

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA SILVA FORTES SUCHODOLAK BRAZ

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À
RESISTÊNCIA À IVERMECTINA EM *Haemonchus contortus* UTILIZANDO
SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

CURITIBA

2014

FERNANDA SILVA FORTES SUCHODOLAK BRAZ

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À
RESISTÊNCIA À IVERMECTINA EM *Haemonchus contortus* UTILIZANDO
SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Clínica, Cirurgia e Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento

CURITIBA

2014


PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS




PARECER

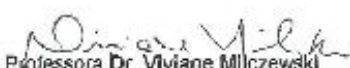
A Comissão Examinadora da Defesa da Tese intitulada "IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA À IVERMECTINA EM *Haemonchus contortus* UTILIZANDO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO" apresentada pela Doutoranda **FERNANDA SILVA FORTES SUCHODOLAK BRAZ** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou a candidata ΔPTA para receber o Título de Doutor em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

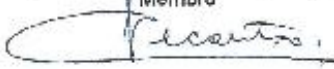
Curitiba, 28 de março de 2014


Professor Dr. Marcelo Beltrão Molento
Presidente/Orientador


Professora Dra. Cristina Santos Sotomaior
Membro


Dra. Simone Cristina Méo Niciura
Membro


Professora Dr. Viviane Milczewski
Membro


Professor Dr. Ivan Deconto
Membro

Aos meus pais, Alberi (*in memorian*) e Bernadete,
exemplos de generosidade, perseverança, luta e amor à vida.

Ao meu esposo, Fabiano,
que completa a minha vida e a torna mais feliz a cada dia.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar presente em minha vida e de minha família, guiando nossos passos e nos mantendo fortes, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus queridos familiares, Bernadete, Paulo, Patricia, Alberto, Fernando, Luiza, Junior, Zélia, Joel, Fabiano e nosso tão esperado bebê (que já está a caminho) pelo apoio e amor sincero.

A todos os amigos, professores e colegas de laboratório, pelo carinho e auxílio prestado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento, por mais esta oportunidade. Agradeço imensamente a amizade, a confiança e todo o apoio técnico.

Ao Prof. Dr. Robin N. Beech, do Instituto de Parasitologia – *McGill University*, pela agradável recepção e por todos os ensinamentos e auxílios proporcionados durante o trabalho.

Ao Prof. Dr. Guilherme Oliveira e ao Dr. Fabiano Pais, do Centro de Excelência em Bioinformática (CEBio) – FIOCRUZ MINAS, pela dedicação e assistência na realização das análises utilizando ferramentas de bioinformática.

Ao Prof. Dr. Amilcar A. Cruz, da *Universidad de Camagüey Ignacio Agramonte Loynaz*, pela amizade e ajuda disponibilizada sempre prontamente. Agradeço todo o apoio e incentivo recebidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento ao projeto de pesquisa (Processo: 559614/2009-8).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Programa de Reestruturação e Interiorização das Universidades Federais (CAPES/REUNI), pela bolsa de doutorado concedida.

Ao *Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture (IICA Canada)*, pelo financiamento ao estágio realizado no exterior.

Agradeço imensamente a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Na verdade só sabemos quão pouco sabemos – com o saber cresce a dúvida.”

(GOETHE, 1826)

RESUMO

Infecções por parasitos nematoides gastrintestinais – principalmente *Haemonchus contortus* – constituem um dos principais problemas sanitários e econômicos na indústria da ovinocultura em todo o mundo. A utilização intensiva de produtos anti-helmínticos para o controle dessas infecções levou à seleção de parasitos resistentes às principais drogas atualmente disponíveis, inclusive à lactona macrocíclica ivermectina (IVM), comprometendo a sua utilização. O desenvolvimento e o uso de métodos seguros e eficientes para o diagnóstico e o monitoramento da resistência anti-helmíntica no campo vêm adquirindo importância progressiva, podendo auxiliar o planejamento de programas de controle parasitário, além de retardar a seleção e propagação de parasitos resistentes. A presente tese está dividida em quatro capítulos. O capítulo inicial apresenta uma introdução, abordando a importância do tema, os objetivos e as justificativas para a realização da pesquisa. O segundo capítulo trata de um artigo de revisão publicado no periódico “Pesquisa Veterinária Brasileira”, em que se discutem os principais métodos atualmente utilizados para o diagnóstico da resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. São apresentados os principais testes diagnósticos *in vivo* e *in vitro*, bem como suas limitações para uso prático efetivo no laboratório e a campo. Além disso, destacam-se os avanços e o desafio no desenvolvimento de testes moleculares, em especial para o grupo das lactonas macrocíclicas. No terceiro capítulo, relata-se um trabalho de pesquisa também publicado no periódico “Pesquisa Veterinária Brasileira”, em que foi avaliada a resistência anti-helmíntica em um isolado de *H. contortus* usando um teste *in vitro* de migração de larvas em ágar. Foi comparada a ação de duas drogas (ivermectina – IVM e moxidectina – MOX), identificando o isolado menos suscetível à IVM do que à MOX, e demonstrando o potencial uso desse método. O quarto capítulo descreve um trabalho de pesquisa para detecção de marcadores moleculares associados à resistência à IVM em *H. contortus*, usando técnicas de sequenciamento de nova geração, de mapeamento genético e de bioinformática, a fim de fornecer novos potenciais marcadores de resistência. Inicialmente, um banco de dados genômico foi produzido a partir do sequenciamento completo do genoma de dois isolados de *H. contortus*, resistente e suscetível à IVM. Um conjunto final de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) e inserção/deleção (indels, do inglês *small insertions and deletions*) foi selecionado em regiões genômicas onde se localizam genes que codificam para as superfamílias de transportadores ABC (do inglês *ATP binding cassette*) e de receptores de canais iônicos abertos por ligante (LGICs, do inglês *Ligand-Gated Ion Channel*), em que estão presentes genes previamente relacionados à resistência à IVM. Tais variantes específicas podem ser usadas para avaliar e validar marcadores moleculares que possibilitem o avanço de pesquisas para a obtenção de um diagnóstico precoce da resistência à IVM.

Palavras-chave: *Haemonchus contortus*. Ivermectina. Resistência anti-helmíntica. Diagnóstico. Marcadores moleculares. SNP. Indel.

ABSTRACT

Gastrointestinal nematode parasite infections – mainly *Haemonchus contortus* – are one of the most health and economic problems in the sheep industry worldwide. The intensive use of anthelmintic drugs for controlling these infections led to the selection of resistant parasites to the major drugs currently available, including ivermectin (IVM), compromising its use. The development and use of safe and efficient methods for the diagnosis and monitoring of anthelmintic resistance in the field are acquiring growing importance, and it may aid the planning of parasite control programs, in addition to delaying the selection and spread of resistant parasites. This thesis is divided into four chapters. The initial chapter presents an introduction, focusing the importance of the theme, objectives and justification for the research. The second chapter is a review published in the journal “Pesquisa Veterinária Brasileira”, in which we discuss the main methods currently used for the diagnosis of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of small ruminants. The main diagnostic tests *in vivo* and *in vitro* as well as its limitations for effective practical use in the laboratory and the field. Furthermore, we highlight the progress and challenges in the development of molecular tests, especially for the macrocyclic lactones group. In the third chapter, we report a research work also published in the journal “Pesquisa Veterinária Brasileira”, in which we evaluated the anthelmintic resistance in *H. contortus* using an *in vitro* larval migration on agar test. The action of two macrocyclic lactones (ivermectin, IVM and moxidectin, MOX) was compared, identifying the *H. contortus* isolate less susceptible to IVM than to MOX and demonstrating the potential use of this method. The fourth section describes a research for detection of molecular markers associated with IVM resistance in *H. contortus*, using techniques of next-generation sequencing, genetic mapping and bioinformatics to provide new potential markers of resistance. Initially, a genomic database was produced from the whole genome sequencing of two *H. contortus* isolates, susceptible and resistant to IVM. A final set of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and small insertions and deletions (indels) was selected in genomic regions where genes encoding ATP binding cassette (ABC) transporter and ligand-gated ion channels (LGICs) superfamily, where genes were previously associated to IVM resistance. Such specific variants can be used to evaluate and validate molecular markers that enable the advancement of research to obtain an early diagnosis of resistance to IVM.

Key words: *Haemonchus contortus*. Ivermectin. Anthelmintic resistance. Diagnostic. Molecular markers. SNP. Indel.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 – CURVAS DE DOSE-RESPOSTA OBTIDAS COM O TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM ÁGAR COM O ISOLADO SP1503Ovi2011 DE *Haemonchus contortus* USANDO IVERMECTINA (IVM, LINHA SÓLIDA) E MOXIDECTINA (MOX, LINHA TRACEJADA)..... 31
- FIGURA 2 – GENOTIPAGEM DE SNPs PELA TÉCNICA DE PCR ALELO-ESPECÍFICA OU PCR BASEADA NO SISTEMA DE AMPLIFICAÇÃO POR MUTAÇÃO REFRAATÁRIA (ARMS)..... 44
- FIGURA 3 – CURVAS DOSE-RESPOSTA OBTIDAS COM O TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM ÁGAR COM O ISOLADO DE *Haemonchus contortus* SP1503Ovi2011, UTILIZANDO IVERMECTINA (IVM) E MOXIDECTINA (MOX)..... 65
- FIGURA 4 – PASSOS PARA A CONVERSÃO DE DADOS BRUTOS DE SEQUENCIAMENTO ILLUMINA EM UM CONJUNTO FINAL DE VARIANTES IDENTIFICADAS..... 81
- FIGURA 5 – DIAGRAMAS DE VENN MOSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO DE SNPS/INDELS EM REGIÕES GENÔMICAS DE TRANSPORTADORES ABC E CANAIS IÔNICOS ABERTOS POR LIGANTE (LGICS) EM ISOLADOS DE *Haemonchus contortus* SUSCETÍVEL (PF23) E RESISTENTE (IVR1503) À IVERMECTINA. A) REGIÃO ABC. B) REGIÃO LGIC..... 86
- FIGURA 6 – DISTRIBUIÇÃO DE SNPS DE ALTA QUALIDADE EM REGIÕES GENÔMICAS DE TRANSPORTADORES ABC E CANAIS IÔNICOS ABERTOS POR LIGANTE (LGICS) USANDO ISOLADOS DE *Haemonchus contortus* SUSCETÍVEL (PF23) E RESISTENTE (IVR1503) À IVERMECTINA, MAPEADOS CONTRA O ISOLADO DE REFERÊNCIA DE *H. contortus* MHco3(ISE) (SCAFFOLDS ABC E LGICS). A) REGIÃO ABC. B) REGIÃO LGIC..... 87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VALORES DE DL ₅₀ , COM O INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (95% IC), VALORES DE Log DL ₅₀ , R ² E VALORES DE <i>p</i> , UTILIZANDO IVERMECTINA (IVM) E MOXIDECTINA (MOX) NO TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM ÁGAR, COM O ISOLADO DE <i>Haemonchus contortus</i> SP1503Ovi2011.....	65
TABELA 2 – TAXAS GERAIS DE ALINHAMENTO E COBERTURA DE MAPEAMENTO POR BOWTIE 2 PARA ISOLADOS DE <i>Haemonchus contortus</i> SUSCETÍVEL (PF23) E RESISTENTE (IVR1503) À IVERMECTINA, UTILIZANDO COMO GENOMA DE REFERÊNCIA SCAFFOLDS DE TRANSPORTADORES ABC E CANAIS IÔNICOS ABERTOS POR LIGANTE (LGICS) DO GENOMA DE <i>H. contortus</i> MHco3(ISE).....	82
TABELA 3 – COMPARAÇÃO DA DETECÇÃO DE SNPS/INDELS EM REGIÕES GENÔMICAS DE TRANSPORTADORES ABC E CANAIS IÔNICOS ABERTOS POR LIGANTE (LGICS) USANDO ISOLADOS DE <i>Haemonchus contortus</i> SUSCETÍVEL (PF23) E RESISTENTE (IVR1503) À IVERMECTINA, E O ISOLADO DE <i>H. contortus</i> MHco3(ISE) (SCAFFOLDS ABC E LGICS) COMO REFERÊNCIA PARA MAPEAMENTO.....	84
TABELA 4 – DISTRIBUIÇÃO DE SNPS/INDELS DETECTADOS EM INTRONS DE REGIÕES GENÔMICAS DE TRANSPORTADORES ABC E CANAIS IÔNICOS ABERTOS POR LIGANTE (LGICS) USANDO ISOLADOS DE <i>Haemonchus contortus</i> SUSCETÍVEL (PF23) E RESISTENTE (IVR1503) À IVERMECTINA, E O ISOLADO DE <i>H. contortus</i> MHco3(ISE) (SCAFFOLDS ABC E LGICS) COMO REFERÊNCIA PARA MAPEAMENTO.....	85
TABELA 5 – LOCALIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM REGIÕES GENÔMICAS DE TRANSPORTADORES ABC (SCAFFOLDS ABC) EM UM ISOLADO DE <i>Haemonchus contortus</i> RESISTENTE À IVERMECTINA (IVR1503) QUE MOSTRARAM UM PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DIFERENTE, QUANDO COMPARADO A OUTROS SCAFFOLDS DE IVR1503 E PF23 (ISOLADO DE <i>H. contortus</i> SUSCETÍVEL À IVERMECTINA).....	88
TABELA 6 – LOCALIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM REGIÕES GENÔMICAS DE CANAIS IÔNICOS ABERTOS POR LIGANTE (LGICS) (SCAFFOLDS LGIC) EM UM ISOLADO DE <i>Haemonchus contortus</i> RESISTENTE À IVERMECTINA (IVR1503) QUE MOSTRARAM UM PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DIFERENTE, QUANDO COMPARADO A OUTROS SCAFFOLDS DE IVR1503 E PF23 (ISOLADO DE <i>H. contortus</i> SUSCETÍVEL À IVERMECTINA).....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AADs	- derivados de amino acetonitrila (do inglês <i>amino-acetonitrile derivatives</i>)
ABC	- do inglês <i>ATP-binding cassette</i>
Ala	- alanina
A/G	- adenina/guanina
ARMS	- amplificação por mutação refratária (do inglês <i>amplification refractory mutation system</i>)
ATP	- adenosina trifosfato (do inglês <i>adenosine triphosphate</i>)
AVs	- avermectinas
BZs	- benzimidazóis
CARS	- do inglês <i>Consortium for Anthelmintic Resistance and Susceptibility</i>
C/T	- citosina/timina
DL ₅₀	- dose capaz de matar 50% dos indivíduos de uma população em teste
DL ₉₅	- dose capaz de matar 95% dos indivíduos de uma população em teste
DMSO	- dimetilsulfóxido
DNA	- ácido desoxirribonucléico
DP	- grau de cobertura (do inglês <i>coverage/read depth</i>)
ELISA	- ensaio imunoenzimático
et al.	- e colaboradores
GABA	- ácido gama-aminobutírico (do inglês <i>gamma-aminobutyric acid</i>)
Gb	- gigabase
Glu	- glutamato
GluCl	- canais de cloro potencializados pelo glutamato (do inglês <i>glutamate-gated Cl⁻ channels</i>)
h	- hora
IC	- intervalo de confiança
Indels	- inserção/deleção (do inglês <i>insertions/deletions</i>)

IVM	- ivermectina
kg	- quilograma
L ₃	- larvas de terceiro estágio
LEV	- levamisole
LGICs	- canais iônicos abertos por ligantes (do inglês <i>ligand-gated ion channel</i>)
LMs	- lactonas macrocíclicas
mg	- miligrama
MHz	- mega-hertz
min	- minutos
mL	- mililitro
MALDT	- do inglês <i>micro-agar larval development test</i>
MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mb	- megabase
MIs	- milbemicinas
MOX	- moxidectina
nAChR	- receptores de acetilcolina nicotínicos (do inglês <i>nicotinic acetylcholine receptor</i>)
OPG	- ovos por grama de fezes
pb	- pares de bases
PCR	- reação em cadeia pela polimerase
P-gps	- glicoproteínas-P (do inglês <i>P-glycoproteins</i>)
Phe	- fenilalanina
PIR	- pirantel
POP	- procedimento operacional padrão
PV	- peso vivo
QUAL	- escore da variante em escala phred (do inglês <i>variant quality</i>)
RFLP	- polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (do inglês <i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RMD	- resistência múltipla a drogas (do inglês <i>multi-drug resistance, MDR</i>)
RNA	- ácido ribonucléico
RNAse	- ribonuclease

rpm	- rotações por minuto
RPMI	- meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RR	- homozigoto resistente
q-PCR	- PCR quantitativo ou PCR em tempo real (do inglês <i>real time PCR</i>)
SNG	- sequenciamento de nova geração
SNPs	- polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês <i>single nucleotide polymorphisms</i>)
sp.	- espécie
spp.	- espécies
SS	- homozigoto suscetível
TBZ	- tiabendazol
TEO	- teste da eclodibilidade de ovos
TDL	- teste de desenvolvimento larvar
TIAL	- teste de inibição da alimentação larvar
TIML	- teste de inibição da migração larvar
TMLA	- teste de migração de larvas em ágar
TRCOF	- teste de redução na contagem de ovos nas fezes
Ts	- transições
Tv	- transversões
Tyr	- tirosina
WAAVP	- Associação mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária (do inglês, <i>World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology</i>)
WGS	- sequenciamento completo do genoma (do inglês <i>whole genome sequencing</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	- porcentagem
μg	- micrograma
$^{\circ}\text{C}$	- graus Celsius
M	- molar
p	- probabilidade de erro
R^2	- coeficiente de determinação
X	- vezes
>	- maior
<	- menor
\geq	- maior ou igual
®	- marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVO GERAL.....	21
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
2 REFERÊNCIAS	22
2 RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES: AVANÇOS E LIMITAÇÕES PARA SEU DIAGNÓSTICO	25
2.1 INTRODUÇÃO.....	27
2.2 MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES.....	29
2.2.1 Técnicas <i>in vivo</i>	33
2.2.1.1 Teste de Redução na Contagem de Ovos nas Fezes (TRCOF).....	33
2.2.2 Técnicas <i>in vitro</i>	37
2.2.2.1 Teste de Eclodibilidade de Ovos (TEO).....	37
2.2.2.2 Teste de Desenvolvimento Larvar (TDL).....	38
2.2.2.3 Testes de motilidade e migração larvar.....	39
2.2.2.4 Testes de alimentação.....	41
2.3 TÉCNICAS MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA.....	42
2.3.1 Diagnóstico de resistência aos BZs em tricostrongilídeos.....	44
2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
REFERÊNCIAS	49
3 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA EM UM ISOLADO DE CAMPO SELECIONADO DE <i>Haemonchus contortus</i> À IVERMECTINA E MOXIDECTINA USANDO O TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM ÁGAR	59
3.1 INTRODUÇÃO.....	61
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	62
3.2.1 Isolado de campo de parasito e produção de coprocultura a partir do isolado.....	62
3.2.2 Infecções experimentais e produção de coproculturas 1 e 2 (isolado SP1503Ovi2011).....	63
3.2.3 Teste <i>in vitro</i> de Migração de Larvas em Ágar (TMLA).....	64
3.2.4 Análise estatística.....	65
3.3 RESULTADOS.....	65
3.4 DISCUSSÃO.....	67
REFERÊNCIAS	69
4 IDENTIFICAÇÃO DE SNPs/INDELS EM REGIÕES GENÔMICAS DE RECEPTORES LGIC E TRANSPORTADORES ABC EM ISOLADOS SUSCETÍVEL E RESISTENTE À IVERMECTINA DE <i>Haemonchus contortus</i> A PARTIR DE DADOS DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO	73
4.1 INTRODUÇÃO.....	75
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	78
4.2.1 Isolados de parasito.....	78
4.2.2 Isolamento de DNA e sequenciamento do genoma.....	79
4.2.3 Mapeamento e detecção de SNPs e indels.....	81
4.3 RESULTADOS.....	82
4.3.1 Sequenciamento e mapeamento.....	82

4.3.2 Detecção de SNPs/indels.....	84
4.4 DISCUSSÃO.....	91
REFERÊNCIAS.....	96
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	102
ANEXOS.....	104
VITA.....	140

1 INTRODUÇÃO

Uma das espécies de parasitos nematoides gastrintestinais mais prevalentes no mundo e economicamente importantes em criações de pequenos ruminantes é o *Haemonchus contortus*, pertencente à ordem Strongylida e superfamília Trichostrongyloidea. Esse parasito é o mais importante em ovinos, e sua alimentação de sangue no abomaso pode levar a sinais de anemia, letargia, perda de peso e até mesmo morte em casos de infecção aguda (haemonchose). O ciclo de vida do *H. contortus* é direto. As fêmeas são ovíparas prolíferas. Os ovos eclodem no ambiente e se desenvolvem até larvas de terceiro estágio (L₃) – que são as formas infectantes – em menos de cinco dias, embora isso possa ser adiado por semanas ou mesmo meses em condições de frio. As L₃ são ingeridas e desembainhadas no abomaso, onde as larvas sofrem duas mudas até a fase adulta. Um pouco antes da muda final do ciclo de vida, os parasitos desenvolvem a lanceta perfurante, permitindo a obtenção de sangue dos vasos da mucosa do abomaso, local de fixação do parasito. Os adultos movem-se livremente na superfície da mucosa, alimentando-se de sangue do hospedeiro. O período pré-patente da infecção por *H. contortus* é de 2-3 semanas em ovinos (MOLENTO e FORTES, 2010).

Apesar do estudo e do desenvolvimento de opções alternativas práticas, o tratamento e o controle de vermes parasitos (helmintos) em geral, e de *H. contortus* em particular, ainda dependem fortemente do uso de medicamentos antiparasitários (anti-helmínticos) (PRICHARD, 2001; WOLSTENHOLME *et al.*, 2004), sendo produtos veterinários de grande valor, constituindo cerca de 40% de todas as despesas destinadas à sanidade animal (YATES *et al.*, 2003). Um dos três grupos clássicos de anti-helmínticos é o das lactonas macrocíclicas (LMs), que compreende as avermectinas (AVs), como a ivermectina (IVM), e as milbemicinas (MIs), como a moxidectina (MOX). As AVs e MIs foram isoladas a partir do fungo *Streptomyces* spp. na década de 1970 e a IVM foi introduzida no mercado no ano de 1981 (YATES *et al.*, 2003). Desde então, a comercialização da IVM cresceu de tal forma a tornar-se a droga mais comumente utilizada na pecuária (YATES *et al.*, 2003; CAMPBELL, 1989), sendo usada tanto para o tratamento preventivo (profilaxia) quanto para o

tratamento clínico de infestação por ectoparasitos e infecção por endoparasitos (YATES *et al.*, 2003). Em *H. contortus*, a IVM provoca inibição do bombeamento da faringe, paralisia da parede do corpo e dos músculos do útero, impossibilitando a alimentação do verme. O exato mecanismo de ação da IVM ainda não está esclarecido, devido a algumas características da droga, como a presença de vários locais de ação, várias espécies-alvo com sensibilidades diferentes e pouca solubilidade em soluções aquosas (TURNER e SCHAEFFER, 1989).

A resistência às drogas em helmintos de importância veterinária, incluindo o *H. contortus*, é um problema sério e global, tendo em vista que o uso de anti-helmínticos é essencial para o rendimento da produção e o bem-estar animal (PRICHARD, 2001). Em particular, a resistência generalizada aos anti-helmínticos mais antigos, incluindo os de espectro estreito e todas as três classes de amplo espectro, é grave em parasitos de ovinos (van WYK e MALAN, 1988; SOCCOL *et al.*, 1996; BACON *et al.*, 1998; JACKSON e COOP, 2000), e aumentou a dependência à IVM. A emergência de resistência à IVM em *H. contortus* é, portanto, uma séria ameaça para o controle do parasito (JACKSON e COOP, 2000; BESIÉ e LOVE, 2003; WALLER, 1997), representado um risco para a ovinocultura em diferentes regiões do mundo (BESIÉ e LOVE, 2003; MOLENTO *et al.*, 2011).

O teste *in vivo* constitui um tipo de definição fenotípica da resistência, de tal modo que a diminuição do número de ovos de nematoides contados nas fezes, após o tratamento anti-helmíntico, é inferior a 95% em relação à contagem de pré-tratamento (teste de redução na contagem de ovos nas fezes, TRCOF) (COLES *et al.*, 1992). No presente momento, a resistência também pode ser identificada e medida com base em alterações no fenótipo, tais como diminuição da inibição da eclosão ou alimentação, ou aumento na sobrevivência após a exposição de *H. contortus* à IVM *in vitro*, que pode ser avaliada em testes de migração larvar. Tais testes fenotípicos não são sensíveis nem confiáveis o suficiente para detectar a seleção precoce da resistência, sendo restritos à indicação de resistência clínica (CRAVEN *et al.*, 1999; HUMBERT *et al.*, 2001; SILVESTRE e CABARET, 2002). Assim, testes moleculares são necessários, a fim de identificar com mais sensibilidade e quantificar a resistência, buscando auxiliar na escolha de meios eficazes para a prevenção e o controle da resistência. Com a identificação de genes ou *loci* sob seleção e a detecção de marcadores genotípicos de resistência à IVM, seria possível

realizar o monitoramento de genótipos resistentes antes de ocorrerem alterações fenotípicas, proporcionando um grande avanço às pesquisas científicas sobre desenvolvimento e controle da resistência.

Como a base genética da resistência à IVM ainda não está estabelecida, e na ausência de ferramentas genômicas disponíveis para *H. contortus*, a abordagem predominante até o momento tem sido a análise de genes individuais ou famílias de genes implicados na resistência à IVM, incluindo as glicoproteínas-P (P-gps, do inglês *P-glycoproteins*) – membros da família de transportadores do tipo ABC (do inglês *ATP binding cassette*) – e os canais de cloro potencializados pelo glutamato (GluCl) – pertencentes ao grupo dos receptores de canais iônicos abertos por ligante (LGICs, do inglês *Ligand-Gated Ion Channel*) (XU *et al.*, 1998; WOLSTENHOLME e ROGERS, 2005). Entretanto, com as recentes publicações do genoma de *H. contortus* por dois grupos de pesquisa distintos (LAING *et al.*, 2013; SCHWARZ *et al.*, 2013), abordagens genômicas amplas podem ser utilizadas para determinar genes ou *loci* sob seleção da IVM, assim como marcadores moleculares associados à resistência à IVM, podendo representar mudanças genotípicas que embasem o desenvolvimento de testes moleculares diagnósticos.

Nesta tese, relata-se um trabalho de pesquisa para a detecção de potenciais marcadores moleculares associados à resistência à IVM em *H. contortus*, a partir da avaliação de polimorfismos em regiões genômicas que incluem as famílias de transportadores do tipo ABC e dos receptores LGICs – alvos extremamente importantes no estudo da resistência à IVM, usando técnicas genômicas e de bioinformática. Parte deste trabalho foi realizada no Instituto de Parasitologia da Universidade McGill, Canadá (ANEXOS 2 e 3). Como embasamento teórico, foi realizada uma revisão bibliográfica publicada no periódico “Pesquisa Veterinária Brasileira” (ANEXO 12), abordando a situação atual dos principais métodos utilizados para o diagnóstico da resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. Nesse trabalho, são apresentadas as vantagens e desvantagens do uso de testes *in vivo* e *in vitro*, incluindo os testes moleculares, bem como os avanços e as dificuldades para o seu desenvolvimento e, em especial, para a detecção de resistência ao grupo das lactonas macrocíclicas.

Relata-se, ainda, um trabalho de pesquisa – também publicado no periódico “Pesquisa Veterinária Brasileira” (ANEXO 13) – em que foi avaliada a resistência

anti-helmíntica em um isolado de *H. contortus* usando um teste *in vitro* de migração de larvas em ágar. Foi comparada a ação de duas lactonas macrocíclicas (ivermectina – IVM e moxidectina – MOX), identificando o isolado menos suscetível à IVM do que à MOX. Dado o conhecido *status* de resistência do isolado a partir do TRCOF, aliado ao crescente aumento da utilização do referido teste *in vitro* em laboratórios de pesquisa e à falta de padronização, buscou-se avaliar o potencial uso desse método, além de confirmar a suscetibilidade do isolado às drogas testadas antes de procedermos aos estudos moleculares.

1.1 OBJETIVO GERAL

Identificar marcadores moleculares associados à resistência à IVM em *Haemonchus contortus*, com potencial para posterior validação e desenvolvimento de testes moleculares.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar a etapa inicial de infecções experimentais de ovinos, a fim de obter um isolado de *H. contortus* altamente resistente à IVM.

Avaliar o potencial uso do teste *in vitro* de migração de larvas em ágar para a detecção de resistência anti-helmíntica, e confirmar a suscetibilidade do isolado de *H. contortus* à IVM e à MOX, previamente à etapa de estudos moleculares.

Obter um banco de dados genômicos, a partir do sequenciamento do genoma de dois isolados de *H. contortus* resistente e suscetível à IVM.

Identificar e analisar polimorfismos nas regiões genômicas dos transportadores do tipo ABC e dos receptores de canais iônicos abertos por ligante (LGICs), comparando os isolados de *H. contortus* resistente e suscetível à IVM.

Fornecer um conjunto específico de polimorfismos ou variantes que possam representar potenciais variações associadas à resistência à IVM.

REFERÊNCIAS

- BACON, J. A.; ULRICH, R. G.; DAVIS, J. P.; THOMAS, E. M.; JOHNSON, S. S.; CONDER, G. A.; SANGSTER, N. C.; ROTHWELL, J. T.; McCracken, R. O.; LEE, B. H.; CLOTHIER, M. F.; GEARY, T. G.; THOMPSON, D. P. Comparative *in vitro* effects of closantel and selected β -ketoamide anthelmintics on a gastrointestinal nematode and vertebrate liver cells. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 21, p. 190-198, 1998.
- BESIER, R. B.; LOVE, S. C. J. Anthelmintic resistance in sheep nematodes in Australia: the need for new approaches. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 43, p. 1383-1391, 2003.
- CAMPBELL, W. C., 1989. **Ivermectin and abamectin**. New York: Springer-Verlag.
- COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, p. 35-44, 1992.
- CRAVEN, J.; BJORN, H.; BARNES, E. H.; HENRIKSEN, S. A.; NANSEN, P. A comparison of *in vitro* tests and a faecal egg count reduction test in detecting anthelmintic resistance in horse strongyles. **Veterinary Parasitology**, v. 85, p. 49-59, 1999.
- HUMBERT, J. F.; CABARET, J.; ELARD, L.; LEIGNEL, V.; SILVESTRE, A. Molecular approaches to studying benzimidazole resistance in trichostrongylid nematode parasites of small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 405-414, 2001.
- JABBAR, A.; IQBAL, Z.; KERBOEUF, D.; MUHAMMAD, G.; KHAN, M. N.; AFAQ, M. Anthelmintic resistance: the state of play revisited. **Life Sciences**, v. 79, p. 2413-2431, 2006.
- JACKSON, F.; COOP, R. L. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Parasitology**, v. 120 Suppl, p. S95-107, 2000.
- LAING, R.; KIKUCHI, T.; MARTINELLI, A.; TSAI, I. J.; BEECH, R. N.; REDMAN, E.; HOLROYD, N.; BARTLEY, D. J.; BEASLEY, H.; BRITTON, C.; CURRAN, D.;

DEVANEY, E.; GILABERT, A.; HUNT, M.; JACKSON, F.; JOHNSTON, S.; KRYUKOV, I.; LI, K.; MORRISON, A. A.; REID, A. J.; SARGISON, N.; SAUNDERS, G.; WASMUTH, J. D.; WOLSTENHOLME, A.; BERRIMAN, M.; GILLEARD, J. S.; COTTON, J. A. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. **Genome Biology**, 14:R88, 2013 doi:10.1186/gb-2013-14-8-r88

MOLENTO, M. B.; FORTES, F. S. 2010. Capítulo 24 – Ordem Strongylida, p.233-263. In: MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca.

MOLENTO, M. B.; FORTES, F. S.; PONDELEK, D. A. S.; BORGES, F. A.; CHAGAS, A. C. S.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; GELDHOF, P. Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 126-132, 2011.

PRICHARD, R. K. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trends in Parasitology**, v. 17, p. 445-453, 2001.

SCHWARZ, E. M.; KORHONEN, P. K.; CAMPBELL, B. E.; YOUNG, N. D.; JEX, A. R.; JABBAR, A.; HALL, R. S.; MONDAL, A.; HOWE, A. C.; PELL, J.; HOFMANN, A.; BOAG, P. R.; ZHU, X.; GREGORY, T. R.; LOUKAS, A.; WILLIAMS, B. A.; ANTOSHECHKIN, I.; BROWN, C. T.; STERNBERG, P. W.; GASSER, R. B. The genome and developmental transcriptome of the strongylid nematode *Haemonchus contortus*. **Genome Biology**, 14:R89, 2013 doi:10.1186/gb-2013-14-8-r89

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

SOCCOL, V. T.; SOTOMAIOR, C.; SOUZA, F. P.; CASTRO, E. A.; PESSÔA SILVA, M. C.; MILCZEWSKI, V. Occurrence of resistance to anthelmintics in sheep in Paraná State, Brazil. **The Veterinary record**, v. 139, p. 421-422, 1996.

TURNER, M. J.; SCHAEFFER, J. M. Mode of action of ivermectin. In: CAMPBELL, W. C. (ed.) **Ivermectin and abamectin**, Springer Verlag, New York, p. 73-88, 1989.

van WYK, J. A.; MALAN, F. S. Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, radoxanide and the benzimidazoles in South Africa. **Veterinary Record**, v. 123, p. 226-228, 1988.

WALLER, P. J. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 72, p. 391-412, 1997.

WOLSTENHOLME, A. J.; FAIRWEATHER, I.; PRICHARD, R.; von SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SANGSTER, N. C. Drug resistance in veterinary helminths. **Trends in Parasitology**, v. 20, p. 469-476, 2004.

WOLSTENHOLME, A. J.; ROGERS, A. T. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. **Parasitology**, v. 131 (Suppl.):S85-S95, 2005.

XU, M.; MOLENTO, M.; BLACKHALL, W.; RIBEIRO, P.; BEECH, R.; PRICHARD, R. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, p. 327-335, 1998.

YATES, D. M.; PORTILLO, V.; WOLSTENHOLME, A. J. The avermectin receptors of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans*. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 1183-1193, 2003.

2 RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES: AVANÇOS E LIMITAÇÕES PARA SEU DIAGNÓSTICO

RESUMO

A seleção e a crescente disseminação de nematoides resistentes aos anti-helmínticos mais comumente utilizados, benzimidazóis (BZs), imidazotiazóis e lactonas macrocíclicas (LMs), constituem um sério entrave na produção de pequenos ruminantes em todo o mundo. O uso de métodos eficientes e sensíveis para a detecção e o monitoramento da resistência anti-helmíntica no campo torna-se urgente, especialmente para os grupos de BZs e LMs, devido aos constantes relatos de resistência. A obtenção de um diagnóstico preciso e precoce da resistência é extremamente importante para auxiliar a tomada de decisão em programas de controle parasitário, com o objetivo de preservar a vida útil dos produtos e limitar o desenvolvimento da resistência nas populações de nematoides. Os testes *in vivo* e, mais recentemente, os testes *in vitro* têm sido desenvolvidos para a detecção de nematoides resistentes aos principais grupos de anti-helmínticos. No entanto, a disponibilidade de testes *in vitro* validados e o seu uso prático ainda são muito limitados. Embora o teste de redução na contagem de ovos nas fezes (TRCOF, *in vivo* - indireto) seja o principal método de escolha para a detecção de resistência a campo, vem recebendo críticas quanto à validade dos resultados, e passa por significativas modificações. Além disso, o desenvolvimento de técnicas moleculares a partir de alterações genômicas gerou avanços consideráveis nessa área de investigação, com o uso de mutações nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina como principais SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único; do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*) associados à resistência aos BZs. A presente revisão tem o objetivo de discutir os métodos de diagnóstico disponíveis para a detecção de resistência anti-helmíntica em nematoides de pequenos ruminantes, destacando progressos e obstáculos para seu uso na rotina laboratorial e no campo.

Palavras-chave: Anti-helmínticos, resistência anti-helmíntica, nematoides gastrintestinais, *Haemonchus contortus*, ovinos, testes *in vivo*, testes *in vitro*, eficácia.

ANTHELMINTIC RESISTANCE IN GASTROINTESTINAL NEMATODES OF SMALL RUMINANTS: ADVANCES AND LIMITATIONS FOR DIAGNOSIS

ABSTRACT

The selection and growing spread of resistant nematodes to the most commonly used anthelmintics, benzimidazoles (BZs), imidazoles and macrocyclic lactones (MLs), constitutes a serious obstacle of small ruminants production worldwide. The use of efficient and sensitive methods for detection and monitoring of anthelmintic resistance in the field becomes urgent, especially for the BZs and MLs groups due to its frequent resistant reports. Obtaining an early and accurate diagnosis of resistance is extremely important to aid decision-making regarding parasite control programs, with the objective to preserve the lifespan of existing products, and to limit the development of resistance in nematode populations. The *in vivo* tests and the more recent *in vitro* tests have been developed for the detection of nematode resistant to the major anthelmintic groups. However, the availability of validated *in vitro* tests and its practical use is still very limited. Although the faecal egg-count reduction test (FECRT, *in vivo* - indirect) is the primary method of choice for the detection of resistance in the field it has being criticized for its results and is receiving significant modifications. Moreover, the development of molecular techniques from genomic changes have generated considerable advances in this research area, with the use of mutations at codons 167, 198 and 200 of β -tubulin gene as the main SNPs (single nucleotide polymorphisms) associated with BZs resistance. This review aims to discuss the available diagnostic methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of small ruminants, highlighting key developments and obstacles to its use in the laboratory and in the field.

Key words: Anthelmintics, anthelmintic resistance, nematoides gastrintestinais, *Haemonchus contortus*, sheep, *in vivo* tests, *in vitro* tests, efficacy.

2.1 INTRODUÇÃO

A alta prevalência de infecções parasitárias e a dificuldade de realizar um controle efetivo de nematoides gastrintestinais em criações de pequenos ruminantes têm grande importância devido aos prejuízos causados ao desempenho zootécnico e ao bem-estar animal. Nas últimas décadas, o uso intensivo de anti-helmínticos pertencentes aos grupos dos benzimidazóis (BZs), dos imidazotiazóis (levamisole, LEV) e das lactonas macrocíclicas (avermectinas e milbemicinas, LMs) demonstrou um impacto positivo inicial, mas atualmente constitui a forma mais desastrosa de controle, resultando na seleção e propagação de parasitos resistentes com alto índice de homozigose (RR) e perda total da heterogenia para indivíduos suscetíveis (SS). Esse é um tema de preocupação mundial crescente, e representa uma ameaça ao controle parasitário de médio e longo prazo, tendo em vista a precária melhoria na condição dos animais, mesmo após o tratamento. O controle químico continua a ser preocupante, pois é praticado com medicamentos contendo alta concentração ou mesmo com o uso da combinação de medicamentos, muitas vezes sem critério de produção e/ou indicação para sua ampla utilização. Foram lançadas, inicialmente no mercado da Nova Zelândia, duas novas classes de anti-helmínticos – monepantel (KAMINSKY *et al.*, 2008) e derquantel, este em combinação com a abamectina (LITTLE *et al.*, 2010) –, com novos modos de ação, buscando uma nova alternativa para o futuro do controle de nematoides gastrintestinais. No entanto, já foram relatados casos de resistência também a essas novas drogas (SAGER *et al.*, 2012; SCOTT *et al.*, 2013).

Embora seja crescente o desenvolvimento e a adoção de programas alternativos de controle parasitário (MOLENTO *et al.*, 2011), visando à redução da aplicação de compostos químicos, as atuais medidas de controle ainda dependem fortemente do uso de anti-helmínticos. Sabe-se que o processo de seleção de parasitos resistentes após sua exposição aos produtos químicos é inevitável e, além disso, o desenvolvimento/comercialização de novas drogas é lento e excessivamente caro (GEARY, 2013). Assim, é de extrema importância prolongar a vida útil dos produtos existentes – antigos e novos – por meio de sua utilização estratégica/seletiva, a fim de manter o adequado controle do parasitismo.

Os relatos de resistência anti-helmíntica em nematoides de pequenos ruminantes para os três grupos de drogas mais comumente utilizados, BZs, LEV e LMs, têm crescido rapidamente em diferentes regiões do mundo, incluindo América do Sul (MOLENTO *et al.*, 2011; TORRES-ACOSTA *et al.*, 2012), África do Sul (VAN WYK *et al.*, 1999), Austrália (LOVE e COLES, 2002), Nova Zelândia (McKENNA, 2010) e Europa (PAPADOPOULOS *et al.*, 2012), representando uma séria ameaça à produção animal. No Brasil, o aumento de relatos de resistência múltipla a drogas (RMD), em vários locais, como as regiões Sul (CEZAR *et al.*, 2010), Sudeste (VERÍSSIMO *et al.*, 2012) e Centro-Oeste (SCZESNY-MORAES *et al.*, 2010), evidencia a gravidade do problema. Conforme verificado em testes de eficácia a campo, 100% das propriedades já apresentam RMD (VERÍSSIMO *et al.*, 2012).

Buscando retardar o avanço da resistência, o uso de testes sensíveis para determinar o grau de eficácia de uma determinada droga, em uma população específica de parasitos, pode auxiliar o planejamento de estratégias de controle (TAYLOR *et al.*, 2002), como a simples opção de uso de compostos que ainda permaneçam eficazes. Contudo, mesmo sendo de fundamental importância, o diagnóstico da resistência anti-helmíntica, ou da redução de eficácia aos anti-helmínticos, ainda não é uma realidade prática no campo (TORRES-ACOSTA *et al.*, 2012). Muito embora a resistência possa ser avaliada por meio de testes *in vivo* e *in vitro*, a disponibilidade de testes *in vitro* validados para o diagnóstico da resistência ainda é muito limitada, com poucos laboratórios que oferecem esse tipo de serviço. Tais testes apresentam limitações quanto à sua confecção e ao alto nível de treinamento técnico para a interpretação dos achados. Quanto ao teste *in vivo* controlado, é inviável para a condição de avaliação a campo, devido à necessidade de sacrifício dos animais e ao alto custo. Conseqüentemente, o teste fenotípico indireto *in vivo* de redução na contagem de ovos nas fezes (TRCOF) continua sendo o principal método de escolha para a detecção de resistência (KAPLAN e VIDYASHANKAR, 2012), sendo amplamente aceito por agências reguladoras e pela própria indústria farmacêutica, bem como para publicações científicas. Vários laboratórios estão trabalhando arduamente para obter o diagnóstico molecular da resistência (SAMSON-HIMMELSTJERNA *et al.*, 2009b), mas o mecanismo resultante dos rearranjos genéticos ainda é considerado um quebra-cabeças.

A variação em protocolos experimentais para a execução dos testes de diagnóstico da resistência, os métodos de análise e a interpretação dos dados podem gerar resultados de qualidade muito variável. Assim, o desenvolvimento de novos métodos e a padronização e validação dos já existentes são essenciais para permitir a comparação de dados obtidos em diferentes laboratórios, além de sua inclusão na rotina laboratorial (CHAGAS *et al.*, 2011; MOLENTO *et al.*, 2012).

Esta revisão tem o objetivo de discutir os principais testes atualmente disponíveis – *in vivo*, *in vitro* e moleculares – para o diagnóstico da resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes, os avanços proporcionados por novas tecnologias e as limitações para o seu uso na rotina laboratorial e no campo.

