

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho  
*Campus Botucatu*

Talita Caroline Teli Ciconi

**Análise da presença do marcador molecular de  
resistência ao princípio ativo do antihelmíntico  
Levamisol em espécimes de *Haemonchus contortus*.**

**Botucatu - SP**

**2021**

Talita Caroline Teli Ciconi

**Análise da presença do marcador molecular  
de resistência ao princípio ativo do  
antihelmíntico Levamisol em espécimes de  
*Haemonchus contortus*.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho”, *Campus* de Botucatu, para  
obtenção do título de Bacharel em Ciências  
Biológicas

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Mônica Regina Vendrame Amarante

**Botucatu - SP**

**2021**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ciconi, Talita Caroline Teli.

Análise da presença do marcador molecular de resistência ao princípio ativo do antihelmíntico Levamisol em espécimes de *Haemonchus contortus* / Talita Caroline Teli Ciconi. - Botucatu, 2021

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Mônica Regina Vendrame Amarante  
Capes: 21302006

1. *Haemonchus*. 2. Anti-helmínticos. 3. Reação em cadeia da polimerase. 4. Resistência à drogas.

Palavras-chave: *Haemonchus contortus*; Levamisol; PCR; Resistência; Suscetibilidade.

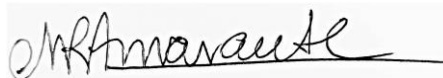
Talita Caroline Teli Ciconi

**Análise da presença do marcador molecular de  
resistência ao princípio ativo do antihelmíntico  
Levamisol em espécimes de *Haemonchus contortus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

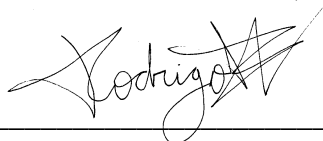
Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Mônica Regina Vendrame Amarante

Comissão Examinadora



---

Profa. Dra. Mônica Regina Vendrame Amarante  
Universidade Estadual Paulista (Unesp)



---

Prof. M.Sc. Rodrigo Bravin Narciso  
Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Botucatu, 11 de novembro de 2021.

Dedico esse trabalho à minha avó  
Maria (*in memoriam*) que sempre  
acreditou que eu fosse capaz de  
realizar meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me dado saúde e força durante todo esse trajeto.

Aos meus pais Angelita e Marco por sempre batalharem para que eu tivesse tudo de melhor nessa vida. Ao meu padrasto Ricardo que sempre me auxiliou com o que fosse preciso.

Aos meus avós João e Maria (*in memoriam*) por sempre se mostrarem orgulhosos com todas as minhas conquistas. Aos meus bisavós Antônio e Antônia (*in memoriam*) por sempre ressaltarem a importância de se ter estudo.

Aos meus tios César e Miriam por permitirem com que eu realizasse meu sonho de estudar na UNESP. Sem eles nada disso seria possível. Às minhas tias Maria Heloisa e Mislene por me darem seus melhores conselhos sobre a vida. Aos meus tios Luan e Diego por sempre estarem ao meu lado me ajudando com o que fosse preciso.

Às crianças da família: Alícia, Manuella e Davi por sempre me lembrarem que não importa o que aconteça, eu sempre serei uma inspiração para eles.

Aos meus pets por sempre me darem um amor incondicional, me acalmando em meus momentos de crise.

À minha orientadora Mônica por todos os ensinamentos durante esse período. Seu apoio e sua confiança em mim foram essenciais para esse trabalho.

Aos meus amigos que conquistei durante essa jornada e de alguma forma me ajudaram a concluir essa etapa de minha vida.

À esta universidade e todo o seu corpo docente, direção e administração que foram essenciais para a realização desse projeto.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa trajetória para a minha formação.

