**, v. 25, p. 269-273, 1995.

LIMA, M.M. et al. Eficácia da moxidectina, ivermectina e albendazol contra helmintos gastrintestinais em propriedades de criação caprina e ovina no estado de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, p. 94-100, 2010.

MARTIN, P.J. et al. Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and in vitro assays. **Australian Veterinary Journal**, v. 66, p. 236–240, 1989.

MARTÍNEZ-VALLADARES, M. et al. 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, p.177-181. 2013.

MCCAVERA, S. et al. An Ivermectin-Sensitive Glutamate-Gated Chloride Channel from the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. **Molecular Pharmacology**, v. 75, p. 1347–1355, 2009.

MELO, A. C. F. L. et al. Resistência aos anti-helmínticos benzimidazóis em nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes do Semiárido nordestino brasileiro. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 294-300, 2009.

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L. Resistência anti-helmíntica em nematóides de pequenos ruminantes: uma revisão. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, p. 35-45. 2002.

MINISTRY OF AGRICULTURE FISHERIES AND FOOD (MAFF), 1986. Manual of Veterinary Parasitological Techniques. Reference Book 418, HMSO, London.

MORENO-GUZMÁN, M. J. et al. Levamisole binding sites in *Haemonchus contortus*. . **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 413-418, 1998.

MOTTIER, L.; LANUSSE, C. Bases moleculares de la resistencia a fármacos. **Revista de Medicina Veterinária**, v. 82, p. 74- 85, 2001.

MOTTIER, M., PRICHARD, R.K. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 18, p. 129–140, 2008.

NEVEU C. et al. Genetic diversity of levamisole receptor subunits in parasitic nematode species and abbreviated transcripts associated with resistance. **Pharmacogenet Genomics**, v. 20, p. 414– 425, 2010.

NEVEU, C. et al. Identification of levamisole resistance markers in the parasitic nematode *Haemonchus contortus* using a cDNA-AFLP approach. **Parasitology**, v. 134, n. Pt 8, p.

1105–10, jan. 2007.

NICIURA, S.C. et al. 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. **Veterinary Parasitology**, v. 19, p.608– 612, 2012.

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

PAPADOPOULOS, E. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Small Ruminant Research**, v. 76, p. 99–103, 2008.

PINHEIRO, A.C. Verminose ovina. **A Hora Veterinária**. n.12, p.5-9, 1983.

PRESIDENTE, P.J.A., 1985. Methods for detection of resistance to anthelmintics. In: Anderson, M., Waller, P.J. (Eds.), *Resistance in Nematodes to Anthelmintic Drugs*. Australian Wool Corporation Technical Publication, CSIRO, Australia.

PRICHARD, R. et al. 2000. Polymerisation and benzimidazole binding assays with recombinant α - and β -tubulins from *Haemonchus contortus*. American Association of Veterinary Parasitologists, Forty-fifth Annual Meeting.

PRICHARD, R. K. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trends in Parasitology**, v. 17, p. 445-452, 2001.

PRICHARD, R. K.; ROULET, A. ABC transporters and beta-tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. **Parasitology**, v. 134, p. 1123–32, 2007.

PRICHARD, R.K. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, p. 239–251, 1980.

RODRIGUES, A.B. et al. Sensibilidade dos nematóides gastrintestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p.162-166, 2007.

SANTOS, J. M. L. et al. High levels of benzimidazole resistance and β -tubulin isotype 1 SNP F167Y in *Haemonchus contortus* populations from Ceará State, Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 146, p. 48–52, 2017.

SANTOS, J.M.L., et al. Identification and quantification of benzimidazole resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 199, p. 160-164. 2014.

SARAI, R. S. et al. Acetylcholine receptor subunit and P-glycoprotein transcription patterns in levamisole-susceptible and -resistant *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 3, p. 51–58, 2013.