2.2 MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES

Desde a recomendação de testes para detecção de resistência anti-helmíntica pela Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária (*World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology - WAAVP*) (COLES *et al.*, 1992) e sua revisão e inclusão de métodos para discussão e avaliação (COLES *et al.*, 2006), uma variedade de métodos *in vivo* e *in vitro* para o diagnóstico da resistência em muitas espécies de nematoides foi descrita, nas últimas décadas. Técnicas moleculares também têm sido desenvolvidas, porém apenas para poucas espécies de parasitos. Assim, é indispensável a identificação correta das espécies de parasitos presentes no hospedeiro para a obtenção de um diagnóstico apropriado, particularmente quando há comparação entre amostras pré e pós-tratamento (DEMELENER *et al.*, 2012b). Descrições detalhadas e orientações sobre o uso das principais técnicas disponíveis estão presentes em trabalhos anteriores (COLES *et al.*, 1992; TAYLOR *et al.*, 2002; COLES *et al.*, 2006), possibilitando a execução e a avaliação dos testes internacionalmente. Todos os métodos possuem, em algum grau, limitações em termos de confiabilidade, reprodutibilidade, sensibilidade, aplicabilidade, interpretação ou custo (TAYLOR *et*

al., 2002). Além disso, não abrangem de maneira satisfatória todos os grupos de anti-helmínticos.

O TRCOF *in vivo* é o método mais amplamente utilizado para a detecção e o monitoramento da resistência anti-helmíntica. No entanto, é considerado o menos sensível e pouco confiável para a detecção da resistência. Trata-se de um teste simples, de execução relativamente fácil e que pode ser usado com todos os grupos de anti-helmínticos, independentemente do seu mecanismo de ação. A eficácia da droga é estimada por meio da comparação das contagens de ovos de nematoides nas fezes antes e depois do tratamento, sendo o tempo definido de acordo com o grupo testado. A população de parasitos é considerada resistente quando a redução é $< 95\%$. Em comparação com o TRCOF, o teste controlado de eficácia, outro método *in vivo*, avalia melhor a realidade da infecção e o efeito do composto. Nesse teste, animais natural ou experimentalmente infectados são separados em grupos (tratamento(s) e controle) e a dose do anti-helmíntico utilizado deverá ser a dose terapêutica recomendada pelo fabricante, cuja eficácia esperada é $\geq 99\%$. Após a necropsia dos animais, realiza-se a contagem dos parasitos presentes no hospedeiro. Então, observa-se a redução ou a eliminação dos parasitos, e estima-se a eficácia do tratamento. Da mesma forma, se a eficácia for $< 95\%$, confirma-se a presença de resistência anti-helmíntica. Quando há uma baixa prevalência de nematoides resistentes, estes podem não ser detectados, devido a pequenos aumentos na dose, que podem causar a morte de 95% dos vermes. Assim, como a dose registrada é frequentemente maior do que a real dose efetiva necessária para a remoção dos vermes, algum ajuste deve ser feito para a realização do teste controlado (COLES *et al.*, 2006). Considerando-se o pouco uso desse teste, não será abordado em detalhes no presente artigo.

Como alternativa aos métodos *in vivo*, um crescente número de testes *in vitro* para a detecção de resistência anti-helmíntica vem sendo desenvolvido e adaptado para diferentes grupos de drogas. Eles são, na maioria das vezes, mais rápidos, mais econômicos e menos trabalhosos do que os *in vivo* (DEMELER *et al.*, 2012a). Os métodos *in vitro* ainda anulam os efeitos causados pela interferência do hospedeiro no estabelecimento da infecção parasitária e pela variação na farmacodinâmica das drogas no animal (CHAGAS *et al.*, 2011). No entanto, há poucos relatos de testes *in vitro* padronizados até o momento. Em geral, esses

testes baseiam-se na incubação de estágios de vida livre do parasito em uma série de concentrações do anti-helmíntico, seguida da avaliação de seus efeitos sobre os nematoides. São geradas curvas de dose-resposta e valores de DL₅₀ (dose do anti-helmíntico necessária para matar 50% dos parasitos) ou DL₉₅ (dose do anti-helmíntico necessária para matar 95% dos parasitos). A FIGURA 1 exemplifica a obtenção de curvas de dose-resposta para um isolado de *Haemonchus contortus* testado para duas drogas (ivermectina – IVM e moxidectina – MOX), mostrando um valor de DL₅₀ para MOX significativamente menor do que para IVM. Atualmente, os principais testes disponíveis avaliam: a eclosão (teste da eclodibilidade de ovos – TEO); o desenvolvimento (teste de desenvolvimento larvar – TDL); a motilidade/migração (teste de motilidade larvar e teste de inibição da migração larvar); e a alimentação (teste de inibição da alimentação larvar) (DEMELER *et al.*, 2012b). Desses, o TEO e o TDL são os mais comumente utilizados. Apenas o TDL possui um teste comercial (*DrenchRite*[®]), disponível em alguns países, e de custo elevado. O uso dos outros testes *in vitro* tem sido limitado principalmente à área de pesquisa científica, utilizando isolados de parasitos cujo estado de resistência ou suscetibilidade foi previamente determinado. O TEO consiste na incubação de ovos não desenvolvidos em concentrações crescentes do anti-helmíntico, e pode ser usado com sucesso para a detecção de resistência aos BZs (SAMSON-HIMMELSTJERNA *et al.*, 2009a), cuja ação impede o embrionamento e a eclosão de ovos de nematoides. Para outras drogas anti-helmínticas sem nenhuma atividade ovicida, como LMs ou LEV, ainda faltam testes *in vitro* altamente satisfatórios para a detecção de resistência. Uma dose discriminante – dose que impede a eclosão de 99% dos ovos suscetíveis – também pode ser usada, ao invés de DL₅₀, sendo estimada a porcentagem de ovos resistentes em amostras de fezes, aumentando a sensibilidade do ensaio (COLES *et al.*, 2006). Já o TDL baseia-se no desenvolvimento de ovos de parasitos em larvas de terceiro estágio (L₃). Uma série de versões do TDL já foi desenvolvida para a detecção de resistência a todas as classes de anti-helmínticos, usando soluções líquidas ou ágar como base para o teste. A dose discriminante também pode aumentar a sensibilidade e a simplicidade do teste.

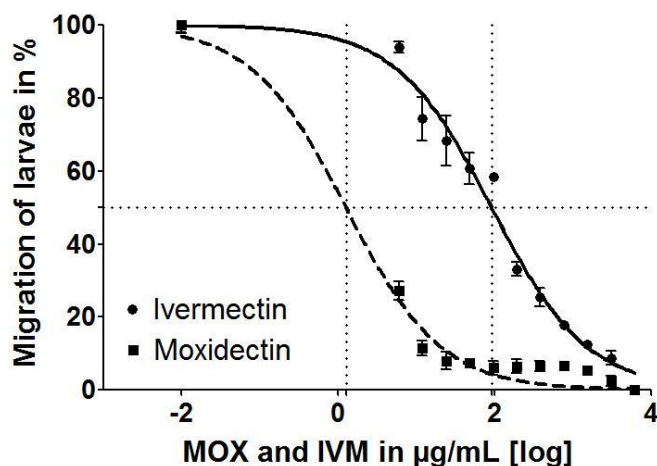


FIGURA 1 – CURVAS DE DOSE-RESPOSTA OBTIDAS COM O TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM ÁGAR COM O ISOLADO SP1503Ovi2011 DE *Haemonchus contortus* USANDO IVERMECTINA (IVM, LINHA SÓLIDA) E MOXIDECTINA (MOX, LINHA TRACEJADA).

FONTE: Fortes et al. (2013)

NOTA: As barras de erro indicam o erro padrão, e não são vistas quando as diferenças entre os valores observados para todas as concentrações testadas são iguais ou muito próximas de 0 (zero).

Nos últimos anos, métodos de diagnóstico molecular da resistência anti-helmíntica a partir de alterações genômicas têm sido desenvolvidos, trazendo avanços consideráveis nessa área de investigação. Em geral, os testes moleculares possuem maior sensibilidade e especificidade, e podem fornecer ferramentas poderosas para superar muitas das desvantagens dos métodos acima referidos, mas requerem pesquisas adicionais para serem usados como uma ferramenta universal prática no campo. A sensibilidade (capacidade de detectar os indivíduos verdadeiramente positivos, ou seja, diagnosticar corretamente os doentes) e a especificidade (capacidade de detectar os indivíduos verdadeiramente negativos, ou seja, diagnosticar corretamente os sadios) são importantes indicadores para a avaliação de um teste diagnóstico. Considera-se o melhor teste aquele que apresenta alta sensibilidade e alta especificidade (fornecendo poucos resultados falso-positivos e falso-negativos), características que podem ser alcançadas com o aprimoramento das técnicas moleculares e dos métodos de análise padrão.

Vários estudos vêm sendo feitos buscando a determinação de marcadores genéticos para a resistência anti-helmíntica, incluindo a identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*) para avaliar frequências alélicas em populações (SAMSON-HIMMELSTJERNA, 2006). Até o momento, testes moleculares estão disponíveis

apenas para o grupo dos BZs, em algumas espécies de nematoides de ovinos. Metodologias utilizando a reação em cadeia pela polimerase (PCR) têm sido estabelecidas para a avaliação da presença, ausência ou quantificação de SNPs associados à resistência aos BZs no isotipo 1 do gene da β -tubulina, alvo dessas drogas. A elucidação insuficiente sobre os mecanismos moleculares envolvidos na resistência ao LEV e às LMs em nematoides, drogas de resistência poligênica, torna mais complexo e desafiador o desenvolvimento de marcadores moleculares para o diagnóstico da resistência a esses compostos. Estudos baseados em diagnóstico imunológico utilizando ELISA para a detecção de antígeno em parasitos também já foram sugeridos. Recentemente, foram detectadas diferenças de expressão de proteína entre isolados de *Haemonchus contortus* resistente e suscetível à IVM por meio de análises de proteômica de *fingerprinting* (HART *et al.*, 2012), sugerindo ser uma possível base para fenotipagem molecular ou marcadores de resistência.

2.2.1 Técnicas *in vivo*

2.2.1.1 Teste de Redução na Contagem de Ovos nas Fezes (TRCOF)

O TRCOF, segundo recomendações da WAAVP (COLES *et al.*, 1992), é considerado o método de escolha para o monitoramento da eficácia anti-helmíntica devido à sua fácil execução e interpretação, sendo realizado com uma sequência de exames de contagem de ovos por grama de fezes (OPG). Quanto ao cálculo de OPG, trata-se de um teste fenotípico cuja contagem depende diretamente do efeito do hospedeiro, e é considerado indireto, pois reflete a postura de ovos das fêmeas, que depende do efeito da resposta imune do hospedeiro. Entretanto, sua execução e/ou interpretação tem sido dificultada por um conjunto de fatores que serão detalhados a seguir. O TRCOF é considerado confiável somente quando há mais de 25% de vermes resistentes em uma população (MARTIN *et al.*, 1989), e dados obtidos mais recentemente não mostraram uma alta reprodutibilidade do teste (MILLER *et al.*, 2006). Assim, o valor diagnóstico do teste para situações de

emergência e baixa prevalência da resistência é limitado. Particularidades existentes de acordo com cada espécie animal e parasitária, a viabilidade do teste em condições de campo e as indicações de concentração para a contagem de ovos são outros fatores limitadores importantes (LEVECKE *et al.*, 2012).

As recomendações referentes ao delineamento do estudo e à dimensão da amostra podem ser de difícil obtenção no campo. Assim, buscando garantir resultados favoráveis com o TRCOF, Levecke *et al.* (2012) desenvolveram um método que permite aos pesquisadores adaptarem seu projeto de estudo conforme uma ampla gama de condições de campo. A inclusão de um grupo não tratado (controle) no teste, para observação de alterações naturais que possam ocorrer na contagem de ovos durante o período, pode não ser prática em muitas situações. Além disso, o uso de médias aritméticas das contagens de ovos nas fezes dos mesmos animais antes e após a administração do anti-helmíntico, ao invés de aleatoriamente, pode proporcionar resultados mais confiáveis (DOBSON *et al.*, 2012).

A avaliação do teste pode ser prejudicada devido às variações na correlação entre a contagem de ovos nas fezes e a carga parasitária adulta entre as diferentes espécies de parasitos. Foi encontrada uma boa correlação para *H. contortus* (ROBERTS e SWAN, 1981; CHAGAS *et al.*, 2013), porém não para *T. colubriformis* (SANGSTER *et al.*, 1979), *Ostertagia circumcincta* (MARTIN *et al.*, 1985) e *Nematodirus* spp. (MARTIN *et al.*, 1985). Palcy *et al.* (2010) relataram uma baixa sensibilidade do teste para a detecção de *T. axei*, cuja postura de ovos é muito baixa. Assim, a ocorrência de variação intra e interespecies na fecundidade e agregação dos ovos nas fezes pode afetar a interpretação do TRCOF (LEVECKE *et al.*, 2012).

Algumas drogas podem causar uma supressão temporária na postura de ovos, levando a uma superestimativa da eficácia anti-helmíntica se avaliada durante esse período. Portanto, recomenda-se que amostras fecais sejam coletadas 3-7 dias após o uso de LEV, 8-10 dias para BZs e entre 14-17 dias para LMs. Somente quando for utilizada moxidectina (MOX), uma LM, as fezes deverão ser coletadas após 21 dias. Quando mais de um tipo de droga estiver sendo avaliado, o período de 14 dias deverá ser empregado (COLES *et al.*, 2006). Após o tratamento anti-helmíntico, deve-se ter atenção com os locais onde os animais serão mantidos, se

pasto/piquete, devido à possibilidade de rápida reinfecção. Uma redução superior a 95% no TRCOF indica que o uso do anti-helmíntico ainda deve ser benéfico em programas de controle parasitário, mas uma pequena porcentagem de vermes sobreviventes pode indicar um problema de resistência, que pode aumentar com tratamentos subsequentes, e precisa ser monitorado.

A precisão do TRCOF depende da sensibilidade da técnica adotada para a contagem de ovos de nematoides nas fezes, sendo que a maioria dos métodos atualmente disponíveis ainda não é precisa (DEMELER *et al.*, 2012b). O uso da técnica descrita por Gordon & Whitlock modificada (câmara McMaster com detecção de 50 OPG) pode não detectar um baixo número de ovos, dificultando o diagnóstico de resistência precoce e de pequenas alterações na eficácia de uma droga (KAPLAN e VIDYASHANKAR, 2012). Assim, acredita-se que é necessária a adoção de um novo método para contagem, que ofereça maior sensibilidade e precisão (DEMELER *et al.*, 2012b). Diferentes reduções percentuais na contagem de ovos podem ser obtidas, dependendo do tipo de contagem, devendo-se adotar um padrão dos métodos de cálculo. Porém, como existem muitas variações na técnica de OPG, sua padronização é dificultada (COLES *et al.*, 1992). Alguns laboratórios utilizam *pool* de amostras de fezes e outros realizam contagens individuais para a obtenção de um valor médio. Ambas as abordagens têm vantagens e desvantagens, e a definição do melhor procedimento para a contagem de ovos nas fezes é importante. Por exemplo, enquanto o teste de OPG – desenvolvido para contagem de ovos em ovinos – pode ser a melhor opção para amostras individuais de ovinos, o teste FECPAK[®] pode ser melhor para um *pool* de amostras (COLES *et al.*, 2006). Já a lâmina FLOTAC[®] é usada em uma técnica recentemente descrita que também apresentou uma melhora significativa com relação à sensibilidade (RINALDI *et al.*, 2011, MOLENTO *et al.*, 2012). Estudos recentes vêm sendo feitos com um sistema mini-FLOTAC, mostrando uma diminuição significativa na média e no desvio padrão de valores em comparação com a técnica de Gordon & Whitlock (MOLENTO *et al.*, 2012). As diferenças na fecundidade entre as espécies de helmintos também demandam diferentes métodos de contagem (LEVECKE *et al.*, 2012). Outro aspecto relevante é que, apesar de a OPG ser altamente variável, ela geralmente é feita a partir de uma única contagem por animal pré e pós-tratamento, ao invés de triplicatas para reduzir a variabilidade (KAPLAN e VIDYASHANKAR, 2012).

Em geral, as populações de nematoides compreendem várias espécies, sendo essencial identificar quais estão envolvidas e, assim, avaliar o efeito de uma droga em diferentes espécies nas populações. Como os ovos nas fezes não podem ser diferenciados morfológicamente (exceto o *Nematodirus*), recomenda-se que coproculturas de amostras pré e pós-tratamento sejam conduzidas separadamente para o desenvolvimento dos ovos até L₃ (ROBERTS e O'SULLIVAN, 1950). A identificação das larvas geralmente é feita utilizando-se um guia simplificado para consulta (UENO e GONÇALVES, 1998), mas é necessária experiência técnica, devido à dificuldade e pouca confiabilidade associada ao método. Além disso, as necessidades para incubação e desenvolvimento das larvas diferem entre as espécies de nematoides, e as condições das coproculturas podem favorecer o desenvolvimento de uma espécie e prejudicar o de outra. Por isso, as condições devem ser as mesmas para coproculturas pré e pós-tratamento. Recomenda-se que as amostras não sejam mantidas a 4°C por período acima de 24 horas, para que não haja interferência na incubação dos ovos de *H. contortus* e *Cooperia* sp. (McKENNA, 1998). Recentemente, Roeber *et al.* (2012) sugeriram um ensaio de PCR previamente avaliado (98% de sensibilidade e 100% de especificidade) para ser usado como alternativa à técnica de coprocultura, sendo que o primeiro foi considerado menos trabalhoso e mais rápido.

Na prática, outros fatores ainda podem prejudicar a interpretação dos dados obtidos com o TRCOF e reduzir a especificidade do teste, como diferenças metodológicas entre os laboratórios, incorreta administração de medicamentos, falhas de equipamentos, erro nas doses de drogas e produtos de má qualidade. Para aperfeiçoar o TRCOF, estudos vêm sendo feitos com base em comparações de métodos de contagem de ovos nas fezes (RINALDI *et al.*, 2011), programas estatísticos (DOBSON *et al.*, 2012), além de outras questões como o período para a realização de amostragens e a manipulação e conservação das amostras. Há ainda questionamentos sobre o grau de sensibilidade do TRCOF, e sobre como os resultados podem ser relacionados com os dados obtidos a partir de testes *in vitro* (COLES *et al.*, 2006), a fim de aprimorar o seu uso.

2.2.2 Técnicas *in vitro*

2.2.2.1 Teste de eclodibilidade de ovos (TEO)

O método foi descrito, inicialmente, por Le Jambre (1979), e um protocolo padronizado foi adotado pela WAAVP (COLES *et al.*, 1992). O TEO tem sido utilizado com várias modificações por uma série de pesquisadores, para a detecção de resistência a BZs e LEV. Um protocolo-padrão para a detecção de resistência aos BZs está disponível (SAMSON-HIMMELSTJERNA *et al.*, 2009a), e laboratórios de toda a Europa utilizam a mesma metodologia. A maioria dos estudos que avaliaram o uso do TEO para a detecção de nematoides resistentes aos BZs mostrou uma boa concordância com os resultados obtidos com o TRCOF em ovinos (VÁRADY *et al.*, 2006, DÍEZ-BAÑOS *et al.*, 2008) e bovinos (DEMELER *et al.*, 2012a). Isso indica que o teste representa uma alternativa confiável e precisa para o TRCOF, além de ser mais prático e economicamente viável.

O tiabendazol (TBZ) é a droga de escolha para a realização do teste por possuir uma solubilidade relativamente elevada em água. Sua estabilidade a longo prazo em soluções de DMSO não é conhecida, mas quando as diluições são feitas em água pode haver uma redução das concentrações esperadas. Como a sensibilidade ao TBZ diminui na medida em que os ovos se desenvolvem, as fezes destinadas ao exame devem ser manipuladas até três horas após a coleta ou armazenadas anaerobicamente (COLES *et al.*, 2006). Isso, muitas vezes, representa uma grande limitação ao uso do TEO no diagnóstico de rotina.

Porcentagens de ovos eclodidos para cada concentração do fármaco, curvas de dose-resposta e valores de DL_{50} podem ser determinadas com essa técnica. Utilizando-se uma dose discriminante, pode-se obter a porcentagem de ovos eclodidos (resistentes aos BZs) na amostra. Dados obtidos com isolados suscetíveis de *H. contortus*, *T. circumcincta* e *Trichostrongylus colubriformis* mostraram uma dose discriminante de 0,1 µg/mL de TBZ. Testes de campo também já demonstraram que ovos de outras espécies sensíveis (*Cooperia* e *Oesophagostomum*) não eclodem com essa concentração. Usando esse critério,

acredita-se que possam ser detectados apenas 2 a 3% de ovos resistentes (COLES *et al.*, 2006). Na Espanha, a dose discriminante única foi utilizada para avaliar o estado de resistência aos BZs no nordeste do país, aumentando a sensibilidade do TEO (CALVETE *et al.*, 2011).

Alguns fatores em investigação, e que podem influenciar os resultados obtidos com o TEO, incluem: diferentes fontes de água utilizada (destilada, desionizada ou água de torneira); grau de limpeza dos ovos (presença de detritos); e o método de dissolução da amostra (p.ex. DMSO e água) (COLES *et al.*, 2006). Como os ovos são muito frágeis e sensíveis à variação de temperatura, a detecção de tais fatores é essencial para que diferentes laboratórios possam obter resultados igualmente eficazes.

2.2.2.2 Teste de desenvolvimento larvar (TDL)

O TDL foi relatado primeiramente por Coles *et al.* (1988) para a detecção de resistência a BZs e LEV. Muitas variações do teste foram publicadas descrevendo seu uso para a detecção de resistência de várias drogas anti-helmínticas em nematoides de ovinos (HUBERT e KERBOEUF, 1992; GILL *et al.*, 1995). Um teste comercial (*DrenchRite*[®]) foi desenvolvido na Austrália para determinar a resistência contra BZs, LEV e LMs em nematoides de ovinos e caprinos, porém é pouco utilizado e expressivamente caro para o uso em rotina. O TDL em microágar (do inglês *MALDT*, *micro-agar larval development test*) foi descrito em detalhes (COLES *et al.*, 2006) e, assim como o TEO, foram encontrados resultados em boa concordância com dados obtidos após a realização do TRCOF (LEATHWICK *et al.*, 2006, VÁRADY *et al.*, 2006). O teste tem demonstrado ser confiável para BZs e LEV (TAYLOR *et al.*, 2002; COLES *et al.*, 2006) e, recentemente, foram relatados resultados comparáveis e confiáveis para detectar a resistência à IVM em *H. contortus* (DOLINSKÁ *et al.*, 2012).

Utilizando o MALDT descrito por Coles *et al.* (2006), Dolinská *et al.* (2012) distinguiram facilmente isolados de *H. contortus* suscetíveis e resistentes à IVM, obtendo uma probabilidade aproximada de 87% para o diagnóstico positivo em uma

população com apenas 2-4% de vermes resistentes. Nesse estudo, dois fatores foram indicados por contribuir para a falta de sensibilidade do teste: a forma de apresentação da IVM e seus análogos, pois esses podem ter diferentes potências contra diferentes espécies de nematoides gastrintestinais; e a correlação entre dados obtidos em testes *in vitro* MALDT e *in vivo* TRCOF, sabendo que o último pode apresentar resultado questionável.

A dose letal de 50% (DL₅₀) determinada para nematoides suscetíveis de ovinos foi de 0,02µg/mL para TBZ e 0,5µg/mL para LEV, mas pesquisas adicionais são necessárias para confirmar esses valores no TDL (COLES *et al.*, 2006). Essa prova é considerada relativamente frágil, pois requer fezes frescas (enviadas ao laboratório em sistema anaeróbio), sendo as condições de armazenamento as que mais afetam o desenvolvimento dos ovos e o bom desempenho do teste (DEMELER *et al.*, 2010). Ao contrário do TEO, para o TDL a idade dos ovos utilizados não importa, e as larvas são obtidas para a diferenciação de espécies. A principal vantagem do TDL é a sua capacidade de avaliação simultânea de resistência a várias drogas (BZs, LEV e LMs), em uma mesma placa.

Para os testes *in vitro*, grandes quantidades de dados precisam ser coletadas para definir um Procedimento Operacional Padrão (POP) com as possíveis interpretações. É preciso ainda determinar a relação entre esses testes padronizados e o TRCOF. Embora o TDL funcione para o diagnóstico de resistência aos BZs, parece não ser tão satisfatório quanto o TEO (COLES *et al.*, 2006).

2.2.2.3 Testes de motilidade e migração larvar

Os testes de motilidade e migração larvar podem ser usados para avaliar o efeito dos anti-helmínticos que causam paralisia na musculatura somática dos parasitos. A motilidade de larvas pode ser determinada por meio de observação, detectores eletrônicos (instrumentos que medem o grau de refração da luz e fornecem um índice de motilidade) ou migração através de peneiras. A grande necessidade de se obter um diagnóstico confiável para a resistência às LMs tem

estimulado o desenvolvimento de testes que avaliam a motilidade dos parasitos utilizando essas técnicas.

Testes mensurando a paralisia larval foram desenvolvidos para a detecção de resistência ao LEV e ao morantel (MARTIN e LEJAMBRE, 1979). Sutherland e Lee (1990) descreveram uma modificação desse teste para a detecção de resistência ao TBZ. Gill *et al.* (1991) relataram um teste de migração para a detecção de resistência à IVM em *H. contortus* e, mais tarde, em *Trichostrongylus colubriformis* e *T. circumcincta* (GILL e LACEY, 1998), mas a avaliação da motilidade das larvas foi muito subjetiva. Assim, foi feita a avaliação e validação do uso de ágar e de peneiras para a separação de L₃ migrantes (sobreviventes) e não migrantes (mortas) para uma quantificação confiável (D'ASSONVILLE *et al.*, 1996; KOTZE *et al.*, 2006). Além desses, uma grande variedade de testes semelhantes de migração de larvas foi publicada, adaptada para o uso de diferentes drogas e espécies de nematoides de ovinos (WAGLAND *et al.*, 1992; DOUCH e MORUM, 1994; MOLENTO e PRICHARD, 2001). No entanto, em nenhum desses trabalhos houve a publicação de dados referentes à repetibilidade de resultados obtidos dentro de um mesmo laboratório e/ou à reprodutibilidade de resultados entre laboratórios distintos. Tais medidas são necessárias, pois podem proporcionar um melhor monitoramento da eficácia das LMs, entre outras drogas, em menor tempo e sem o uso de animais experimentais como, por exemplo, no teste controlado.

Um teste de inibição da migração larvar (TIML) para a detecção de resistência à IVM em nematoides de ruminantes foi padronizado na Europa (DEMELER *et al.*, 2010), permitindo a separação das larvas móveis das imóveis por meio da migração através de peneiras. O mesmo protocolo foi realizado em seis laboratórios de cinco países, mostrando resultados altamente reprodutíveis, e fornecendo uma ferramenta útil para o monitoramento da resistência à IVM em nematoides de ruminantes.

A aplicabilidade do teste no campo, onde infecções mistas de parasitos ocorrem comumente, ainda precisa ser mais bem estudada, sendo necessários estudos que possibilitem a diferenciação das espécies (KOTZE *et al.*, 2006). Uma pesquisa mostrou uma boa concordância dos resultados obtidos a partir do TIML com o TRCOF em bovinos (DEMELER *et al.*, 2012a), demonstrando o potencial uso do TIML. O método também foi utilizado para avaliar a eficácia *in vitro* de IVM e

MOX em isolado de *Cooperia* sp. (ALMEIDA *et al.*, 2013) e de *H. contortus* (FORTES *et al.*, 2013), mostrando ser um teste possivelmente útil para a avaliação de eficácia da IVM. Em comparação ao TDL, o TIML é um exame fácil e simples, possível de ser realizado na maioria dos laboratórios. Além disso, o TIML requer larvas de terceiro estágio, que podem ser facilmente obtidas a partir de coproculturas, e mantidas em geladeira até o seu uso (DEMELENER *et al.*, 2010).

A motilidade de larvas e adultos de nematoides, após incubação com anti-helmínticos, também pode ser estimada por meio de um instrumento que mede o grau de refração da luz e fornece um índice de motilidade. O movimento dos parasitos causa uma variação dos sinais luminosos refletidos e recebidos pelo fotodetector. Os efeitos anti-helmínticos *in vitro* sobre *H. contortus* resistentes aos BZs foram detectados utilizando esse medidor de micromotilidade (FOLZ *et al.*, 1987). Recentemente, um medidor de micromotilidade também foi utilizado com eficiência para avaliar a ação de IVM sobre parasitos adultos de *C. oncophora* (DEMELENER *et al.*, 2010).

2.2.2.4 Testes de alimentação

Estudos têm sido realizados para determinar o efeito sobre a alimentação do parasito após tratamento anti-helmíntico em larvas e adultos. O teste de inibição da alimentação larvar (TIAL) foi usado para diferenciar isolados monoespecíficos de nematoides resistentes e suscetíveis à IVM (ALVAREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2005) e isolados de campo resistentes e suscetíveis, compostos principalmente por *Teladorsagia circumcincta* (MARTÍNEZ-VALLADARES *et al.*, 2012). Em um estudo realizado no noroeste da Espanha, os valores de resistência ao LEV e às LMs encontrados com o TIAL foram semelhantes aos obtidos pelo TRCOF, porém foram feitos em diferentes rebanhos (MARTÍNEZ-VALLADARES *et al.*, 2013). Díez-Baños *et al.* (2008) avaliaram a eficácia anti-helmíntica no campo e encontraram um valor mais elevado de resistência às LMs utilizando o TIAL (10%), comparado ao TRCOF (3%). Isso indica que o teste *in vitro* tem o potencial de detectar a resistência à classe de drogas mais comumente utilizada.

2.3 TÉCNICAS MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA

Muito se tem investido para o desenvolvimento de um método diagnóstico de parasitos resistentes utilizando técnicas moleculares. Entretanto, devido ao carácter extremamente poligênico das populações, pesquisadores continuam sendo desafiados a descobrir o mecanismo de resistência das drogas e divulgar um ou mais candidatos a marcador específico. O principal mecanismo molecular associado à resistência aos BZs em nematoides tricostrongilídeos de pequenos ruminantes envolve uma mutação – transversão T>A, modificando o códon TTC para TAC – que leva à substituição do aminoácido fenilalanina por tirosina na posição 200 (polimorfismo Phe200Tyr) no isotipo 1 do gene da β -tubulina, em isolados resistentes de *H. contortus*, *T. colubriformis* e *O. circumcincta* (KWA *et al.*, 1994; 1995; ELARD *et al.*, 1996; 1999; SILVESTRE e HUMBERT, 2000). Tal polimorfismo também tem sido associado à resistência às LMs (MOTTIER e PRICHARD, 2008). Já foram descritas outras mutações, menos frequentes: no códon 167 (Phe167Tyr) em *H. contortus* e *T. circumcincta* (SILVESTRE e CABARET, 2002), modificando também o códon TTC para TAC; e no códon 198 (Glu200Ala), que codifica alanina em vez de glutamato em isolados resistentes, em *H. contortus* resistente a BZs (GHISI *et al.*, 2007; RUFENER *et al.*, 2009a), alterando o códon GAA para GCA. Essas mutações nos códons 167, 198 e 200 podem, então, ser utilizadas como marcadores para a detecção de resistência aos BZs nesses parasitos, sendo importante conhecer os efeitos da associação entre os SNPs e o nível de homozigose/heterozigose presente (SILVESTRE e CABARET, 2002; BARRÈRE *et al.*, 2012). Barrère *et al.* (2012) indicam que os testes de resistência para BZs no campo deveriam avaliar a heterozigose dos SNPs 167 e 200 para obter melhores resultados. Protocolos de PCR convencional e em tempo real (q-PCR) foram analisados para a detecção de SNPs nos códons 167 e 200 na β -tubulina (SAMSON-HIMMELSTJERNA, 2006). Para a determinação da resistência associada ao códon TAC na posição 200, técnicas de PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism* ou polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) foram desenvolvidas para *H. contortus* (TIWARI *et al.*, 2006) e *T. circumcincta* (SHAYAN *et al.*, 2007). A técnica de pirosequenciamento também se mostrou rápida e adequada

para a detecção múltipla de SNPs (SAMSON-HIMMELSTJERNA *et al.*, 2007). A quantificação dos alelos de resistência/suscetibilidade no DNA extraído de *pool* de larvas de nematoides pode ser feita usando as técnicas de PCR em tempo real e pirosequenciamento, permitindo uma avaliação sensível, confiável e economicamente acessível do nível de resistência em populações de *H. contortus* no campo (HÖGLUND *et al.*, 2009; SAMSON-HIMMELSTJERNA *et al.*, 2009b).

Muito embora não se tenham testes moleculares disponíveis para LMs, LEV ou tetra-hidropirimidinas em quaisquer espécies de parasitos, a base molecular da resistência para tais drogas recebe muita atenção e estudos. Foi relatado que quatro conjuntos de proteínas contribuem para a resistência ao LEV em *Caenorhabditis elegans*, sendo que o principal foco dos estudos para a expressão ou detecção de polimorfismos associados à resistência ao LEV em nematoides são os receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR) (MARTIN *et al.*, 2012). Propriedades de ligação ao receptor de LEV em *H. contortus* não sofreram variação significativa com a resistência à droga e, a partir de análises de sequência e de RFLP em um gene nAChR (*hca1*) em várias populações de *H. contortus* resistentes ao LEV, foi observado polimorfismo, mas sem associação com a resistência (HOEKSTRA *et al.*, 1997). Com relação às LMs, o mecanismo de resistência parece ser complexo, associado a muitas mutações em diferentes *loci*. Estudos sugerem que a resistência à IVM pode envolver alterações em transportadores de drogas, como a glicoproteína-P (P-gp, do inglês *P-glycoprotein*) e canais de cloro controlados pelo glutamato (XU *et al.*, 1998; WOLSTENHOLME e ROGERS, 2005). A resistência à IVM também tem sido associada a alterações alélicas no isotipo 1 do gene da β -tubulina, o *locus* chave envolvido na resistência aos BZs, e a proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas (MDR, do inglês *multi-drug resistance*), juntamente com membros da família de transportadores do tipo ABC (do inglês *ATP binding cassette*) (XU *et al.*, 1998; BOURGUINAT *et al.*, 2007; PRICHARD, 2007).

Recentemente, o monepantel foi introduzido no mercado da Nova Zelândia como o primeiro membro da nova classe de drogas sintéticas nematocidas chamada Derivados de Amino Acetonitrila (AADs, do inglês *Amino-Acetonitrile Derivatives*). O alvo do monepantel (um nAChR específico de nematoide da subfamília DEG-3) e um conjunto de mutações associadas à sensibilidade reduzida a AADs em *H. contortus* também foram descritos (KAMINSKY *et al.*, 2008; RUFENER *et al.*, 2009b). Tais

conhecimentos poderão ser úteis para o diagnóstico molecular da resistência. A identificação de mutações – induzidas, nesse caso, por seleção experimental – e relatos de isolados de campo resistentes ao monepantel (SCOTT *et al.*, 2013) poderão auxiliar o estudo da importância prática dessas alterações genéticas.

2.3.1 Diagnóstico de resistência aos BZs em tricostrongilídeos

Como o teste de genotipagem de uma única larva ou verme adulto é muito trabalhoso e relativamente caro, os testes moleculares devem ser desenvolvidos para PCR em tempo real ou pirosequenciamento, a fim de torná-los adequados e viáveis ao uso na rotina laboratorial com amostras de campo. Somente com um diagnóstico baseado no uso de *pool* de amostras de DNA de larvas, será possível disponibilizar os testes de resistência molecular para uso rotineiro. A pesquisa para o desenvolvimento de testes moleculares pode ser justificável principalmente para espécies em que o problema da resistência é amplamente distribuído, além de auxiliar a busca por estratégias de manejo que possam retardar o desenvolvimento de resistência.

Para se iniciar o diagnóstico de resistência com amostras de campo, é feita a amplificação no isotipo 1 do gene da β -tubulina para obter uma quantidade suficiente de DNA, por meio de duas PCRs consecutivas (*nested-PCR*). Segue-se, então, com a identificação das espécies *T. circumcincta*, *H. contortus* e *T. colubriformis*, a partir da análise de polimorfismo nos locais de restrição da enzima *RsaI* no segmento amplificado desse gene, usando a técnica de RFLP. Esse método apresentou a vantagem de superar as limitações de identificação morfológica dos estágios larvais de espécies de nematóides (COLES *et al.*, 2006). Larvas de *T. colubriformis* armazenadas por um mês a 4°C foram corretamente genotipadas, enquanto larvas de *T. circumcincta* mantidas em nitrogênio líquido foram menos eficientemente amplificadas. Assim, é recomendado o uso de larvas “frescas” para a obtenção de resultados confiáveis.

O princípio do diagnóstico de resistência aos BZs depende de um sistema de amplificação por mutação refratária (ARMS, do inglês *Amplification Refractory*

Mutation System). Essa técnica permite a genotipagem de SNPs, usando um conjunto de quatro iniciadores (dois iniciadores não específicos – *primers* controle; e dois específicos de alelo – *primers* internos), consistindo em uma reação de PCR alelo-específica (FIGURA 2). Como mostra a referida figura, foram utilizados dois *primers* controles (*forward* e *reverse*) e dois *primers* internos específicos (um *forward*, que se liga a um alelo, e um *reverse*, que se liga a outro alelo), resultando em três diferentes padrões de bandas (um controle e dois específicos). A concentração de iniciadores pode alterar a especificidade da PCR, e deve ser verificada com grande precisão, a fim de garantir uma eficiente competição entre os iniciadores. Isolados de parasitos reconhecidamente suscetíveis e resistentes devem ser utilizados como padrão e testados para validar a genotipagem de populações desconhecidas (COLES *et al.*, 2006).

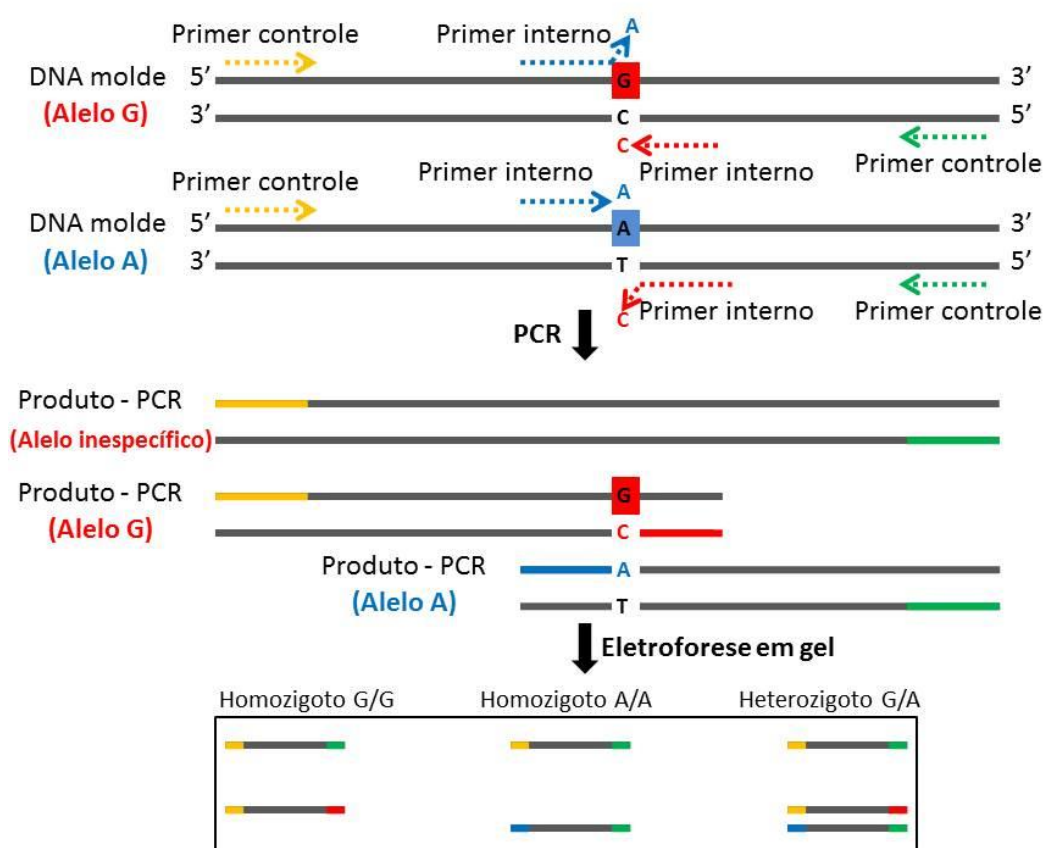


FIGURA 2 – GENOTIPAGEM DE SNPs PELA TÉCNICA DE PCR ALELO-ESPECÍFICA OU PCR BASEADA NO SISTEMA DE AMPLIFICAÇÃO POR MUTAÇÃO REFRAATÁRIA (ARMS)
 FONTE: Fortes (2011)

Foi determinado que o limite de detecção da resistência aos BZs, por meio de diagnóstico molecular, seja com um número de 100, 50, 35 e 20 parasitos para,

respectivamente, 4, 8, 10 e 12% de vermes resistentes na população, a fim de encontrar pelo menos um indivíduo resistente ($p=0,002$) (ELARD *et al.*, 1999). Em uma população mista de nematoides, a frequência de alelos dependerá da proporção de espécies na população, e a identificação de genótipos resistentes homozigóticos em quaisquer espécies poderia sugerir a presença de resistência (COLES *et al.*, 2006).

Ainda são poucas as informações de correlação entre a presença de mutações associadas à resistência e a eficácia de droga esperada, dificultando a interpretação clínica dos dados moleculares. Recentemente, HÖGLUND *et al.*, (2009) encontraram altas frequências alélicas associadas à resistência (códon 200 no isotipo 1 do gene da β -tubulina em *H. contortus*) em 19 rebanhos de ovinos dos 45 testados, enquanto o TRCOF detectou resistência ao albendazol em apenas dois rebanhos. Em três rebanhos cuja eficácia da droga pelo TRCOF foi de 100, 99 e 97%, foram encontradas frequências muito altas de alelos resistentes de 95, 97 e 100%. A disparidade nos resultados sugere ser muito difícil definir recomendações ideais para medidas de controle parasitário com base exclusivamente em dados moleculares (KAPLAN e VIDYASHANKAR, 2012).

Como mostrado, os testes moleculares parecem ser mais sensíveis que o TRCOF na detecção da presença de resistência anti-helmíntica em um rebanho. Mas o significado prático da resistência genotípica relacionada à eficácia esperada da droga, principalmente para produtos de um mesmo grupo, ainda não está claro. É comum a técnica de TRCOF detectar resistência a um anti-helmíntico e, ao mesmo tempo, alta eficácia a outro do mesmo grupo. Uma vez que marcadores moleculares de resistência aos BZs não são específicos de uma só droga, o uso de dados moleculares para a escolha de drogas a serem utilizadas no campo ainda exige uma maior compreensão (KAPLAN e VIDYASHANKAR, 2012). Os autores discutiram ainda outros pontos críticos: quando a resistência a um grupo de drogas é multi-alélica, torna-se necessário conhecer a contribuição relativa de cada alelo para a manifestação do fenótipo; a resistência a qualquer droga é espécie-específica, mas as infecções mistas nos animais são muito comuns, sendo necessário o desenvolvimento de testes moleculares capazes de detectar resistência em múltiplas espécies, ou testes separados para as espécies importantes.