## RESUMO

*Haemonchus contortus* (que parasita, preferencialmente, ovinos) apresenta resistência a todas as classes de antihelmínticos resultando em perdas econômicas significativas em todo mundo. Também há resistência anti-helmíntica em *Haemonchus placei* (parasita preferencial de bovinos) embora ocorra mais raramente. Porém, infecções mistas têm sido observadas quando ovinos e bovinos compartilham pastagens em sistemas extensivos de produção e já foram identificados híbridos tanto em hospedeiros infectados naturalmente, quanto em infecções artificiais, havendo evidência de fluxo gênico entre essas espécies. A identificação das diferentes espécies de *Haemonchus* é realizada, preferencialmente, através de análise morfológica, mas sobreposições entre medidas têm sido observadas, o que dificulta a identificação espécie-específica. Embora os métodos moleculares sejam considerados laboriosos e mais caros, têm maior sensibilidade e especificidade. A resistência anti-helmíntica tem sido frequentemente descrita como sendo poligênica, porém, os mecanismos genéticos envolvidos não são totalmente conhecidos. Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram desenvolvidos por Barrère et al. (2014) para avaliar a inserção/deleção (indel) de 63 pares de base (pb) no gene *acr-8* em *H. contortus*. Esta deleção promove a formação da proteína truncada do gene *ACR-8b*, que está relacionada com a resistência ao Levamisol. Santos et al. (2014) analisaram morfológica e molecularmente os espécimes de *H. contortus* empregando o isolado denominado de RsHco1, obtido em ovinos criados no estado do Rio Grande do Sul. Este isolado é suscetível a todas as classes de antihelmínticos, destoando das amostras de *H. contortus* obtidas a campo no estado de São Paulo, pois as mesmas tem se mostrado resistentes aos princípios ativos analisados até o momento. Porém, Santos et al. (2014) tiveram problemas para identificar os espécimes de *Haemonchus*. Assim sendo, os objetivos deste projeto são: identificar molecularmente, com o emprego da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR convencional) os mesmos espécimes de *H. contortus* com o emprego do par de *primers* espécie-específico descrito por Amarante et al. (2017), bem como testar o par de *primers* descrito por Barrère et al. (2014) para a verificação de resistência/susceptibilidade ao antihelmíntico Levamisol. As análises moleculares dos 152 espécimes machos de *H. contortus* foram repetidas com o par de *primers* *HcBotuF1/R2* (Amarante et al., 2017), visando dirimir os problemas de identificação. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE e fotografados sob luz UV. Na avaliação dos géis, foi observada uma banda de amplificação de 260 pb, que resultou na identificação molecular das 152 amostras de DNA como *H. contortus*. Essas mesmas amostras também foram submetidas à PCR convencional para a identificação da resistência/susceptibilidade ao Levamisol, o que resultou em: 96 amostras (63,2%) que apresentaram somente bandas de 256 pb, ou seja, os respectivos espécimes de *H. contortus* foram considerados resistentes ao levamisol; 44 amostras (28,9%), somente bandas de 319 pb, cujos espécimes foram considerados susceptíveis a este antihelmíntico e 12 amostras amostras (7,9%) apresentaram ambas as bandas de amplificação, sendo considerados molecularmente heterozigotas quanto ao levamisol. Uma vez que os espécimes de *H. contortus* utilizados neste estudo eram provenientes do isolado RsHco1 (suscetível a todas as classes de anti helmínticos) conclui-se que o par de *primers* descrito por Barrère et al (2014) é capaz de detectar um segmento de DNA relacionado à susceptibilidade/resistência ao Levamisol, mas não pode ser empregado como um marcador molecular confiável, em amostras de campo, para a verificação da susceptibilidade e/ou resistência a este antihelmíntico.