SAUNDERS, G.I. et al. Characterization and comparative analysis of the complete *Haemonchus contortus* b-tubulin gene family and implications for benzimidazole resistance in strongylid nematodes. **International Journal for Parasitology**. v. 43, P. 465–475, 2013.

SECHI, S. et al. Effects of anthelmintic treatment on milk production in Sarda dairy ewes naturally infected by gastrointestinal nematodes. **Small Ruminant Research**, v. 88, p. 145-150, 2010.

SILVESTRE, A.; CABARET, J. Mutation in position 167 of isotype 1 b -tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? **Molecular Biochemistry and Parasitology**, v.120, p. 297-300, 2002.

SILVESTRE, A; HUMBERT, J. F.A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites. **Experimental Parasitology**, v. 95, p. 271–276. 2000.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL (SINDAN). Mercado veterinário por classe terapêutica e espécie animal. São Paulo, SP. Disponível em [<http://www.sindan.org.br>]. Acesso em: 20 maio 2017.

TAYLOR, M. A. et al. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary parasitology**, v. 103, p. 183-94, 2002.

TAYLOR, M.A. A larval development test for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 49, p. 198–202.1990.

TIWARI, J. et al. Detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using RFLP-PCR technique. **Veterinary Parasitology**, v. 138, p. 301–307, 2006.

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

VADLEJCH, et al. The effect of risk factors of sheep flock management practices on the development of anthelmintic resistance in the Czech Republic. **Small Ruminant Research**. v. 117, p. 183-190, 2014.

VARADY et al.. Comparison of two versions of larval development test to detect anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 267-271, 2009.

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

VIEIRA, L.S. et al. Redução do número de ovos por grama de fezes (OPG) em caprinos medicados com anti-helmínticos. Sobral: **Embrapa-CNPc**, 1989. 18 p. (Boletim de Pesquisa, 11).

VIEIRA, L.S.; CAVALCANTE, A.C.R. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, p. 99-103, 1999.

VON SAMSON-HIMMELSTJENA, G. et al. Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing. **Parasitology**, v. 136, p. 349–358, 2009.

VON SAMSON-HIMMELSTJENA, G. et al. Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes. **Parasitology**, v. 134, p. 1077–1086, 2007.

WALSH, T. K. et al. Detection and measurement of benzimidazole resistance alleles in *Haemonchus contortus* using real-time PCR with locked nucleic acid Taqman probes. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 304–312, 2007.


WILLIAMSON, S. M. et al. Molecular & Biochemical Parasitology Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 180, n. 2, p. 99–105, 2011.

WOOD, J.B. et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP): second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology**, v. 58, p. 181–213. 1995.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Publicação do artigo referente ao capítulo 1


Small Ruminant Research 146 (2017) 48–52



Contents lists available at ScienceDirect


Small Ruminant Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/smallrumres



Short communication

High levels of benzimidazole resistance and β -tubulin isotype 1 SNP F167Y in *Haemonchus contortus* populations from Ceará State, Brazil



Jessica Maria Leite dos Santos^a, Jomar Patrício Monteiro^b,
 Wesley Lyeverton Correia Ribeiro^a, Iara Tersia Freitas Macedo^a,
 José Vilemar de Araújo Filho^a, Weibson Paz Pinheiro Andre^a,
 Paulo Ricardo Monteiro Araújo^c, Janaelia Ferreira Vasconcelos^d,
 Edilson Pereira de Freitas^d, Ana Lourdes Fernandes Camurça-Vasconcelos^a,
 Luiz da Silva Vieira^b, Claudia Maria Leal Bevilaqua^{a,*}

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará—UECE, 60714-903, Fortaleza, CE, Brazil
^b Embrapa Caprinos e Ovinos, Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral Graziara km 04, Caixa Postal 745, 62016-970, Sobral, Ceará, Brazil
^c Instituto Superior de Tecnologia Aplicada—INTA, 62050-100, Sobral, CE, Brazil
^d Universidade Estadual Vale do Acaraú—UVA, 62040-370, Sobral, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 4 August 2016
 Received in revised form 25 November 2016
 Accepted 30 November 2016
 Available online 2 December 2016