A grande dificuldade para o diagnóstico com base molecular é ter a certeza de que a mutação associada à resistência à determinada droga seja a única mutação responsável em uma espécie particular. Esse desafio pode ser exemplificado pela existência de mais de um ponto de mutação de resistência aos BZs em certos nematoides de ovinos. No caso das LMs, se as diferentes espécies de nematoides têm diferentes mecanismos para impedir a ação das drogas, a dificuldade para o desenvolvimento e a utilização de testes torna-se ainda maior. No entanto, como não há nenhum teste *in vitro* de confiabilidade reconhecida para a resistência às LMs, a necessidade de testes moleculares é muito grande (COLES *et al.*, 2006).

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maioria das estratégias de controle de nematoides gastrintestinais empregadas em criações intensivas de ovinos e caprinos ainda depende do frequente uso de anti-helmínticos. No entanto, o grande número de relatos de parasitos resistentes a um ou mais anti-helmínticos utilizados vem inviabilizando os programas de controle sanitário. É evidente a necessidade de adoção de estratégias sustentáveis, incluindo o controle químico, ambiental e imunológico, visando substituir os esquemas baseados no uso exclusivo de anti-helmínticos, para diminuir a pressão de seleção na população de parasitos. Novos conceitos, como a manutenção da população de parasitos em *refugia*, não expostos a anti-helmínticos, obtida principalmente com o uso de tratamento seletivo dos animais, precisam ser amplamente difundidos entre produtores e profissionais da área.

Como visto, a rapidez com que ocorre a propagação da resistência anti-helmíntica, com o comércio de animais, é preocupante, e reforça a necessidade urgente de testes diagnósticos sensíveis e economicamente acessíveis para a detecção e o monitoramento da resistência. Devido ao grande impacto que a resistência possui em relação à produção e ao bem-estar de pequenos ruminantes, torna-se cada vez mais importante o seu diagnóstico preciso e precoce. Faz-se necessário aprimorar os métodos conhecidos às condições dos produtores, com a

inclusão de testes, como o TRCOF, para detectar a resistência na rotina de programas sanitários. Para isso, uma série de testes *in vitro* ainda precisa ser padronizada, a fim de permitir sua correta execução e interpretação em diferentes laboratórios. Infelizmente, os esforços para a obtenção do diagnóstico da resistência anti-helmíntica e a conscientização de profissionais da área acerca desse problema ainda são insuficientes.

Espera-se que o uso crescente de modernas técnicas de sequenciamento genômico propicie avanços na compreensão do mecanismo molecular (ou mecanismos moleculares) da resistência anti-helmíntica, permitindo o aprimoramento de técnicas de monitoramento rápido. As recentes publicações do genoma de *H. contortus* (LAING *et al.*, 2013; SCHWARZ *et al.*, 2013) podem auxiliar e acelerar os avanços do conhecimento nessa área. A obtenção de um diagnóstico da resistência mais precoce e acessível no campo pode auxiliar a tomada de decisão quanto à escolha do tipo de estratégia de controle parasitário a ser utilizado. Para isso, é extremamente importante haver orientação profissional adequada aos produtores sobre o uso racional de anti-helmínticos, buscando manter a eficácia das drogas e retardar o fenômeno da resistência. Recomenda-se que, tanto o pesquisador como o profissional ligado à área de sanidade, tenham interesse na leitura das recomendações técnicas. Deve-se utilizar o TRCOF uma vez ao ano, com o objetivo de monitorar a eficácia, e substituir produtos que apresentem valores abaixo de 80%. Espera-se que, com isso, possa-se contribuir para a sustentabilidade da pecuária nacional, visando obter melhores condições de saúde, tanto para os animais como para a comunidade.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G. D.; FELIZ, D. C.; HECKLER, R. P.; BORGES, D. G. L.; ONIZUKA, M. K. V.; TAVARES, L. E. R.; PAIVA, F.; BORGES, F. A. 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, p. 59-65, 2013.

ALVAREZ-SANCHEZ, M. A.; PEREZ GARCIA, J.; BARTLEY, D.; JACKSON, F.; ROJO-VAZQUEZ, F. A. The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. **Experimental Parasitology**, v. 110, p. 56-61, 2005.

BARRÈRE, V.; ALVAREZ, L.; SUAREZ, G.; CEBALLOS, L.; MORENO, L.; LANUSSE, C.; PRICHARD, R. K. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the β -tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 344-349, 2012.

BEECH, R. 2013 Comunicação pessoal (Institute of Parasitology, McGill University, Canada).

BOURGUINAT, C.; PION, S. D. S.; KAMGNO, J.; GARDON, J.; DUKE, B. O. L.; BOUSSINESQ, M.; PRICHARD, R. K. Genetic selection of low fertile *Onchocerca volvulus* by ivermectin treatment. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, p. 1-11, 2007.

CALVETE, C.; CALAVIA, R.; FERRER, L. M.; RAMOS, J. J.; LACASTA, D.; URIARTE, J. Management and environmental factors related to benzimidazole resistance in sheep nematodes in Northeast Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 23, p. 193-203, 2011.

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

CHAGAS, A. C. S.; NICIURA, S. C. M.; MOLENTO, M. B. 2011. Manual Prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF. 153p.

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

COLES, G. C.; TRITSCHLER, J. J. II; GIORDANO, D. J.; LASTE, N. J.; SCHMIDT, A. L. A larval development test for detection of anthelmintic resistant nematodes. **Research in Veterinary Science**, v. 45, p. 50-53, 1988.

COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. 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.; JACKSON, F.; POMROY, W. E.; PRICHARD, R. K.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M. A.; VERCRUYSSSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 167-185, 2006.

D'ASSONVILLE, J. A.; JANOVSKY, E.; VERSTER, A. In vitro screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 61, p. 73-80, 1996.

DEMELER, J.; KUTTLER, U.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. 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.; KLEINSCHMIDT, N.; KÜTTLER, U.; KOOPMANN, R.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Evaluation of the Egg Hatch Assay and the Larval Migration Inhibition Assay to detect anthelmintic resistance in cattle parasitic nematodes on farms. **Veterinary Parasitology**, v. 61, p. 614-618, 2012a.

DEMELER, J.; SCHEIN, E.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Advances in laboratory diagnosis of parasitic infections of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 189, p. 52-64, 2012b.

DÍEZ-BAÑOS, P.; PEDREIRA, J.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; FRANCISCO, I.; SUÁREZ, J.L.; DÍAZ, P.; PANADERO, R.; ARIAS, M.; PAINCEIRA, A.; PAZ-SILVA, A.; MORRONDO, P. Field evaluation for anthelmintic-resistant ovine gastrointestinal

nematodes by *in vitro* and *in vivo* assays. **Journal of Parasitology**, v. 94, p. 925-928, 2008.

DOBSON, R. J.; HOSKING, B. C.; JACOBSON, C. L.; COTTER, J. L.; BESIÉ, R. B.; STEIN, P. A.; REID, S. A. Preserving new anthelmintics: A simple method for estimating faecal egg count reduction test (FECRT) confidence limits when efficacy and/or nematode aggregation is high. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 79-92, 2012.

DOLINSKÁ, M.; KÖNIGOVÁ, A.; VÁRADY, M. Is the micro-agar larval development test reliable enough to detect ivermectin resistance? **Parasitology Research**, v. 111, p. 2201-2204, 2012.

DOUCH, P. G.; MORUM, P. E. The effects of anthelmintics on ovine larval nematode parasite migration *in vitro*. **International Journal for Parasitology**, v. 24, p. 321-326, 1994.

ELARD, L.; COMES, A. M.; HUMBERT, J. F. Sequences of beta-tubulin cDNA from benzimidazole-susceptible and -resistant strains of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 79, p. 249-253, 1996.

ELARD, L.; CABARET, J.; HUMBERT, J. F. 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.

FOLZ, S. D.; PAX, R. A.; THOMAS, E. M.; BENNETT, J. L.; LEE, B. L.; CONDER, G. A. Motility response of benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* larvae to several anthelmintics. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 54, p. 249-253, 1987.

FORTES, F. S. 2011. Marcadores moleculares SNP: conceitos e aplicações na resistência anti-helmíntica, p.83-91. In: CHAGAS, A. C. S.; NICIURA, S. C. M.; MOLENTO, M. B. 2011. **Manual Prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF.

FORTES, F. S.; KLOSTER, F. S.; SCHAFFER, A. S.; BIER, D.; BUZATTI, A.; YOSHITANI, U. Y.; MOLENTO, M. B. 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, n. 2, p. 183-187, 2013.

GEARY, T. 2013 Comunicação pessoal (Institute of Parasitology, McGill University, Canada).

GHISI, M.; KAMINSKY, R.; MASER, P. 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.; LACEY, E. Avermectin/milbemyacin resistance in trichostrongyloid nematodes. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 863-877, 1998.

GILL, J. H.; REDWIN, J. M.; VAN WYK, J. A.; LACEY, E. Detection of resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v. 21, p. 771-776, 1991.

GILL, J.H.; REDWIN, J. M.; VAN WYK, J. A.; LACEY, E. Avermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus*-effects of ivermectin resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 25, p. 463-470, 1995.

HART, E. H.; MORPHEW, R. M.; BARTLEY, D. J.; MILLARES, P.; WOLF, B. T.; BROPHY, P. M.; HAMILTON, J. V. The soluble proteome phenotypes of ivermectin resistant and ivermectin susceptible *Haemonchus contortus* females compared. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 104-113, 2012.

HOEKSTRA, R.; VISSER, A.; WILEY, L. J.; WEISS, A. S.; SANGSTER, N. C.; ROOS, M. H. Characterisation of an acetylcholine receptor gene of *Haemonchus contortus* in relation to levamisole resistance. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 84, p. 179-187, 1997.

HÖGLUND, J.; GUSTAFSSON, K.; LJUNGSTRÖM, B. L.; ENGSTRÖM, A.; DONNAN, A.; SKUCE, P. Anthelmintic resistance in Swedish sheep flocks based on a comparison of the results from the faecal egg count reduction test and resistant allele frequencies of the beta-tubulin gene. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 60-68, 2009.

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.

KAMINSKY, R.; DUCRAY, P.; JUNG, M.; CLOVER, R.; RUFENER, L.; BOUVIER, J.; WEBER, S. S.; WENGER, A.; WIELAND-BERGHAUSEN, S.; GOEBEL, T.; GAUVRY, N.; PAUTRAT, F.; SKRIPSKY, T.; FROELICH, O.; KOMOIN-OKA, C.; WESTLUND, B.; SLUDER, A.; MÄSER, P. A new class of anthelmintics effective against drug resistant nematodes. **Nature**, v. 452, p. 176-180, 2008.

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

KERBOEUF, D.; CHAMBRIER, P.; VERN, Y. I.; AYCARDI, J. Flow cytometry analysis of drug transport mechanisms in *Haemonchus contortus* susceptible or resistant to anthelmintics. **Parasitology Research**, v. 85, p. 118-123, 1999.

KOTZE, A. C.; LE JAMBRE, L. F.; O'GRADY, J. 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.

KWA, M. S. G.; VEENSTRA, J. G.; ROOS, M. H. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 63, p. 299-303, 1994.

KWA, M. S. G.; VEENSTRA, J. G.; DIJK, M. V.; ROOS, M. H. Beta-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Molecular Biology**, v. 246, p. 500-510, 1995.

LEATHWICK, D. M.; MILLER, C. M.; ATKINSON, D. S.; HAACK, N. A.; ALEXANDER, R. A.; OLIVER, A. M.; WAGHORN, T. S.; POTTER, J. F.; SUTHERLAND, I. A. Drenching adult ewes: implications of anthelmintic treatments pre- and post-lambing on the development of anthelmintic resistance. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 54, p. 297-304, 2006.

LEVECKE, B.; DOBSON, R. J.; SPEYBROECK, N.; VERCRUYSSSE, J.; CHARLIER, J. Novel insights in the faecal egg count reduction test for monitoring drug efficacy against gastrointestinal nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 391-396, 2012.

LITTLE, P. R.; HODGES, A.; WATSON, T. G.; SEED, J. A.; MAEDER, S. J. Field efficacy and safety of an oral formulation of the novel combination anthelmintic,

derquantel–abamectin, in sheep in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 58, p. 121-129, 2010.

LOVE, S. J. C.; COLES, G. C. Anthelmintic resistance in sheep worms in New South Wales, Australia. **Veterinary Record**, v. 150, p. 87, 2002.

MARTIN, P. J.; LeJAMBRE, L. F. Larval paralysis test as an in vitro assay of levamisole and morantel tartrate resistance in *Ostertagia*. **Veterinary Science Communications**, v. 3, p. 159-164, 1979.

MARTIN, P. J.; ANDERSON, N.; JARRET, R. G. Resistance to benzimidazole anthelmintics in field strains of *Ostertagia* and *Nematodirus* in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 62, p. 38-43, 1985.

MARTIN, P. J.; ANDERSON, N.; JARRET, R. G. Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and in vitro assays. **Australian Veterinary Journal**, v. 66, p. 236-240, 1989.

MARTIN, R. J.; ROBERTSON, A. P.; BUXTON, S. K.; BEECH, R. N.; CHARVET, C. L.; NEVEU, C. Levamisole receptors: a second awakening. **Trends in Parasitology**, v. 28, p. 289-296, 2012.

MARTÍNEZ-VALLADARES, M.; FAMULARO, M. R.; FERNÁNDEZ-PATO, N.; CORDERO-PÉREZ, C.; CASTAÑÓN-ORDÓÑEZ, L.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A. Characterization of a multidrug resistant *Teladorsagia circumcincta* isolate from Spain. **Parasitology Research**, v. 110, p. 2083-2087, 2012.

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

McKENNA, P. B. The effect of previous cold storage on the subsequent recovery of infective third stage nematode larvae from sheep faeces. **Veterinary Parasitology**, v. 89, p. 167-172, 1998.

McKENNA, P. B. Update on the prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 58, p. 172-173, 2010.

MILLER, C. M.; WAGHORN, T. S.; LEATHWICK, D. M.; GILMOUR, M. L. How repeatable is a faecal egg count reduction test? **New Zealand Veterinary Journal**, v. 54, p. 323-328, 2006.

MOLENTO, M. B.; PRICHARD, R. K. Effect of multigrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, p. 117-121, 2001.

MOLENTO, M. B.; FORTES, F. S.; PONDELEK, D. A. S.; BORGES, F. A.; CHAGAS, A. C. S.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; GELDHOF, P. Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 126-132, 2011.

MOLENTO, M. B.; FORTES, F. S.; KLOSTER, F. S. Diagnóstico da resistência anti-helmíntica com a utilização de métodos coproparasitológicos. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2012, São Luís, MA. **Anais...** São Luís: 2012. p.15-16.

MOTTIER, M. L.; 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.

PALCY, C.; SILVESTRE, A.; SAUVE, C.; CORTET, J.; CABARET, J. Benzimidazole resistance in *Trichostrongylus axei* in sheep: long-term monitoring of affected sheep and genotypic evaluation of the parasite. **The Veterinary Journal**, v. 183, p. 68-74, 2010.

PAPADOPOULOS, E.; GALLIDIS, E.; PTOCHOS, S. Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A selected review. **Veterinary Parasitology**, v. 189, p. 85-88, 2012.

PRICHARD, R. Ivermectin resistance and overview of the consortium for anthelmintic resistance SNPs. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 2(Suppl. 1):S41–S52, 2007.

RINALDI, L.; COLES, G. C.; MAURELLI, M. P.; MUSELLA, V.; CRINGOLI, G. Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 177, p. 345-352, 2011.

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, J. P. Methods for egg count and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1, p. 99-102, 1950.

ROBERTS, J. L.; SWAN, R. A. Quantitative studies of ovine haemonchosis. I. Relationship between faecal egg counts and total worm counts. **Veterinary Parasitology**, v. 8, p. 165-171, 1981.

ROEBER, F.; LARSEN, J. W. A.; ANDERSON, N.; CAMPBELL, A. J. D.; ANDERSON, G. A.; GASSER, R. B.; JEX, A. R. A molecular diagnostic tool to replace larval culture in conventional faecal egg count reduction testing in sheep. **PLOS ONE**, v. 7, n. 5:e37327. doi:10.1371/journal.pone.0037327, 2012.

RUFENER, L.; KAMINSKY, R.; MÄSER, P. In vitro selection of *Haemonchus contortus* for benzimidazole resistance reveals a mutation at amino acid 198 of beta-tubulin. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 168, p. 120-122, 2009a.

RUFENER, L.; MÄSER, P.; RODITI, I.; KAMINSKY, R. *Haemonchus contortus* acetylcholine receptors of the DEG-3 subfamily and their role in sensitivity to monepantel. **PLOS Pathogens**, v. 5, n. 4:e1000380. doi:10.1371/journal.ppat.1000380, 2009b.

SAGER, H.; BAPST, B.; STREHLAU, G. A.; KAMINSKY, R. Efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against adult stages of a multi-resistant *Haemonchus contortus* isolate. **Parasitology Research**, v. 111, p. 2205-2207, 2012.

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Molecular diagnosis of anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 99-107, 2006.

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; HARDER, A.; SCNIEDER, T. Quantitative analysis of ITS2 sequences in trichostrongyle parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1529-1535, 2002.

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; BLACKHALL, W. J.; McCARTHY, J. S.; SKUCE, P. J. Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes. **Parasitology**, v. 134, p. 1077-1086, 2007.

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; COLES, G. C.; JACKSON, F.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F.; CIRAK, V. Y.; DEMELER, J.; DONNAN, A.; DORNY, P.; EPE, C.; HARDER, A.; HOGLUND, J.; KAMINSKY, R.; KERBOEUF, D.; KUTTLER, U.;

PAPADOPOULOS, E.; POSEDI, J.; SMALL J.; VARADY, M.; VERCRUYSSSE, J.; WIRTHERLE, N. Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. **Parasitology Research**, v. 105, p. 825-834, 2009a.

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; WALSH, T. K.; DONNAN, A. A.; CARRIÈRE, S.; JACKSON, F.; SKUCE, P. J.; ROHN, K.; WOLSTENHOLME, A. J. Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing. **Parasitology**, v. 136, p. 349-358, 2009b.

SANGSTER, N. C.; WHITLOCK, H. V.; RUSS, I. G.; GUNAWAN, M.; GRIFFIN, D. L.; KELLY, J. D. *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* resistant to levamisole, morantel tartrate and thiabendazole: occurrence of field strains. **Research in Veterinary Science**, v. 27, p. 106-110, 1979.

SCOTT, I.; POMROY, W. E.; KENYON, P. R.; SMITH, G.; ADLINGTON, B.; MOSS, A. Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 198, p. 166-171, 2013.

SCZESNY-MORAES, E. A.; BIANCHIN, I.; SILVA, K. F.; CATTO, J. B.; HONER, M. R.; PAIVA, F. Resistência anti-helmíntica de nematoides gastrointestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 229-236, 2010.

SHAYAN, P.; ESLAMI, A.; BORJI, H. Innovative restriction site created PCR-RFLP for detection of benzimidazole resistance in *Teladorsagia circumcincta*. **Parasitology Research**, v. 100, p. 1063-1068, 2007.

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.

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

SUTHERLAND, I. A.; LEE, D. L. A larval paralysis assay for the detection of thiabendazole resistance in trichostrongyles. **Parasitology**, v. 100, p. 131-135, 1990.

TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, v. 103, p. 183-194, 2002.

TIWARI, J.; KUMAR, S.; KOLTE, A. P.; SWARNKAR, C. P.; SINGH, D.; PATHAK, K. M. Detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using RFLP-PCR technique. **Veterinary Parasitology**, v. 138, p. 301-307, 2006.

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

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. 1998. **Manual para Diagnóstico das Helmintoses de Ruminantes**. 4^a ed. Press Color, Salvador. 143p.

VAN WYK, J. A.; STENSON, S. O.; VAN DER MREWE, J. S.; VORDSETR, R. J.; VILJOEN, P. G. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 273-284, 1999.

VÁRADY, M.; CERNANSKÁ, D.; CORBA, J. Use of two in vitro methods for the detection of anthelmintic resistant nematode parasites on Slovak sheep farms. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 325-331, 2006.

VERÍSSIMO, C. J.; NICIURA, S. C. M.; ALBERTI, A. L. L.; RODRIGUES, C. F. C.; BARBOSA, C. M. P.; CHIEBAO, D. P.; CARDOSO, D.; da SILVA, G. S.; PEREIRA, J. R.; MARGATHO, L. F. F.; da COSTA, R. L. D.; NARDON, R. F.; UENO, T. E. H.; CURCI, V. C. L. M.; MOLENTO, M. B. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 209-216, 2012.

WAGLAND, B. M.; JONES, W. O.; HRIBAR, L.; BENDIXSEN, T.; EMERY, D. L. A new simplified assay for larval migration inhibition. **International Journal for Parasitology**, v. 22, p. 1183-1185, 1992.

WOLSTENHOLME, A. J.; ROGERS, A. T. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. **Parasitology**, v. 131 (Suppl.):S85-S95, 2005.

XU, M.; MOLENTO, M.; BLACKHALL, W.; RIBEIRO, P.; BEECH, R.; PRICHARD, R. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, p. 327-335, 1998.

3 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA EM UM ISOLADO DE CAMPO SELECIONADO DE *Haemonchus contortus* À IVERMECTINA E MOXIDECTINA USANDO O TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM ÁGAR

RESUMO

Haemonchus contortus é uma das causas mais comuns e economicamente significativas de doença em produções de pequenos ruminantes em todo o mundo, e os programas de controle de parasitos nematoides – incluindo *H. contortus* – baseiam-se principalmente no uso de drogas anti-helmínticas. A consequência da utilização desses compostos, como sendo a única estratégia sanitária para evitar infecções por parasitos, tem sido a redução da eficácia de todos os produtos quimioterápicos, selecionando fortemente para resistência. O desenvolvimento generalizado da resistência anti-helmíntica e a dificuldade de seu diagnóstico precoce têm sido uma grande preocupação para o manejo sustentável de parasitos no campo. O objetivo desta pesquisa foi determinar e comparar o efeito da ivermectina (IVM) e da moxidectina (MOX) em um isolado de campo selecionado de *H. contortus* com um estado de resistência conhecido, utilizando o teste *in vitro* de migração de larvas em ágar (TMLA). Larvas de terceiro estágio de um isolado de *H. contortus* selecionado foram obtidas a partir de culturas de fezes de ovinos infectados experimentalmente e incubadas em onze concentrações diluídas crescentes de IVM e MOX (6, 12, 24, 48, 96, 192, 384, 768, 1536, 3072 e 6144 µg/mL). As curvas sigmóides de dose-resposta foram obtidas utilizando o valor de $R^2 > 0,90$ e a dose de concentração letal (DL₅₀) para as drogas anti-helmínticas testadas, utilizando um modelo logístico de quatro parâmetros. O valor de DL₅₀ para MOX foi significativamente menor do que para IVM (1,253 µg/mL e 91,06 µg/mL), identificando o isolado de *H. contortus* como consideravelmente menos suscetível à IVM em comparação à MOX. Além disso, o TMLA mostrou uma alta consistência ($p < 0,0001$) e pode ser uma ferramenta útil de diagnóstico para monitorar o status de resistência de IVM e MOX em isolado de campo de *H. contortus*, assim como ser utilizado de forma oficial e em rotina para programas de monitoramento das drogas sob a demanda do Ministério da Agricultura (MAPA).

Palavras-chave: *Haemonchus contortus*. Anti-helmínticos. Ivermectina. Moxidectina. Ovinos. Lactonas macrocíclicas. *In vitro*. Nematoides. Eficácia.

EVALUATION OF RESISTANCE IN A SELECTED FIELD STRAIN OF *Haemonchus contortus* TO IVERMECTIN AND MOXIDECTIN USING THE LARVAL MIGRATION ON AGAR TEST

ABSTRACT

Haemonchus contortus is one of the most common and economically significant causes of disease in small ruminants worldwide, and the control programs of parasitic nematodes - including *H. contortus* - rely mostly on the use of anthelmintic drugs. The consequence of the use of this, as the sole sanitary strategy to avoid parasite infections, was the reduction of the efficacy of all chemotherapeutic products with a heavy selection for resistance. The widespread of anthelmintic resistance and the difficulty of its early diagnosis has been a major concern for the sustainable parasite management on farms. The objective of this research was to determine and compare the ivermectin (IVM) and moxidectin (MOX) effect in a selected field strain of *H. contortus* with a known resistance status, using the *in vitro* larval migration on agar test (LMAT). Third stage larvae of the selected isolate were obtained from faecal cultures of experimentally infected sheep and incubated in eleven increasing diluted concentrations of IVM and MOX (6, 12, 24, 48, 96, 192, 384, 768, 1536, 3072 and 6144 μ g/mL). The dose-response sigmoidal curves were obtained using the R^2 value of >0.90 and the lethal concentration (LC50) dose for the tested anthelmintic drugs using a four-parameter logistic model. The LC50 value for MOX was significantly lower than IVM (1.253 μ g/mL and 91.06 μ g/mL), identifying the *H. contortus* isolate as considerably less susceptible to IVM compared to MOX. Furthermore, the LMAT showed a high consistency ($p < 0.0001$) and provided to be a useful diagnostic tool for monitoring the resistance status of IVM and MOX in *H. contortus* field isolate, as well as it may be used for official routine drug monitoring programs under the Ministry of Agriculture (MAPA) guidance.

Key words: *Haemonchus contortus*. Anthelmintics. Ivermectin. Moxidectin. Sheep. Macrocyclic lactones. *In vitro*. Nematodes. Efficacy.

3.1 INTRODUÇÃO

Haemonchus contortus é um dos mais importantes nematoides gastrintestinais na produção de pequenos ruminantes no mundo, devido à sua alta prevalência e patogenicidade, causando sérios prejuízos econômicos (KAPLAN, 2004). Drogas anti-helmínticas são comumente utilizadas como o único método de controle desse parasito. No entanto, o uso intensivo de todos os compostos disponíveis no mercado tem levado ao desenvolvimento generalizado da resistência anti-helmíntica nos principais países produtores de ovinos (VAN WYK *et al.*, 1999; PAPADOPOULOS, 2008; MOLENTO *et al.*, 2011; KAPLAN e VIDYASHANKAR, 2012; VERÍSSIMO *et al.*, 2012).

Entre as drogas mais utilizadas, as lactonas macrocíclicas (LMs), como a ivermectina (IVM), um composto da classe das avermectinas, e a moxidectina (MOX), uma milbemicina, têm um amplo espectro de atividade contra nematoides parasitos em animais e seres humanos. A resistência a estas drogas tem sido detectada em diferentes nematoides no Brasil, incluindo *H. contortus* (ECHEVARRIA *et al.*, 1996; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2004; ROSALINSKI-MORAES *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2010; CRUZ *et al.*, 2010; SCZESNY-MORAES *et al.*, 2010; VERÍSSIMO *et al.*, 2012).

Há uma necessidade urgente de determinar-se o estado de eficácia das drogas para apoiar o planejamento e o uso sustentável dos anti-helmínticos que ainda permanecem eficazes, reduzindo a propagação de parasitos resistentes (COLES *et al.*, 2006; DEMELER *et al.*, 2010). O método padrão ouro para a detecção da resistência anti-helmíntica é o teste controlado de eficácia, com base na redução da contagem de vermes adultos após o sacrifício dos animais. Embora seja o teste mais confiável disponível até o momento para detectar resistência às drogas, o mesmo é extremamente caro, trabalhoso e demorado. O Teste de Redução na Contagem de Ovos nas Fezes (TRCOF), que compara as contagens de ovos realizadas pré e pós-tratamento, pode definir a porcentagem de eficácia por meio da redução no número de ovos. Apesar de ser utilizado para todas as classes de anti-helmínticos, sendo comumente usado para monitorar a resistência em nematoides, o

TRCOF não avalia a redução no número de parasitos adultos (COLES *et al.*, 2006; DE GRAEF *et al.*, 2012; KAPLAN e VIDYASHANKAR, 2012).

Portanto, é necessário um método diagnóstico eficaz para a resistência anti-helmíntica, rápido, mais econômico e que não envolva o sacrifício de animais. Vários métodos *in vitro* têm sido desenvolvidos nos últimos 30 anos (GILL *et al.*, 1995; D'ASSONVILLE *et al.*, 1996; MOLENTO e PRICHARD, 2001; TAYLOR *et al.*, 2002; COLES *et al.*, 2006; DEMELER *et al.*, 2010), tendo como principal característica evitar o efeito “*in vivo* – animal” (isto é, raça, idade, gordura/escore corporal), que pode alterar significativamente a farmacocinética das drogas, em consequência de diferentes taxas de absorção, metabolismo e tempo para atingir os tecidos-alvo.

Entre os métodos *in vitro*, os testes de migração consistem em uma alternativa simples, rápida e de baixo custo para a análise dos efeitos de algumas classes de anti-helmínticos. O principal mecanismo a ser avaliado é a paralisia muscular causada aos nematoides, que pode ser visualizada como uma redução da migração quando são comparados grupos controle e tratados. O Teste de Migração de Larvas em Ágar (TMLA) está sendo usado como uma ferramenta diagnóstica para detectar e monitorar a resistência às LMs em laboratório (D'ASSONVILLE *et al.*, 1996; MOLENTO e PRICHARD, 2001; DEMELER *et al.*, 2010). Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar o efeito da IVM e da MOX em *H. contortus* isolado de uma fazenda de ovinos com histórico de resistência à IVM e suscetibilidade à MOX (VERÍSSIMO *et al.*, 2012), utilizando um teste de migração modificado (MOLENTO e PRICHARD, 2001).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Isolado de campo de parasito e produção de coprocultura a partir do isolado

O isolado de campo de parasito utilizado neste estudo foi obtido a partir de uma fazenda de ovinos localizada no Estado de São Paulo, Brasil, com relatos de resistência à IVM (16%) e suscetibilidade à MOX (99%) pelo TRCOF realizado

anteriormente (VERÍSSIMO *et al.*, 2012) (ANEXO 4). A população de parasitos inicial foi composta por *Haemonchus* sp. (59%), *Cooperia* sp. (22%), *Trichostrongylus* sp. (11%) e *Teladorsagia* sp. (8%). Amostras de fezes contendo ovos de nematoides foram coletadas de ovinos para a realização de coproculturas por 7 dias e obtenção de larvas de terceiro estágio (L₃). As L₃ infectantes resultantes foram armazenadas em água destilada, sob refrigeração, até serem utilizadas para infectar artificialmente novos ovinos livres de parasitos, a fim de produzir coproculturas puras de *H. contortus*.

3.2.2 Infecções experimentais e produção de coproculturas 1 e 2 (isolado SP1503Ovi2011)

Quatro ovinos foram selecionados e tratados por via oral com oxfendazole 2,5 mg/kg de peso vivo (PV) (Oxfaden®, Biovet) e levamisole 5,0 mg/kg/PV (Ripercol® L, Fort Dodge), por três dias consecutivos, para remover todas as infecções parasitárias naturais. Amostras de fezes foram coletadas dos animais por quatro semanas para confirmar seu estado livre de parasitos. Os animais foram mantidos em baias livres de vermes até as infecções experimentais.

Dois ovinos (Grupo 1) foram infectados artificialmente com 8.000 L₃ de nematoides gastrintestinais por via oral. Após o estabelecimento da infecção em, pelo menos, 28 dias, amostras de fezes foram obtidas do dia 28 ao dia 34 para realização de OPG e coprocultura (ANEXOS 6 e 7). Os animais foram eutanasiados no dia 34 pós-infecção e os vermes adultos de *H. contortus* foram coletados diretamente do abomaso. Os vermes adultos foram imediatamente colocados em placas de Petri contendo solução salina a 36°C e mantidos em uma estufa por um período de 2-12 horas para a realização da oviposição das fêmeas. Os ovos foram transferidos para um cálice de sedimentação e, em seguida, foram misturados com fezes de cavalo autoclavadas para se obter uma coprocultura monoespecífica (Coprocultura 1) (ANEXO 8).

Dois ovinos (Grupo 2) foram infectados artificialmente por via oral com 8.000 L₃ de *H. contortus* obtidos a partir da Coprocultura 1. Após a confirmação do

estabelecimento da infecção, novas coproculturas foram preparadas a fim de produzir uma coprocultura pura de *H. contortus* (Coprocultura 2). As larvas infectantes da Coprocultura 2 foram identificadas e armazenadas em água destilada até 30 dias, para serem utilizadas nos testes *in vitro*. Apesar de não estar incluído no Banco de Dados de Isolado de Parasito, o código de nomenclatura dado para o presente isolado (SP1503Ovi2011) foi baseado no CARS (*Consortium for Anthelmintic Resistance and Susceptibility*), usando o seguinte código: Estado de origem / número do código da fazenda amostrada / animais hospedeiro / ano do isolamento.

3.2.3 Teste *in vitro* de Migração de Larvas em Ágar (TMLA)

O TMLA foi realizado segundo a técnica modificada por Molento e Prichard (2001) (ANEXO 9). As L₃ coletadas a partir da Coprocultura 2 foram desembainhadas usando hipoclorito de sódio a 0,3%. Após o desembainhamento de mais de 90% das larvas móveis, foi feita a lavagem destas em água destilada por três vezes e a subdivisão em grupos de 400 L₃ por poço, em triplicatas. Em cada grupo de larvas foi adicionada água destilada até atingir o volume total de 0,5 mL, enquanto as diluições das drogas eram preparadas em tubos separados (volume total de 0,5 mL). Onze concentrações foram testadas (6, 12, 24, 48, 96, 192, 384, 768, 1536, 3072 e 6144 µg/mL) para ivermectina a 1% (Ivomec®, Merial Saúde Animal) e moxidectina a 1% (Cydectin®, Fort Dodge). As L₃, juntamente com as diluições das drogas, foram colocadas a 27°C por 6h (primeira incubação). Na sequência, ágar a 1,4% foi adicionado às larvas tratadas, sendo a mistura imediatamente transferida a aparatos previamente preparados, feitos utilizando-se uma placa de Petri contendo no centro da base duas malhas (plástica e de metal) e um cilindro plástico na parte superior. O aparato foi anteriormente preenchido com 22 mL de água destilada e armazenado a -20°C, congelando a água sobre a malha. Após a adição de todo o conteúdo, o aparato foi colocado em uma estufa por 18h, a 27°C, sob uma luz de lâmpada de 150 MHz, para estimular a migração larval para fora da porção de ágar. Após a segunda migração, a porção líquida contendo as

larvas migrantes foi transferida para um tubo de 50 mL e centrifugada a 3.000 rpm por 5 min, com a remoção do sobrenadante. Os tubos foram, então, agitados, sendo retiradas amostras de 1 mL em triplicatas. As contagens finais foram feitas pela média das alíquotas, multiplicada por 10.

Todos os procedimentos experimentais descritos neste artigo foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Brasil (Protocolo 021/2010) (ANEXO 1).

3.2.4 Análise estatística

A dose letal (DL_{50}) e o erro padrão foram medidos por um modelo de regressão não linear, o que resultou em uma curva de resposta de concentração sigmoideal (equação logística de quatro parâmetros com uma inclinação variável), usando o programa GraphPad Prism® 5.01. Todas as análises foram realizadas após a transformação dos dados em seus logaritmos ($\log X = X$), antes de calcular os valores de $\log DL_{50}$ (valores de DL_{50}), intervalos de confiança de 95% e R^2 . Além disso, os valores de p para os de DL_{50} das respostas de IVM e MOX foram calculados utilizando-se o mesmo programa.

3.3 RESULTADOS

Os gêneros de nematoides recuperados a partir da Coprocultura 2 mostraram > 96% de *H. contortus* seguido por < 3% de *Cooperia* sp. e *Trichostrongylus* sp. Todos os testes *in vitro* foram executados com L_3 de *H. contortus* da Coprocultura 2. Para a inclusão dos dados experimentais, foi necessário observar dois critérios: uma taxa de migração de pelo menos 80% no controle negativo e valores de $R^2 > 0,90$. As curvas de dose-resposta para as drogas IVM e MOX utilizando o TMLA estão apresentadas na FIGURA 3.

A análise estatística das curvas foi feita utilizando-se os valores de DL_{50} . Os resultados identificaram corretamente o isolado de *H. contortus* resistente à IVM e suscetível à MOX, mostrando o valor da DL_{50} -IVM de 91,06 $\mu\text{g/mL}$ e da DL_{50} -MOX de 1,253 $\mu\text{g/mL}$ (TABELA 1). Os resultados foram estatisticamente significativos ($p < 0,0001$) comparando ambas as drogas.

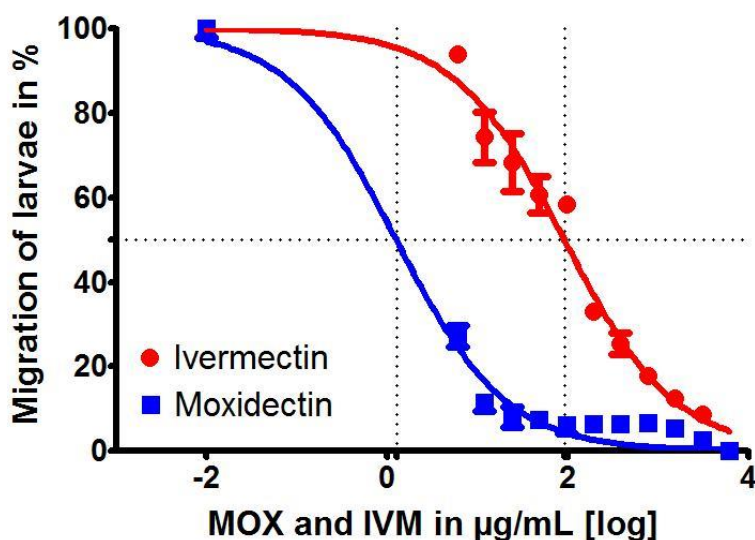


FIGURA 3 – CURVAS DOSE-RESPOSTA OBTIDAS COM O TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM ÁGAR COM O ISOLADO DE *Haemonchus contortus* SP1503Ovi2011, UTILIZANDO IVERMECTINA (IVM) E MOXIDECTINA (MOX).

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Barras de erro indicam o erro padrão, e não são vistas quando as diferenças entre os valores observados para todas as concentrações testadas é 0 (zero) ou muito próximo de 0.

TABELA 1 – VALORES DE DL_{50} , COM O INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (95% IC), VALORES DE $\text{Log } DL_{50}$, R^2 E VALORES DE p , UTILIZANDO IVERMECTINA (IVM) E MOXIDECTINA (MOX) NO TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM ÁGAR, COM O ISOLADO DE *Haemonchus contortus* SP1503Ovi2011

	MOX	IVM
DL_{50}	1,253 $\mu\text{g/mL}$	91,06 $\mu\text{g/mL}$
95% IC	0,704–2,229 $\mu\text{g/mL}$	75,53–109,8 $\mu\text{g/mL}$
$\text{Log } DL_{50}$	0,099	1,959
R^2	0,97	0,96
p	< 0,0001	

3.4 DISCUSSÃO

É muito importante monitorar a eficácia anti-helmíntica, em intervalos regulares, para detectar mudanças sutis, tão cedo quanto possível, a fim de evitar o estabelecimento de resistência anti-helmíntica. Isso pode ser realizado por meio de testes de diagnóstico *in vitro* acessíveis e sensíveis, determinando quais drogas ainda permanecem eficazes contra uma população de parasitos em particular, permitindo a escolha de um anti-helmíntico para utilização terapêutica no campo (KAPLAN, 2004; DEMELER *et al.*, 2010; MOLENTO *et al.*, 2011). Os testes de desenvolvimento larval (TDL) são os mais comumente empregados e foram capazes de distinguir facilmente isolados de parasitos suscetíveis e resistentes. O TDL mostrou ser capaz de identificar baixos níveis de vermes resistentes em uma população, mas a execução desses exames apresentam algumas dificuldades (DOLINSKÁ *et al.*, 2012). Uma alternativa potencial que ainda está sendo estudada para a detecção de parasitos resistentes são os testes de migração de larvas (TML). O TML vem sendo utilizado para a detecção de resistência à IVM, à MOX e aos benzimidazóis em nematoides de ovinos, caprinos e bovinos (WAGLAND *et al.*, 1992; RABEL *et al.*, 1994; MOLENTO e PRICHARD, 2001; GATONGI *et al.*, 2003; KAPLAN *et al.*, 2007; DEMELER *et al.*, 2010; BORGES *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de resistência à IVM e também a concomitante perda de sensibilidade à MOX é um debate permanente (CONDER *et al.*, 1993; SHOOP *et al.*, 1993; MOLENTO *et al.*, 1999; RANJAN *et al.*, 2002; DE GRAEF *et al.*, 2012). El-Abdellati *et al.* (2010) sugerem que, quando é detectada resistência à IVM, a utilização de qualquer tipo de LM é inadequada. No entanto, a taxa de resistência difere entre os compostos, e ocorre mais lentamente para MOX do que para IVM (RANJAN *et al.*, 2002; LE JAMBRE *et al.*, 2005). Mesmo que a resistência a um anti-helmíntico possa ser detectada, outra droga da mesma classe ainda pode permanecer altamente eficaz (KAPLAN e VIDYASHANKAR, 2012). Embora surjam cada vez mais relatos de resistência à MOX em nematoides em todo o mundo, muitos casos de multirresistência grave foram detectados, com MOX permanecendo como a droga com melhor efeito (MORTENSEN *et al.*, 2003; KAPLAN *et al.*, 2007).

Assim, nossos resultados indicam que a MOX poderia ter algum potencial de aplicação no controle de *H. contortus* em ovinos na fazenda selecionada, e isso pode ser verdade para outros nematoides gastrintestinais.

O preocupante estado de resistência anti-helmíntica previamente detectado por meio do TRCOF foi confirmado pelo teste *in vitro*, no presente estudo, como mostrado pelos diferentes valores de DL₅₀. Tais dados estão de acordo com outros relatos, em que as populações de nematoides de ovinos mostraram alta resistência contra LMs *in vivo* e também foram menos suscetíveis *in vitro*, usando testes de desenvolvimento larvar (HUBERT e KERBOEUF, 1992; TAYLOR et al., 2002). O problema da resistência anti-helmíntica, identificada em ambos os testes, é, possivelmente, a situação que predomina na maioria das criações de ovinos no Brasil. Portanto, sugerimos que o Ministério da Agricultura, MAPA poderia adotar oficialmente testes *in vitro* para serem usados por programas de monitoramento de drogas. Antes disso, é essencial melhorar e adaptar protocolos operacionais padrão para a execução e interpretação do TMLA, a fim de tornar o teste aplicável para a prática de rotina. É necessário testar diferentes isolados com diferentes graus de resistência a drogas em laboratórios diferentes, utilizando-se um protocolo idêntico, para confirmar a reprodutibilidade e repetibilidade dos dados do TMLA.