**Palavras-chave:** *Haemonchus contortus*; Levamisol; PCR; resistência; susceptibilidade.

## SUMMARY

*Haemonchus contortus* primarily infects sheep and has shown resistance to all major anthelmintic drug classes and causes significant economic losses in the livestock industry worldwide. There also have been reports of anthelmintic resistance in *H. placei*, although the level of resistance is not so extensive. In addition, mixed infections have been reported in livestock production systems in which cattle and sheep share the same pasture and hybrids have been found in naturally and artificial infected animals and there is evidence of gene flow. Morphological identification of *Haemonchus* species is usually performed but overlap between measurements among specimens can occur, casting doubt upon the correct species identification. Although molecular techniques are considered more expensive and laborious they show higher sensitivity and specificity. Anthelmintic resistance has been described to be polygenic, but all genetic mechanisms involved have not been determined. Oligonucleotide primers were designed by Barrère et al. (2014) to evaluate an insertion/deletion (indel) of 63 bp of the *acr-8* gene in *H. contortus*. The truncated isoform of the ACR-8b protein arises due to the 63bp deletion that is associated with the phenotypic resistance to levamisol. Santos et al. (2014) used molecular and morphological methods in order to identify *H. contortus* species. They analysed specimens from the laboratory isolate RsHco1 which is susceptible to all chemical classes of anthelmintics. The opposite situation has been observed in São Paulo state, Brazil where anthelmintic resistance is widespread. Once Santos et al. (2014) were not able to identify all *H. contortus* samples, the goals of this study were: to identify the same *H. contortus* specimens using the species-specific primer pair (conventional PCR) described by Amarante et al. (2017) and to verify resistance/susceptibility to levamisol using the primer described by Barrère et al. (2014). Molecular analysis of 152 male specimens of *H. contortus* employed primers *HcBotuF1/R2* (Amarante et al., 2017) in order to solve identification problems. PCR products were electrophoresed on 2% agarose gels in 1% Tris–acetate–EDTA (TAE) buffer. A 260 bp amplification band was observed and allowed the identification of 152 DNA samples as *H. contortus*. The same DNA samples were also submitted to conventional PCR to identify resistance/susceptibility to levamisol. And 96 samples presented a 256 bp band, 44 samples presented a 319 bp one and 12 samples (7.9%) showed both bands, which means 63.2% of the *H. contortus* specimens were resistant to levamisol, 28.9% were susceptible and 7.9% of them presented genetic heterozygosity, respectively. Considering *H. contortus* specimens were obtained from the laboratory isolate RsHco1, which is susceptible to all chemical classes of anthelmintics, it can be concluded that Barrère et al (2014) described primers that are able to detect one DNA segment correlated with the levamisol resistance/susceptibility. But that can't be used as a reliable molecular marker to verify susceptibility or resistance to levamisol in field populations.

**Keywords:** *Haemonchus contortus*; levamisol; PCR; resistance; susceptibility.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1** - Reações de PCR com o par de primers BotuF1/R2 (AMARANTE et al., 2017)

**Figura 2** - Reações de PCR com o par de primers LevF/R (BARRÈRE et al., 2014)

**Figura 3** - Gráfico de setores, no qual são especificadas as porcentagens de bandas de amplificação obtidas a partir da análise com o par de primers LevF/R (BARRÈRE et al., 2014)

**Tabela 1** - Análise molecular (PCR convencional), visando a identificação espécie específica de amostras provenientes de espécimes machos de *Haemonchus*, com o emprego de dois pares de *primers*: 75 e 86 (ZARLENGA et al., 1994), realizada por Santos et al. (2014); e *HcBotuF1/R2* (AMARANTE et al., 2017)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>13</b>
<b>2.1 AMOSTRAS DE <i>HAEAEMONCHUS</i></b>	<b>13</b>
<b>2.2 ANÁLISES MOLECULARES</b>	<b>13</b>
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>15</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b>	<b>18</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>21</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>22</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Infecções parasitárias contribuem para a redução do desempenho produtivo e da mortalidade dos animais (AMARANTE, 2011). *Haemonchus* spp. são nematóides originados da África que se localizam no abomaso de ruminantes domésticos e selvagens (SANTOS et al., 2019). No Brasil, destacam-se as infecções helmínticas causadas pelas espécies *Haemonchus contortus* (RUDOLPHI, 1803), cujos hospedeiros preferenciais são pequenos ruminantes, e *Haemonchus placei* (PLACE, 1893) que parasitam, preferencialmente, bovinos. Porém, infecções mistas têm sido observadas quando ovinos compartilham pastagens com bovinos em sistemas extensivos de produção (AMARANTE et al., 1997; HOBERG et al., 2004; ROCHA et al., 2008). Adicionalmente, já foram identificados indivíduos híbridos tanto em hospedeiros infectados naturalmente quanto em infecções artificiais e, há evidência de fluxo gênico ocorrendo entre *H. contortus* e *H. placei* (CHAUDHRY et al., 2015).