Keywords:
 Real-time PCR
 Nematodes
 Sheep
 Benzimidazoles
 Anthelmintic resistance

ABSTRACT

Haemonchus contortus is the most prevalent parasitic nematode in tropical areas, and anthelmintic resistance is a global problem. Our objective was to characterize benzimidazole (BZ) resistance in gastrointestinal nematode populations in Ceará State, Brazil, using the egg hatch test (EHT) and in *H. contortus* populations using quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). Twenty locations were surveyed, and fecal samples were collected from a minimum of 40 animals from each farm and pooled. Five thousand L3 from each farm were used to infect single animals at Embrapa (Brazilian Agricultural Research Company) to provide a source of eggs for both phenotypical and molecular tests. The mean EHT was 2.46 μ g/ml (\pm 0.58 μ g/ml), and BZ resistance was detected at all surveyed locations. The mean resistant allelic frequencies at positions F200Y and F167Y were 34.16% (\pm 12.13%) and 58.31% (\pm 18.89%), respectively. The resistant allelic frequencies at F167Y were higher than those at F200Y in most studied locations. We also investigated the possibility that specific BZ utilization may influence resistant allelic frequencies. We selected three nematode populations based on the resistant SNP prevalence at F200Y and F167Y as follows: higher frequency at SNP F200Y, higher frequency at SNP F167Y and similar frequencies at both positions. Anthelmintic treatments included two BZs (oxfendazole and albendazole) and ivermectin. Three animals per population per treatment were infected with 5000 L3, and nematode eggs were collected for molecular test before and after anthelmintic treatments. The results showed preferential selection of SNP F167Y in response to oxfendazole, an increase in resistant SNP frequencies in general in response to albendazole and little change in relation to pre-treatment situations in response to ivermectin. Our results confirm that BZ resistance is common. The resistant allele at SNP F167Y in *H. contortus* prevails in Ceará State, and we provide evidence that this result may be due to the utilization of oxfendazole in recent years.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

* Corresponding author at: Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/UECE, Av. Sítio Manguba, 1700, Campus do Itaperi, CEP 60714-903, Fortaleza, Ceará, Brazil.
 E-mail addresses: bevilaqua.uece@gmail.com, claudiaml@yahoo.com.br (C.M.L. Bevilaqua).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.sma.2016.11.023>
 0921-4488/© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Gastrointestinal nematodes of the genus *Haemonchus* constitute a major cause of loss for livestock production in tropical and sub-tropical areas. Parasites are controlled using various anthelmintics, which exert selection pressure resulting in anthelmintic resistance (Torres-Acosta et al., 2012). Benzimidazoles are among the most used anthelmintics in Northeastern Brazil (Melo et al., 2009), and

APÊNDICE B - Comprovante de submissão do artigo referente ao capítulo 2

Dear Dr. Jessica Santos,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: International Journal for Parasitology

Corresponding Author: Jomar Monteiro

Co-Authors: Jessica L Santos, Msc; Janaelia F Vasconcelos, undergraduate student; Gracielle A Frota, undergraduate student; Wesley L Ribeiro, Msc; Weibson P André, Msc; Luiz S Vieira, Ph.D.;

Marcel Teixeira, Ph.D.; Claudia M Bevilaqua, Ph.D.;

Title: *Haemonchus contortus* <beta>-tubulin isotype 1 gene F200Y and F167Y SNPs are both selected by ivermectin and oxfendazole treatments with differing impacts on anthelmintic resistance

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at jomar.monteiro@embrapa.br; jomarmont@gmail.com; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<https://ees.elsevier.com/ijpara/l.asp?i=91217&l=UV0DDUHR>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

International Journal for Parasitology