Em conclusão, o TMLA *in vitro* descrito aqui foi usado com sucesso para gerar curvas de dose-resposta confiáveis ($p < 0,0001$) para as drogas testadas. O valor de DL₅₀ obtido para MOX foi 72,67 vezes menor do que para IVM, identificando esse isolado de *H. contortus* altamente resistente à IVM. Os presentes dados também mostram a possibilidade de utilizar o TMLA para a análise de resistência às LMs e podem proporcionar uma ferramenta de diagnóstico útil para o monitoramento da resistência anti-helmíntica.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, G. D.; FELIZ, D. C.; HECKLER, R. P.; BORGES, D. G.; ONIZUKA, M. K.; TAVARES, L. E.; PAIVA, F.; BORGES, F. A. 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** (Epub ahead of print), 2012.
- ALMEIDA, F. A.; GARCIA, K. C. O. D.; TORGERSON, P. R.; AMARANTE, A. F. T. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v. 59, p. 622-625, 2010.
- BORGES, F. A.; ROSSINI, J. B.; VELLUDO, P. P.; BUZZULINI, C.; COSTA, G. H.; MOLENTO, M. B.; COSTA, A. J. Weak phenotypic reversion of ivermectin resistance in a field resistant isolate of *Haemonchus contortus* by verapamil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 731-736, 2011.
- COLES, G. C.; JACKSON, F.; POMROY, W. E.; PRICHARD, R. K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M. A.; VERCRUYSSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 167-85, 2006.
- CONDER, G. A.; THOMPSON, D. P.; JOHNSON, S. S. Demonstration of co-resistance of *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin. **Veterinary Record**, v. 132, p. 651-652, 1993.
- CRUZ, D. G.; ROCHA, L. O.; ARRUDA, S. S.; PALIERAQUI, J. G. B.; CORDEIRO, R. C.; SANTOS JUNIOR, E.; MOLENTO, M. B.; SANTOS, C. P. Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 340-343, 2010.
- D'ASSONVILLE, J. A.; JANOVSKY, E.; VERSTER, A. In vitro screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 61, p. 73-80, 1996.
- DE GRAEF, J.; SARRE, C.; MILLS, B. J.; MAHABIR, S.; CASAERT, S.; DE WILDE, N.; VAN WEYENBERG, M.; GELDHOF, P.; MARCHIONDO, A.; VERCRUYSSE, J.; MEEUS, P.; CLAEREBOUT, E. Assessing resistance against macrocyclic lactones in gastro-intestinal nematodes in cattle using the faecal egg count reduction test and

the controlled efficacy test. **Veterinary Parasitology**, 2012
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.040>>

DEMELER, J.; KÜTTLER, U.; EL-ABDELLATI, A.; STAFFORD, K.; RYDZIK, A.; VARADY, M.; KENYON, F.; COLES, G.; HÖGLUND, J.; JACKSON, F.; VERCRUYSSSE, J.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 174, p. 58-64, 2010.

DOLINSKÁ, M.; KÖNIGOVÁ, A.; VÁRADY, M. Is the micro-agar larval development test reliable enough to detect ivermectin resistance? **Parasitology Research**, v. 111, p. 2201-2204, 2012.

ECHEVARRIA, F.; BORBA, M. F. S.; PINHEIRO, A. C.; WALLER, P. J.; HANSEN, J. W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America. Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 199-206, 1996.

EL-ABDELLATI, A.; GELDHOF, P.; CLAEREBOUT, E.; VERCRUYSSSE, J.; CHARLIER, J. Monitoring macrocyclic lactone resistance in *Cooperia oncophora* on a Belgian cattle farm during four consecutive years. **Veterinary Parasitology**, v. 171, p. 167-171, 2010.

GATONGI, P. M.; NJOROGE, J. M.; SCOTT, M. E.; RANJAN, S.; GATHUMA, J. M.; MUNYUA, W. K.; CHERUIYOT, H.; PRICHARD, R. Susceptibility to IVM in a field strain of *Haemonchus contortus* subjected to four treatments in a closed sheep-goat flock in Kenya. **Veterinary Parasitology**, v. 110, p. 235-240, 2003.

GILL, J. H.; REDWIN, J. M.; VAN WYK, J. A.; LACEY, E. Avermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus*: Effects of ivermectin resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 25, p. 463-470, 1995.

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.

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

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

- KAPLAN, R. M.; VIDYASHANKAR, A. N.; HOWELL, S. B.; NEISS, J. M.; WILLIAMSON, L. H.; TERRILL, T. H. A novel approach for combining the use of in vitro and in vivo data to measure and detect emerging moxidectin resistance in gastrointestinal nematodes of goats. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 795-804, 2007.
- LE JAMBRE, L. F.; GEOGHEGAN, J.; LYNDAL-MURPHY, M. Characterization of moxidectin resistant *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 83-90, 2005.
- MOLENTO, M. B.; FORTES, F. S.; PONDELEK, D. A. S.; BORGES, F. A.; CHAGAS, A. C. S.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; GELDHOF, P. Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 126-132, 2011.
- MOLENTO, M. B.; PRICHARD, R. K. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, p. 117-121, 2001.
- MOLENTO, M. B.; WANG, G. T.; PRICHARD, R. K. Decreased ivermectin and moxidectin sensitivity in *Haemonchus contortus* selected with moxidectin over 14 generations. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 77-81, 1999.
- MORTENSEN, L. L.; WILLIAMSON, L. H.; TERRILL, T. H.; KIRCHER, R.; LARSEN, M.; KAPLAN, R. M. Evaluation of prevalence and clinical implications of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of goats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 23, p. 495-500, 2003.
- PAPADOPOULOS, E. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Small Ruminant Research**, v. 76, p. 99-103, 2008.
- RABEL, B.; MCGREGOR, R.; DOUCH, P. G. Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. **International Journal for Parasitology**, v. 24, p. 671-676, 1994.
- RANJAN, S.; WANG, G. T.; HIRSCHLEIN, C.; SIMKINS, K. L. Selection for resistance to macrocyclic lactones by *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 103, p. 109-117, 2002.

ROSALINSKI-MORAES, F.; MORETTO, L. H.; BRESOLIN, W. S.; GABRIELLI, I.; KAFER, L.; ZANCHET, I. K.; SONAGLIO, F.; THOMAZ-SOCCOL, V. Resistencia anti-helmintica em rebanhos ovinos da regio da associaçao dos municipios do alto Irani (AMAI), oeste de Santa Catarina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, p. 559-565, 2007.

SCZESNY-MORAES, E. A.; BIANCHIN, I.; DA SILVA, K. F.; CATTO, J. B.; HONER, M. R.; PAIVA, F. Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 229-236, 2010.

SHOOP, W. L.; HAINES, H. W.; MICHAEL, B. F.; EARY, C. H. Mutual resistance to avermectins and milbemycins: oral activity of ivermectin and moxidectin against ivermectin-resistant and susceptible nematodes. **Veterinary Record**, v. 133, p. 445-447, 1993.

TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, v. 103, p. 183-194, 2002.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F. P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E. A.; MILCZEWSKI, V.; MOCELIN, G.; PESSOA E SILVA, M. C. Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 41-47, 2004.

VAN WYK, J. A.; STENSON, M. O.; VANDER MERWE, J. S.; VORSTER, R. J.; VILJOEN, P. G. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 273-284, 1999.

VERÍSSIMO, C. J.; NICIURA, S. C. M.; ALBERTI, A. L. L.; RODRIGUES, C. F. C.; BARBOSA, C. M. P.; CHIEBAO, D. P.; CARDOSO, D.; DA SILVA, G. S.; PEREIRA, J. R.; MARGATHO, L. F. F.; DA COSTA, R. L. D.; NARDON, R. F.; UENO, T. E. H.; CURCI, V. C. L. M.; MOLENTO, M. B. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 209-216, 2012.

WAGLAND, B. M.; JONES, W. O.; HRIBAR, L.; BENDIXSEN, T.; EMERY, D. L. A new simplified assay for larval migration inhibition. **International Journal for Parasitology**, v. 22, p. 1183-1185, 1992.

4 IDENTIFICAÇÃO DE SNPs/INDELS EM REGIÕES GENÔMICAS DE RECEPTORES LGIC E TRANSPORTADORES ABC EM ISOLADOS SUSCETÍVEL E RESISTENTE À IVERMECTINA DE *Haemonchus contortus* A PARTIR DE DADOS DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

RESUMO

Haemonchus contortus é um parasito de pequenos ruminantes, economicamente importante em todo o mundo, sendo o seu controle um problema generalizado, devido à resistência contra a maioria das drogas anti-helmínticas. Nesse aspecto, questões críticas permanecem sem solução. A ivermectina (IVM) – uma lactona macrocíclica (LM) de amplo espectro – é comumente usada em animais de produção, cuja resistência à droga tem-se mostrado um grande desafio. Devido à complexa associação entre alterações genéticas e resistência às LMs, torna-se difícil identificar marcadores moleculares para resistência a drogas desse grupo. Um isolado de campo de *H. contortus*, IVR1503, altamente resistente à IVM, foi obtido a partir de ovinos, e submetido a passagens em ovinos experimentalmente infectados. Foi pesquisada a presença de polimorfismos em regiões genômicas de IVR1503, onde estão localizados genes que codificam para a família de transportadores ABC (do inglês *ATP binding cassette*) e para a superfamília de receptores de canais iônicos abertos por ligante (LGICs, do inglês *Ligand-Gated Ion Channel*). Tais genes foram previamente associados à resistência à IVM, incluindo as glicoproteínas-P (P-gps, do inglês *P-glycoproteins*) e os canais de cloro potencializados pelo glutamato (GluCl, do inglês *glutamate-gated Cl⁻ channels*). Os resultados foram comparados a um isolado de laboratório de *H. contortus* suscetível a todas as drogas, chamado PF23, usando como referência para mapeamento o genoma do isolado também suscetível MHco3(ISE).N1. Este estudo relata um conjunto final selecionado de variantes, incluindo polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) e inserção/deleção (indels, do inglês *small insertions and deletions*), obtidos a partir de dados gerados após o sequenciamento de nova geração Illumina de DNA genômico de ambos os isolados. Um conjunto total de 179 variantes (132 SNPs, 47 indels) para IVR1503 e de 60 (34 SNPs, 26 indels) para PF23 foram selecionados na região ABC. Adicionalmente, foram identificadas 367 variantes (291 SNPs, 76 indels) e 155 (106 SNPs, 49 indels) na região LGIC de IVR1503 e PF23, respectivamente. Os níveis de variação genética foram marcadamente maiores em IVR1503, e as características e o padrão de todos esses sítios polimórficos foram analisados e comparados em IVR1503 e PF23, encontrando-se algumas regiões com um padrão de polimorfismos diferente/incomum no isolado resistente. Este estudo fornece uma importante fonte de dados de SNPs/indels de regiões específicas que podem ser usados para avaliar e validar marcadores moleculares para estudos de associação e mapeamento genético. A validação e o teste dessas variantes serão importantes para direcionar trabalhos futuros sobre o diagnóstico precoce da resistência à IVM. Além disso, esses resultados devem contribuir para o avanço de estudos genéticos e pesquisas sobre a resistência anti-helmíntica no parasito *H. contortus*.

Palavras-chave: Nematóide. Resistência anti-helmíntica. Lactona macrocíclica. Canais iônicos abertos por ligante. Transportadores ABC. Polimorfismos. SNP. Indel.

SNPs/INDELS IDENTIFICATION IN GENOMIC REGIONS OF LGIC RECEPTORS AND ABC TRANSPORTERS IN A SUSCEPTIBLE AND IVERMECTIN-RESISTANT ISOLATES OF *Haemonchus contortus* FROM NEXT-GENERATION SEQUENCING DATA

ABSTRACT

Haemonchus contortus is an economically important parasite of small ruminants worldwide, but its control has been a widespread problem due to resistance against most anthelmintic drugs and critical issues remain unresolved. The ivermectin (IVM) – a broad-spectrum anthelmintic macrocyclic lactone (ML) – is commonly used in livestock where the resistance to this drug is a great challenge to our understanding. Due to the complex association between genetic changes and ML resistance, it is difficult to identify molecular marker for resistance to drugs of this group. A field isolate of *H. contortus*, IVR1503, highly resistant to IVM was obtained from sheep and passaged through experimentally infected sheep. We searched for the presence of polymorphisms in IVR1503 at genomic regions where genes encoding ATP binding cassette (ABC) transporter family and ligand-gated ion channels (LGICs) superfamily are located. Such genes were previously associated with IVM resistance (P-glycoproteins and glutamate-gated Cl⁻ channels). The results were compared to a fully drug-susceptible laboratory isolate of *H. contortus* named PF23 using as the mapping reference a susceptible genome strain MHco3(ISE).N1. This study reports a selected final set of high-quality variants for single nucleotide polymorphisms (SNPs) and small insertions and deletions (indels) obtained from data generated after Illumina next-generation sequencing of genomic DNA of both isolates. A total set of 179 variants (132 SNPs, 47 indels) to IVR1503 and 60 (34 SNPs, 26 indels) to PF23 were selected in the ABC region. In addition, we found 367 variants (291 SNPs, 76 indels) and 155 (106 SNPs, 49 indels) in the LGIC region of IVR1503 and PF23, respectively. The genetic variation levels were markedly higher in IVR1503, and the features and pattern of all these polymorphic sites were analyzed and compared within and between IVR1503 and PF23, which we found some regions showing a different/unusual pattern of polymorphisms in the resistant isolate. This study provides a rich data source of putative SNPs/indels of specific regions that could be used to evaluate and validate molecular markers for studies of genetic and association mapping. Validation and testing of these variants will be important to direct future work on the early diagnosis of IVM resistance. Furthermore, these results shall contribute to the advancement of genetic studies and anthelmintic resistance research in *H. contortus* parasite.

Key words: Nematode. Anthelmintic resistance. Macrocyclic lactone. Ligand-gated ion channels. ATP-Binding Cassette transporters. Polymorphisms. SNP. Indel.

4.1 INTRODUÇÃO

O nematoide estrogilídeo *Haemonchus contortus* é um parasito gastrointestinal hematófago de pequenos ruminantes, altamente patogênico para a saúde animal e economicamente significativo para a produção animal em todo o mundo (PETER e CHANDRAWATHANI, 2005). Entre as drogas anti-helmínticas mais comumente utilizadas para o controle de infecções por nematoides estão as lactonas macrocíclicas (LMs) de amplo espectro, tais como a potente ivermectina (IVM), amplamente disponível e rotineiramente usada em animais de produção. Membros da superfamília de receptores de canais iônicos abertos por ligante (LGICs, do inglês *Ligand-Gated Ion Channel*) – incluindo vários diferentes canais de cloro potencializados pelo glutamato (GluCl, do inglês *glutamate-gated Cl⁻ channels*) e pelo ácido gama-aminobutírico (GABA, do inglês *gamma-aminobutyric acid gated channels*) – têm sido identificados como alvos para o mecanismo de ação da IVM em alguns nematoides, como o *H. contortus* (BLACKHALL *et al.*, 2003). As LMs afetam os parasitos por inibição e paralisia do bombeamento da faringe, afetando a alimentação, a mobilidade e a fecundidade, devido ao constante fluxo de íons cloreto através desses canais (ARDELLI *et al.*, 2009; TOMPKINS *et al.*, 2011). No entanto, como também ocorre com outros grupos de drogas, o uso intensivo da IVM acelerou o surgimento generalizado de estrogilídeos resistentes, incluindo o *H. contortus*, que tem alta capacidade de desenvolver resistência a todos os anti-helmínticos, ameaçando a eficácia da terapia medicamentosa (WOLSTENHOLME *et al.*, 2004). Portanto, há uma necessidade urgente de melhorar o entendimento dos mecanismos genéticos que causam a resistência anti-helmíntica e desenvolver testes diagnósticos mais sensíveis para detectar a resistência às LMs e outros compostos, juntamente com o desenvolvimento de novos métodos de controle e de sítios-alvo de vacinas. No entanto, em relação ao desenvolvimento e uso de um diagnóstico precoce de resistência às LMs, as principais dificuldades são a ausência de marcadores específicos e a falta de uma completa compreensão do mecanismo molecular da resistência.

Vários grupos de pesquisa estão investigando ativamente a base molecular da resistência às diferentes classes de anti-helmínticos (LMs; benzimidazóis: BZs;

levamisole: LEV; e pirantel: PIR), que permanecem não muito bem compreendidas. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) que causam mudanças nas posições nucleotídicas 167, 198 e 200 no isotipo 1 do gene da β -tubulina têm sido encontrados em populações de parasitos resistentes aos BZs (GHISI *et al.*, 2007; KWA *et al.*, 1994; SILVESTRE e CABARET, 2002). Alterações nos níveis de expressão de subunidades do receptor de LEV foram observadas em conjunto com a resistência ao PIR em ancilostomíneos e, recentemente, transcritos de subunidades de receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR, do inglês *nicotinic acetylcholine receptor*) têm sido associados à resistência ao LEV em parasitos tricostrongilídeos (KOOP *et al.*, 2009; NEVEU *et al.*, 2010). No caso das LMs, a identificação de mecanismos de resistência é mais complexa, e mudanças no sítio-alvo associadas à resistência ainda permanecem incertas.

Vários diferentes GluCl podem estar envolvidos na ação e resistência às LMs, incluindo os genes de *H. contortus* (*Hco*-) *avr-14*, *avr-15*, *glc-2*, *glc-3*, *glc-4*, *glc-5* e *glc-6* (BLACKHALL *et al.*, 1998b; DENT *et al.*, 2000; McCAVERA *et al.*, 2007; RAO *et al.*, 2009; LAING *et al.*, 2013). A resistência também pode envolver outros *loci*, como o gene do receptor de GABA *Igc-37* (BLACKHALL *et al.*, 2003) e subunidades de canais de ânion ativados por ligantes, como o gene do canal de cloro associado à dopamina *ggr-3* (RAO *et al.*, 2009). Alterações em outros genes que não são alvos imediatos de drogas (como genes envolvidos no transporte e no metabolismo de drogas) também podem estar envolvidas com o processo de resistência. Glicoproteínas-P (P-gps, do inglês *P-glycoproteins*) – membros da família de transportadores ABC (do inglês *ATP binding cassette*) – são transportadores que podem expulsar vários compostos através da membrana celular, incluindo a IVM (HIGGINS, 1992). P-gps e outros transportadores ABC parecem desempenhar um papel no processo de resistência, tendo sido associados à resistência à IVM em *H. contortus* e a outras drogas, devido a modificações decorrentes de polimorfismos genéticos e níveis de expressão gênica (KERBOEUF *et al.*, 2003; ARDELLI *et al.*, 2006; BLACKHALL *et al.*, 2008; DICKER *et al.*, 2011; GLENDINNING *et al.*, 2011; ARDELLI e PRICHARD, 2013). Em *C. elegans*, *pgp-1* e *pgp-2* têm sido associados à resistência à IVM (JAMES e DAVEY, 2009). Alterações na sequência ou expressão de *pgp-1*, *pgp-2* (XU *et al.*, 1998) e *pgp-9* foram relatadas em isolados de *H. contortus* resistente e suscetível à IVM, e *pgp-9* em *Teladorsagia circumcincta*

resistente (BLACKHALL *et al.*, 1998b; WILLIAMSON *et al.*, 2011; DICKER *et al.*, 2011). Apesar das pesquisas atuais, é difícil identificar um único marcador molecular para a resistência a drogas do grupo das LMs, devido à complexa associação entre alterações genéticas e resistência.

Uma abordagem adotada em vários estudos mencionados acima relaciona-se à análise da variabilidade de um gene específico em indivíduos sensíveis e resistentes à determinada droga, a fim de confirmar o envolvimento de tal gene no processo de resistência (BEECH *et al.*, 1994; BLACKHALL *et al.*, 1998b; BLACKHALL *et al.*, 2003). Contudo, o polimorfismo genético associado à resistência pode ocorrer devido a fenômenos não relacionados ao mecanismo de resistência. Efeitos da carona genética (*hitch hiking*) ou de interações epistáticas podem ser responsáveis por alterações nas frequências alélicas de genes que não estão diretamente envolvidos na resistência (BLACKHALL *et al.*, 1998b). Assim, muitos estudos têm buscado identificar diferenças genéticas específicas indicadas como a causa da resistência, ou intimamente associadas, que podem ser usadas como marcadores moleculares (McCAVERA *et al.*, 2007; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA *et al.*, 2007; BEECH e SILVESTRE, 2010).

Tecnologias recentes de sequenciamento de nova geração (SNG) têm reduzido drasticamente o custo e o tempo para o sequenciamento genômico, e podem gerar uma grande quantidade de dados para a detecção de variação genética, com destaque para as pesquisas de associação aplicadas ao mapeamento genético. A identificação bem sucedida de variantes associadas a doenças por tecnologias SNG revolucionou estudos biomédicos e biológicos, principalmente na pesquisa de doenças humanas (NG *et al.*, 2009), sendo uma ferramenta útil para o rápido avanço da pesquisa também em nematoides. Entre as mutações que podem ser encontradas nesses estudos, SNPs e pequenas inserções e deleções (indels, do inglês *small insertions and deletions*) são os mais abundantes, e os SNPs tornaram-se o marcador de escolha para estudos de associação genômica ampla.

No presente estudo, foram avaliadas regiões genômicas de LGICs e transportadores ABC. *Pools* de DNA genômico de um isolado de laboratório suscetível à IVM (PF23) e de um isolado de campo resistente à IVM (IVR1503) de *H. contortus* foram sequenciados com a tecnologia SNG Illumina e mapeados em regiões genômicas de interesse, a partir do isolado suscetível de referência

MHco3(ISE).N1, de um projeto de genoma de *H. contortus* publicado recentemente (LAING *et al.*, 2013). Portanto, o objetivo foi investigar polimorfismos nas regiões genômicas de LGICs e transportadores ABC. Foi observado o padrão de distribuição de SNPs e indels, a fim de identificar se alguma região do genoma apresentaria um padrão incomum ou uma assinatura genômica no isolado IVR1503 resistente à IVM, fornecendo um conjunto específico de variantes que podem ser potenciais alterações associadas à resistência à IVM.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Isolados de parasito

O isolado de laboratório suscetível a drogas de *H. contortus* (PF23) foi gentilmente fornecido por RK Prichard e RN Beech (*Institute of Parasitology, McGill University, Canada*), e foi obtido a partir do campo, sem nunca ter sido exposto a qualquer agente anti-helmíntico de largo espectro. Parasitos foram selecionados por meio de pelo menos 23 gerações de passagem em ovinos experimentalmente infectados sem contato com drogas (BEECH *et al.*, 2010).

O isolado de campo resistente à IVM de *H. contortus* (IVR1503) foi derivado de um rebanho de ovinos localizado no sudeste do Brasil com histórico de falha no tratamento com IVM (16% de eficácia), cujo *status* de resistência foi confirmado pelo teste de redução na contagem de ovos nas fezes (TRCOF) (VERÍSSIMO *et al.*, 2012) (ANEXO 4) e pelo teste *in vitro* de migração de larvas em ágar (FORTES *et al.*, 2013). As fezes foram coletadas de animais e larvas de terceiro estágio (L₃), obtidas a partir de coproculturas, usadas para iniciar o período de infecção experimental na Universidade Federal do Paraná (ANEXO 5). Todos os procedimentos experimentais foram examinados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (Protocolo 021/2010) (ANEXO 1). O total de 8.000 L₃ foi usado para infectar, por via oral, dois ovinos livres de infecção, e o estabelecimento da infecção foi

confirmado após, pelo menos, 28 dias. Do dia 28 ao dia 34, amostras de fezes foram coletadas para a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e coproculturas (ANEXOS 6 e 7). No dia 34 pós-infecção, adultos de *H. contortus* foram coletados do abomaso após necropsia. Os vermes adultos foram imediatamente colocados em placas de Petri contendo solução salina a 36°C e mantidos em estufa por um período de até 12 horas para estimular a oviposição das fêmeas. Os ovos foram recolhidos e colocados em um cálice de sedimentação e, após, misturados com fezes autoclavadas de cavalo a fim de se obter uma coprocultura monoespecífica (ANEXO 8). As larvas foram utilizadas para infectar dois ovinos livres de infecção, por administração oral de 8.000 L₃ de *H. contortus*. Após a confirmação do estabelecimento da infecção, os animais foram tratados com IVM (Ivomec®) a 0.4mg/kg/pv (duas vezes a dose terapêutica) por via subcutânea, selecionando vermes altamente resistentes à IVM. Após a confecção de novas coproculturas, o total de 8.000 L₃ de *H. contortus* resistentes à IVM (sobreviventes) foi usado para infectar um terceiro grupo de dois ovinos livres de infecção. Após o estabelecimento da infecção, ovinos de ambos os grupos (2 e 3) foram eutanasiados e parasitos adultos coletados, de forma manual, diretamente do abomaso e identificados. Machos e fêmeas de *H. contortus* foram imediatamente transferidos para placas de petri contendo meio de cultura de tecidos RPMI 1640 pré-aquecido, mantendo a temperatura de 37°C em estufa por 24h, sendo, em seguida, armazenados em álcool 80° até seu uso.

4.2.2 Isolamento de DNA e sequenciamento do genoma

O DNA genômico de fêmeas adultas de *H. contortus* foi isolado seguindo o método adaptado de Beech *et al.* (1994) (ANEXO 10). O total de 150 fêmeas adultas do isolado IVR1503 foi dividido em oito grupos de 16 a 20 vermes/grupo. Os parasitos foram, então, incubados a 37°C em 400 µL de tampão de extração (376 µL de STE, 16 µL de mercaptoetanol, 4 µL de proteinase K, 4 µL de RNase), por pelo menos 1h até a completa dissolução dos vermes. Foi adicionado 400 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) a cada tubo. Após a homogeneização e

centrifugação a 3.000 rpm por 2 min, o líquido claro presente no topo dos tubos foi cuidadosamente transferido para novos tubos limpos. Adicionou-se, então, 80 µL de solução de acetato de amônia 7,5 M, mais 1000 µL de etanol 100% para obter a precipitação do DNA. Os tubos foram agitados para a homogeneização e centrifugados a 3.000 rpm, por 20 min, descartando-se o sobrenadante. Um volume de 200 µL de etanol 70% foi adicionado a cada tubo, deixando-se em repouso por 10 min sobre a bancada, descartando-se o sobrenadante novamente. O sedimento de DNA foi novamente resuspenso em 50 µL de água pura para DNA. As soluções de DNA foram transferidas para um único tubo, armazenando-o a -20°C até ser utilizado. Os mesmos procedimentos foram adotados para a preparação do DNA de 150 fêmeas adultas do isolado PF23. Ambas as amostras foram utilizadas separadamente, a fim de evitar qualquer contaminação durante o procedimento. A qualidade e a quantidade de DNA dos dois isolados foram verificadas (razão A260/A280) com espectrofotômetro (NanoDrop ND1000, Thermo Fisher Scientific, USA) e a sua integridade foi visualizada por eletroforese em gel de agarose (ANEXO 11). As misturas de DNA das 150 fêmeas adultas de IVR1503 e das 150 fêmeas adultas de PF23 foram, então, usadas separadamente para o sequenciamento.

O sequenciamento completo do genoma (WGS, do inglês *whole genome sequencing*) foi gerado com a tecnologia SNG Illumina HiSeq 2000 no Génome Québec Innovation Centre (Montreal, Canada). Bibliotecas de DNA do tipo *paired-end* com leituras (*reads*) de 100 pares de bases (pb) e distância de 200 pb foram construídos para cada *pool* de amostras dos isolados resistente IVR1503 e suscetível PF23, com a identificação de bases e valores de qualidade para todas as leituras, de acordo com as recomendações do fabricante. Para todo o sequenciamento, os reads foram exportados para o formato FASTQ (COCK *et al.*, 2010). A qualidade dos dados brutos foi avaliada com FASTQC versão 0.10.1, e as leituras com índice de qualidade phred < 20 foram excluídas, a fim de eliminar leituras de baixa qualidade, usando PRINSEQ LITE versão 0.17.4. Essa etapa de filtragem tem como objetivo manter somente bases de alta confiança, e o índice de qualidade phred igual ou maior que 20 (Q20) foi indicado como o ponto de corte mais utilizado (NIELSEN *et al.*, 2011).

4.2.3 Mapeamento e detecção de SNPs e indels

Após o controle de qualidade, para cada isolado resistente à IVM IVR1503 e suscetível à IVM PF23 de *H. contortus*, leituras de sequenciamento foram usadas para o alinhamento (ou mapeamento de *reads*) em uma referência disponível do genoma de *H. contortus* MHco3(ISE).N1 (LAING *et al.*, 2013), usando o programa Bowtie 2, versão 2.1.0 (LANGMEAD *et al.*, 2009; LANGMEAD e SALZBERG, 2012). Inicialmente, duas abordagens para comparação (alinhamento local e *end-to-end*) foram empregadas, gerando um conjunto de resultados de mapeamento no formato BAM/SAM. O isolado MHco3(ISE).N1 foi obtido a partir de um único cruzamento, usando-se um macho adulto e uma fêmea adulta da linhagem de *H. contortus* MHco3(ISE), que tem um longo histórico de endogamia e manutenção em laboratório, e é suscetível a todas as principais classes de anti-helmínticos. O MHco3(ISE).N1 foi usado como genoma padrão para o projeto de sequenciamento do *H. contortus*, realizado no Wellcome Trust Sanger Institute (http://www.sanger.ac.uk/Projects/H_contortus/), recentemente publicado (LAING *et al.*, 2013) e disponível *on line* <ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Haemonchus/contortus>. Como genoma de referência, foram utilizadas as regiões que contêm os principais genes relacionados à resistência à IVM, incluindo os genes conhecidos de LGIC e transportadores ABC, além de outros ainda não nomeados. Especificamente para o mapeamento e a comparação foram usados os scaffolds de ABC e LGIC do genoma de *H. contortus* MHco3(ISE).N1 (LAING *et al.*, 2013), com um tamanho total de 6.697.811 bp/6,7 Mb e 16.621.277 bp/16,6 Mb em formato FASTA, respectivamente. As regiões ABC e LGIC contêm um total de 81 e 145 scaffolds, bem como contêm 48 e 85 proteínas anotadas, respectivamente, em adição a mais de 380 e 830 genes desconhecidos preditos por AUGUSTUS (STANKE *et al.*, 2006), respectivamente.

Após os alinhamentos, foram utilizadas as funções SAMtools *m-pileup* e *bcftools* (versão 0.1.13, disponível em <http://samtools.sourceforge.net/>) para a chamada de variantes, gerando arquivos em formato VCF (do inglês *Variant Call Format*). A fim de identificar um conjunto de variantes de alta qualidade, suficiente para proceder à validação ou a análises adicionais, foram usados parâmetros de

escore de variante em escala phred (QUAL, do inglês *variant quality*) e cobertura para todas as amostras (DP, do inglês *coverage/read depth*), sendo adotados os valores de corte de QUAL ≥ 28 e DP ≥ 5 para SNPs e QUAL ≥ 17 e DP ≥ 3 , apropriados para filtrar supostos SNPs/indels, conforme sugerido por Jia *et al.* (2012). Um simples e conciso *pipeline* para detectar SNPs e indels foi construído, incluindo: extração de DNA; sequenciamento completo do genoma e processamento dos dados; mapeamento das leituras de SNG em um genoma de referência; e chamada de SNPs/indels e filtragem (Figura 4).



FIGURA 4. PASSOS PARA A CONVERSÃO DE DADOS BRUTOS DE SEQUENCIAMENTO ILLUMINA EM UM CONJUNTO FINAL DE VARIANTES IDENTIFICADAS.

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Após o processo de extração de DNA (em azul) de ambos os isolados de *H. contortus* resistente (IVR1503) e suscetível (PF23), as amostras de DNA genômico foram sequenciadas pela tecnologia SNG Illumina (vermelho), e as etapas de processamento produziram um conjunto final de dados de sequenciamento. Após o controle de qualidade, o procedimento de mapeamento (amarelo) nos *scaffolds* ABC e LGIC do genoma de referência de *H. contortus* MHco3(ISE).N1 gerou um conjunto de leituras alinhadas, contendo uma medida de confiança, ou índice de qualidade, associada às bases de cada leitura. Finalmente, um método de chamada de variantes (verde) foi aplicado para identificar variantes, e os supostos SNPs/indels gerados foram filtrados de acordo com os índices de qualidade e cobertura associados, a fim de obter um conjunto final de SNPs/indels confiáveis.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Sequenciamento e mapeamento

O DNA genômico dos isolados de *H. contortus* IVR1503 e PF23 foram sequenciados em uma plataforma Illumina HiSeq 2000, produzindo arquivos FASTQ.

Duas bibliotecas *paired-end* Illumina foram construídas (IVR1503 e PF23) com leituras de 100 pb e distância de 200 pb (fragmento total de 400 pb), com um total de duas *lanes* (canais ou canaletas) de sequência geradas (sem contar uma *lane* descartada devido à baixa qualidade). Isso gerou cerca de 46 Gb de sequências brutas para IVR1503 (cerca de 124X de cobertura), e 26 Gb de sequências brutas para PF23 (70X de cobertura) – cobertura com base em um tamanho de genoma de 370 Mb (LAING *et al.*, 2013). Um total de 193.070.115 pares de leituras foi obtido para IVR1503, e 109.542.363 pares de leituras para PF23. Após filtrar as leituras de baixa qualidade, esses números foram reduzidos a 190.030.963 e 183.868.464 leituras para IVR1503-R1 (sense/forward) e IVR1503-R2 (anti-sense/reverse), respectivamente; 104.719.325 e 81.365.195 leituras para PF23-R1 (sense/forward) e PF23-R2 (anti-sense/reverse), respectivamente. O conjunto final de dados gerou 182.125.770 leituras com os pares corretos para IVR1503 e 80.186.762 leituras com os pares corretos para PF23. A porcentagem de leituras mapeadas por Bowtie2 nos *scaffolds* ABC e LGIC, e também a cobertura de mapeamento, estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 – TAXAS GERAIS DE ALINHAMENTO E COBERTURA DE MAPEAMENTO POR BOWTIE 2 PARA ISOLADOS DE *Haemonchus contortus* SUSCETÍVEL (PF23) E RESISTENTE (IVR1503) À IVERMECTINA, UTILIZANDO COMO GENOMA DE REFERÊNCIA SCAFFOLDS DE TRANSPORTADORES ABC E CANAIS IÔNICOS ABERTOS POR LIGANTE (LGICS) DO GENOMA DE *H. contortus* MHco3(ISE).

	Alinhamento local (%)	Cobertura estimada (local)	Alinhamento End-to-end (%)	Cobertura estimada (end-to-end)
Scaffold ABC				
PF23	12,93	155	7,32	88
IVR1503	14,22	387	7,31	199
Scaffold LGIC				
PF23	17,25	83	10,45	50
IVR1503	18,40	202	10,36	113

FONTE: O autor (2014)

NOTA: $C=LN/G$, em que C é a cobertura estimada, L é o comprimento da leitura, N é o número de leituras e G é o tamanho do genoma.

4.3.2 Detecção de SNPs/indels

Para o isolado IVR1503, foi obtido um conjunto inicial de 1.177 e 1.313 mutações nas regiões genômicas de ABC e LGIC, respectivamente, incluindo ambos SNPs e indels. No entanto, para o isolado PF23, foi encontrado um conjunto inicial de 458 e 504 mutações nas regiões genômicas de ABC e LGIC, respectivamente, incluindo também todas as variantes. A fim de selecionar SNPs de alta qualidade, consideramos os parâmetros $QUAL \geq 28$ e $DP \geq 5$, obtendo um total de 132 SNPs para IVR1503 e 34 SNPs para PF23, na região de ABC. Da mesma forma, foi selecionado um total de 291 SNPs para IVR1503 e 106 SNPs para PF23 na região de LGIC. Com base nos parâmetros $QUAL \geq 17$ e $DP \geq 3$ para selecionar indels de alta qualidade, foi identificado um total de 47 indels para IVR1503 e 26 indels para PF23 na região de ABC, e um total de 76 indels para IVR1503 e 49 indels para PF23 na região de LGIC (Tabela 3). A maioria dos SNPs/indels selecionados foi localizada em DNA genômico não codificante (introns e regiões intergênicas) de ambas as regiões de ABC e LGIC. Apenas um grupo de SNPs foi localizado em exons, mas todos pertencentes a genes ainda não nomeados, e a maioria desses SNPs são não-sinônimos, implicando mudança de aminoácido (Tabela 3). Com respeito aos SNPs/indels encontrados em introns, a distribuição das variantes está resumida na Tabela 4. A maioria delas ocorreu em genes ainda não nomeados, enquanto alguns SNPs/indels foram localizados em introns de genes conhecidos, os quais possuem similaridade com genes/proteínas relatados em bases de dados públicos. Polimorfismos foram encontrados em três classes de genes da região de ABC: *abt* (*ABC Transporter family*, *Hco-abt-9*, *Hco-abt-10*, *Hco-abt-11*); *haf* (*HAIF transporter – PGP related*, *Hco-haf-2*, *Hco-haf-4*); e *wht* (*WHiTe related ABC transporter*, *Hco-wht-1*, *Hco-wht-5*). Na região de LGIC, polimorfismos foram identificados em quatro classes de genes: *acr* (*AcetylCholine Receptor*, *Hco-acr-9*, *Hco-acr-11*, *Hco-acr-12*, *Hco-acr-15*, *Hco-acr-24*); *des* (*Degeneration Suppressor*, *Hco-des-2*); *ggr* (*GABA/Glycine Receptor family*, *Hco-ggr-1*); e *lgc* (*Ligand-Gated ion Channel*, *Hco-lgc-5*, *Hco-lgc-38*, *Hco-lgc-10*).

TABELA 3 – COMPARAÇÃO DA DETECÇÃO DE SNPS/INDELS EM REGIÕES GENÔMICAS DE TRANSPORTADORES ABC E CANAIS IÔNICOS ABERTOS POR LIGANTE (LGICS) USANDO ISOLADOS DE *Haemonchus contortus* SUSCETÍVEL (PF23) E RESISTENTE (IVR1503) À IVERMECTINA, E O ISOLADO DE *H. contortus* MHco3(ISE) (SCAFFOLDS ABC E LGICS) COMO REFERÊNCIA PARA MAPEAMENTO.

Dados	Parâmetros	IVR1503		PF23	
<i>Região ABC</i>					
	Chamada inicial	1113 SNPs	64 indels	434 SNPs	24 indels
	QUAL \geq 28, DP \geq 5	132 SNPs		34 SNPs	
	QUAL \geq 17, DP \geq 3	47 indels		26 indels	
	Região intergênica	68 SNPs/34 indels		26 SNPs/19 indels	
	Intron	55 SNPs/13 indels		6 SNPs/7 indels	
	Exon	9 SNPs		2 SNPs	
	SNP não-sinônimo	8 SNPs		-	
	SNP sinônimo	1 SNP		2 SNPs	
<i>Região LGIC</i>					
	Chamada inicial	1209 SNPs	104 indels	448 SNPs	56 indels
	QUAL \geq 28, DP \geq 5	291 SNPs		106 SNPs	
	QUAL \geq 17, DP \geq 3	76 indels		49 indels	
	Região intergênica	195 SNPs/48 indels		74 SNPs/33 indels	
	Intron	63 SNPs/28 indels		17 SNPs/16 indels	
	Exon	33 SNPs		15 SNPs	
	SNP não-sinônimo	26 SNPs		13 SNPs	
	SNP sinônimo	7 SNPs		2 SNPs	

FONTE: O autor (2014)

NOTA: QUAL: índice de qualidade de SNPs e indels. DP: grau de cobertura. SNP: polimorfismo de nucleotídeo único. Indel: inserção/deleção.

TABELA 4 – DISTRIBUIÇÃO DE SNPS/INDELS DETECTADOS EM INTRONS DE REGIÕES GENÔMICAS DE TRANSPORTADORES ABC E CANAIS IÔNICOS ABERTOS POR LIGANTE (LGICS) USANDO ISOLADOS DE *Haemonchus contortus* SUSCETÍVEL (PF23) E RESISTENTE (IVR1503) À IVERMECTINA, E O ISOLADO DE *H. contortus* MHco3(ISE) (SCAFFOLDS ABC E LGICS) COMO REFERÊNCIA PARA MAPEAMENTO.

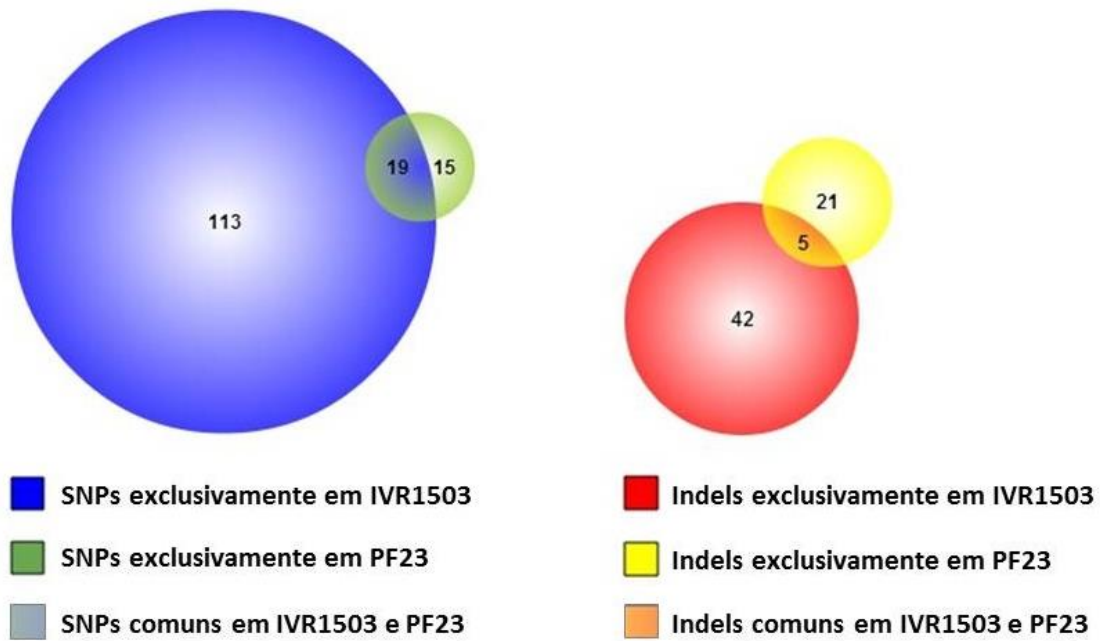
SNPs/indels detectados em introns na região de ABC		
IVR1503	PF23	Gene/scaffold
33 SNPs/10 indels	3 SNPs/6 indels	genes desconhecidos
6 SNPs	-	Hco-wht-1_scaffold2425.1_size41882CDS
4 SNPs/1 indel	-	Hco-abt-10_g8495.t1_g8496.t1_g8497.t1_scaffold684.1_size12 5693 CDS
7 SNPs	2 SNPs	Hco-abt-11_g19745.t1_g19744.t1_g19746.t1_scaffold4153.1_size18291 CDS
3 SNPs/1 indels	-	Hco-wht-5.2_g11338.t1_g11339.t1_g11340.t1_scaffold1129.1_size86954 CDS
1 SNPs/1 indel	-	Hco-abt-9_g15690.t1_g15691.t1_scaffold2203.1_size47789 CDS
1 SNP	1 SNP	Hco-haf-4_g7302.t1_scaffold539.1_size142255 CDS
-	1 indel	Hco-haf-2_g7265.t1_scaffold536.1_size142651 CDS
SNPs/indels detectados em introns na região de LGIC		
IVR1503	PF23	Gene/scaffold
39 SNPs/24 indels	10 SNPs/16 indels	genes desconhecidos
1 SNP/1 indel	-	Hco-lgc-5_scaffold3792.1_size21957 CDS
1 SNP	-	Hco-des-2_g18356.t1_scaffold3297.1_size27722 CDS
2 SNPs	2 SNPs	Hco-ggr-1_g11805.t1_scaffold1215.1_size82487 CDS
3 SNPs	1 SNP	Hco-acr-12_g9168.t1_scaffold776.1_size114329 CDS
2 SNPs	-	Hco-acr-11_g10089.t1_scaffold916.1_size100505 CDS
9 SNPs/1 indel	3 SNPs	Hco-lgc-38_scaffold1630.1_size65151 CDS
4 SNPs	1 SNP	Hco-acr-9_g10026.t1_scaffold907.1_size100980 CDS
2 SNPs	-	Hco-acr-15_g7850.t1_g7848.t1_scaffold603.1_size133714 CDS
1 indel	-	Hco-acr-24_g18447.t1_scaffold3341.1_size27209 CDS
1 indel	-	Hco-lgc-10_g6822.t1_scaffold487.1_size152046 CDS

FONTE: O autor (2014)

NOTA: SNP: polimorfismo de nucleotídeo único. Indel: inserção/deleção.

Entre todas as variantes detectadas na região de ABC, 113 SNPs e 42 indels estavam presentes exclusivamente em IVR1503, 15 SNPs e 21 indels presentes exclusivamente em PF23, enquanto 19 SNPs e cinco indels foram comuns aos dois isolados. Das variantes identificadas presentes na região de LGIC, 241 SNPs/60 indels e 56 SNPs/33 indels ocorreram unicamente em IVR1503 e PF23, respectivamente; ao passo que 50 SNPs/16 indels coincidiram em ambos os isolados, como mostrado na hipotética Figura 5.

A) Região ABC



B) Região LGIC

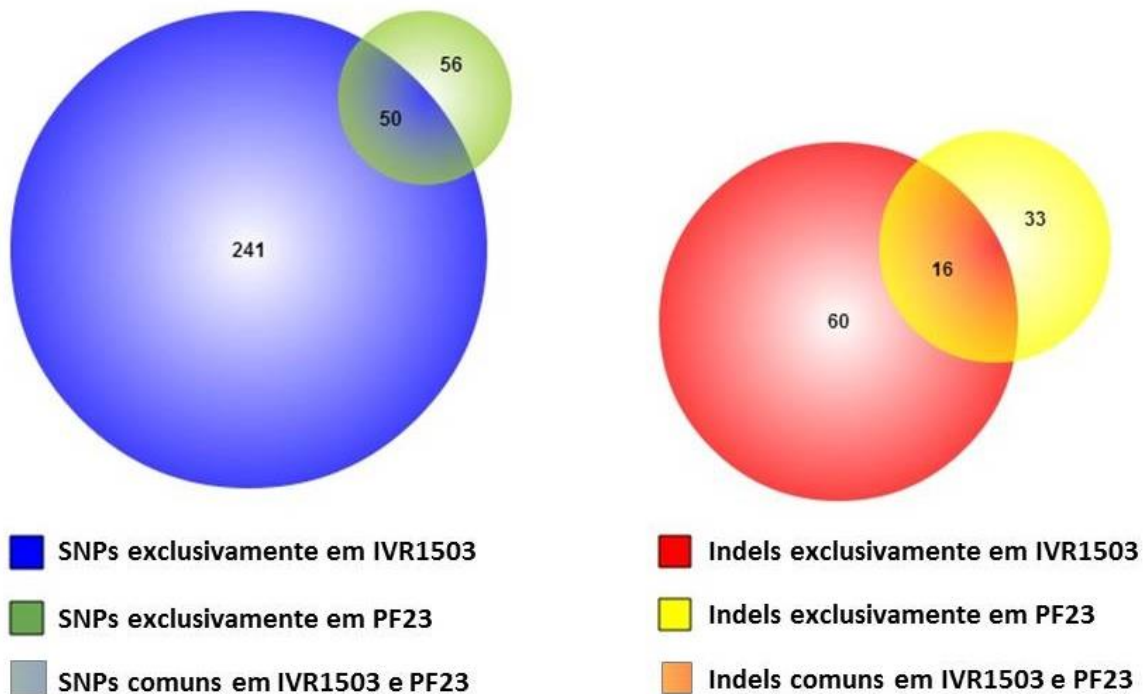


FIGURA 5. DIAGRAMAS DE VENN MOSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO DE SNPS/INDELS EM REGIÕES GENÔMICAS DE TRANSPORTADORES ABC E CANAIS IÔNICOS ABERTOS POR LIGANTE (LGIC) EM ISOLADOS DE *Haemonchus contortus* SUSCETÍVEL (PF23) E RESISTENTE (IVR1503) À IVERMECTINA. A) REGIÃO ABC. B) REGIÃO LGIC.

FONTE: O autor (2014)

NOTA: SNP: polimorfismo de nucleotídeo único. Indel: inserção/deleção.

A maioria dos SNPs candidatos filtrados detectados neste estudo foram transições (Ts) (A/G ou C/T), com um total variando entre 58-68%. Em contraste, transversões (Tv) (A/C, A/T, C/G ou G/T) foram presentes em 31-41% dos SNPs (Fig. 6). Especificamente na região de ABC, foram encontrados 68,18% e 31,82% de Ts e Tv em IVR1503, respectivamente; e 58,82% e 41,18% de Ts e Tv em PF23, respectivamente. Na região de LGIC, foram detectados 61,17% e 38,83% de Ts e Tv em IVR1503, respectivamente; e 67,92% e 32,08% de Ts e Tv em PF23, respectivamente.

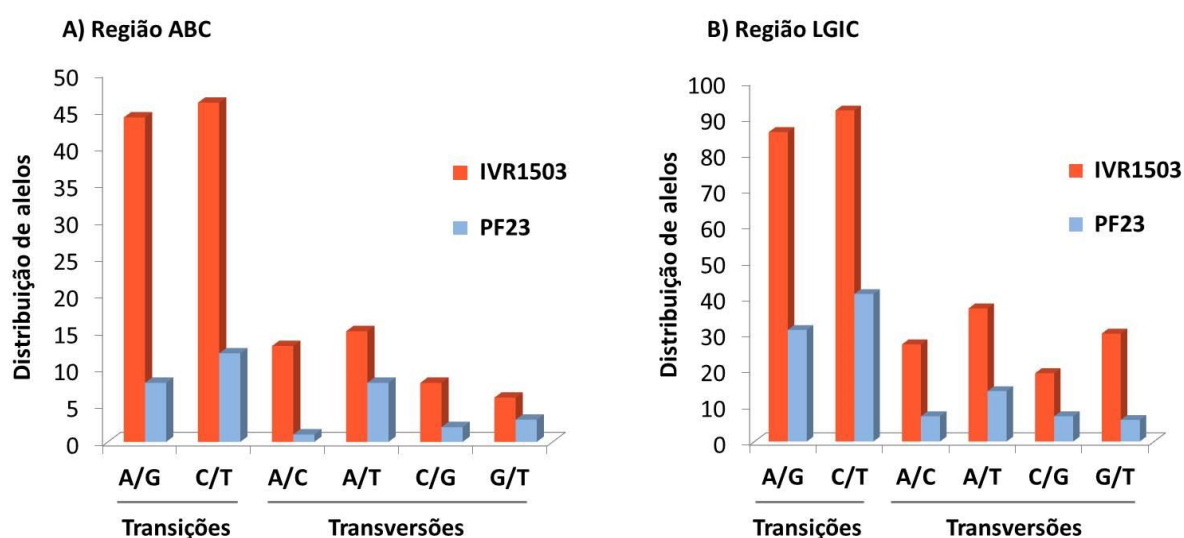


FIGURA 6. DISTRIBUIÇÃO DE SNPs DE ALTA QUALIDADE EM REGIÕES GENÔMICAS DE TRANSPORTADORES ABC E CANAIS IÔNICOS ABERTOS POR LIGANTE (LGICS) USANDO ISOLADOS DE *Haemonchus contortus* SUSCETÍVEL (PF23) E RESISTENTE (IVR1503) À IVERMECTINA, MAPEADOS NO ISOLADO DE REFERÊNCIA DE *H. contortus* MHco3(ISE) (SCAFFOLDS ABC E LGICS). A) REGIÃO ABC. B) REGIÃO LGIC.

FONTE: O autor (2014)

NOTA: A/G: adenina/guanina. C/T: citosina/timina.

Todos os scaffolds foram observados separadamente, e 14 scaffolds ABC e 28 scaffolds LGIC, ou partes destes, mostraram um padrão diferente de polimorfismos no isolado de *H. contortus* resistente à ivermectina IVR1503, quando comparados a outros scaffolds em IVR-1503 e PF23 (Tabelas 5 e 6).

TABELA 5 – LOCALIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM REGIÕES GENÔMICAS DE TRANSPORTADORES ABC (SCAFFOLDS ABC) EM UM ISOLADO DE *Haemonchus contortus* RESISTENTE À IVERMECTINA (IVR1503) QUE MOSTRARAM UM PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DIFERENTE, QUANDO COMPARADO A OUTROS SCAFFOLDS DE IVR1503 E PF23 (ISOLADO DE *H. contortus* SUSCETÍVEL À IVERMECTINA).

Identificação de scaffolds ABC	SNPs/indels	Posições de variantes
lcl scaffold2454.1_size41882	16/0	3772, 3788, 3795, 3823, 3848, 3873, 22487, 22562, 22859, 22870, 22905, 39635, 39679, 39913, 39961, 40092
lcl scaffold1370.1_size75319	11/1	4325, 4370, 5869, 6244, 6255, 6259, 50182, 50299, 50418, 50487, 50490, 50574
lcl scaffold684.1_size125693	7/1	5849, 5914, 35122, 35418, 35429, 105933, 106225, 106234
lcl scaffold4153.1_size18291	7/0	6150, 6311, 6356, 6404, 6413, 6429, 6605
lcl scaffold330.1_size184503	6/2	6476, 93775, 93813, 94133, 94378, 94476, 94496, 94554
lcl scaffold33.1_size426451.1.1_397310	5/1	11451, 11681, 264173, 307575, 353553, 353599
lcl scaffold1129.1_size86954	7/2	20993, 21180, 21244, 21529, 25169, 25480, 25485, 47372, 47462
lcl scaffold1356.1_size75841	5/1	32202, 32355, 32477, 32523, 74642, 74651
lcl scaffold470.1_size155887	3/2	27194, 49049, 49062, 49074, 49124
lcl scaffold539.1_size142255	24/2	62094, 62139, 62410, 62416, 72595, 72631, 72639, 72642, 72917, 81325, 103480, 103571, 103683, 103715, 103788, 103820, 103853, 103862, 103899, 115083, 115159, 115235, 115327, 115498, 130398
lcl scaffold316.1_size188078	2/4	69802, 81665, 82007, 82008, 117410
lcl scaffold186.1_size240422	5/4	71293, 71297, 114268, 114557, 114562, 123752, 123813, 138580, 138597
lcl scaffold122.1_size285303	11/0	135339, 135421, 223960, 224052, 224102, 224110, 224202, 224280, 224288, 224314, 224370
lcl scaffold23.1_size474064	8/5	194812, 194886, 195279, 198920, 199249, 213051, 213318, 355053, 359390, 359423, 359472, 359553, 359567

FONTE: O autor (2014)

NOTA: SNP: polimorfismo de nucleotídeo único. Indel: inserção/deleção.

TABELA 6 – LOCALIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM REGIÕES GENÔMICAS DE CANAIS IÔNICOS ABERTOS POR LIGANTE (LGICS) (SCAFFOLDS LGIC) EM UM ISOLADO DE *Haemonchus contortus* RESISTENTE À IVERMECTINA (IVR1503) QUE MOSTRARAM UM PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DIFERENTE, QUANDO COMPARADO A OUTROS SCAFFOLDS DE IVR1503 E PF23 (ISOLADO DE *H. contortus* SUSCETÍVEL À IVERMECTINA).

Identificação de scaffolds LGIC	SNPs/indels	Posições de variantes
lcl scaffold21.1_size487937.4.393693_487937	9/0	330, 378, 402, 410, 653, 713, 1009, 1040
lcl scaffold3535.1_size24826	13/0	363, 383, 399, 439, 449, 7085, 7104, 7112, 7341, 7362, 7365, 7407, 7411
lcl scaffold41.1_size403548.2.329901_403548	6/0	373, 490, 520, 689, 706, 720
lcl scaffold1434.1_size72666	9/1	943, 1008, 1108, 1259, 26280, 26386, 41372, 41384, 41621
lcl scaffold1215.1_size82487	6/0	5877, 6145, 18584, 18830, 73326
lcl scaffold45.1_size385644.5.70900_385644	11/0	9456, 9531, 9703, 284096, 299809, 299854, 299884, 299893, 300110
lcl scaffold27.1_size442791	9/1	3891, 10852, 10939, 10956, 10990, 11019,

		11043, 132260, 132284, 176167
lcl scaffold573.1_size138451	19/0	11448, 11487, 11705, 14035, 14036, 14063, 69380, 69423, 69570, 69768, 90708, 90757, 90761, 90797, 90969, 91021, 91061, 91090
lcl scaffold776.1_size114329	15/4	20000, 20306, 28519, 112786, 112791, 112845, 112847, 113225, 113292, 113442, 113451, 113455, 113545, 113595, 113597, 113609, 113766, 114014, 114019
lcl scaffold1833.1_size58677	13/0	22677, 22719, 22960, 23341, 23353, 23648, 23680, 23717, 23901, 23970
lcl scaffold90.1_size309204	6/0	25452, 25784, 25793, 25805, 121539, 121585
lcl scaffold1630.1_size65151	12/5	376, 377, 696, 1103, 25727, 44297, 44339, 44345, 44361, 44651, 44663, 44674, 44685, 44728, 44819, 50890, 50912
lcl scaffold2322.1_size44881	8/0	32846, 32853, 32899, 32916, 32961, 33007, 33024, 33059
lcl scaffold505.1_size148541	15/1	34334, 34624, 68642, 68675, 68957, 125335, 125353, 125374, 142098, 142300, 142353, 142361, 142399, 142461, 142557, 142572
lcl scaffold907.1_size100980	7/0	40074, 40088, 51500, 51549, 51732, 79984
lcl scaffold1092.1_size89268	5	43134, 43503, 43508, 43552, 52727
lcl scaffold96.1_size307271	5/1	49974, 50288, 50300, 50308, 50333, 209305
lcl scaffold28.1_size436153	9/0	57753, 57860, 58025, 58131, 58142, 183695, 324695, 324951, 324952
lcl scaffold175.1_size246567	7/6	84557, 84707, 84720, 84828, 84885, 84886, 236329, 236350, 236374, 236435, 236524, 236629, 236743
lcl scaffold5.1_size735775	5/3	6864, 6897, 99714, 402694, 672660, 672671, 673192, 673283
lcl scaffold487.1_size152046	1/6	46623, 84765, 84943, 85081, 85084, 102076, 102677
lcl scaffold635.1_size130355	5/0	120628, 120636, 120867, 120885, 120921
lcl scaffold127.1_size283107	7/6	114970, 134447, 134784, 184969, 185269, 185277, 208235, 254230, 254319, 254320, 254389
lcl scaffold493.1_size151450	2/4	137381, 137385, 138384, 138691, 138698
lcl scaffold547.1_size141490	3/5	560, 615, 627, 628, 635, 139449, 139465, 139726
lcl scaffold438.1_size160931	10/3	152322, 152329, 152591, 152823, 152834, 152839, 159964, 160051, 160069, 160177, 160238, 160408
lcl scaffold23.1_size474064	7/5	194812, 194886, 195279, 198920, 199249, 213051, 213318, 359390, 359423, 359472, 359553, 359567
lcl scaffold34.1_size425167	6/1	310005, 396281, 413548, 413570, 413600, 413664, 413679

FONTE: O autor (2014)

NOTA: SNP: polimorfismo de nucleotídeo único. Indel: inserção/deleção.

4.4 DISCUSSÃO

Tecnologias de sequenciamento de nova geração (SNG), como Illumina, permitem a identificação de SNPs/indels em menor tempo, com alta eficácia, sendo uma alternativa promissora para ser aplicada em várias áreas de pesquisa, incluindo estudos genéticos em larga escala e de comparação de genomas. Nota-se que a variação alélica é uma característica importante usada para identificar genes associados à resistência a vários anti-helmínticos (GILLEARD e BEECH, 2007). O uso de alguns parâmetros, tais como a filtragem de variantes de alta qualidade, como feito no presente estudo, aumenta a eficiência da análise genômica. Esses métodos estão sendo rapidamente atualizados, com o desenvolvimento de novos programas estatísticos e de recomendações para a análise de dados SNG (NIELSEN *et al.*, 2011). Neste estudo, vários SNPs/indels foram identificados a partir de alinhamentos de múltiplas leituras Illumina em referências de scaffolds disponíveis (LAING *et al.*, 2013). O uso de leituras *paired-end* pode melhorar a qualidade do mapeamento e a profundidade de cobertura das sequências. Até o momento, esta é a primeira abordagem de SNG para identificar SNPs e indels nas grandes regiões genômicas de transportadores ABC e receptores LGIC, usando isolados de *H. contortus* suscetível (PF23) e resistente à IVM (IVR1503). A simples abordagem de chamada de variantes utilizada tem potencial de aplicação em muitos laboratórios para pesquisas similares. Além disso, a recente disponibilidade de dois genomas do *H. contortus* fornece uma base de dados sólida para estudos do genoma completo, particularmente para a associação de *loci* genéticos com a resistência anti-helmíntica. Contudo, cabe destacar a dificuldade na montagem dos genomas, bem como em análises posteriores, devido a diferenças encontradas entre os dois, incluindo, por exemplo, o tamanho de 320 Mb (SCHWARZ *et al.*, 2013) e 370 Mb (LAING *et al.*, 2013).

Uma característica comum à maioria dos estudos genéticos de resistência é o uso de parasitos isolados por meio de passagens em ovinos por muitas gerações, em laboratório, com ou sem tratamento anti-helmíntico, mantendo uma pressão de seleção, e obtendo isolados de parasitos selecionados ou não para determinada droga. Embora essa metodologia permita a associação de um fenótipo com

mudanças alélicas que podem ser devidas à seleção ocorrida durante a exposição ao anti-helmíntico, algumas alterações podem ocorrer possivelmente devido a outras causas, como o processo de endogamia ou o efeito de gargalo populacional (BLACKHALL *et al.* 2003). Além disso, com tal metodologia, pode-se obter uma situação diferente da encontrada a campo. Buscando evitar esse problema, usou-se, no presente trabalho, uma abordagem alternativa, comparando-se um isolado de laboratório de *H. contortus* suscetível à IVM (PF23) e um isolado de campo de *H. contortus* resistente à IVM (IVR1503), cuja resistência não foi induzida em laboratório, sendo submetido a uma única pressão de seleção, com tratamento utilizando uma dose dobrada de IVM para a eliminação de parasitos suscetíveis. Além disso, enquanto muitos estudos têm examinado genes específicos associados à resistência às LMs, separadamente, neste estudo foram analisadas as grandes regiões genômicas disponibilizadas recentemente por Laing *et al.* (2013), contendo todos os genes conhecidos de transportadores ABC e receptores LGIC de *H. contortus*, inclusive os genes candidatos relacionados com a resistência à IVM a partir de estudos anteriores, além de um grande número de genes ainda não identificados.

Nesta pesquisa, foram apresentadas as diferenças de polimorfismos entre um isolado resistente e suscetível à IVM e, em geral, um menor número de SNPs/indels foi encontrado nas regiões de ABC e LGIC do segundo. Sabe-se que a manutenção de um isolado em laboratório leva à redução na variabilidade genética, devido ao processo de endogamia, o que poderia explicar essa diferença. As distribuições da frequência de alelos dos SNPs, mostradas na Figura 3, estão de acordo com relatos anteriores de análises de mineração de SNPs em espécies não modelo (VALENZUELA-MUNOZ *et al.*, 2013). A maior parte das variantes selecionadas foi localizada em regiões não codificantes. Uma grande quantidade de variação em sequência em determinadas regiões do genoma não tem uma razão clara para tal, e acredita-se que a elevada taxa de mutação em parasitos que ocorrem em regiões não codificantes pode ajudar a explicar a capacidade do *H. contortus* tornar-se rapidamente resistente a uma grande variedade de anti-helmínticos (SCHWARZ *et al.*, 2013). Estudos demonstraram que regiões não codificantes do genoma também podem regular a expressão pós-transcricional de uma variedade de genes (NOZAKI e CROSS, 1995; JOAQUIM e EL-HANI, 2010),

por exemplo, influenciando a quantidade, a localização e a estabilidade de moléculas de RNA mensageiro. Assim, sugere-se que pesquisas adicionais sejam realizadas, a fim de identificar, no processo de expressão gênica, a influência dos polimorfismos detectados em sequências não codificantes.

Em princípio, as variações na forma de SNPs/indels são encontradas em posições aleatórias em todo o genoma, incluindo as grandes regiões de ABC e de LGIC, sendo quase impossível encontrar uma ou duas variações que realmente causem a resistência. Portanto, usou-se, aqui, uma abordagem diferenciada, que não se limitou simplesmente a procurar variações presentes somente em IVR1503 ou em PF23. Buscou-se, por outro lado, obter uma visão geral dos padrões de distribuição de SNPs/indels nas regiões genômicas de ABC e LGIC. Entre todos os scaffolds usados para mapeamento, alguns provavelmente devem conter variantes acidentais decorrentes simplesmente de diferenças na origem genética das populações de parasitos. Contudo, outros apresentaram um padrão diferente de polimorfismos no isolado resistente (com relação à quantidade e à distribuição de variantes), após a comparação da incidência de polimorfismos entre todos os scaffolds de IVR1503 e de PF23. Em algumas dessas regiões, pode haver mutações que causam resistência nas proximidades. Assim, variantes específicas podem representar potenciais mudanças associadas à resistência à IVM, e serão estudadas em uma etapa seguinte.

A base de muitas pesquisas tem sido a comparação detalhada de genes candidatos particulares entre isolados de parasitos resistente e suscetível à determinada droga, a fim de encontrar mutações associadas com o fenótipo de resistência ou suscetibilidade. No entanto, os mecanismos complexos da resistência anti-helmíntica devem ser multigênicos em *H. contortus* (SCHWARZ *et al.*, 2013) e tem sido difícil progredir no entendimento da base molecular da resistência, bem como determinar marcadores moleculares para uso em provas diagnósticas. O conhecimento é mais avançado para o grupo dos benzimidazóis, com a identificação de polimorfismos no gene da β -tubulina associados com a resistência (VON SAMSON-HIMMELSTJERNA *et al.*, 2009), mas para o levamisole e as LMs nenhum marcador molecular ligado à resistência está disponível (WILLIAMSON *et al.*, 2011). Parasitos nematoides possuem uma grande família de LGIC, e vários estudos têm associado polimorfismos de alguns genes ao processo de resistência às LMs. Uma

única substituição de aminoácido L256F no gene *avr-14* alterou a resposta à IVM em *Cooperia oncophora* (NJUE e PRICHARD, 2004) e *H. contortus* (McCAVERA *et al.*, 2009). A substituição K169R na subunidade do gene *lgc-37* associado a GABA levou à diminuição de sensibilidade à moxidectina (FENG *et al.*, 2002). Em *H. contortus*, uma substituição de A169V na subunidade do gene *glc-5* potencializado pelo glutamato e o seu efeito para as LMs também tem sido estudados (BEECH *et al.*, 2011). A importância desses genes para o desenvolvimento de resistência às LMs, bem como a confirmação por meio de testes de comparação entre isolados de laboratório e de campo ainda precisam ser determinadas. Embora os canais de cloro potencializados por glutamato e GABA sejam os principais mediadores das LMs, essas drogas são moduladoras alostéricas de vários canais de cátion e ânion (KRAUSE *et al.*, 1998). Um único SNP no gene *ggr-3* de *H. contortus* associado à dopamina apresentou uma redução significativa de expressão em isolados resistentes às LMs. Contudo, faz-se necessário estudar os efeitos na expressão de proteínas e a função do gene na resistência às LMs (MOLENTO *et al.*, 1999; RAO *et al.*, 2009).

Além disso, alguns genes de transportadores ABC também têm sido associados à resistência às LMs em nematoides, como *pgp-1* e *pgp-2*. Um aumento na expressão de P-gp causa também um aumento no transporte de drogas e sua remoção a partir do sítio de ação (XU *et al.*, 1998; BEECH *et al.*, 2011). Uma única substituição de aminoácido S581Y encontrada em uma variante bovina do semi-transportador (*half-transporter*), ABCG2 (MERINO *et al.*, 2009), e a expressão de genes *mrp* (ARDELLI *et al.*, 2009) podem estar ligadas à resistência às LMs. Em ambos os isolados IVR1503 e PF23, nenhuma variante selecionada foi encontrada em regiões codificantes de proteínas conhecidas e previamente associadas à resistência à IVM, tendo sido identificado apenas um pequeno grupo de SNPs presentes em éxons de genes desconhecidos. A maioria desses SNPs foram identificados como não sinônimos. Propõe-se, assim, a análise desses novos SNPs em estudos epidemiológicos, a fim de determinar sua função/relação com a resistência à IVM, utilizando-se ferramentas de genômica funcional, como técnicas de RNA de interferência.

Há um consenso científico de que mais pesquisas são necessárias para compreender a base molecular da resistência anti-helmintica e desenvolver métodos

confiáveis de diagnóstico e monitoramento para melhorar a utilização de drogas no controle parasitário em animais de produção. Neste estudo, identificou-se um banco de dados abrangente para sítios polimórficos candidatos confiáveis, contendo um conjunto selecionado de variantes para *H. contortus* que podem estar associadas à resistência à IVM e ainda ser um recurso útil para futuros estudos que visam ao aprimoramento das ferramentas de diagnóstico. Nesse aspecto, cabe frisar que os resultados obtidos neste trabalho devem ser interpretados com cautela, na medida em que pesquisas adicionais são necessárias para avaliar o comportamento desses alelos em isolados de parasitos de campo resistentes e suscetíveis à droga e sua real aplicação em situações no campo.

Na presente pesquisa, buscou-se relatar um extenso conjunto de dados contendo a identificação e a comparação de polimorfismos nas regiões genômicas de ABC e LGIC descrito em *H. contortus*. Com isso, foi obtido um importante ponto de partida, contendo uma fonte de SNPs/indels selecionados, passíveis de serem utilizados para avaliação e validação de marcadores para a resistência à IVM em uma próxima etapa de estudo, o que pode beneficiar o avanço do conhecimento para o diagnóstico molecular da resistência anti-helmíntica. Foram analisadas regiões contendo os principais genes associados à resistência à IVM em *H. contortus*, e também regiões próximas, utilizando-se dados SNG, proporcionando, como mencionado anteriormente, um potencial conjunto de SNPs/indels para análises experimentais futuras. Esta investigação possibilita, assim, novas perspectivas quanto ao conhecimento molecular de regiões selecionadas associadas à IVM para um dos parasitos de pequenos ruminantes mais importantes em todo o mundo. Por fim, o grande conjunto de dados de sequenciamento obtidos neste estudo poderá também ser utilizado para avaliar outras regiões genômicas relevantes.

REFERÊNCIAS

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.

ARDELLI, B. F.; GUERRIERO, S. B.; PRICHARD, R. K. Ivermectin imposes selection pressure on P-glycoprotein from *Onchocerca volvulus*: linkage disequilibrium and genotype diversity. **Parasitology**, v. 132, p. 375-86, 2006.

ARDELLI, B. F.; STITT, L. E.; TOMPKINS, J. B.; PRICHARD, R. K. A comparison of the effects of ivermectin and moxidectin on the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 96-108, 2009.

BEECH, R. N.; PRICHARD, R. K.; SCOTT, M. E. Genetic variability of the β -tubulin genes in benzimidazole-susceptible and –resistance strains of *Haemonchus contortus*. **Genetics**, v. 138, p. 103-110, 1994.

BEECH, R. N.; LEVITT, N.; CAMBOS, M.; ZHOU, S.; FORRESTER, S. G. Association of ion-channel genotype and macrocyclic lactone sensitivity traits in *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 171, p. 74-80, 2010.

BEECH, R. N.; SILVESTRE, A. Mutations associated with anthelmintic drug resistance. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 105-112, 2010.

BEECH, R. N.; SKUCE, P.; BARTLEY, D. J.; MARTIN, R. J.; PRICHARD, R. K.; GILLEARD, J. S. Anthelmintic resistance: markers for resistance, or susceptibility? **Parasitology**, v. 138, n. 2, p. 160-174, 2011.

BLACKHALL, W. J.; LIU, H. Y.; XU, M.; PRICHARD, R. K.; BEECH, R. N. Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 95, p. 193-201, 1998a.

BLACKHALL, W. J.; POULIOT, J. F.; PRICHARD, R. K.; BEECH, R. N. *Haemonchus contortus*: Selection at a Glutamate-Gated Chloride Channel Gene in Ivermectin- and Moxidectin-Selected Strains. **Experimental Parasitology**, v. 90, p. 42-48, 1998b.

BLACKHALL, W. J.; PRICHARD, R. K.; BEECH, R. N. Selection at a γ -aminobutyric acid receptor gene in *Haemonchus contortus* resistant to avermectins/milbemectins. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 131, p. 137-145, 2003.

BLACKHALL, W. J.; PRICHARD, R. K.; BEECH, R. N. P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 101-107, 2008.

BOURGUINAT, C.; ARDELLI, B. F.; PION, S. D.; KAMGNO, J.; GARDON, J.; DUKE, B. O.; BOUSSINESQ, M.; PRICHARD, R. K. P-glycoprotein-like protein, a possible genetic marker for ivermectin resistance selection in *Onchocerca volvulus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 158, p. 101-111, 2008.

COCK, P. J.; FIELDS, C. J.; GOTO, N.; HEUER, M. L.; RICE, P. M. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 1767-1771, 2010.

DENT, J. A.; SMITH, M. M.; VASSILATIS, D. K.; AVERY, L. The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 2674-2679, 2000.

DICKER, A. J.; NISBET, A. J.; SKUCE, P. J. Gene expression changes in a P-glycoprotein (Tci-pgp-9) putatively associated with ivermectin resistance in *Teladorsagia circumcincta*. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 935-942, 2011.

FENG, X. P.; HAYASHI, J.; BEECH, R. N.; PRICHARD, R. K. Study of the nematode putative GABA type-A receptor subunits: evidence for modulation by ivermectin. **Journal of Neurochemistry**, v. 83, p. 870-878, 2002.

FORTES, F. S.; KLOSTER, F. S.; SCHAFER, A. S.; BIER, D.; BUZATTI, A.; YOSHITANI, U. Y.; MOLENTO, M. B. 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.

GHISI, M.; KAMINSKY, R.; MASER, P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 313-20, 2007.

GILLEARD, J. S.; BEECH, R. N. Population genetics of anthelmintic resistance in parasitic nematodes. **Parasitology**, v. 134, p. 1133-1147, 2007.

GLENDINNING, S. K.; BUCKINGHAM, S. D.; SATTELLE, D. B.; WONNACOTT, S.; WOLSTENHOLME, A. J. Glutamate-Gated Chloride Channels of *Haemonchus contortus* Restore Drug Sensitivity to Ivermectin Resistant *Caenorhabditis elegans*. **PLoS ONE**, v. 6, p. e22390, 2011.

HIGGINS, C. F. ABC transporters: from micro organisms to man. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 67-113, 1992.

JAMES, C. E.; DAVEY, M. W. Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 213-220, 2009.

JIA, P.; LI, F.; XIA, J.; CHEN, H.; JI, H.; PAO, W.; ZHAO, Z. Consensus Rules in Variant Detection from Next-Generation Sequencing Data. **PLoS ONE**, v. 7, n.6, 2012, e38470. doi:10.1371/journal.pone.0038470

JOAQUIM, L. M.; EL-HANI, C. N. A genética em transformação: crise e revisão do conceito de gene. **Scientiae Studia**, v. 8, p. 93-128, 2010.

KERBOEUF, D.; BLACKHALL, W.; KAMINSKY, R.; von SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, p. 332-46, 2003.

KOPP, S. R.; COLEMAN, G. T.; TRAUB, R. J.; McCARTHY, J. S.; KOTZE, A. C. Acetylcholine receptor subunit genes from *Ancylostoma caninum*: altered transcription patterns associated with pyrantel resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 435-41, 2009.

KRAUSE, R. M.; BUISSON, B.; BERTRAND, S.; CORRINGER, P. J.; GALZI, J. L.; CHANGEUX, J. P.; BERTRAND, D. Ivermectin: a positive allosteric effector of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 53, p. 283-294, 1998.

KWA, M. S.; VEENSTRA, J. G.; ROOS, M. H. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in β -tubulin isotype 1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 63, p. 299-303, 1994.

LAING, R.; KIKUCHI, T.; MARTINELLI, A.; TSAI, I. J.; BEECH, R. N.; REDMAN, E.; HOLROYD, N.; BARTLEY, D. J.; BEASLEY, H.; BRITTON, C.; CURRAN, D.; DEVANEY, E.; GILABERT, A.; HUNT, M.; JACKSON, F.; JOHNSTON, S.; KRYUKOV, I.; LI, K.; MORRISON, A. A.; REID, A. J.; SARGISON, N.; SAUNDERS, G.; WASMUTH, J. D.; WOLSTENHOLME, A.; BERRIMAN, M.; GILLEARD, J. S.; COTTON, J. A. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. **Genome Biology**, v. 14, p. R88, 2013 doi:10.1186/gb-2013-14-8-r88

LANGMEAD, B.; TRAPNELL, C.; POP, M.; SALZBERG, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biology**, v. 10, p. R25, 2009.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, p. 357-359, 2012.

McCAVERA, S.; WALSH, T. K.; WOLSTENHOLME, A. J. Nematode ligand-gated chloride channels: an appraisal of their involvement in macrocyclic lactone resistance and prospects for developing molecular markers. **Parasitology**, v. 134, p. 1111-1121, 2007.

McCAVERA, S.; ROGERS, A. T.; YATES, D. M.; WOODS, D. J.; WOLSTENHOLME, A. J. An Ivermectin-Sensitive Glutamate-Gated Chloride Channel from the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. **Molecular Pharmacology**, v. 75, p. 1347-1355, 2009.

MERINO, G.; REAL, R.; BARO, M. F.; GONZALEZ-LOBATO, L.; PRIETO, J. G.; ALVAREZ, A. I.; MARQUES, M. M. Natural allelic variants of bovine ATP-binding cassette transporter ABCG2: increased activity of the Ser581 variant and development of tools for the discovery of new ABCG2 inhibitors. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, p. 5-9, 2009.

MOLENTO, M. B.; WANG, G. T.; PRICHARD, R. K. Decreased ivermectin and moxidectin sensitivity in *Haemonchus contortus* selected with moxidectin over 14 generations. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 77-81, 1999.

NEVEU, C.; CHARVET, C. L.; FAUVIN, A.; CORTET, J.; BEECH, R. N.; CABARET, J. Genetic diversity of levamisole receptor subunits in parasitic nematode species and abbreviated transcripts associated with resistance. **Pharmacogenet Genomics**, v. 20, p. 414-25, 2010.

NG, S. B.; TURNER, E. H.; ROBERTSON, P. D.; FLYGARE, S. D.; BIGHAM, A. W., et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. **Nature**, v. 461, p. 272-276, 2009.

NIELSEN, R.; PAUL, J. S.; ALBRECHTSEN, A.; SONG, Y. S. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. **Genetics**, v. 12, p. 443-451, 2011.

NJUE, A. I.; PRICHARD, R. K. Genetic variability of glutamate-gated chloride channel genes in ivermectin susceptible and -resistant strains of *Cooperia oncophora*. **Parasitology**, v. 129, p. 741-751, 2004.

NOZAKI, T.; CROSS, G. A. M. Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 75, p. 55-67, 1995.

PETER, J. W.; CHANDRAWATHANI, P. *Haemonchus contortus*: parasite problem No. 1 from tropics – Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. **Tropical Biomedicine**, v. 22, p. 131-137, 2005.

RAO, V. T.; SIDDIQUI, S. Z.; PRICHARD, R. K.; FORRESTER, S. G. A dopamine-gated ion channel (HcGGR3*) from *Haemonchus contortus* is expressed in the cervical papillae and is associated with macrocyclic lactone resistance. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 166, p. 54–61, 2009.

SCHWARZ, E. M.; KORHONEN, P. K.; CAMPBELL, B. E.; YOUNG, N. D.; JEX, A. R.; JABBAR, A.; HALL, R. S.; MONDAL, A.; HOWE, A. C.; PELL, J.; HOFMANN, A.; BOAG, P. R.; ZHU, X.; GREGORY, T. R.; LOUKAS, A.; WILLIAMS, B. A.; ANTOSHECHKIN, I.; BROWN, C. T.; STERNBERG, P. W.; GASSER, R. B. The genome and developmental transcriptome of the strongylid nematode *Haemonchus contortus*. **Genome Biology**, v. 14, p. R89, 2013 doi:10.1186/gb-2013-14-8-r89.

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

STANKE, M.; KELLER, O.; GUNDUZ, I.; HAYES, A.; WAACK, S.; MORGENSTERN, B. Augustus: ab initio prediction of alternative transcripts. *Nucleic Acids Research*, v. 34 (Web Server), W435-W439. doi: 10.1093/nar/gkl200.

TOMPKINS, J. B.; STITT, L. E.; MORISSETTE, A. M.; ARDELLI, B. F. The role of *Brugia malayi* ATP-binding cassette transporters in potentiating drug sensitivity. **Parasitology Research**, v. 109, n. 5, p. 1311-1322, 2011.

VALENZUELA-MUÑOZ, V.; ARAYA-GARAY, J. M.; GALLARDO-ESCÁRATE, C. SNP discovery and High Resolution Melting Analysis from massive transcriptome sequencing in the California red abalone *Haliotis rufescens*. **Marine Genomics**, v. 10, p. 11-16, 2013.

VERÍSSIMO, C. J.; NICIURA, S. C. M.; ALBERTI, A. L. L.; RODRIGUES, C. F. C.; BARBOSA, C. M. P.; CHIEBAO, D. P.; CARDOSO, D.; SILVA, G. S.; PEREIRA, J. R.; MARGATHO, L. F. F.; COSTA, R. L. D.; NARDON, R. F.; UENO, T. E. H; CURCI, V. C. L. M.; MOLENTO, M. B. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 1-2, p. 209-216, 2012.

VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; BLACKHALL, W. J.; McCARTHY, J. S.; SKUCE, P. J. Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes. **Parasitology**, v. 134, p. 1077-1086, 2007.

VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; WALSH, T. K.; DONNAN, A. A.; et al. Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* as a tool for routine field diagnosis. **Parasitology**, v. 136, p. 349-58, 2009.

XU, M.; MOLENTO, M.; BLACKHALL, W.; RIBEIRO, P.; BEECH, R.; PRICHARD, R. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, p. 327-335, 1998.

WILLIAMSON, S. M.; STOREY, B.; HOWELL, S.; HARPER, K. M.; KAPLAN, R. M.; WOLSTENHOLME, A. J. Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 180, p. 99-105, 2011.

WOLSTENHOLME, A. J.; FAIRWEATHER, I.; PRICHARD, R.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SANGSTER, N. C. Drug resistance in veterinary helminths. **Trends in Parasitology**, v. 20, p. 469-476, 2004.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido ao grande impacto que a resistência anti-helmíntica possui em relação à produção e ao bem-estar de pequenos ruminantes, torna-se evidente a necessidade urgente de testes diagnósticos sensíveis e economicamente viáveis para a detecção e o monitoramento da resistência. Diversos estudos com testes *in vivo* e *in vitro* (incluindo testes moleculares) – para avaliar vários fatores tais como confiabilidade, significado prático e repetibilidade/reprodutibilidade – ainda buscam respostas que possam embasar a escolha de uma melhor alternativa de diagnóstico e controle parasitário no campo. Particularmente, para algumas drogas, como as lactonas macrocíclicas, os mecanismos moleculares e o desenvolvimento de testes para a resistência parecem ser complexos. O capítulo referente à revisão bibliográfica buscou, além de reforçar a importância e as consequências da resistência anti-helmíntica em parasitos nematoides (como o *Haemonchus contortus*), descrever a situação atual dos principais testes disponíveis para a detecção da resistência às drogas comumente utilizadas em produções animais, a partir de dados disponíveis na literatura.

O uso do teste *in vitro* de migração de larvas em ágar para a detecção de resistência anti-helmíntica, comumente aplicado em vários laboratórios, demonstrado no terceiro capítulo desta tese, evidencia o potencial desse método com a geração de dados significativos estatisticamente. Entretanto, a adaptação, a padronização e a execução de estudos epidemiológicos futuros são consideradas etapas decisivas para tornar o teste aplicável na prática de rotina de laboratórios.

Identificou-se também, no presente trabalho, um banco de dados abrangente para sítios polimórficos candidatos confiáveis, contendo um conjunto selecionado de variantes para *H. contortus* que podem estar associadas à resistência à IVM e ainda ser um recurso útil para futuros estudos que visem ao aprimoramento das ferramentas de diagnóstico. Nesse aspecto, cabe frisar que os resultados obtidos aqui devem ser interpretados com cautela, na medida em que pesquisas adicionais são necessárias para avaliar o comportamento desses alelos em isolados de parasitos de campo resistentes e suscetíveis à droga e sua real aplicação em situações no campo.

No presente estudo, um conjunto de variantes selecionadas (SNPs/indels) encontrado em regiões genômicas de ABC e LGIC no parasito *H. contortus* foi considerado um importante ponto de partida para o estudo da associação de polimorfismos à resistência à IVM, com dados obtidos a partir de uma abordagem genômica diferente da maioria das pesquisas atuais. Tais dados foram apresentados em detalhes no quarto capítulo, com a descrição de um *pipeline* eficaz para detectar SNPs e indels, utilizando sequenciamento NGS. A avaliação/validação dessas variantes podem identificar quais marcadores moleculares são importantes para a resistência à IVM em *H. contortus* no campo, contribuindo para o aumento do conhecimento molecular de regiões do genoma associadas à resistência à droga. Ao mesmo tempo, o armazenamento dos dados de sequenciamento genômico obtidos neste trabalho permite o seu uso em avaliações de outras regiões de interesse, possibilitando também a pesquisa de polimorfismos associados à resistência a outras drogas, como, por exemplo, os benzimidazóis.

ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	105
ANEXO 2 – CERTIFICADO DE ESTÁGIO REALIZADO NO EXTERIOR.....	106
ANEXO 3 – CARTA SUPERVISIONADA DE ESTÁGIO REALIZADO NO EXTERIOR.....	107
ANEXO 4 – INFORMAÇÕES/HISTÓRICO RELACIONADO À PROPRIEDADE 1503.....	108
ANEXO 5 – CRONOGRAMA DO PERÍODO EXPERIMENTAL RELACIONADO ÀS INFECÇÕES DE OVINOS.....	108
ANEXO 6 – PROTOCOLO DA TÉCNICA DE COPROCULTURA E COLETA DE LARVAS INFECTANTES DE TRICOSTRONGILÍDEOS.....	109
ANEXO 7 – PROTOCOLO DA TÉCNICA DE IDENTIFICAÇÃO E CONTAGEM DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG).....	111
ANEXO 8 – PROTOCOLO DA TÉCNICA DE NECROPSIA PARASITOLÓGICA PARA ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DE <i>Haemonchus contortus</i> ..	114
ANEXO 9 – PROTOCOLO DO TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM GEL DE ÁGAR (MODIFICADO).....	115
ANEXO 10 – PROTOCOLO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE DNA.....	117
ANEXO 11 – VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE E QUANTIDADE DE DNA DOS DOIS ISOLADOS COM ESPECTROFOTÔMETRO (a) E DA SUA INTEGRIDADE COM ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (b).	118
ANEXO 12 – ARTIGO PUBLICADO (CAPÍTULO 1).....	118
ANEXO 13 – ARTIGO PUBLICADO (CAPÍTULO 2).....	130
ANEXO 14 – TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O CURSO DE DOUTORADO.....	135

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

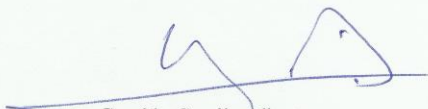
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 021/2010, referente ao projeto “Marcadores moleculares para resistência à ivermectina em *Haemonchus contortus*”, sob a responsabilidade de Fernanda Silva Fortes, na forma que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 09 de Dezembro de 2010. Este certificado expira em 09 de dezembro de 2011.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 021/2010, regarding the project “ Molecular markers for resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus* ”, in charge of Fernanda Silva Fortes, in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on December 2010. This certificate expires on December, 2011.

Curitiba, 09 de dezembro de 2010.



Geraldo Camilo Alberton
Presidente



Patrick Schmidt
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais
Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná.

ANEXO 2 – CERTIFICADO DE ESTÁGIO REALIZADO NO EXTERIOR



ANEXO 3 – CARTA SUPERVISIONADA DE ESTÁGIO REALIZADO NO EXTERIOR

**McGill****Institute of Parasitology**

McGill University
Macdonald Campus
21 111 Lakeshore Road
Ste. Anne de Bellevue
Quebec, Canada H9X 3V9

Institut de parasitologie

Université McGill
Campus Macdonald
21 111, chemin Lakeshore
Ste-Anne-de-Bellevue
Québec, Canada H9X 3V9

Tel.: (514) 398-7722
Fax: (514) 398-7857

Thursday, 22 December, 2011

Ms Fernanda Fortes arrived in my lab on 26th September 2011 and worked continuously for the following 3 months and will be flying back to Brazil tomorrow, December 23rd. She worked very diligently while she was here and made substantial progress. She focused on two different projects during her time in Canada. First, a project to investigate whether genome wide sequencing can be used to determine levels of polymorphism at random locations around the genome for association with resistance to IVM. Second, a related project to determine the pattern of genetic linkage within a long continuous stretch of the X-chromosome and thereby estimate the power of recombination to disrupt association between anthelmintic resistance and linked genetic markers.

During this work, Fernanda gained experience in modern molecular biology techniques including genomic DNA purification from parasite material, PCR amplification of specific sequences, agarose-gel electrophoresis, restriction digestion of PCR products and Sanger DNA sequencing

Yours sincerely

Robin N. Beech PhD
Associate Professor

ANEXO 4 – INFORMAÇÕES/HISTÓRICO RELACIONADO À PROPRIEDADE 1503

Propriedade: Fazenda Pinhalzinho

Código da propriedade: 1503

Município: Engenheiro Coelho - SP

Altitude: 655

Latitude: 22⁰29'18" Longitude: 47⁰12'54"

Data da coleta de amostras/informações: 29/04/2009

Área total: 2000 ha

Área de pastagem: 15 ha

Raça: Santa Inês (956 fêmeas, 22 machos, 250 cordeiros)

Atividade: carne e reprodutor

Teste de eficácia - % (TRCOF): Ivermectina (16), albendazol (0), levamisol (94),
moxidectina (99), closantel (78)

Identificação/coprocultura (controle): T (11), H (59), C (22), S (-), O (8)

Identificação/coprocultura (ivermectina): T (4), H (89), C (5), S (-), O (2)

Identificação/coprocultura (albendazol): T (1), H (68), C (8), S (-), O (23)

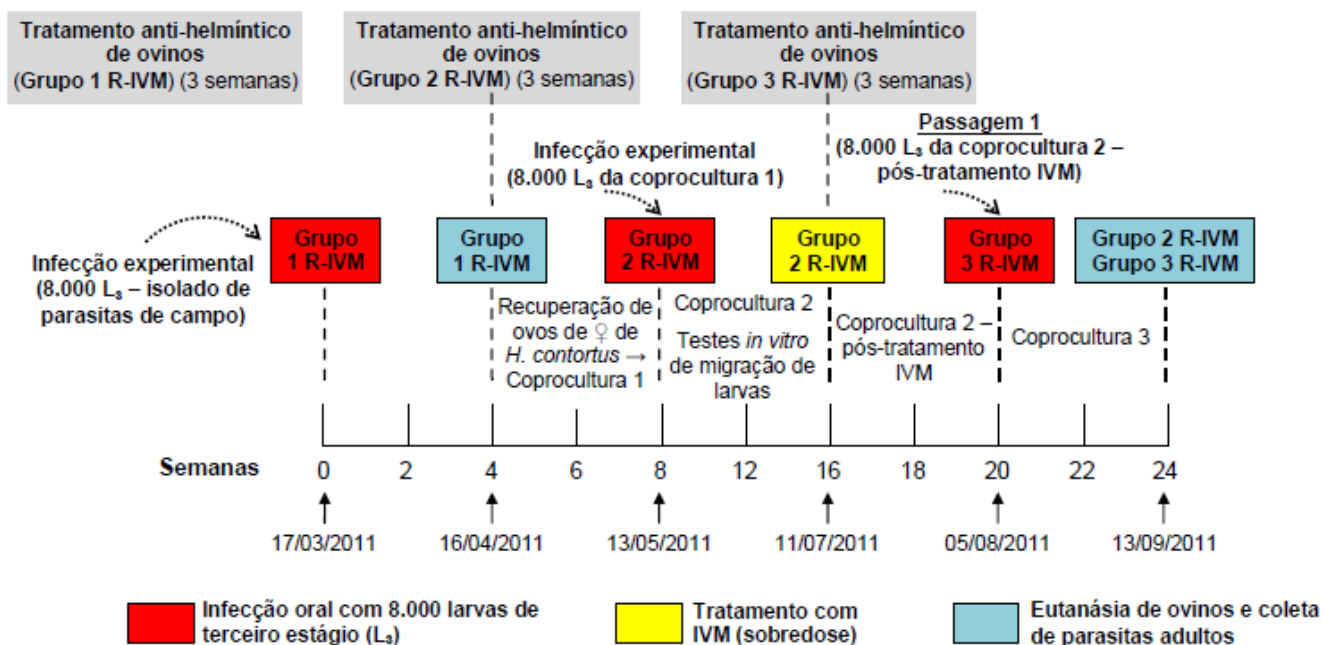
Identificação/coprocultura (levamisol): T (-), H (100), C (-), S (-), O (-)

Identificação/coprocultura (moxidectina): T (1), H (87), C (5), S (-), O (7)

Identificação/coprocultura (closantel): T (22), H (11), C (28), S (-), O (39)

Genótipo: RR (41,2), RS (47,1), SS (11,8), alelo f(A) (0,65), alelo f(T) (0,35)

ANEXO 5 – CRONOGRAMA DO PERÍODO EXPERIMENTAL RELACIONADO ÀS INFECÇÕES DE OVINOS



* Cada grupo com dois ovinos.

ANEXO 6 – PROTOCOLO DA TÉCNICA DE COPROCULTURA E COLETA DE LARVAS INFECTANTES DE TRICOSTRONGILÍDEOS

Roberts & O'Sullivan (1950)

Amostras: 20g de fezes para bovinos e eqüinos ou 6-10 síbalas para ovinos e caprinos.

Material: Frasco de vidro e plástico, carvão vegetal ou vermiculite, espátula, tubo de ensaio, placa de Petri, pipeta Pasteur, estufa (28° C e 70% umidade), Lugol, copo cônico.

MÉTODO

1. Misturar as fezes colhidas da ampola retal com espátula e um pouco de vermiculite (2:1) dentro de um frasco de vidro ($\frac{3}{4}$ do volume do frasco) e umedecer levemente, formando uma fina camada de água no fundo do frasco. O material não deve apresentar aparência aquosa.
2. Limpar os bordos do frasco e tampá-lo com a placa de Petri. Permitir a aeração da cultura colocando um cordão de algodão entre o frasco e a placa.
3. Colocar o frasco e a mistura em estufa controlada entre 25 a 27°C com umidade entre 70% por sete dias (Nematodirus: 15 dias) tomando o cuidado de manter a umidade no frasco durante este período. Pode-se deixar o conteúdo por 10 dias fora da estufa. É importante verificar o cultivo/umidade a cada dois dias para verificar se existe crescimento de fungo.
4. Para recuperar as larvas de terceiro estágio infectantes deve-se colocar água morna (35-40°C) até o bordo do frasco, tampando-o e invertendo-o bruscamente, sem derramar.
5. Deve-se colocar 10 mL de água na placa de Petri para permitir a saída das larvas. Pode-se usar o aparato de Baermann para recuperação das larvas em grande quantidade.
6. Pipetar as larvas após 2h, pois irá ocorrer a migração das larvas para a porção líquida com auxílio de pipeta, colocando em copo cônico (cálce de sedimentação) ou tubo de ensaio.

7. Permitir a decantação por 2h e retirar o sobrenadante e colher amostra para identificação.
8. Fazer linhas longitudinais com as larvas em lâminas de vidro ou colocar uma gota de solução com as larvas e colocar lamínula para observação em microscópio (10x e 40x).
9. Adicionar uma gota de Lugol para melhor visualização das estruturas das larvas. Deve-se utilizar manual técnico para identificação, observando detalhes da cabeça e cauda/bainha.

Obs.: Pode-se guardar o tubo de ensaio contendo as larvas em geladeira (sem Lugol) onde estas permanecerão vivas por até 90 dias. Deve-se tomar o cuidado de não utilizar serragem de madeiras muito verdes e que contém resinas.

É importante fazer a correlação dos dados da OPG com a proporção de larvas (gênero ou espécie) encontradas na coprocultura.

Solução de Lugol: Iodo cristalizado.....1 parte
Iodeto de potássio.....5 partes
Água destilada.....100 partes

Dissolve-se o iodeto de potássio em água e após adicionar o iodo cristalizado para ser dissolvido.

ANEXO 7 – PROTOCOLO DA TÉCNICA DE IDENTIFICAÇÃO E CONTAGEM DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG)

Gordon & Whitlock – *modificado* (Ueno e Gonçalves, 1998)

Princípio: Método de flutuação associado à contagem de ovos, usando a câmara McMaster. Exame microscópico quantitativo e qualitativo.

Amostras: 4g de fezes (bovinos, eqüinos e suínos) e 2g de fezes (ovinos e caprinos).

Material: Solução hipersaturada de cloreto de sódio; câmara McMaster; bastão de vidro; copo graduado; copo plástico; pipeta Pasteur e peneira.

MÉTODO

1. Inicialmente, realiza-se a colheita de fezes (6 a 8 cíbalas) diretamente da ampola retal do animal com o auxílio de um saco plástico fino. Após a colheita, as amostras devem ser acondicionadas em isopor com gelo e encaminhadas ao laboratório.
2. O exame de contagem de OPG deve ser feito em, no máximo, 4 dias após a colheita das fezes. Até o momento da realização do exame, as amostras devem ser refrigeradas (jamais congeladas) em geladeira (a 4 °C) em sacos plásticos bem lacrados.
3. Para a contagem de OPG (Figura 1), no mínimo um dia antes dos exames, a solução saturada de sal é preparada por meio da adição de sal a um litro de água até que o sal comece a precipitar.
4. Acrescentar em um copo: 28 mL de solução saturada (quando usar 2g de fezes) ou 56 mL de solução saturada (quando usar 4g de fezes). Triturar as fezes com o bastão de vidro e homogeneizar.
5. Passar a mistura para outro copo através da peneira.
6. Homogeneizar o líquido e, com a pipeta Pasteur, retirar uma amostra para preencher as duas cavidades da câmara de McMaster.
7. Esperar 3 min para os ovos flutuarem e observar ao microscópio (objetiva 10x), iniciando a contagem.

8. Nas duas células da câmara McMaster devem ser contados os ovos da família Trichostrongylidae, de *Strongyloides* spp (ovos larvados), de *Moniezia* spp e os oocistos de *Eimeria* spp (Figura 2). Vale ressaltar que os ovos degenerados não devem ser considerados. Contar também os ovos existentes nas linhas. Cuidado com a existência de bolhas de ar e não confundi-las com ovos.
9. O número de ovos obtido nas duas células da câmara McMaster é multiplicado por 50 para a obtenção da contagem de OPG. O resultado da contagem de ovos dá a quantidade de ovos por grama de fezes (OPG).
 - Observação: Registrar o procedimento e resultados em Planilha de OPG.
 - É importante fazer a correlação dos dados da OPG com a proporção de larvas (gênero ou espécie) encontradas na coprocultura.
 - A presença de oocistos de protozoários e de ovos de cestódeos será observada, mas não contados.
 - Significado da contagem de ovos por grama de fezes (OPG): O significado da contagem de ovos (OPG) não é indicativo real do grau de infecção do hospedeiro, devendo-se sempre levar em consideração a manifestação de sinais clínicos nos animais e variação entre as amostras.

Solução hipersaturada de cloreto de sódio:	
NaCl.....	350g
Água.....	1.000mL

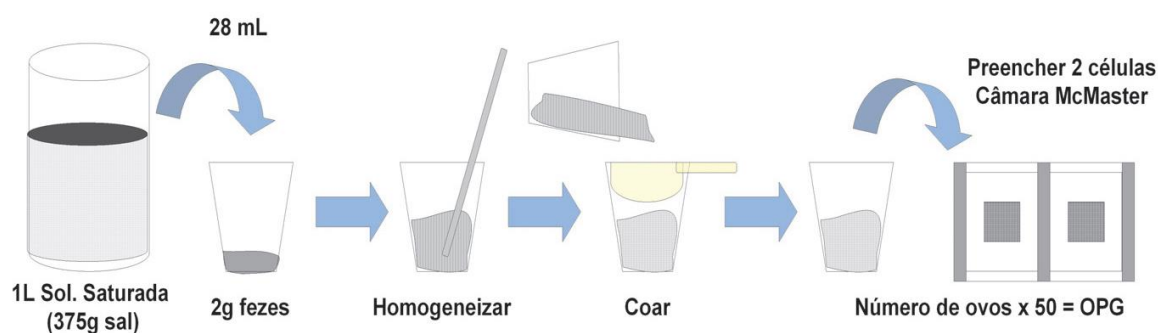


Figura 1. Esquema do método de contagem de ovos por grama de fezes (OPG).
 Fonte: Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pecuária Sudeste.

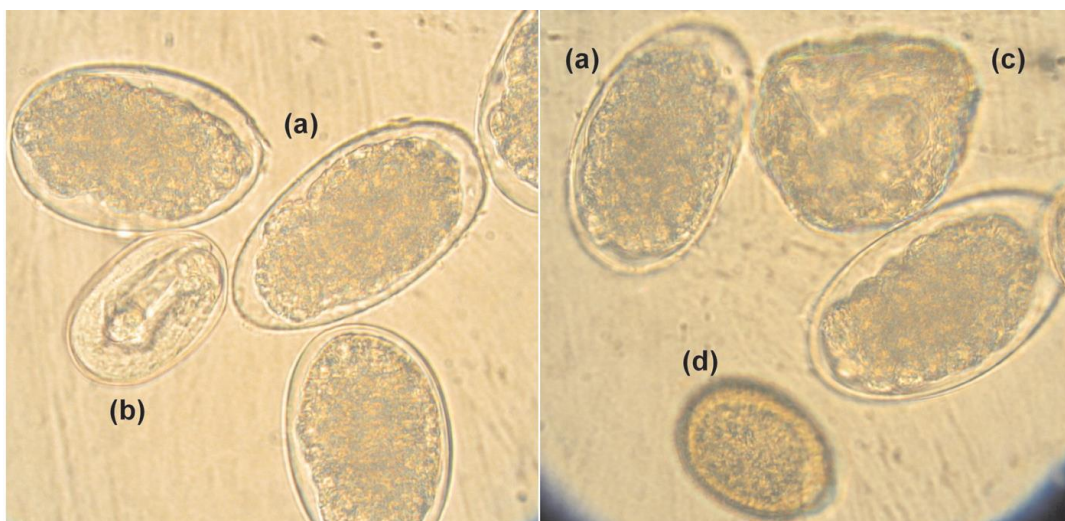


Figura 2. Imagens microscópicas de ovos e oocistos de parasitos gastrintestinais de ovinos. a) Ovos da família Trichostrongylidae; b) ovos de *Strongyloides* spp; c) ovos de *Moniezia* spp; d) oocistos de *Eimeria* spp. Fonte: Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pecuária Sudeste.

ANEXO 8 – PROTOCOLO DA TÉCNICA DE NECROPSIA PARASITOLÓGICA PARA ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DE *Haemonchus contortus*

Objetivo: Obtenção de coproculturas puras de *H. contortus*.

Material: barbante; bandejas; tesouras; estufa a 36°C; estufa para coproculturas; luvas; estiletos (agulha encurvada, fixada em uma haste); placa de Petri; microscópio estereoscópio (lupa); solução fisiológica (deve ser mantida o tempo todo a 36°C. Se não fizer isso, as fêmeas morrerão ou não realizarão postura); fezes autoclavadas (fezes de equinos autoclavadas = fezes colocadas em pote de vidro envolvido em papel craft e fechado com fita crepe, a 120°C por 30 min); cálice de sedimentação; pipeta Pasteur.

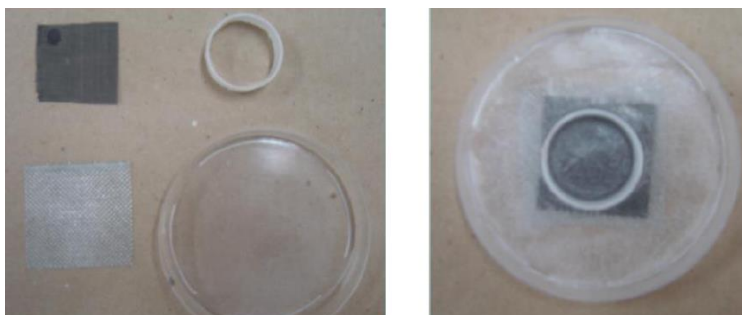
MÉTODO

1. Separar o sistema digestório (omaso e abomaso) por meio de ligaduras duplas.
2. Abrir os dois segmentos do sistema digestório dentro de recipientes (bandejas), para não haver perda de conteúdo.
3. O processo de lavagem e raspagem pode danificar as fêmeas. Por isso, o abomaso deve ser aberto sobre a bandeja (*sempre manter úmido com solução fisiológica a 36°C) e, imediatamente, transferir o conteúdo a outra bandeja com solução fisiológica a 36°C.
4. Coletar os adultos (fêmeas) de *Haemonchus* manualmente (cuidado para não pegar *Trichostrongylus*) diretamente da mucosa e do conteúdo com auxílio de estilete, e colocá-los em placas de Petri com solução fisiológica a 36°C.
5. Incubar as placas de Petri em estufa a 36°C por um período de 2 a 12 horas para realização de ovipostura.
 - Incubar as placas de Petri em estufa a 36°C por 4 horas.
 - Após esse período, transferir os adultos para outra placa de Petri com solução fisiológica a 36°C (deixar por 4 horas na estufa), e colocar a solução com os ovos em um cálice de sedimentação por 3 horas.
 - Retirar o sobrenadante do cálice de sedimentação (deixando apenas a solução contendo os ovos).*Esse procedimento pode ser repetido por 3 ou 4 vezes.
6. Pipetar a solução contendo os ovos em fezes autoclavadas e manter a 27°C por 10 dias para obtenção de larvas de terceiro estágio (coproculturas).

ANEXO 9 – PROTOCOLO DO TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM GEL DE ÁGAR (MODIFICADO)

MÉTODO

1. Colher larvas de terceiro estágio frescas após coprocultura.
2. Adicionar 0,3% de hipoclorito de sódio para desembainhar as larvas (aprox. 1h). Verificar se existem 90% das larvas sem bainha e com 90% de motilidade.
3. Lavar as larvas 3 vezes em água destilada centrifugando em 3000 rpm/2min.
4. Colocar 400 larvas para cada grupo de tratamento, por dose e em triplicata.
5. Colocar as larvas em 0,5mL de água destilada e adicionar mais 0,5mL com a diluição do produto, preparado previamente em frasco diferente (total 1 mL).
6. Colocar a solução água+larva+produto em placa de 24 poços em incubadora a 27°C/6h.
7. Colocar, após isto, 1 mL de solução de Agar a 1,4% a 45°C em cada poço (total 2 mL) e transferir imediatamente a solução Agar + solução com as larvas para um aparato* previamente preparado utilizando pipeta de 5 mL.
8. Colocar o aparato em incubadora a 27°C por 18 h sob lâmpada de 150 MHz. O objetivo da luz é estimular a mobilidade das larvas para fora do gel.
9. Após a segunda incubação, retirar a porção líquida da solução em tubo Falcon de 50 mL com tampa. Centrifugar a 3000 rpm por 5 min. O volume final deve ser de 10 mL.
10. Agitar o tubo (vortex) por 3 segundos e retirar 3 alíquotas de 1 mL para análise, colocando 10 µL de solução de iodo a 2% em cada amostra.
11. Colocar as amostras de 1ml em Eppendorf, centrifugar por 3 min/3000rpm.
12. Contar as larvas (100µL x 3) em microscópio.
13. Multiplicar a média obtida das alíquotas por 10.



*Preparo do aparato: placa de Petri, contendo uma malha plástica na base e uma malha de abertura menor sobre esta e ainda um cilindro plástico com 2 cm de altura acima deles. Deve-se colocar 22 mL de água destilada e colocar o aparato no freezer para que a água feche as malhas no congelamento. Deve-se permitir que exista espaço no cilindro para colocar a solução final de 2 mL.

ANEXO 10 – PROTOCOLO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE DNA -
PREPARAÇÃO DE DNA DE UM ÚNICO ADULTO DE *Haemonchus
contortus*

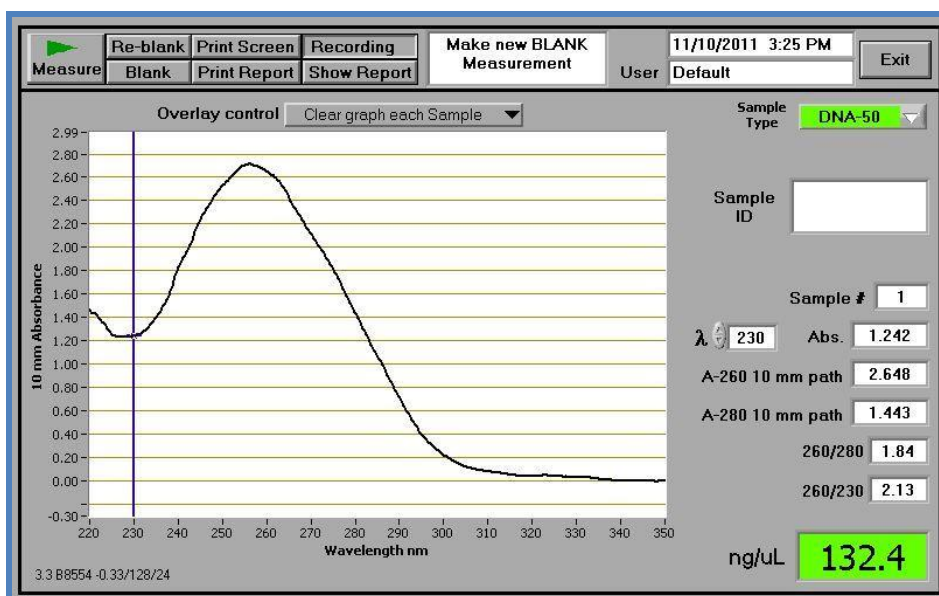
Buffer de Extração para 1 parasito: 190 µL STE; 8 µL Mercaptoetanol; 2 µL Proteinase K

Siga os passos para purificar o DNA de um adulto individual de *H. contortus*:

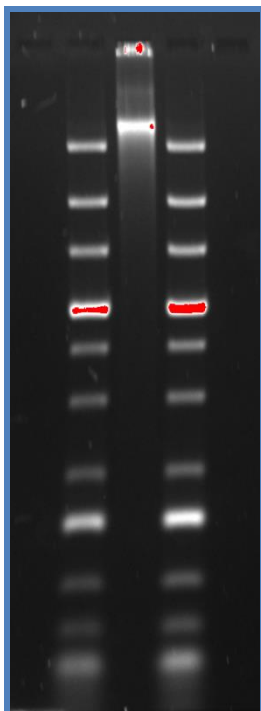
1. Prepare uma quantidade de Buffer de Extração suficiente para o número de parasitos que você deseja processar. Se você tem 10 parasitos, faça Buffer suficiente para 12.
2. Identifique tubos eppendorf suficientes para a quantidade de parasitos que você quer extrair.
3. Coloque 200 µL de Buffer de Extração em cada tubo.
4. Adicione um parasito em cada tubo e feche a tampa.
5. Incube o tubo a 37°C por pelo menos 1 hora. Cheque para ter certeza que os parasitos estão completamente dissolvidos.
6. No fluxo, adicione 200 µL de Fenol Clorofórmio.
7. Agite o tubo para misturar os conteúdos completamente.
8. Centrifugue por 2 min e identifique novos tubos, um para cada parasito.
9. Transfira o líquido limpo pela superfície do líquido para novos tubos limpos.
10. Adicione 40 µL de Solução de Acetato de Amônia 7,5 M.
11. Adicione 500 µL de Etanol 100%.
12. Agite o tubo para misturar os conteúdos completamente.
13. Centrifugue por 20 min.
14. Remova o líquido de cada tubo e centrifugue novamente por 5 segundos.
15. Use a ponteira amarela para remover o resto de líquido.
16. Adicione 100 µL de Etanol 70% e deixe na bancada por 10 min.
17. Remova o líquido com uma ponteira amarela.
18. Centrifugue por 5 segundos e remova o resto de líquido com a ponteira amarela.
19. Adicione 50 µL de água pura para DNA.
20. Deixe na bancada por 10 min para o DNA dissolver e, então, armazene a menos 20°C.

ANEXO 11 – VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE E QUANTIDADE DE DNA DOS DOIS ISOLADOS COM ESPECTROFOTÔMETRO (a) E DA SUA INTEGRIDADE COM ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (b)

a)



b)



ANEXO 12 – ARTIGO PUBLICADO (CAPÍTULO 1)

Pesq. Vet. Bras. 33(12):1391-1402, dezembro 2013

Artigo de Revisão

Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico¹Fernanda S. Fortes^{2*} e Marcelo B. Molento²

ABSTRACT.- Fortes F.S. & Molento M.B. 2013. [Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of small ruminants: advances and limitations for diagnosis.] Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(12):1391-1402. Laboratório de Doenças Parasitárias, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários 1540, Curitiba, PR 80035-050, Brazil. E-mail: fortesfs@gmail.com

The selection and growing spread of resistant nematodes to the most commonly used anthelmintics, benzimidazoles (BZs), imidazoles and macrocyclic lactones (MLs), constitutes a serious obstacle of small ruminants production worldwide. The use of efficient and sensitive methods for detection and monitoring of anthelmintic resistance in the field becomes urgent, especially for the BZs and MLs groups due to its frequent resistant reports. Obtaining an early and accurate diagnosis of resistance is extremely important to aid decision-making regarding parasite control programs, with the objective to preserve the lifespan of existing products, and to limit the development of resistance in nematode populations. The *in vivo* tests and the more recent *in vitro* tests have been developed for the detection of nematode resistant to the major anthelmintic groups. However, the availability of validated *in vitro* tests and its practical use is still very limited. Although the faecal egg-count reduction test (FECRT, *in vivo* - indirect) is the primary method of choice for the detection of resistance in the field it has being criticized for its results and is receiving significant modifications. Moreover, the development of molecular techniques from genomic changes have generated considerable advances in this research area, with the use of mutations at codons 167, 198 and 200 of β -tubulin gene as the main SNPs (single nucleotide polymorphisms) associated with BZs resistance. This review aims to discuss the available diagnostic methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of small ruminants, highlighting key developments and obstacles to its use in the laboratory and in the field.

INDEX TERMS: Anthelmintics, anthelmintic resistance, nematoides gastrintestinais, *Haemonchus contortus*, sheep, *in vivo* tests, *in vitro* tests, efficacy.

RESUMO.- A seleção e a crescente disseminação de nematoides resistentes aos anti-helmínticos mais comumente utilizados, benzimidazóis (BZs), imidazotiazóis e lactonas macrocíclicas (LMs), constituem um sério entrave na produção de pequenos ruminantes em todo o mundo. O uso de métodos eficientes e sensíveis para a detecção e o monitoramento da resistência anti-helmíntica no campo torna-se urgente, especialmente para os grupos de BZs e LMs, devido aos constantes relatos de resistência. A obtenção

de um diagnóstico preciso e precoce da resistência é extremamente importante para auxiliar a tomada de decisão em programas de controle parasitário, com o objetivo de preservar a vida útil dos produtos e limitar o desenvolvimento da resistência nas populações de nematoides. Os testes *in vivo* e, mais recentemente, os testes *in vitro* têm sido desenvolvidos para a detecção de nematoides resistentes aos principais grupos de anti-helmínticos. No entanto, a disponibilidade de testes *in vitro* validados e o seu uso prático ainda são muito limitados. Embora o teste de redução na contagem de ovos nas fezes (TRCOF, *in vivo* - indireto) seja o principal método de escolha para a detecção de resistência no campo, vem recebendo críticas quanto à validade dos resultados, e passa por significativas modificações. Além disso, o desenvolvimento de técnicas moleculares a partir

¹ Recebido em 26 de julho de 2013.

Aceito para publicação em 28 de outubro de 2013.

² Laboratório de Doenças Parasitárias, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua dos Funcionários 1540, Curitiba, PR 80035-050, Brasil. E-mail: molento@ufpr.br *Autor para correspondência: fortesfs@gmail.com

de alterações genômicas gerou avanços consideráveis nessa área de investigação, com o uso de mutações nos códons 167, 198 e 200 do gene da β -tubulina como principais SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único; do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*) associados à resistência aos BZs. A presente revisão tem o objetivo de discutir os métodos de diagnóstico disponíveis para a detecção de resistência anti-helmíntica em nematóides de pequenos ruminantes, destacando progressos e obstáculos para seu uso na rotina laboratorial e no campo.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Anti-helmínticos, resistência anti-helmíntica, nematóides gastrintestinais, *Haemonchus contortus*, ovinos, testes *in vivo*, testes *in vitro*, eficácia.

INTRODUÇÃO

A alta prevalência de infecções parasitárias e a dificuldade de realizar um controle efetivo de nematóides gastrintestinais em criações de pequenos ruminantes têm grande importância devido aos prejuízos causados ao desempenho zootécnico e ao bem-estar animal. Nas últimas décadas, o uso intensivo de anti-helmínticos pertencentes aos grupos dos benzimidazóis (BZs), dos imidazotiazóis (levamisole, LEV) e das lactonas macrocíclicas (avermectinas e milbemicinas, LMs) demonstrou um impacto positivo inicial durante uma década, mas atualmente constitui a forma mais desastrosa de controle, resultando na seleção e propagação de parasitos resistentes com alto índice de homozigose (RR) e perda total da heterogenia para indivíduos suscetíveis (SS). Esse é um tema de preocupação mundial crescente, e representa uma ameaça ao controle parasitário de médio e longo prazo, tendo em vista a precária melhoria na condição dos animais, mesmo após o tratamento. O controle químico continua a ser preocupante, pois é praticado com medicamentos contendo alta concentração ou mesmo com o uso da combinação de medicamentos, muitas vezes sem critério de produção e/ou indicação para sua ampla utilização. Recentemente, duas novas classes de anti-helmínticos – monepantel (Kaminsky et al. 2008) e derquantel, este em combinação com a abamectina (Little et al. 2010) –, com novos modos de ação, foram lançados no mercado na Nova Zelândia, sendo uma alternativa promissora para o futuro do controle de nematóides gastrintestinais.

Embora seja crescente o desenvolvimento e a adoção de programas alternativos de controle parasitário (Molento et al. 2011), visando à redução da aplicação de compostos químicos, as atuais medidas de controle ainda dependem fortemente do uso de anti-helmínticos. Sabe-se que o processo de seleção de parasitos resistentes após sua exposição aos produtos químicos é inevitável e, além disso, o desenvolvimento/comercialização de novas drogas é lento e excessivamente caro (Geary 2013). Assim, é de extrema importância prolongar a vida útil dos produtos existentes – antigos e novos – por meio de sua utilização estratégica/seletiva, a fim de manter o adequado controle do parasitismo.

Os relatos de resistência anti-helmíntica em nematóides de pequenos ruminantes para os três grupos de drogas

mais comumente utilizados, BZs, LEV e LMs, têm crescido rapidamente em diferentes regiões do mundo, incluindo América do Sul (Molento et al. 2011, Torres-Acosta et al. 2012), África do Sul (Van Wyk et al. 1999), Austrália (Love & Coles 2002), Nova Zelândia (McKenna 2010) e Europa (Papadopoulos et al. 2012), representando uma séria ameaça à produção animal. No Brasil, o aumento de relatos de resistência múltipla a drogas (RMD) em vários locais, como as regiões Sul (Cezar et al. 2010), Sudeste (Veríssimo et al. 2010) e Centro-Oeste (Szczeny-Moraes et al. 2010), evidenciam a gravidade desse problema. Conforme verificado em testes de eficácia a campo, 100% das propriedades já apresentam RMD (Veríssimo et al. 2010).

Buscando retardar o avanço da resistência, o uso de testes sensíveis para determinar o grau de eficácia de uma determinada droga, em uma população específica de parasitos, pode auxiliar o planejamento de estratégias de controle (Taylor et al. 2002), como a simples opção de uso de compostos que ainda permaneçam eficazes. Contudo, mesmo sendo de fundamental importância, o diagnóstico da resistência anti-helmíntica, ou da redução de eficácia aos anti-helmínticos, ainda não é uma realidade prática no campo (Torres-Acosta et al. 2012). Muito embora a resistência possa ser avaliada por meio de testes *in vivo* e *in vitro*, a disponibilidade de testes *in vitro* validados para o diagnóstico da resistência ainda é muito limitada, com poucos laboratórios que oferecem esse tipo de serviço. Tais testes ainda apresentam limitações quanto à sua confecção e ao alto nível de treinamento técnico para a interpretação dos achados. Quanto ao teste *in vivo* controlado, é inviável para a condição de avaliação a campo, devido à necessidade de sacrifício dos animais e ao alto custo. Consequentemente, o teste fenotípico indireto *in vivo* de redução na contagem de ovos nas fezes (TRCOF) continua sendo o principal método de escolha para a detecção de resistência (Kaplan & Vidyashankar 2012), sendo amplamente aceito por agências reguladoras e pela própria indústria farmacêutica, bem como para publicações científicas. Vários laboratórios estão trabalhando arduamente para obter o diagnóstico molecular da resistência (Samson-Himmelstjerna et al. 2009b), mas o mecanismo resultante dos rearranjos genéticos ainda é considerado um quebra-cabeças.

A variação em protocolos experimentais para a execução dos testes de diagnóstico da resistência, os métodos de análise e a interpretação dos dados, podem gerar resultados de qualidade muito variável. Assim, o desenvolvimento de novos métodos e a padronização e validação dos já existentes são essenciais para permitir a comparação de dados obtidos em diferentes laboratórios, além de sua inclusão na rotina laboratorial (Chagas et al. 2011, Molento et al. 2012).

Esta revisão tem o objetivo de discutir os principais testes atualmente disponíveis – *in vivo*, *in vitro* e moleculares – para o diagnóstico da resistência anti-helmíntica em nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes, os avanços proporcionados por novas tecnologias e as limitações para o seu uso na rotina laboratorial e no campo.

MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM NEMATOIDES GASTRINTestinais DE PEQUENOS RUMINANTES

Desde a recomendação de testes para detecção de resistência anti-helmíntica pela Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária (*World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology - WAAVP*) (Coles et al. 1992) e sua revisão e inclusão de métodos para discussão e avaliação (Coles et al. 2006), uma variedade de métodos *in vivo* e *in vitro* para o diagnóstico da resistência em muitas espécies de nematoides foi descrita, nas últimas décadas. Técnicas moleculares também têm sido desenvolvidas, porém apenas para poucas espécies de parasitos. Assim, é indispensável a identificação correta das espécies de parasitos presentes no hospedeiro para a obtenção de um diagnóstico apropriado, particularmente quando há comparação entre amostras pré e pós-tratamento (Demeler et al. 2012b). Descrições detalhadas e orientações sobre o uso das principais técnicas disponíveis estão presentes em trabalhos anteriores (Coles et al. 1992, Taylor et al. 2002, Coles et al., 2006), possibilitando a execução e a avaliação dos testes internacionalmente. Todos os métodos possuem, em algum grau, limitações em termos de confiabilidade, reprodutibilidade, sensibilidade, aplicabilidade, interpretação ou custo (Taylor et al. 2002). Além disso, não abrangem de maneira satisfatória todos os grupos de anti-helmínticos.

O TRCOF *in vivo* é o método mais amplamente utilizado para a detecção e o monitoramento da resistência anti-helmíntica. No entanto, é considerado o menos sensível e pouco confiável para a detecção da resistência. Trata-se de um teste simples, de execução relativamente fácil e que pode ser usado com todos os grupos de anti-helmínticos, independentemente do seu mecanismo de ação. A eficácia da droga é estimada por meio da comparação das contagens de ovos de nematoides nas fezes antes e depois do tratamento, sendo o tempo definido de acordo com o grupo testado. A população de parasitos é considerada resistente quando a redução é < 95%. Em comparação com o TRCOF, o teste controlado de eficácia, outro método *in vivo*, avalia melhor a realidade da infecção e o efeito do composto. Nesse teste, animais natural ou experimentalmente infectados são separados em grupos (tratamento(s) e controle) e a dose do anti-helmíntico utilizado deverá ser a dose terapêutica recomendada pelo fabricante, cuja eficácia esperada é ≥ 99%. Após a necropsia dos animais, realiza-se a contagem dos parasitos presentes no hospedeiro. Então, observa-se a redução ou a eliminação dos parasitos, e estima-se a eficácia do tratamento. Da mesma forma, se a eficácia for < 95%, confirma-se a presença de resistência anti-helmíntica. Quando há uma baixa prevalência de nematoides resistentes, estes podem não ser detectados devido a pequenos aumentos na dose, que podem causar a morte de 95% dos vermes. Assim, como a dose registrada é frequentemente maior do que a real dose efetiva necessária para a remoção dos vermes, algum ajuste deve ser feito para a realização do teste controlado (Coles et al. 2006). Devido ao pouco uso desse teste, o mesmo não será abordado em detalhes no presente artigo.

Como alternativa aos métodos *in vivo*, um crescente número de testes *in vitro* para a detecção de resistência anti-helmíntica vem sendo desenvolvido e adaptado para diferentes grupos de drogas. Eles são, na maioria das vezes, mais rápidos, mais econômicos e menos trabalhosos do que os *in vivo* (Demeler et al. 2012a). Os métodos *in vitro* ainda anulam os efeitos causados pela interferência do hospedeiro no estabelecimento da infecção parasitária e pela variação na farmacodinâmica das drogas no animal (Chagas et al. 2011). No entanto, há poucos relatos de testes *in vitro* padronizados até o momento. Em geral, esses testes baseiam-se na incubação de estágios de vida livre do parasito em uma série de concentrações do anti-helmíntico, seguido da avaliação de seus efeitos sobre os nematoides. São geradas curvas de dose-resposta e valores de DL_{50} (dose do anti-helmíntico necessária para matar 50% dos parasitos) ou DL_{95} (dose do anti-helmíntico necessária para matar 95% dos parasitos). A Fig. 1 exemplifica a obtenção de curvas de dose-resposta para um isolado de *Haemonchus contortus* testado para duas drogas (Ivermectina - IVM e moxidectina - MOX), mostrando um valor de DL_{50} para MOX significativamente menor do que para IVM. Atualmente, os principais testes disponíveis avaliam: a eclosão (teste de eclodibilidade de ovos - TEO); o desenvolvimento (teste de desenvolvimento larvar - TDL); a motilidade/migração (teste de motilidade larvar e teste de inibição da migração larvar); e a alimentação (teste de inibição da alimentação larvar) (Demeler et al. 2012b). Desses, o TEO e o TDL são os mais comumente utilizados. Apenas o TDL possui um teste comercial (*DrenchRite*®), disponível em alguns países e de custo elevado. O uso dos outros testes *in vitro* tem sido limitado principalmente à área de pesquisa científica, utilizando isolados de parasitos cujo estado de resistência ou suscetibilidade foi previamente determinado. O TEO consiste na incubação de ovos não desenvolvidos em concentrações crescentes do anti-helmíntico, e pode ser usado com

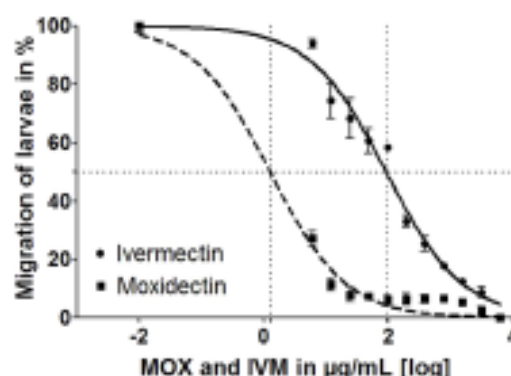


Fig. 1. Curvas de dose-resposta obtidas com o Teste de Migração de Larvas em Ágar com o isolado SP1503Ovi2011 de *Haemonchus contortus* usando Ivermectina (IVM, linha sólida) e moxidectina (MOX, linha tracejada). As barras de erro indicam o erro padrão. As barras de erro não são vistas quando as diferenças entre os valores observados para todas as concentrações testadas foram iguais ou muito próximas de 0 (zero) (Fortes et al. 2013).

sucesso para a detecção de resistência aos BZs (Samson-Himmelstjerna et al. 2009a), cuja ação impede o embrião e a eclosão de ovos de nematóides. Para outras drogas anti-helmínticas sem nenhuma atividade ovicida, como LMs ou LEV, ainda faltam testes *in vitro* altamente satisfatórios para a detecção de resistência. Uma dose discriminante - dose que impede a eclosão de 99% dos ovos suscetíveis - também pode ser usada, ao invés de DL_{50} , sendo estimada a porcentagem de ovos resistentes em amostras de fezes, aumentando a sensibilidade do ensaio (Coles et al. 2006). Já o TDL baseia-se no desenvolvimento de ovos de parasitos em larvas de terceiro estágio (L_3). Uma série de versões do TDL já foi desenvolvida para a detecção de resistência a todas as classes de anti-helmínticos, usando soluções líquidas ou ágar como base para o teste. A dose discriminante também pode aumentar a sensibilidade e simplicidade do teste.

Nos últimos anos, métodos de diagnóstico molecular da resistência anti-helmíntica a partir de alterações genômicas têm sido desenvolvidos, trazendo avanços consideráveis nessa área de investigação. Em geral, os testes moleculares possuem maior sensibilidade e especificidade e podem fornecer ferramentas poderosas para superar muitas das desvantagens dos métodos acima referidos, mas requerem pesquisas adicionais para serem usados como uma ferramenta universal prática no campo. A sensibilidade - capacidade de detectar os indivíduos verdadeiramente positivos, ou seja, diagnosticar corretamente os doentes - e a especificidade - capacidade de detectar os indivíduos verdadeiramente negativos, ou seja, diagnosticar corretamente os sadios - são importantes indicadores para a avaliação de um teste diagnóstico. É considerado o melhor teste aquele que apresenta alta sensibilidade e alta especificidade, fornecendo poucos resultados falso-positivos e falso-negativos, que pode ser obtido com o aprimoramento das técnicas moleculares e dos métodos de análise padrão.

Vários estudos vêm sendo feitos buscando a determinação de marcadores genéticos para a resistência anti-helmíntica, incluindo a identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*) para avaliar frequências alélicas em populações (Samson-Himmelstjerna 2006). Até o momento, testes moleculares estão disponíveis apenas para o grupo dos BZs, em algumas espécies de nematóides de ovinos. Metodologias utilizando a reação em cadeia pela polimerase (PCR) têm sido estabelecidas para a avaliação da presença, ausência ou quantificação de SNPs associados à resistência aos BZs no isótipo 1 do gene da β -tubulina, alvo dessas drogas. A elucidação insuficiente sobre os mecanismos moleculares envolvidos na resistência ao LEV e às LMs em nematóides, drogas de resistência poligênica, torna mais complexo e desafiador o desenvolvimento de marcadores moleculares para o diagnóstico da resistência a esses compostos. Estudos baseados em diagnóstico imunológico utilizando ELISA para a detecção de antígeno em parasitos também já foram sugeridos. Recentemente, foram detectadas diferenças de expressão de proteína entre isolados de *Haemonchus contortus* resistente e suscetível à IVM por meio de análises de proteômica de *fingerprinting* (Hart et

al. 2012), sugerindo ser uma possível base para fenotipagem molecular ou marcadores de resistência.

Técnicas *in vivo*

Teste de Redução na Contagem de Ovos nas Fezes (TRCOF). O TRCOF, segundo recomendações da WAAVP (Coles et al. 1992), é considerado o método de escolha para o monitoramento da eficácia anti-helmíntica devido à sua fácil execução e interpretação, sendo realizado com uma sequência de exames de contagem de ovos por grama de fezes (OPG). Quanto à OPG, trata-se de um teste fenotípico cuja contagem depende diretamente do efeito do hospedeiro, e é considerado indireto, pois reflete a postura de ovos das fêmeas, que depende do efeito da resposta imune do hospedeiro. Entretanto, sua execução e/ou interpretação tem sido dificultada por um conjunto de fatores que serão detalhados a seguir. O TRCOF é considerado confiável somente quando há mais de 25% de vermes resistentes em uma população (Martin et al. 1989), e dados obtidos mais recentemente não mostraram uma alta reprodutibilidade do teste (Miller et al. 2006). Assim, o valor diagnóstico do teste para situações de emergência e baixa prevalência da resistência é limitado. A pouca importância dada à interação hospedeiro-parasito de acordo com cada espécie animal e parasitária, a viabilidade do teste em condições de campo e as indicações de concentração para a contagem de ovos são outros fatores limitadores importantes (Levecke et al. 2012).

As recomendações referentes ao delineamento do estudo e à dimensão da amostra podem ser de difícil obtenção no campo. Assim, buscando garantir resultados favoráveis com o TRCOF, Levecke et al. (2012) desenvolveram um método que permite aos pesquisadores adaptarem seu projeto de estudo conforme uma ampla gama de condições de campo. A inclusão de um grupo não tratado (controle) no teste, para observação de alterações naturais que possam ocorrer na contagem de ovos durante o período, pode não ser prática em muitas situações. Além disso, o uso de médias aritméticas das contagens de ovos nas fezes dos mesmos animais antes e após a administração do anti-helmíntico, ao invés de aleatoriamente, pode proporcionar resultados mais confiáveis (Dobson et al. 2012).

A avaliação do teste pode ser prejudicada devido às variações na correlação entre a contagem de ovos nas fezes e a carga parasitária adulta entre as diferentes espécies de parasitos. Foi encontrada uma boa correlação para *H. contortus* (Roberts & Swan 1981, Chagas et al. 2013), porém não para *T. colubriformis* (Sangster et al. 1979), *Ostertagia circumcincta* (Martin et al. 1985) e *Nematodirus* spp. (Martin et al. 1985). Palcy et al. (2010) relataram uma baixa sensibilidade do teste para a detecção de *T. axei*, cuja postura de ovos é muito baixa. Assim, a ocorrência de variação intra e interespecíficas na fecundidade e agregação dos ovos nas fezes pode afetar a interpretação do TRCOF (Levecke et al. 2012).

Algumas drogas podem causar uma supressão temporária na postura de ovos, levando a uma superestimativa da eficácia anti-helmíntica se avaliada durante esse período. Portanto, recomenda-se que amostras fecais sejam co-

letadas 3-7 dias após o uso de LEV, 8-10 dias para BZs e entre 14-17 dias para LMs. Somente quando for utilizada moxidectina (MOX), uma LM, as fezes deverão ser coletadas após 21 dias. Quando mais de um tipo de droga estiver sendo avaliado, o período de 14 dias deverá ser empregado (Coles et al. 2006). Após o tratamento anti-helmíntico, deve-se ter atenção com os locais onde os animais serão mantidos, se pasto ou piquete, devido à possibilidade de rápida reinfeção. Uma redução superior a 95% no TRCOF indica que o uso do anti-helmíntico ainda deve ser benéfico em programas de controle parasitário, mas uma pequena porcentagem de vermes sobreviventes pode indicar um problema de resistência, que pode aumentar com tratamentos subsequentes, e precisa ser monitorado.

A precisão do TRCOF depende da sensibilidade da técnica adotada para a contagem de ovos de nematóides nas fezes, sendo que a maioria dos métodos atualmente disponíveis ainda não é precisa (Demeler et al. 2012b). O uso da técnica descrita por Gordon & Whitlock modificada (câmara McMaster com detecção de 50 OPG) pode não detectar um baixo número de ovos, dificultando o diagnóstico de resistência precoce e de pequenas alterações na eficácia de uma droga (Kaplan & Vidyashankar 2012). Assim, acredita-se que é necessária a adoção de um novo método para contagem, que ofereça maior sensibilidade e precisão (Demeler et al. 2012b). Diferentes reduções percentuais na contagem de ovos podem ser obtidas, dependendo do tipo de contagem, devendo-se adotar um padrão dos métodos de cálculo. Porém, como existem muitas variações na técnica de OPG, sua padronização é dificultada (Coles et al. 1992). Alguns laboratórios utilizam pool de amostras de fezes e outros realizam contagens individuais para a obtenção de um valor médio. Ambas as abordagens têm vantagens e desvantagens, e a definição do melhor procedimento para a contagem de ovos nas fezes é importante. Por exemplo, enquanto o teste de OPG – desenvolvido para contagem de ovos em ovinos – pode ser a melhor opção para amostras individuais de ovinos, o teste FECPAK® pode ser melhor para um pool de amostras (Coles et al. 2006). Já a lâmina FLÓTAC® é usada em uma técnica recentemente descrita que também apresentou uma melhora significativa com relação à sensibilidade (Rinaldi et al. 2011, Molento et al. 2012). Estudos recentes vêm sendo feitos com um sistema mini-FLÓTAC, mostrando uma diminuição significativa na média e no desvio padrão de valores em comparação com a técnica de Gordon & Whitlock (Molento et al. 2012). As diferenças na fecundidade entre as espécies de helmintos também demandam diferentes métodos de contagem (Leveck et al. 2012). Outro aspecto relevante é que apesar de a OPG ser altamente variável, ela geralmente é feita a partir de uma única contagem por animal pré e pós-tratamento, ao invés de triplicatas para reduzir a variabilidade (Kaplan & Vidyashankar 2012).

Em geral, as populações de nematóides compreendem várias espécies, sendo essencial identificar quais estão envolvidas e, assim, avaliar o efeito de uma droga em diferentes espécies nas populações. Como os ovos nas fezes não podem ser diferenciados morfológicamente (exceto o *Nematodirus*), recomenda-se que coproculturas de amos-

tras pré e pós-tratamento sejam conduzidas separadamente para o desenvolvimento dos ovos até L₃ (Roberts & O'Sullivan 1950). A identificação das larvas geralmente é feita utilizando-se um guia simplificado para consulta (Ueno & Gonçalves 1998), mas é necessária experiência técnica devido à dificuldade e pouca confiabilidade associada ao método. Além disso, as necessidades para incubação e desenvolvimento das larvas diferem entre as espécies de nematóides, e as condições das coproculturas podem favorecer o desenvolvimento de uma espécie e prejudicar o de outra. Por isso, as condições devem ser as mesmas para coproculturas pré e pós-tratamento. Recomenda-se que as amostras não devem ser mantidas a 4°C por período acima de 24 horas, para que não haja interferência na incubação dos ovos de *H. contortus* e *Cooperia* (McKenna 1998). Recentemente, Roeber et al. (2012) sugeriram um ensaio de PCR previamente avaliado (98% de sensibilidade e 100% de especificidade) para ser usado como alternativa à técnica de coprocultura, sendo que o primeiro foi considerado menos trabalhoso e mais rápido.

Na prática, outros fatores ainda podem prejudicar a interpretação dos dados obtidos com o TRCOF e reduzir a especificidade do teste, como as diferenças metodológicas entre os laboratórios, a incorreta administração de medicamentos, falhas de equipamentos, erro nas doses de drogas e produtos de má qualidade. Para aperfeiçoar o TRCOF, estudos vêm sendo feitos com base em comparações de métodos de contagem de ovos nas fezes (Rinaldi et al. 2011), programas estatísticos (Dobson et al. 2012), além de outras questões como o período para a realização de amostragens e a manipulação e conservação das amostras. Há ainda questionamentos sobre o grau de sensibilidade do TRCOF, e sobre como os resultados podem ser relacionados com os dados obtidos a partir de testes *in vitro* (Coles et al. 2006), a fim de aprimorar o seu uso.

Técnicas *in vitro*

Teste de eclodibilidade de ovos (TEO). O método foi descrito, inicialmente, por Le Jambre (1979), e um protocolo padronizado foi adotado pela WAAVP (Coles et al. 1992). O TEO tem sido utilizado com várias modificações por uma série de pesquisadores, para a detecção de resistência a BZs e LEV. Um protocolo-padrão para a detecção de resistência aos BZs está disponível (Samson-Himmelstjerna et al. 2009a), e laboratórios de toda a Europa utilizam a mesma metodologia. A maioria dos estudos que avaliaram o uso do TEO para a detecção de nematóides resistentes aos BZs mostrou uma boa concordância com os resultados obtidos com o TRCOF em ovinos (Várady et al. 2006, Díez-Baños et al. 2008) e bovinos (Demeler et al. 2012a). Isso indica que o teste representa uma alternativa confiável e precisa para o TRCOF, além de ser mais prático e economicamente viável.

O tiabendazol (TBZ) é a droga de escolha para a realização do teste por possuir uma solubilidade relativamente elevada em água. Sua estabilidade a longo prazo em soluções de DMSO não é conhecida, mas quando as diluições são feitas em água pode haver uma redução das concentrações esperadas. Como a sensibilidade ao TBZ diminui na medida em que os ovos se desenvolvem, as fezes destinadas ao

exame devem ser manipuladas até três horas após a coleta ou armazenadas anaerobicamente (Coles et al. 2006). Isso, muitas vezes, representa uma grande limitação ao uso do TEO no diagnóstico de rotina.

Porcentagens de ovos eclodidos para cada concentração do fármaco, curvas de dose-resposta e valores de DL_{50} podem ser determinadas com essa técnica. Utilizando-se uma dose discriminante, pode-se obter a porcentagem de ovos eclodidos (resistentes aos BZs) na amostra. Dados obtidos com isolados suscetíveis de *H. contortus*, *T. circumcincta* e *Trichostrongylus colubriformis* mostraram uma dose discriminante de 0,1 µg/ml de TBZ. Testes de campo também já demonstraram que ovos de outras espécies sensíveis (*Cooperia* e *Oesophagostomum*) não eclodem com essa concentração. Usando esse critério, acredita-se que possam ser detectados apenas 2 a 3% de ovos resistentes (Coles et al. 2006). Na Espanha, a dose discriminante única foi utilizada para avaliar o estado de resistência aos BZs no nordeste do país, aumentando a sensibilidade do TEO (Calvete et al. 2011).

Alguns fatores em investigação e que podem influenciar os resultados obtidos com o TEO, incluem: diferentes fontes de água utilizada (destilada, desionizada ou água da torneira); grau de limpeza dos ovos (presença de detritos); e o método de dissolução da amostra (p.ex. DMSO e água) (Coles et al. 2006). Como os ovos são muito frágeis e sensíveis à variação de temperatura, a detecção de tais fatores é essencial para que diferentes laboratórios possam obter resultados igualmente eficazes.

Teste de desenvolvimento larvar (TDL). O TDL foi relatado primeiramente por Coles et al. (1988) para a detecção de resistência a BZs e LEV. Muitas variações do teste foram publicadas descrevendo seu uso para a detecção de resistência de várias drogas anti-helmínticas em nematóides de ovinos (Hubert & Kerboeuf 1992, Gill et al. 1995). Um teste comercial (*DrenchRite*®) foi desenvolvido na Austrália para determinar a resistência contra BZs, LEV e LMs em nematóides de ovinos e caprinos, porém é pouco utilizado e expressivamente caro para o uso em rotina. O TDL em microágar (do inglês *MALDT, micro-agar larval development test*) foi descrito em detalhes (Coles et al. 2006) e, assim como o TEO, foram encontrados resultados em boa concordância com dados obtidos após a realização do TRCOF (Leathwick et al. 2006, Várady et al. 2006). O teste tem demonstrado ser confiável para BZs e LEV (Taylor et al. 2002, Coles et al. 2006) e, recentemente, foram relatados resultados comparáveis e confiáveis para detectar a resistência à IVM em *H. contortus* (Dolinská et al. 2012).

Utilizando o MALDT descrito por Coles et al. (2006), Dolinská et al. (2012) distinguiram facilmente isolados de *H. contortus* suscetíveis e resistentes à IVM, obtendo uma probabilidade aproximada de 87% para o diagnóstico positivo em uma população com apenas 2-4% de vermes resistentes. Nesse estudo, dois fatores foram indicados por contribuir para a falta de sensibilidade do teste: a forma de apresentação da IVM e seus análogos, pois esses podem ter diferentes potências contra diferentes espécies de nematóides gastrintestinais; e a correlação entre dados obtidos em testes *in vitro* MALDT e *in vivo* TRCOF, sabendo que o último pode apresentar resultado questionável.

A dose letal de 50% (DL_{50}) determinada para nematóides suscetíveis de ovinos foi de 0,02 µg/ml para TBZ e 0,5 µg/ml para LEV. Contudo, pesquisas adicionais são necessárias para confirmar esses valores no TDL (Coles et al. 2006). Essa prova é considerada relativamente frágil, pois requer fezes frescas (enviadas ao laboratório em sistema anaeróbico), sendo as condições de armazenamento as que mais afetam o desenvolvimento dos ovos e o bom desempenho do teste (Demeler et al. 2010). Ao contrário do TEO, para o TDL a idade dos ovos utilizados não importa, e as larvas são obtidas para a diferenciação de espécies. A principal vantagem do TDL é a sua capacidade de avaliação simultânea de resistência a várias drogas (BZs, LEV e LMs), em uma mesma placa.

Para os testes *in vitro*, grandes quantidades de dados precisam ser coletadas para definir um Procedimento Operacional Padrão (POP) com as possíveis interpretações. É preciso ainda determinar a relação entre esses testes padronizados e o TRCOF. Embora o TDL funcione para o diagnóstico de resistência aos BZs, parece não ser tão satisfatório quanto o TEO (Coles et al. 2006).

Testes de motilidade e migração larvar. Os testes de motilidade e migração larvar podem ser usados para avaliar o efeito dos anti-helmínticos que causam paralisia na musculatura somática dos parasitos. A motilidade de larvas pode ser determinada por meio de observação, detectores eletrônicos (instrumentos que medem o grau de refração da luz e fornecem um índice de motilidade) ou migração através de peneiras. A grande necessidade de se obter um diagnóstico confiável para a resistência às LMs tem estimulado o desenvolvimento de testes que avaliam a motilidade dos parasitos utilizando essas técnicas.

Testes mensurando a paralisia larval foram desenvolvidos para a detecção de resistência ao LEV e ao morantel (Martin & Lejambre 1979). Sutherland & Lee (1990) descreveram uma modificação desse teste para a detecção de resistência ao TBZ. Gill et al. (1991) relataram um teste de migração para a detecção de resistência à IVM em *H. contortus* e, mais tarde, em *Trichostrongylus colubriformis* e *T. circumcincta* (Gill & Lacey 1998), mas a avaliação da motilidade das larvas foi muito subjetiva. Assim, foi feita a avaliação e validação do uso de ágar e de peneiras para a separação de L_3 migrantes (sobreviventes) e não migrantes (mortas) para uma quantificação confiável (D'assonville et al. 1996, Kotze et al. 2006). Além desses, uma grande variedade de testes semelhantes de migração de larvas foi publicada, sendo adaptadas para o uso de diferentes drogas e espécies de nematóides de ovinos (Wagland et al. 1992, Douch & Morum 1994, Molento & Prichard 2001). No entanto, em nenhum desses trabalhos houve a publicação de dados referentes à repetibilidade de resultados obtidos dentro de um mesmo laboratório e/ou à reprodutibilidade de resultados entre laboratórios distintos. Isto se faz necessário, pois pode significar um melhor monitoramento da eficácia das LMs, entre outras drogas, em menor tempo e sem o uso de animais experimentais como, por exemplo, no teste controlado.

Um teste de inibição da migração larvar (TIML) para a detecção de resistência à IVM em nematóides de rumi-

nantes foi padronizado na Europa (Demeler et al. 2010), permitindo a separação das larvas móveis das imóveis por meio da migração através das peneiras. O mesmo protocolo foi realizado em seis laboratórios de cinco países, mostrando resultados altamente reprodutíveis, e fornecendo uma ferramenta útil para o monitoramento da resistência à IVM em nematóides de ruminantes.

A aplicabilidade do teste no campo, onde infecções mistas de parasitos ocorrem comumente, ainda precisa ser mais bem estudada, sendo necessários estudos que possibilitem a diferenciação das espécies (Kotze et al. 2006). Um estudo mostrou uma boa concordância dos resultados obtidos a partir do TIML com o TRCOF em bovinos (Demeler et al. 2012a), demonstrando o potencial uso do TIML. O método também foi utilizado para avaliar a eficácia *in vitro* de IVM e MOX em isolados de *Cooperia* sp. (Almeida et al. 2013) e em isolado de *H. contortus* (Fortes et al. 2013), mostrando ser um teste possivelmente útil para a avaliação de eficácia da IVM. Em comparação ao TDL, o TIML é um exame fácil e simples, possível de ser realizado na maioria dos laboratórios. Além disso, o TIML requer larvas de terceiro estágio, que podem ser facilmente obtidas a partir de coproculturas, e mantidas em geladeira até o seu uso (Demeler et al. 2010).

A motilidade de larvas e adultos de nematóides, após incubação com anti-helmínticos, também pode ser estimada por meio de um instrumento que mede o grau de refração da luz e fornece um índice de motilidade. O movimento dos parasitos causa uma variação dos sinais luminosos refletidos e recebidos pelo fotodetector. Os efeitos anti-helmínticos *in vitro* sobre *H. contortus* resistentes aos BZs foram detectados utilizando esse medidor de micromotilidade (Polz et al. 1987). Recentemente, um medidor de micromotilidade também foi utilizado com eficiência para avaliar a ação de IVM sobre parasitos adultos de *C. oncophora* (Demeler et al. 2010).

Testes de alimentação. Estudos têm sido realizados para determinar o efeito sobre a alimentação do parasito após tratamento anti-helmíntico em larvas e adultos. O teste de inibição da alimentação larvar (TIAL) foi usado para diferenciar isolados monoespecíficos de nematóides resistentes e suscetíveis à IVM (Alvarez-Sánchez et al. 2005) e isolados de campo resistentes e suscetíveis, compostos principalmente por *Teladorsagia circumcincta* (Martínez-Valladares et al. 2012). Em um estudo realizado no noroeste da Espanha, os valores de resistência ao LEV e às LMs encontrados com o TIAL foram semelhantes aos obtidos pelo TRCOF, porém foram feitos em diferentes rebanhos (Martínez-Valladares et al. 2013). Díez-Baños et al. (2008) avaliaram a eficácia anti-helmíntica no campo e encontraram um valor mais elevado de resistência às LMs utilizando o TIAL (10%), comparado ao TRCOF (3%). Isso indica que o teste *in vitro* tem o potencial de detectar a resistência à classe de drogas mais comumente utilizada.

TÉCNICAS MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA

Muito se tem investido para o desenvolvimento de um método diagnóstico de parasitos resistentes utilizando

técnicas moleculares. Entretanto, devido ao caráter extremamente poligênico das populações, pesquisadores continuam sendo desafiados a descobrir o mecanismo de resistência das drogas e divulgar um ou mais candidatos a marcador específico. O principal mecanismo molecular associado à resistência aos BZs em nematóides tricostrogilídeos de pequenos ruminantes envolve uma mutação – transverso T > A, modificando o códon TTC para TAC – que leva à substituição do aminoácido fenilalanina por tirosina na posição 200 (polimorfismo Phe200Tyr) no isotipo 1 do gene da β -tubulina, em isolados resistentes de *H. contortus*, *T. colubriformis* e *O. circumcincta* (Kwa et al. 1994, 1995, Elard et al. 1996, 1999, Silvestre & Humbert 2000). Tal polimorfismo também tem sido associado à resistência às LMs (Mottier & Prichard 2008). Já foram descritas outras mutações, menos frequentes: no códon 167 (Phe167Tyr) em *H. contortus* e *T. circumcincta* (Silvestre & Cabaret 2002), modificando também o códon TTC para TAC; e no códon 198 (Glu200Ala), que codifica alanina em vez de glutamato em isolados resistentes, em *H. contortus* resistente a BZs (Ghisi et al. 2007, Rufener et al. 2009a), alterando o códon GAA para GCA. Essas mutações nos códons 167, 198 e 200 podem, então, ser utilizadas como marcadores para a detecção de resistência aos BZs nesses parasitos, sendo importante conhecer os efeitos da associação entre os SNPs e o nível de homozigose/heterozigose presente (Silvestre & Cabaret 2002, Barrère et al. 2012). Barrère et al. (2012) indicam que os testes de resistência para BZs no campo deveriam avaliar a heterozigose dos SNPs 167 e 200 para obter melhores resultados. Protocolos de PCR convencional e em tempo real (rt-PCR) foram analisados para a detecção de SNPs nos códons 167 e 200 na β -tubulina (Samson-Himmelstjerna 2006). Para a determinação da resistência associada ao códon TAC na posição 200, técnicas de PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism* ou polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) foram desenvolvidas para *H. contortus* (Tiwari et al. 2006) e *T. circumcincta* (Shayan et al. 2007). A técnica de pirosequenciamento também se mostrou rápida e adequada para a detecção múltipla de SNPs (Samson-Himmelstjerna et al. 2007). A quantificação dos alelos de resistência/suscetibilidade no DNA extraído de pool de larvas de nematóides pode ser feita usando as técnicas de PCR em tempo real e pirosequenciamento, permitindo uma avaliação sensível, confiável e economicamente acessível do nível de resistência em populações de *H. contortus* no campo (Höglund et al. 2009, Samson-Himmelstjerna et al. 2009b).

Muito embora não se tenham testes moleculares disponíveis para LMs, LEV ou tetra-hidropirimidinas em quaisquer espécies de parasitos, a base molecular da resistência para tais drogas recebe muita atenção e estudos. Foi relatado que quatro conjuntos de proteínas contribuem para a resistência ao LEV em *Caenorhabditis elegans*, sendo que o principal foco dos estudos para a expressão ou detecção de polimorfismos associados à resistência ao LEV em nematóides são os receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR) (Martin et al. 2012). Foi demonstrado que propriedades de ligação ao receptor de LEV em *H. contortus* não sofreram variação significativa com a resistência à droga e,

a partir de análises de sequência e de RFLP em um gene nAChR (*hca1*) em várias populações de *H. contortus* resistentes ao IVE, foi observado polimorfismo, mas sem associação com a resistência (Hoelstra et al. 1997). Com relação às LMs, o mecanismo de resistência parece ser complexo, associado a muitas mutações em diferentes loci. Estudos sugerem que a resistência à IVM pode envolver alterações em transportadores de drogas, como a glicoproteína-P (P-gp, do inglês *P-glycoprotein*) e canais de cloro controlados pelo glutamato (Xu et al. 1998, Wolstenholme & Rogers 2005). A resistência à IVM também tem sido associada a alterações alélicas no isotipo 1 do gene da β -tubulina, o locus chave envolvido na resistência aos BZs, e a proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas (MRP, do inglês *multi-drug resistance*), juntamente com membros da família de transportadores do tipo ABC (do inglês *ATP binding cassette*) (Xu et al. 1998, Bourguinat et al. 2007, Prichard 2007).

Recentemente, o monepantel foi introduzido no mercado da Nova Zelândia como o primeiro membro da nova classe de drogas sintéticas nematocidas chamada Derivados de Amino Acetonitrila (AADs, do inglês *Amino-Acetonitrile Derivatives*). O alvo do monepantel (um nAChR específico de nematoide da subfamília DEG-3) e um conjunto de mutações associadas à sensibilidade reduzida a AADs em *H. contortus* também foram descritos (Kaminsky et al. 2008, Rufener et al. 2009b). Tais conhecimentos genéticos poderão ser úteis para o diagnóstico molecular da resistência. Contudo, como as mutações neste caso foram induzidas por seleção experimental, e enquanto não há isolados de parasitos de campo resistentes ao monepantel, não está claro se elas serão de importância prática (Demeler et al. 2012b).

Diagnóstico de resistência aos BZs em tricostrongilídeos. Como o teste de genotipagem de uma única larva ou verme adulto é muito trabalhoso e relativamente caro, os testes moleculares devem ser desenvolvidos para PCR em tempo real ou pirsequenciamento, a fim de torná-los adequados e viáveis ao uso na rotina laboratorial com amostras de campo. Somente com um diagnóstico baseado no uso de pool de amostras de DNA de larvas, será possível disponibilizar os testes de resistência molecular para uso rotineiro. A pesquisa para o desenvolvimento de testes moleculares pode ser justificável principalmente para espécies em que o problema da resistência é amplamente distribuído, além de auxiliar a busca por estratégias de manejo que possam retardar o desenvolvimento de resistência.

Para se iniciar o diagnóstico de resistência com amostras de campo, é feita a amplificação no isotipo 1 do gene da β -tubulina para obter uma quantidade suficiente de DNA, por meio de duas PCRs consecutivas (*nested-PCR*). Segue-se, então, com a identificação das espécies *T. circumcincta*, *H. contortus* e *T. colubriformis*, a partir da análise de polimorfismo nos locais de restrição da enzima *RsaI* no segmento amplificado desse gene, usando a técnica de RFLP. Esse método apresentou a vantagem de superar as limitações de identificação morfológica dos estágios larvais de espécies de nematoides (Coles et al. 2006). Larvas de *T. colubriformis* armazenadas por um mês a 4°C foram corretamente genotipadas, enquanto larvas de *T. circumcincta*

mantidas em nitrogênio líquido foram menos eficientemente amplificadas. Assim, é recomendado o uso de larvas "frescas" para a obtenção de resultados confiáveis.

O princípio do diagnóstico de resistência aos BZs depende de um sistema de amplificação por mutação refratária (ARMS, do inglês *Amplification Refractory Mutation System*). Essa técnica permite a genotipagem de SNPs, usando um conjunto de quatro iniciadores (dois iniciadores não específicos - primers controle, e dois específicos de alelo - primers internos), consistindo em uma reação de PCR alelo-específica (Fig. 2). Como mostra a referida figura, foram utilizados dois primers controles (*forward* e *reverse*) e dois primers internos específicos (um *forward*, que se liga a um alelo, e um *reverse*, que se liga ao outro alelo), resultando em três diferentes padrões de bandas (um controle e dois específicos). A concentração de iniciadores pode alterar a especificidade da PCR, e deve ser verificada com grande precisão, a fim de garantir uma eficiente competição entre os iniciadores. Isolados de parasitos reconhecidamente suscetíveis e resistentes devem ser utilizados como padrão e testados para validar a genotipagem de populações desconhecidas (Coles et al. 2006).

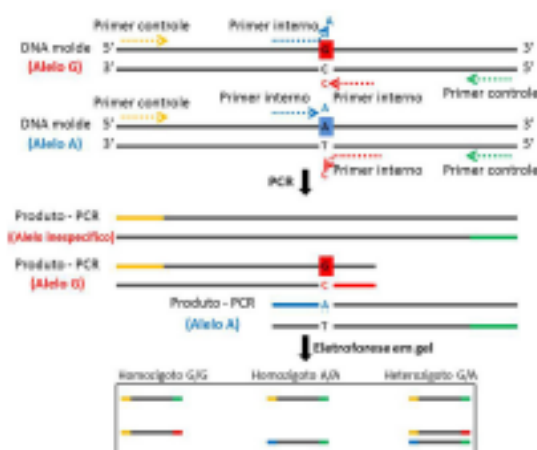


Fig.2. Genotipagem de SNPs pela técnica de PCR alelo-específica ou PCR baseada no sistema de amplificação por mutação refratária (ARMS) (Fortes 2011).

Foi determinado que o limite de detecção da resistência aos BZs, por meio de diagnóstico molecular, seja com um número de 100, 50, 35 e 20 parasitos para, respectivamente, 4, 8, 10 e 12% de vermes resistentes na população, a fim de encontrar pelo menos um indivíduo resistente ($p=0,002$) (Elard et al. 1999). Em uma população mista de nematoides, a frequência de alelos dependerá da proporção de espécies na população, e a identificação de genótipos resistentes homocigóticos em quaisquer espécies poderia sugerir a presença de resistência (Coles et al. 2006).

Ainda são poucas as informações de correlação entre a presença de mutações associadas à resistência e a eficácia de droga esperada, dificultando a interpretação clínica dos dados moleculares. Recentemente, Högjund et al. (2009)

enquanto o TRCOF detectou resistência ao albendazol em apenas dois rebanhos. Em três rebanhos cuja eficácia da droga pelo TRCOF foi de 100, 99 e 97%, foram encontradas frequências muito altas de alelos resistentes de 95, 97 e 100%. A disparidade nos resultados sugere ser muito difícil definir recomendações ideais para medidas de controle parasitário com base exclusivamente em dados moleculares (Kaplan & Vidyashankar 2012).

Como mostrado, os testes moleculares parecem ser mais sensíveis que o TRCOF na detecção da presença de resistência anti-helmíntica em um rebanho. Mas o significado prático da resistência genotípica relacionada à eficácia esperada da droga, principalmente para produtos de um mesmo grupo, ainda não está claro. É comum a técnica de TRCOF detectar resistência a um anti-helmíntico e, ao mesmo tempo, alta eficácia a outro do mesmo grupo. Uma vez que marcadores moleculares de resistência aos BZs não são específicos de uma só droga, o uso de dados moleculares para a escolha de drogas a serem utilizadas no campo ainda exige uma maior compreensão (Kaplan & Vidyashankar 2012). Os autores discutiram ainda outros pontos críticos: quando a resistência a um grupo de drogas é multi-alelica, torna-se necessário conhecer a contribuição relativa de cada alelo para a manifestação do fenótipo; a resistência a qualquer droga é espécie-específica, mas as infecções mistas nos animais são muito comuns, sendo necessário o desenvolvimento de testes moleculares capazes de detectar resistência em múltiplas espécies, ou testes separados para as espécies importantes.

A grande dificuldade para o diagnóstico com base molecular, é ter a certeza de que a mutação associada a resistência à determinada droga seja a única mutação responsável em uma espécie particular. Esse desafio pode ser exemplificado pela existência de mais de um ponto de mutação de resistência aos BZs em certos nematóides de ovinos. No caso das LMs, se as diferentes espécies de nematóides têm diferentes mecanismos para impedir a ação das drogas, a dificuldade para o desenvolvimento e a utilização de testes torna-se ainda maior. No entanto, como não há nenhum teste *in vitro* de confiabilidade reconhecida para a resistência às LMs, a necessidade de testes moleculares é muito grande (Coles et al. 2006).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maioria das estratégias de controle de nematóides gastrointestinais empregadas em criações intensivas de ovinos e caprinos ainda depende do frequente uso de anti-helmínticos. No entanto, o grande número de relatos de parasitos resistentes a um ou mais anti-helmínticos utilizados vem inviabilizando os programas de controle sanitário. É evidente a necessidade de adoção de estratégias sustentáveis, incluindo o controle químico, ambiental e imunológico, visando substituir os esquemas baseados no uso exclusivo de anti-helmínticos, para diminuir a pressão de seleção na população de parasitos. Novos conceitos, como a manutenção da população de parasitos em *refúgio*, não expostos a anti-helmínticos, obtida principalmente com o uso de tratamento seletivo dos animais, precisam ser amplamente difundidos entre produtores e profissionais da área.

Como visto, a rapidez com que ocorre a propagação da resistência anti-helmíntica, com o comércio de animais, é preocupante e reforça a necessidade urgente de testes diagnósticos sensíveis e economicamente acessíveis para a detecção e o monitoramento da resistência. Devido ao grande impacto que a resistência possui em relação à produção e ao bem-estar de pequenos ruminantes, torna-se cada vez mais importante o seu diagnóstico preciso e precoce. Faz-se necessário aprimorar os métodos conhecidos às condições dos produtores, com a inclusão de testes para detectar a resistência na rotina de programas sanitários, como o TRCOF. Para isso, uma série de testes *in vitro* ainda precisa ser padronizada, a fim de permitir sua correta execução e interpretação em diferentes laboratórios. Infelizmente, os esforços para a obtenção do diagnóstico da resistência anti-helmíntica e a conscientização de profissionais da área acerca desse problema ainda são insuficientes.

Espera-se que o uso crescente de modernas técnicas de sequenciamento genômico (o genoma completo do *H. contortus* será publicado em breve, Beech 2013) propicie avanços na compreensão do mecanismo molecular (ou mecanismos moleculares) da resistência anti-helmíntica, permitindo o aprimoramento de técnicas de monitoramento rápido. A obtenção de um diagnóstico da resistência mais precoce e acessível no campo pode auxiliar a tomada de decisão quanto à escolha do tipo de estratégia de controle parasitário a ser utilizado. Para isso, é extremamente importante haver orientação profissional adequada aos produtores sobre o uso racional de anti-helmínticos, buscando manter a eficácia das drogas e retardar o fenômeno da resistência. Recomenda-se que, tanto o pesquisador como o profissional ligado à área de sanidade, tenha interesse na leitura das recomendações técnicas. Deve-se utilizar o TRCOF uma vez ao ano, com o objetivo de monitorar a eficácia, e substituir produtos que apresentem percentuais abaixo de 80%. Espera-se que, com isso, possa-se contribuir para a sustentabilidade da pecuária nacional, visando obter melhores condições de saúde, tanto para os animais como para a comunidade.

Agradecimentos. - À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/REUNI), pela concessão de bolsa de doutorado à Fernanda S. Fortes.

REFERÊNCIAS

- Almeida G.D., Feltz D.C., Heckler R.P., Borges D.G.L., Onizuka M.K.V., Tinoco L.E.R., Paiva F. & Borges R.A. 2013. Ivermectin and moxidectin resistance characterization by larval migration inhibition test in field isolates of *Cooperia* spp. in beef cattle, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Vet. Parasitol.* 191:59-65.
- Alvarez-Sanchez M.A., Perez Garcia J., Bartley D., Jackson F. & Rojo-Vazquez R.A. 2005. The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. *Exp. Parasitol.* 110:56-61.
- Barrère V., Alvarez L., Suarez G., Ceballos L., Moreno L., Lanusse C. & Prichard R.K. 2012. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the β -tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 186:344-349.
- Beech R. 2013. Comunicação pessoal (Institute of Parasitology, McGill University, Canada).
- Bourguinat C., Pion S.D.S., Kamgno J., Gardon J., Duke B.O.L., Bouattiq M.

- & Prichard R.K. 2007. Genetic selection of low fertile *Onchocerca volvulus* by ivermectin treatment. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 1:1-11.
- Calvete C., Calvete R., Ferrer L.M., Ramos J.J., Lacasta D. & Uriarte J. 2011. Management and environmental factors related to benzimidazole resistance in sheep nematodes in Northeast Spain. *Vet. Parasitol.* 23:193-203.
- Cezar A.S., Toscan G., Camillo G., Sangioni L.A., Ribas H.D. & Vogel E.S.F. 2010. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 173:157-160.
- Chagas A.C.S., Nicruis S.C.M. & Molento M.B. 2011. Manual Prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes. Empresa Informação Tecnológica, Brasília, DF. 153p.
- Chagas A.C.S., Katiki L.M., Silva L.C., Giglioti R., Esteves S.N., Oliveira M.C.S. & Barioni Júnior W. 2013. *Haemonchus contortus*: A multiple-resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. *Parasitol. Int.* 62:1-6.
- Coles G.C., Tritschler J.J. II, Giordano D.J., Laste N.J. & Schmidt A.L. 1988. A larval development test for detection of anthelmintic resistant nematodes. *Res. Vet. Sci.* 45:50-53.
- Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F.H.M., Geerts S., Klei T.R., Taylor M.A. & Waller P.J. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44:35-44.
- Coles G.C., Jackson P., Pomroy W.R., Prichard R.K., Samson-Himmelfart G., Silvestre A., Taylor M.A. & Vercruyse J. 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 136:167-185.
- Demeler J., Kuttler U. & Samson-Himmelfart G. 2010. Adaptation and evaluation of three different *in vitro* tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle. *Vet. Parasitol.* 170:61-70.
- Demeler J., Kleinschmidt N., Kuttler U., Koopmann R. & Samson-Himmelfart G. 2012a. Evaluation of the Egg Hatch Assay and the Larval Migration Inhibition Assay to detect anthelmintic resistance in cattle parasitic nematodes on farms. *Vet. Parasitol.* 61:614-618.
- Demeler J., Schein E. & Samson-Himmelfart G. 2012b. Advances in laboratory diagnosis of parasitic infections of sheep. *Vet. Parasitol.* 189:52-64.
- Díaz-Batós P., Pedreira J., Sánchez-Andrade R., Francisco I., Suárez J.L., Díaz P., Panadero R., Arias M., Palencia A., Paz-Silva A. & Morondo P. 2008. Field evaluation for anthelmintic-resistant ovine gastrointestinal nematodes by *in vitro* and *in vivo* assays. *J. Parasitol.* 94:925-928.
- Dobson R.J., Hosking B.C., Jacobson C.L., Cotter J.L., Beaser R.B., Stein P.A. & Reid S.A. 2012. Preserving new anthelmintics: A simple method for estimating faecal egg count reduction test (FECRT) confidence limits when efficacy and/or nematode aggregation is high. *Vet. Parasitol.* 186:79-92.
- Dolinski M., Křitková Alžběta & Várady M. 2012. Is the micro-agar larval development test reliable enough to detect ivermectin resistance? *Parasitol. Res.* 111:2201-2204.
- Douch P.G. & Morum P.E. 1994. The effects of anthelmintics on ovine larval nematode parasite migration *in vitro*. *Int. J. Parasitol.* 24:321-326.
- Elard L., Comes A.M. & Humbert J.F. 1996. Sequences of beta-tubulin cDNA from benzimidazole-susceptible and -resistant strains of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. *Mol. Biochem. Parasitol.* 79:249-253.
- Elard L., Cabaret J. & Humbert J.F. 1999. PCR diagnosis of benzimidazole-susceptibility or -resistance in natural populations of the small ruminant parasite, *Teladorsagia circumcincta*. *Vet. Parasitol.* 80:231-237.
- Folz S.D., Pax R.A., Thomas E.M., Bennett J.L., Lee B.L. & Conder G.A. 1987. Motility response of benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* larvae to several anthelmintics. *Proc. Helminthol. Soc. Washington* 54:249-253.
- Fortes F.S. 2011. Marcadores moleculares SNP: conceitos e aplicações na resistência anti-helmíntica, p.83-91. In: Chagas A.C.S., Nicruis S.C.M. & Molento M.B. 2011. Manual Prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes. Empresa Informação Tecnológica, Brasília, DF.
- Fortes F.S., Klotzer F.S., Schaller A.S., Bier D., Buzatti A., Yoshitani U.Y. & Molento M.B. 2013. Evaluation of resistance in a selected field strain of *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin using the Larval Migration on Agar Test. *Pesq. Vet. Bras.* 33(2):183-187.
- Geary T. 2013. Comunicação pessoal (Institute of Parasitology, McGill University, Canada).
- Ghali M., Kaminsky R. & Moser P. 2007. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Vet. Parasitol.* 144:313-320.
- Gill J.H. & Lacey E. 1998. Avermectin/milbemycin resistance in trichostrongylid nematodes. *Int. J. Parasitol.* 28:863-877.
- Gill J.H., Redwin J.M., Van Wyk J.A. & Lacey E. 1991. Detection of resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 21:771-776.
- Gill J.H., Redwin J.M., Van Wyk J.A. & Lacey E. 1995. Avermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus*-effects of ivermectin resistance. *Int. J. Parasitol.* 25:463-470.
- Hart E.H., Morphew R.M., Bartley D.J., Millares P., Wolf B.T., Brophy P.M. & Hamilton J.V. 2012. The soluble proteome phenotypes of ivermectin resistant and ivermectin susceptible *Haemonchus contortus* females compared. *Vet. Parasitol.* 190:104-113.
- Hoekstra R., Vloser A., Wiley L.J., Weiss A.S., Sangster N.C. & Roos M.H. 1997. Characterisation of an acetylcholine receptor gene of *Haemonchus contortus* in relation to levamisole resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* 84:179-187.
- Höglund J., Gustafsson K., Ljungström B.L., Engström A., Donnan A. & Skuce P. 2009. Anthelmintic resistance in Swedish sheep flocks based on a comparison of the results from the faecal egg count reduction test and resistant allele frequencies of the beta-tubulin gene. *Vet. Parasitol.* 161:60-68.
- Hubert J. & Kerboeuf D. 1992. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet. Rec.* 130:442-446.
- Kaminsky R., Ducray P., Jung M., Clover R., Rafener L., Bouvier J., Weber S.S., Wenger A., Wieland-Berghausen S., Goebel T., Gauvry N., Prutrat F., Skripitsky T., Froelich O., Kornob-Okla C., Westlund B., Studer A. & Mäser P. 2008. A new class of anthelmintics effective against drug resistant nematodes. *Nature*. 452:176-180.
- Kaplan R.M. & Vidyaashankar A.N. 2012. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 186:70-78.
- Kerboeuf D., Chambrier P., Vern Y. & Aycard J. 1999. Flow cytometry analysis of drug transport mechanisms in *Haemonchus contortus* susceptible or resistant to anthelmintics. *Parasitol. Res.* 85:118-123.
- Kotze A.C., Le Jambre L.F. & O'Grady J. 2006. A modified larval migration assay for detection of resistance to macrocyclic lactones in *Haemonchus contortus*, and drug screening with Trichostrongylidae parasites. *Vet. Parasitol.* 137:294-305.
- Kwa M.S.G., Veenstra J.G. & Roos M.H. 1994. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. *Mol. Biochem. Parasitol.* 63:299-303.
- Kwa M.S.G., Veenstra J.G., Dijk M.V. & Roos M.H. 1995. Beta-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* 246:500-510.
- Leathwick D.M., Miller C.M., Atkinson D.S., Haack N.A., Alexander R.A., Oliver A.M., Waggoner T.S., Potter J.F. & Sutherland L.A. 2006. Drenching adult ewes: Implications of anthelmintic treatments pre- and post-lambing on the development of anthelmintic resistance. *N. Z. Vet. J.* 54:297-304.
- Leveck B., Dobson R.J., Speybroeck N., Vercruyse J. & Charlier J. 2012. Novel insights in the faecal egg count reduction test for monitoring drug efficacy against gastrointestinal nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 188:391-396.

- Little P.R., Hodges A., Watson T.G., Seed J.A. & Maeder S.J. 2010. Field efficacy and safety of an oral formulation of the novel combination anthelmintic, derquantel-abamectin, in sheep in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 58:121-129.
- Love S.J.C. & Coles G.C. 2002. Anthelmintic resistance in sheep worms in New South Wales, Australia. *Vet. Rec.* 150:87.
- Martin P.J. & LeJambre L.F. 1979. Larval paralysis test as an in vitro assay of levamisole and morantel tartrate resistance in *Ostertagia*. *Vet. Sci. Commun.* 3:159-164.
- Martin P.J., Anderson N. & Jarrett R.G. 1985. Resistance to benzimidazole anthelmintics in field strains of *Ostertagia* and *Nematodirus* in sheep. *Aust. Vet. J.* 62:38-43.
- Martin P.J., Anderson N. & Jarrett R.G. 1989. Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and in vitro assays. *Aust. Vet. J.* 66:236-240.
- Martin R.J., Robertson A.P., Buxton S.K., Beech R.N., Charvet C.L. & Neveu C. 2012. Levamisole receptors: a second awakening. *Trends Parasitol.* 28:289-296.
- Martínez-Valladares M., Fariolero M.R., Fernández-Pato N., Cordero-Pérez C., Castañón-Ordóñez L. & Rojo-Vázquez F.A. 2012. Characterization of a multidrug resistant *Teladorsagia circumcincta* isolate from Spain. *Parasitol. Res.* 110:2083-2087.
- Martínez-Valladares M., Martínez-Pérez J.M., Robles-Pérez D., Cordero-Pérez C., Fariolero M.R., Fernández-Pato N., Castañón-Ordóñez L. & Rojo-Vázquez F.A. 2013. The present status of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematode infections of sheep in the northwest of Spain by *in vivo* and *in vitro* techniques. *Vet. Parasitol.* 191:177-181.
- McKenna P.B. 1998. The effect of previous cold storage on the subsequent recovery of infective third stage nematode larvae from sheep faeces. *Vet. Parasitol.* 89:167-172.
- McKenna P.B. 2010. Update on the prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 58:172-173.
- Miller C.M., Waghorn T.S., Leathwick D.M. & Gilmour M.L. 2006. How repeatable is a faecal egg count reduction test? *N. Z. Vet. J.* 54:323-328.
- Molento M.B. & Prichard R.K. 2001. Effect of multigrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Pesq. Vet. Bras.* 21:117-121.
- Molento M.B., Fortes F.S., Pendelek D.A.S., Borges F.A., Chagas A.C.S., Torres-Acosta J.F.J. & Gelhof P. 2011. Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. *Vet. Parasitol.* 180:126-132.
- Molento M.B., Fortes F.S. & Kloster F.S. 2012. Diagnóstico da resistência anti-helmíntica com a utilização de métodos coproparasitológicos. *Anais XVII Congr. Parasitol. Vet., São Luís, MA*, p.15-16.
- Mottler M.L. & Prichard R.K. 2008. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. *Pharmacogenet. Genomics* 18:129-140.
- Paley C., Silvestre A., Sauve C., Cortet J. & Cabaret J. 2010. Benzimidazole resistance in *Trichostrongylus axei* and in sheep: long-term monitoring of affected sheep and genotypic evaluation of the parasite. *Vet. Journal* 183:68-74.
- Papadopoulos E., Galidis E. & Ptochos S. 2012. Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A selected review. *Vet. Parasitol.* 189:85-88.
- Prichard R. 2007. Ivermectin resistance and overview of the consortium for anthelmintic resistance SNPs. *Expert Opin. Drug Discov.* 2(Suppl. 1): S41-S52.
- Rinaldi L., Coles G.C., Murelli M.P., Musella V. & Cringoli G. 2011. Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep. *Vet. Parasitol.* 177:345-352.
- Roberts F.H.S. & O'Sullivan J.P. 1950. Methods for egg count and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Aust. J. Agr. Res.* 1:99-102.
- Roberts J.L. & Swan R.A. 1981. Quantitative studies of ovine haemonchosis. I. Relationship between faecal egg counts and total worm counts. *Vet. Parasitol.* 8:165-171.
- Roeder F., Larsen J.W.A., Anderson N., Campbell A.J.D., Anderson G.A., Gaiser R.B. & Jex A.R. 2012. A molecular diagnostic tool to replace larval culture in conventional faecal egg count reduction testing in sheep. *PLoS ONE* 7(5):e37327. doi:10.1371/journal.pone.0037327
- Rufener L., Kaminsky R. & Mäser P. 2009a. In vitro selection of *Haemonchus contortus* for benzimidazole resistance reveals a mutation at amino acid 198 of beta-tubulin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 168:120-122.
- Rufener L., Mäser P., Roditi I. & Kaminsky R. 2009b. *Haemonchus contortus* acetylcholine receptors of the DEG-3 subfamily and their role in sensitivity to monepantel. *PLoS Pathog.* 5(4):e1000380. doi: 10.1371/journal.ppat.1000380
- Samsón-Himmelsjöerna G. 2006. Molecular diagnosis of anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 136:99-107.
- Samsón-Himmelsjöerna G., Harder A. & Snieider T. 2002. Quantitative analysis of ITS2 sequences in trichostrongyle parasites. *Int. J. Parasitol.* 32:1529-1535.
- Samsón-Himmelsjöerna G., Blackhall W.J., McCarthy J.S. & Skuce P.J. 2007. Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes. *Parasitology* 134:1077-1086.
- Samsón-Himmelsjöerna G., Coles G.C., Jackson F., Bauer C., Bongsteede F., Clark V.Y., Demeler J., Donnan A., Dorry P., Epe C., Harder A., Hogland J., Kaminsky R., Kerboeuf D., Küttler U., Papadopoulos E., Poudi J., Small J., Varady M., Verduynse J. & Wirthler N. 2009a. Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. *Parasitol. Res.* 105:825-834.
- Samsón-Himmelsjöerna G., Walsh T.K., Donnan A.A., Carrière S., Jackson F., Skuce P.J., Rohn K. & Wolstenholme A.J. 2009b. Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing. *Parasitology* 136:349-358.
- Sangster N.C., Whitlock H.V., Russ L.G., Gunawan M., Griffin D.L. & Kelly J.D. 1979. *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* resistant to levamisole, morantel tartrate and thiabendazole: occurrence of field strains. *Res. Vet. Sci.* 27:106-110.
- Shayan P., Elami A. & Borji H. 2007. Innovative restriction site created PCR-RFLP for detection of benzimidazole resistance in *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitol. Res.* 100:1063-1068.
- Scaryny-Morais E.A., Bianchin I., Silva K.F., Catto J.R., Honer M.R. & Paiva E. 2010. Resistência anti-helmíntica de nematódeos gastrointestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 30:229-236.
- Silvestre A. & Humbert J.F. 2000. A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites. *Exp. Parasitol.* 95:271-276.
- Silvestre A. & Cabaret J. 2002. Mutation in position 167 of isotype 1 beta-tubulin gene of trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? *Mol. Biochem. Parasitol.* 120:297-300.
- Sutherland I.A. & Lee D.L. 1990. A larval paralysis assay for the detection of thiabendazole resistance in trichostrongyles. *Parasitology* 100:131-135.
- Taylor M.A., Hunt K.R. & Goodyear K.L. 2002. Anthelmintic resistance detection methods. *Vet. Parasitol.* 103:183-194.
- Tiwari J., Kumar S., Kolte A.P., Swarnkar C.P., Singh D. & Pathak K.M. 2006. Detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using RFLP-PCR technique. *Vet. Parasitol.* 138:301-307.
- Torres-Acosta J.F.J., Mendoza-de-Gives P., Aguilar-Caballero A.J. & Cuñill-Ordaz J.A. 2012. Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. *Vet. Parasitol.* 189:89-96.
- Ueno H. & Gonçalves P.C. 1998. Manual para Diagnóstico das Helmintoszes de Ruminantes. 4ª ed. Presso Color, Salvador. 143p.
- Van Wyk J.A., Stemon S.O., Van der Mrewe J.S., Vordrecht R.J. & Viljoen R.G. 1999. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 66:273-284.
- Virady M., Cernanská D. & Corba J. 2006. Use of two in vitro methods for the detection of anthelmintic resistant nematode parasites on Slovak sheep farms. *Vet. Parasitol.* 135:325-331.
- Verlósimo C.J., Niclura S.C.M., Alberti A.L.L., Rodrigues C.F.C., Barbosa

- C.M.P., Chiebao D.P., Cardoso D., da Silva G.S., Pereira J.R., Margallo L.F.F., da Costa R.L.D., Nardon R.F., Ueno T.E.H., Cerci V.C.L.M. & Molento M.B. 2012. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. *Vet. Parasitol.* 187:209-216.
- Wagland B.M., Jones W.O., Hirsh L., Bendisøen T. & Emery D.L. 1992. A new simplified assay for larval migration inhibition. *Int. J. Parasitol.* 22:1183-1185.
- Wolstenholme A.J. & Rogers AT. 2005. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology* 131 (Suppl.):S85-S95.
- Xu M., Molento M., Blackhall W., Ribeiro P., Beech R. & Prichard R. 1998. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91:327-335.

ANEXO 13 – ARTIGO PUBLICADO (CAPÍTULO 2)

Pesq. Vet. Bras. 33(2):183-187, fevereiro 2013

Evaluation of resistance in a selected field strain of *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin using the Larval Migration on Agar Test¹

Fernanda S. Fortes^{2*}, Fernando S. Kloster², Andressa S. Schafer², Daniele Bier²,
Andréia Buzatti², Ursula Y. Yoshitani² and Marcelo B. Molento²

ABSTRACT. Fortes F.S., Kloster F.S., Schafer A.S., Bier D., Buzatti A., Yoshitani U.Y. & Molento M.B. 2013. Evaluation of resistance in selected field strain of *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin using the Larval Migration on Agar Test. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(2):183-187. Laboratório de Doenças Parasitárias, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários 1540, Curitiba, PR 80035-050, Brazil. E-mail: fortesfs@gmail.com

Haemonchus contortus is one of the most common and economically significant causes of disease in small ruminants worldwide, and the control programs of parasitic nematodes - including *H. contortus* - rely mostly on the use of anthelmintic drugs. The consequence of the use of this, as the sole sanitary strategy to avoid parasite infections, was the reduction of the efficacy of all chemotherapeutic products with a heavy selection for resistance. The widespread of anthelmintic resistance and the difficulty of its early diagnosis has been a major concern for the sustainable parasite management on farms. The objective of this research was to determine and compare the ivermectin (IVM) and moxidectin (MOX) effect in a selected field strain of *H. contortus* with a known resistance status, using the *in vitro* larval migration on agar test (LMAT). Third stage larvae of the selected isolate were obtained from faecal cultures of experimentally infected sheep and incubated in eleven increasing diluted concentrations of IVM and MOX (6, 12, 24, 48, 96, 192, 384, 768, 1536, 3072 and 6144 µg/mL). The dose-response sigmoidal curves were obtained using the R^2 value of >0.90 and the lethal concentration (LC_{50}) dose for the tested anthelmintic drugs using a four-parameter logistic model. The LC_{50} value for MOX was significantly lower than IVM (1.253 µg/mL and 91.06 µg/mL), identifying the *H. contortus* isolate as considerably less susceptible to IVM compared to MOX. Furthermore, the LMAT showed a high consistency ($p < 0.0001$) and provided to be a useful diagnostic tool for monitoring the resistance status of IVM and MOX in *H. contortus* field isolate, as well as it may be used for official routine drug monitoring programs under the Ministry of Agriculture (MAPA) guidance.

INDEX TERMS: *Haemonchus contortus*, anthelmintics, ivermectin, moxidectin, sheep, macrocyclic lactones, *in vitro*, nematodes, efficacy.

RESUMO. [Avaliação da resistência em um isolado de campo selecionado de *Haemonchus contortus* à ivermectina e moxidectina usando o Teste de Migração de Larvas em Ágar.] *Haemonchus contortus* é uma das causas

mais comuns e economicamente significativas de doença em produções de pequenos ruminantes em todo o mundo, e os programas de controle de parasitas nematóides - incluindo *H. contortus* - baseiam-se principalmente no uso de drogas anti-helmínticas. A consequência da utilização desses compostos, como sendo a única estratégia sanitária para evitar infecções por parasitas, tem sido a redução da eficácia de todos os produtos quimioterápicos, selecionando fortemente para resistência. O desenvolvimento generalizado da resistência anti-helmíntica e a dificuldade de seu diagnóstico precoce têm sido uma grande preocupação para o manejo sustentável de parasitas no campo. O obje-

¹ Received on August 10, 2012.

Accepted for publication on November 23, 2012.

² Laboratório de Doenças Parasitárias, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua dos Funcionários 1540, Curitiba, PR 80035-050, Brazil. *Autor para correspondência: fortesfs@gmail.com

³ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Fátima de Carmo, Km 9, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

tivo desta pesquisa foi determinar e comparar o efeito da ivermectina (IVM) e da moxidectina (MOX) em um isolado de campo selecionado de *H. contortus* com um estado de resistência conhecido, utilizando o teste *in vitro* de migração de larvas em ágar (LMTA). Larvas de terceiro estágio de um isolado de *H. contortus* selecionado foram obtidas a partir de culturas de fezes de ovinos infectados experimentalmente e incubadas em onze concentrações diluídas crescentes de IVM e MOX (6, 12, 24, 48, 96, 192, 384, 768, 1536, 3072 e 6144 µg/ml). As curvas sigmóides de dose-resposta foram obtidas utilizando o valor de $R^2 > 0,90$ e a dose de concentração letal (CL_{50}) para as drogas anti-helmínticas testadas, utilizando um modelo logístico de quatro parâmetros. O valor de CL_{50} para MOX foi significativamente menor do que para IVM (1,253 µg/ml e 91,06 µg/ml.), identificando o isolado de *H. contortus* como consideravelmente menos suscetível à IVM em comparação à MOX. Além disso, o LMTA mostrou uma alta consistência ($p < 0,0001$) e pode ser uma ferramenta útil de diagnóstico para monitorar o status de resistência de IVM e MOX em isolado de campo de *H. contortus*, assim como ser utilizado de forma oficial e em rotina para programas de monitoramento das drogas sob a demanda do Ministério da Agricultura (MAPA).

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Haemonchus contortus*, anti-helmínticos, ivermectina, moxidectina, ovinos, lactonas macrocíclicas, *in vitro*, nematóides, eficácia.

INTRODUCTION

Haemonchus contortus is one of the most important gastrointestinal nematodes of small ruminant production worldwide due to its high prevalence and pathogenicity, causing serious economic losses (Kaplan 2004) and anthelmintic drugs are commonly used as the sole method to control this parasite. Nonetheless, the intensive use of all the available compounds has led to the widespread development of anthelmintic resistance in all major sheep producing countries (Van Wyk et al. 1999, Papadopoulos 2008, Molento et al. 2011, Kaplan & Vidyashankar 2012, Veríssimo et al. 2012).

Among the most widely used drugs, the macrocyclic lactones (MLs) such as ivermectin (IVM), an avermectin class compound, and moxidectin (MOX), a milbemycin, have a broad spectrum of activity against parasitic nematodes in livestock and humans. Resistance to these compounds has been detected in different nematodes in Brazil, also *H. contortus* (Echevarria et al. 1996, Thomaz-Soccol et al. 2004, Rosalinski-Moraes et al. 2007, Almeida et al. 2010, Cruz et al. 2010, Sczesny-Moraes et al. 2010, Veríssimo et al. 2012).

There is an urgent need to determine the drug efficacy status to continue to support farm planning and the sustainable use of the remaining effective anthelmintics, reducing the spread of resistant parasites (Coles et al. 2006, Demeler et al. 2010). The gold standard method for detecting anthelmintic resistance is the controlled efficacy test based on the reduction in worm counts after the sacrifice of animals. Although the most reliable test available to date to detect drug resistance, the test is extremely expensive, laborious and time consuming. The faecal egg count reduction test (FECRT), which compares the egg counts performed pre-

and post-treatment can define the percentage of efficacy by reducing egg numbers. Although the method is employed on all anthelmintic classes and has been commonly used to monitor resistance in nematodes, it does not measure the reduction of adult parasite number (Coles et al. 2006, De Graef et al. 2012, Kaplan & Vidyashankar 2012).

Therefore, a rapid and more cost effective diagnosis method for anthelmintic resistance is needed. Various *in vitro* methods have been developed in the last 30 years (Gill et al. 1995, d'Assonville et al. 1996, Molento & Prichard 2001, Taylor et al. 2002, Coles et al. 2006, Demeler et al. 2010), having the main characteristic of avoiding the "animal - *in vivo*" effect (i.e. breed, age, body fat/score), which can significantly alter the drug pharmacokinetics, as a consequence of different rates of absorption, metabolism and the time to reach the target tissues.

Among the *in vitro* methods, the migration tests consist in a simple, rapid and cost effective alternative for the analysis of the effects of a few classes of anthelmintics. The main mechanism to be tested is the muscle paralysis caused to the nematodes, which can be viewed as a reduction of migration when comparing the control and treated groups. The Larval Migration on Agar Test (LMIT) is being used as a diagnostic tool to detect and monitor the resistance to MLs in the Laboratory (d'Assonville et al. 1996, Molento & Prichard 2001, Demeler et al. 2010). Therefore, the objective of the present study was to evaluate and compare the IVM and MOX effect in a *H. contortus*, isolated from a sheep farm with a history of IVM resistance and MOX susceptibility (Veríssimo et al. 2012), using a modified migration test (Molento & Prichard 2001).

MATERIALS AND METHODS

Parasite field isolate and production of faecal culture from the isolate. The parasite field isolate used in this study was obtained from a sheep farm located in São Paulo State, Brazil, with reports of resistance to IVM (16%) and susceptibility to MOX (99%) by the FECRT conducted previously (Veríssimo et al. 2012). The original parasite population was composed by *Haemonchus* sp. (59%), *Cooperia* sp. (22%), *Trichostrongylus* sp. (11%) and *Teladorsagia* sp. (8%). Faecal samples containing nematode eggs were collected from sheep and were submitted to faecal cultures for 7 days to obtain third stage larvae (L₃). The infective L₃ obtained were stored in distilled water under refrigeration until used to artificially infect new parasite-free sheep in order to obtain pure cultures of *H. contortus* (see detail Protocol below).

Experimental infections and the production of faecal cultures 1 and 2 (isolate SP1503Ovt2011). Four lambs were selected and treated orally with oxfendazole 2.5mg/kg body weight (BW) (Oxfaden®, Biovet) and levamisole at 5.0mg/kg/BW (Ripercol® L, Fort Dodge) for three consecutive days, to remove every natural parasite infection. Faecal samples were collected for 4 weeks from the animals to confirm their parasite-free status. After that the animals were kept on worm-free paddocks until the experimental infections.

Two lambs (Group 1) were artificially infected with 8000 L₃ of gastrointestinal nematodes by oral gavage. The infection was allowed to establish for at least 28 days. From day 28 to 34 faecal samples were taken for EPG and larvae culture. The animals were euthanized on day 34 post-infection and the *H. contortus* adults were directly collected from the abomasum. The adult worms

were immediately placed into Petri dishes containing saline solution at 36°C and kept in an incubator for a period of 2-12 hours for completion of the female oviposition. The eggs were harvested and placed in a sedimentation glass. Then, the eggs were mixed with autoclaved horse feces to obtain a monospecific faecal culture (Faecal culture 1).

Two lambs (Group 2) were artificially infected by the oral administration of 8000 L₃ of *H. contortus* obtained from the faecal culture 1. After the confirmation of the establishment of the infection, new faecal cultures were prepared to produce a pure *H. contortus* larval culture (Faecal culture 2). The infective larvae from the faecal culture 2 were identified and stored in distilled water up to 30 days until it was used with the *in vitro* assays. Although not included in the Parasite Isolate Database, the nomenclature code used for the present isolate (SP1503Ovt2011) was based on that of CARS (Consortium for Anthelmintic Resistance and Susceptibility) using the following code: state of origin/code number of the farm sampled/host animal/year of isolation.

In vitro Larval Migration on Agar Test (LMAT). The LMAT was performed following the technique modified by Molento & Prichard (2001). The L₃ collected from the faecal culture 2 were esheathed using 0.3% sodium hypochlorite and when more than 90% of the motile larvae were esheathed, they were washed three times in distilled water and subdivided in groups of 400 L₃ per well in triplicates. Each group of larvae was mixed with distilled water to make a total volume of 0.5ml, while drug dilutions were prepared in separate tubes (total volume of 0.5ml). Eleven drug concentrations were tested (6, 12, 24, 48, 96, 192, 384, 768, 1536, 3072 and 6144 µg/mL) for 1% ivermectin (Ivomec®, Merial Saúde Animal) and 1% moxidectin (Cydectin®, Fort Dodge). The L₃ plus the drug dilutions were placed at 27°C for 6h (first incubation). After that, an 1.4% agar solution was added to the treated larvae plus drug solution and immediately transferred to a previously prepared apparatus made of a Petri dish containing a plastic mesh in the middle of the base, a metal mesh and a plastic cylinder on the top. The apparatus was previously filled with 22ml of distilled water and stored at -20°C allowing the frozen water to cover the mesh. After the addition of the whole content, the apparatus was placed in an incubator for 18h at 27°C under a 150 MHz light bulb, to stimulate the larval migration - out the agar portion. After the second migration, the liquid portion containing the migrated larvae was transferred into a 50ml tube and centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes where the supernatant was removed. The tubes were then vortex and triplicate samples of 1 ml were taken. The final counts were made by the average of the aliquots multiplied by 10.

All experimental procedures reported in this manuscript were examined and approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Federal University of Paraná, Brazil (Protocol 021/2010).

Statistical analysis. The 50% lethal concentration (LC₅₀) and the standard error were measured by a non-linear regression model which resulted in a sigmoidal concentration response curve (four-parameter logistic equation with a variable slope), using the program GraphPad Prism® 5.01. All analyses were carried out after transforming the data into their logarithm ($X = \log X$), before calculating the log LC₅₀ values (LC₅₀ values), 95% confidence intervals and R² values. In addition, the p-values for the LC₅₀ values of IVM and MOX responses were calculated using the same program.

RESULTS

The nematode genera recovered from the faecal culture 2 showed >96% of *Haemonchus contortus* genus followed by <3% of *Cooperia* sp. and *Trichostrongylus* sp. All *in vi-*

tro tests were run with the *H. contortus* L₃ from the faecal culture 2. For the inclusion of experimental data, it was necessary to attend two criteria: a migration ratio of at least 80% in the negative control and R² values > 0.90. The dose-response curves for IVM and MOX drugs using the *in vitro* LMAT are presented in Figure 1.

The statistical analysis of the curves was performed using the LC₅₀ values. The results correctly identified the *H. contortus* isolate resistant to IVM and susceptible to MOX, showing the IVM-LC₅₀ value of 91.06 µg/mL and the MOX-LC₅₀ value of 1.253 µg/mL (Table 1). The results were statistically significant ($p < 0.0001$) for both drugs.

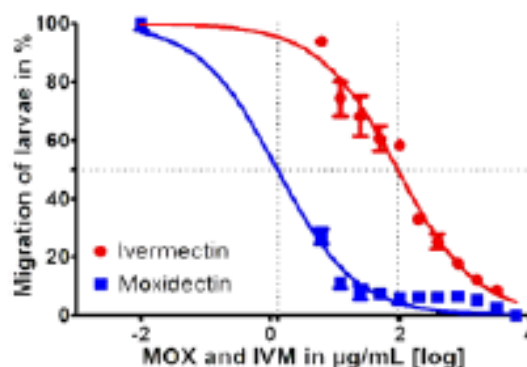


Fig. 1. Dose-response curves obtained with the Larval Migration on Agar Test with the SP1503Ovt2011 isolate of *Haemonchus contortus* using ivermectin (IVM, solid line) and moxidectin (MOX, dashed line). Error bars indicate the standard error. The error bars are not seen where the differences between the values observed for all concentrations tested was 0 or very close to 0.

Table 1. The LC₅₀ values, with the 95% confidence interval (95% CI), log LC₅₀ values, R² and p-values using ivermectin (IVM) and moxidectin (MOX) in the Larval Migration on Agar Test with the isolate SP1503Ovt2011 of *Haemonchus contortus*

	MOX	IVM
LC ₅₀	1.253 µg/mL	91.06 µg/mL
95% CI	0.704-2.229 µg/mL	75.53-109.8 µg/mL
Log LC ₅₀	0.099	1.959
R ²	0.97	0.96
p-value	<0.0001	

DISCUSSION

It is very important to monitor anthelmintic efficacy at regular intervals to detect subtle changes, as early as possible in order to avoid the establishment of anthelmintic resistance. This may be performed by accessible and sensitive *in vitro* diagnostic tests, determining even which drugs are still effective against a particular parasite population to enable the choice of an anthelmintic for therapeutic use in the field (Kaplan 2004, Demeler et al. 2010, Molento et al. 2011). The larval development tests (LDT) are the most commonly employed and was able to easily discriminate between susceptible and resistant parasite isolates.

The LDT showed ability to identify low levels of resistant worms in a population, but the execution of these exams present some difficulties (Dolinská et al. 2012). Another potential alternative that is still being studied for the detection of resistant parasites is the larval migration tests (LMT). The LMT has being used for the detection of drug resistance for IVM, MOX and the benzimidazoles in sheep, goats and cattle nematodes (Wagland et al. 1992, Rabel et al. 1994, Molento & Prichard 2001, Gatongi et al. 2003, Kaplan et al. 2007, Demeler et al. 2010, Borges et al. 2011, Almeida et al. 2012).

The development of IVM resistance and also the concomitant loss of sensitivity to MOX is an ongoing debate (Conder et al. 1993, Shoop et al. 1993, Molento et al. 1999, Ranjan et al. 2002, De Graef et al. 2012). El-Abdellati et al. (2010) suggest that when detecting resistance to IVM the use of any type of MLs is inappropriate. However, the rate of resistance differs between compounds and occurs slower to MOX than to IVM (Ranjan et al. 2002, Le Jambre et al. 2005). While the resistance to one anthelmintic can be detected, another drug of the same class may still remain highly effective (Kaplan & Vidyashankar 2012). Although increasing reports of resistance to MOX in nematodes throughout the world, severe multidrug resistance was detected, with MOX remaining as the drug with better effect (Mortensen et al. 2003, Kaplan et al. 2007). So, our results indicate that MOX could have some potential application in controlling *H. contortus* in sheep on that farm and this might be true to other gastrointestinal nematodes.

The disturbing anthelmintic resistance status previously detected by FECRT was confirmed by the *in vitro* test in the present trial, as shown by the different LD50's. This is in accordance with other reports, where sheep nematode populations showed high resistance against MLs *in vivo* and also were less susceptible *in vitro*, using larval development tests (Hubert & Kerboeuf 1992, Taylor et al. 2002). The problem of anthelmintic resistance, identified in both tests, is possibly the situation that predominates in most of the sheep farms in Brazil. Therefore, we suggest that the Ministry of Agriculture, MAPA could officially adopt *in vitro* tests to be used by drug-monitoring programs. Before that, it is essential to improve and adapt standard operating protocols for running and interpreting the LMAT in order to make this test applicable for routine practice. It is necessary to test different isolates with different status of drug resistance in different laboratories, using the identical protocol, to confirm the reproducibility and repeatability of the LMAT data.

In conclusion, the *in vitro* LMAT described here was successfully used to generate reliable ($p < 0.0001$) dose-response curves for the tested drugs. The obtained LC_{50} value for MOX was 72.67 times lower than for the IVM, identifying this *H. contortus* isolate highly resistant to IVM. The present data also shows the potential of using the LMAT for the analysis of resistance to MLs and can provide a useful diagnostic tool for monitoring anthelmintic resistance.

Acknowledgements. We are very grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support

(Processo no. 559614/2009-8) and to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/REUNI) for providing a doctoral degree scholarship to Fernanda S. Fortes.

REFERENCES

- Almeida G.D., Felix D.C., Heckler R.P., Borges D.G., Onizuka M.K., Tavares L.R., Paves F. & Borges E.A. 2012. Ivermectin and moxidectin resistance characterization by larval migration inhibition test in field isolates of *Cooperia* spp. in beef cattle, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Vet. Parasitol.* (Epub ahead of print)
- Almeida E.A., Garcia K.C.O.D., Borgerson P.R. & Amarante A.F.T. 2010. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. *Parasitol. Int.* 59:622-625.
- Borges E.A., Rosolini J.B., Velludo P.P., Buzzulini C., Costa G.H., Molento M.B. & Costa A.J. 2011. Weak phenotypic reversion of ivermectin resistance in a field resistant isolate of *Haemonchus contortus* by verapamil. *Peq. Vet. Bras.* 31:731-736.
- Coles G.C., Jackson F., Pomroy W.E., Prichard R.K., von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor M.A. & Vercruyse J. 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 136:167-85.
- Conder G.A., Thompson D.P. & Johnson S.S. 1993. Demonstration of co-resistance of *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin. *Vet. Rec.* 132:651-652.
- Cruz D.G., Rocha L.O., Arruda S.S., Pallemaqui J.G.B., Cordeiro R.C., Santos Junior E., Molento M.B. & Santos C.P. 2010. Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Vet. Parasitol.* 170:340-343.
- d'Aonville J.A., Janovsky E. & Verster A. 1996. *In vitro* screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. *Vet. Parasitol.* 61:73-80.
- De Graef J., Sarmé C., Mills B.J., Mahabir S., Cassart S., De Wilde N., Van Weyenberg M., Geldhof P., Marchiondo A., Vercruyse J., Meuss P. & Claerebout E. 2012. Assessing resistance against macrocyclic lactones in gastro-intestinal nematodes in cattle using the faecal egg count reduction test and the controlled efficacy test. *Vet. Parasitol.* <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.040>>
- Demeler J., Köhler U., El-Abdellati A., Stafford K., Rydzik A., Várady M., Kerryon F., Coles G., Höglund J., Jackson F., Vercruyse J. & von Samson-Himmelstjerna G. 2010. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro-intestinal nematodes of ruminants. *Vet. Parasitol.* 174:58-64.
- Dolinská M., Křnigová A. & Várady M. 2012. Is the micro-agar larval development test reliable enough to detect ivermectin resistance? *Parasitol. Res.* 111:2201-2204.
- Echevarria F., Borba M.F.S., Pinheiro A.C., Waller P.J. & Hansen J.W. 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America, Brazil. *Vet. Parasitol.* 62:199-206.
- El-Abdellati A., Geldhof P., Claerebout E., Vercruyse J. & Charlier J. 2010. Monitoring macrocyclic lactone resistance in *Cooperia oncophora* on a Belgian cattle farm during four consecutive years. *Vet. Parasitol.* 171:167-171.
- Gatongi P.M., Njoroge J.M., Scott M.E., Ranjan S., Gathuma J.M., Muryua W.K., Cheruiyot H. & Prichard R. 2003. Susceptibility to IVM in a field strain of *Haemonchus contortus* subjected to four treatments in a closed sheep-goat flock in Kenya. *Vet. Parasitol.* 110:235-240.
- Gill J.H., Redwin J.M., Van Wyk J.A. & Lacey E. 1995. Avermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus*: Effects of ivermectin resistance. *Int. J. Parasitol.* 25:463-470.
- Hubert J. & Kerboeuf D. 1992. A micro-larval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet. Rec.* 130:442-446.
- Kaplan R.M. 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: A status report. *Trends in Parasitology* 20:477-481.
- Kaplan R.M. & Vidyashankar A.N. 2012. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 186:70-78.

- Kaplan R.M., Vidyasankar A.N., Howell S.B., Neils J.M., Williamson L.H. & Terrill T.H. 2007. A novel approach for combining the use of in vitro and in vivo data to measure and detect emerging moxidectin resistance in gastrointestinal nematodes of goats. *Int. J. Parasitol.* 37:795-804.
- Le Jambre L.F., Geoghegan J. & Lyndal-Murphy M. 2005. Characterization of moxidectin resistant *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 128:83-90.
- Molento M.B., Fortes ES, Pondelek D.A.S., Borges EA, Chagas A.C.S., Torres-Acosta J.F. & Geldhof P. 2011. Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. *Vet. Parasitol.* 180:126-132.
- Molento M.B. & Prichard R.K. 2001. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Pesq. Vet. Bras.* 21:117-121.
- Molento M.B., Wang G.T. & Prichard R.K. 1999. Decreased ivermectin and moxidectin sensitivity in *Haemonchus contortus* selected with moxidectin over 14 generations. *Vet Parasitol.* 86:77-81.
- Mortensen L.L., Williamson L.H., Terrill T.H., Kircher R., Larsen M. & Kaplan R.M. 2003. Evaluation of prevalence and clinical implications of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of goats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 23:495-500.
- Papadopoulos E. 2008. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Rum. Res.* 76:99-103.
- Rabel B., McGregor R. & Douch P.G. 1994. Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. *Int. J. Parasitol.* 24:671-676.
- Ranjan S., Wang G.T., Hirschleins C. & Simkins K.L. 2002. Selection for resistance to macrocyclic lactones by *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. Parasitol.* 103:109-117.
- Rzoliński-Morsos F., Moretto L.H., Bresolin W.S., Gabrielli I., Kafer L., Zanetti L.K., Sonaglio F. & Thomaz-Soccol V. 2007. Resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos da região da associação dos municípios do alto Itari (AMAI), oeste de Santa Catarina. *Cienc. Aním. Bras.* 8:559-565.
- Szczary-Morsos EA, Bianchin I., da Silva K.F., Catto J.B., Honer M.R. & Palva F. 2010. Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 30:229-236.
- Shoop W.L., Haines H.W., Michael B.F. & Bary C.H. 1993. Mutual resistance to avermectins and milbemycin: oral activity of ivermectin and moxidectin against ivermectin-resistant and susceptible nematodes. *Vet. Rec.* 133:445-447.
- Taylor M.A., Hunt K.R. & Goodyear K.L. 2002. Anthelmintic resistance detection methods. *Vet. Parasitol.* 103:183-194.
- Thomaz-Soccol V., Souza F.P., Sotomator C., Castro E.A., Milczewski V., Mucelli G. & Pessoa e Silva M.C. 2004. Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 47:41-47.
- Van Wyk J.A., Stenson M.D., Vander Merwe J.S., Vorster R.J. & Viljoen B.G. 1999. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 66:273-284.
- Verissimo C.J., Niclusa S.C.M., Alberti A.L.L., Rodrigues C.F.C., Barbosa C.M.P., Chiebas D.P., Cardoso D., da Silva G.S., Pereira J.R., Margallo L.F.F., da Costa R.L.D., Nardon R.F., Ueno T.E.H., Curci V.C.L.M. & Molento M.B. 2012. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. *Vet. Parasitol.* 187:209-216.
- Wagland B.M., Jones W.O., Hribar L., Bendixen T. & Emery D.L. 1992. A new simplified assay for larval migration inhibition. *Int. J. Parasitol.* 22:1183-1185.

ANEXO 14 – TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O CURSO DE DOUTORADO

- ARTIGOS COMPLETOS:

1. 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.
2. MOLENTO, M. B.; FORTES, F. S.; BUZATTI, A.; KLOSTER, F. S.; SPRENGER, L. K.; COIMBRA, E.; SOARES, L. D. Partial selective treatment of *Rhipicephalus microplus* and breed resistance variation in beef cows in Rio Grande do Sul, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 192, p. 234-239, 2013.
3. FORTES, F. S.; KLOSTER, F. S.; SCHAFER, A. S.; BIER, D.; BUZATTI, A.; YOSHITANI, U. Y.; MOLENTO, M. B. 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.
4. HAMMERSCHMIDT, J.; BIER, D.; FORTES, F. S.; WARZENSAKY, P.; BAINY, A. M.; MACEDO, A. A. S.; MOLENTO, M. B. Avaliação do sistema integrado de controle parasitário em uma criação semi-intensiva de caprinos na região de Santa Catarina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 927-934, 2012.
5. FORTES F. S.; DUTRA, L. H.; BIONDO, A. W.; MOLENTO, M. B. Febre maculosa brasileira em cães. **Semina. Ciências Agrárias**, v. 32, p. 339-354, 2011.
6. MOLENTO, M. B.; FORTES, F. S.; PONDELEK, D.; BORGES, F. A.; CHAGAS, A. C. S.; TORRES-ACOSTA, J. F.; GELDHOF, P. Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 126-132, 2011.
7. FORTES, F. S.; SANTOS, L. C.; CUBAS, Z. S.; BARROS FILHO, I. R.; BIONDO, A. W.; SILVEIRA, I.; LABRUNA, M. B.; MOLENTO, M. B. Anti-*Rickettsia* spp. antibodies in free-ranging and captive capybaras from southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 1014-1018, 2011.
8. DUTRA, L. H.; MOLENTO, M. B.; NAUMANN, C. C.; BIONDO, A. W.; FORTES, F. S.; SAVIO, D.; MALONE, J. Mapping risk of bovine fasciolosis in the south of Brazil using Geographic Information Systems. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 76-81, 2010.
9. BATISTA, F. G.; SILVA, D. M.; GREEN, K. T.; TEZZA, L. B. L.; VASCONCELOS, S. P.; CARVALHO, S. G. S.; SILVEIRA, I.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B.; FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Serological survey of *Rickettsia* spp. in horses and dogs in a non-endemic area in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 1-5, 2010.

10. FORTES, F. S.; SILVEIRA, I.; MORAES-FILHO, J.; LEITE FILHO, R. V.; BONACIM, J. E.; BIONDO, A. W.; LABRUNA, M. B.; MOLENTO, M. B. Seroprevalence of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia felis* in dogs, São José dos Pinhais, State of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 222-227, 2010.

- CAPÍTULOS DE LIVROS:

1. FORTES, F. S.; PONDELEK, D.; BIER, D. Nematoides gastrintestinais. In: Editores técnicos; Ana Carolina de Souza Chagas; Simone Cristina Méo Niciura; Marcelo Beltrão Molento. **Manual prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes**. 1ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011, v. 1, p. 1-16.

2. FORTES, F. S. Marcadores moleculares SNP: conceitos e aplicações na resistência anti-helmíntica. In: Editores técnicos; Ana Carolina de Souza Chagas; Simone Cristina Méo Niciura; Marcelo Beltrão Molento. **Manual Prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes**. 1ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011, v. 1, p. 83-91.

3. MOLENTO, M. B.; FORTES, F. S. Ordem Strongylida. In: Sílvia Gonzalez Monteiro. **Parasitologia na medicina veterinária**. 1ed. São Paulo: Roca, 2010, v. 1, p. 233-262.

- RESUMOS DE CONGRESSOS:

1. FORTES, F.; KLOSTER, F.; SCHAFER, A.; BIER, D.; BUZATTI, A.; YOSHITANI, U.; MOLENTO, M. Evaluation of resistance in a selected field strain of *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin using the Larval Migration on Agar Test. In: 24th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Australia, 2013 (apresentação oral)

2. KLOSTER, F. S.; BONDESAN, A.; SCHAFER, A. S.; FORTES, F. S.; CANEVER, R. J.; BIER, D.; SCHAPIRO, J.; CARACOSTANTO GOLO, J.; ZAWADZKI-BAGGIO, S. F.; MAURER, J. B. B.; MOLENTO, M. B. Pesquisa de taninos em *Schinopsis brasiliensis* Engl. e estudo do potencial bioativo contra nematódeos gastrintestinais de bovinos.. In: VI Jornada Catarinense de Plantas Mediciniais, 2010, Florianópolis. Anais da VI Jornada Catarinense de Plantas Mediciniais, 2010.

3. KLOSTER, F. S.; BONDESAN, A.; SCHAFER, A. S.; FORTES, F. S.; CANEVER, R. J.; BIER, D.; ZAWADZKI-BAGGIO, S. F.; MAURER, J. B. B.; MOLENTO, M. B. Pesquisa de taninos em *Carica papaya* e eficácia no controle de nematódeos gastrintestinais de bovinos.. In: VI Jornada Catarinense de Plantas Mediciniais, 2010, Florianópolis. Anais da VI Jornada Catarinense de Plantas Mediciniais, 2010.

- 4. KLOSTER, F. S.; CHAGAS, A. C. S.; BORGES, F. A.; SCHAFER, A. S.; FORTES, F. S.; BUZATTI, A.; FRANÇA, K. A. T.; MOLENTO, M. B. Avaliação in vitro do potencial bioativo da andiroba (*Carapa guianensis*) sobre ovos de nematódeos gastrintestinais de bovinos e larvas L3 de *Cooperia* sp.. In: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010, Campo Grande - MS. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010.**
- 5. SCHAFER, A. S.; FORTES, F. S.; BIER, D.; KLOSTER, F. S.; BUZATTI, A.; CANEVER, R. J.; MOLENTO, M. B. Teste de migração de larvas em ágar (modificado) para avaliação de anti-helmíntico sobre parasitos gastrintestinais de ovinos. In: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010, Campo Grande - MS. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010.**
- 6. CANEVER, R. J.; KLOSTER, F. S.; BUZATTI, A.; FORTES, F. S.; BIER, D.; FRANÇA, K. A. T.; SCHAFER, A. S.; MOLENTO, M. B. Práticas de controle anti-helmíntico em centros de criação de equinos. In: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010, Campo Grande - MS. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010.**

VITA

Fernanda Silva Fortes Suchodolak Braz é Médica Veterinária, formada pela Universidade Federal do Paraná – UFPR, em dezembro de 2007, atuando principalmente nas seguintes áreas: parasitologia veterinária, doenças parasitárias, biologia molecular, epidemiologia e medicina veterinária preventiva.

Durante a graduação, foi bolsista do projeto de extensão universitária “Controle de Zoonoses em Curitiba e Região Metropolitana”, monitora na disciplina de Zoonoses, e realizou iniciação científica com o projeto de pesquisa “Vigilância Molecular da Leptospirose em Roedores no Estado do Paraná”. Cumpriu o estágio final de graduação no Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses da Universidade Estadual Paulista – UNESP.

Obteve o título de Mestre em Ciências Veterinárias pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFPR, em fevereiro de 2010, atuando na linha de pesquisa de Sanidade Animal e Medicina Veterinária Preventiva. Realizou o projeto de pesquisa intitulado “Infecção por *Rickettsia* spp. em cães no município de São José dos Pinhais e em capivaras no município de Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil”.

Para a realização do presente projeto de pesquisa de doutorado, além da UFPR, contou também com: a colaboração técnica do Instituto de Parasitologia – *McGill University* e do Centro de Excelência em Bioinformática (CEBio) – FIOCRUZ MINAS; o financiamento do projeto pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); a bolsa de doutorado concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Programa de Reestruturação e Interiorização das Universidades Federais (CAPES/REUNI); e o apoio financeiro do *Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture (IICA Canada)* para o estágio realizado no exterior.