A identificação das diferentes espécies de *Haemonchus* é realizada, preferencialmente, através da análise morfológica das larvas infectantes (L3) (SANTIAGO, 1968) e dos exemplares de machos adultos (AMARANTE et al., 1997; ACHI et al., 2003). Contudo, sobreposições entre as medidas morfológicas, tais como comprimento do corpo, dos espículos e ganchos ocorrem, dificultando a identificação das espécies (AMARANTE, 2011; SANTOS et al., 2014). Sendo assim, embora a avaliação molecular seja considerada laboriosa e de maior custo, é mais precisa para a identificação de espécies (ZARLENGA et al., 2016).

*Haemonchus contortus* apresenta resistência a todas as classes de antihelmínticos e isto resulta em perdas econômicas significativas em todo o mundo (KOTZE; PRICHARD, 2016). A resistência antihelmíntica também foi relatada em *H. placei*, embora ocorra com menor intensidade (NEVES et al., 2014).

Nos Estados Unidos, foram observadas infecções mistas de *H. contortus* e *H. placei*

parasitando bovinos e, a população *H. contortus* mostrou-se bem adaptada a este hospedeiro (GASBARRE et al., 2009). Adicionalmente, ao analisar espécimes provenientes de infecção cruzada entre espécies diferentes de *Haemonchus* sp., que convivem com diferentes hospedeiros (bovinos e ovinos) compartilhando a mesma pastagem e submetidos a condições ambientais adversas em diferentes localidades geográficas, observou-se que a adaptação destes indivíduos foi bastante variável quanto à especificidade parasitária, mostrando-se, às vezes, mais generalista ou mais especialista (HOBERG; ZARLENGA, 2016). Considerando-se a ocorrência de fluxo gênico entre estas espécies, é importante realizar sua identificação precisa, bem como avaliar a resistência aos antihelmínticos. Embora a resistência antihelmíntica seja frequentemente descrita como sendo poligênica, os mecanismos moleculares envolvidos no transporte das várias classes de medicamentos não são totalmente conhecidos (ROEBER et al., 2013).

Levamisol é um antihelmíntico bastante utilizado no tratamento de ovinos desde 1960 e apresenta amplo espectro, atuando nos receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs), presentes nos músculos localizados ao longo do corpo dos nematóides. (BALTRUSIS et al., 2021). Segundo esses autores, causa paralisia espástica que, conseqüentemente, leva à expulsão dos nematóides. Entretanto, apesar de ser um antihelmíntico eficiente, *H. contortus* tem apresentado resistência a ele (BALTRUSIS et al., 2021).

Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram desenvolvidos para avaliar a inserção/deleção (indel) de um segmento de 63 pares de base (pb) no gene *acr-8* (BARRÈRE et al., 2014; KOTZE; PRICHARD, 2016). Segundo esses autores, esta deleção promove a formação da proteína truncada ACR-8b, que está relacionada à perda de susceptibilidade ao princípio ativo levamisol. Barrère et al (2014) analisaram isolados de *H. contortus* resistentes e susceptíveis ao levamisol e identificaram que a banda de amplificação de 319 pb (contendo o segmento de 63 pb) está associada ao fenótipo de susceptibilidade, enquanto a banda de 256 pb (contendo a deleção de 63 pb) está associada à perda de susceptibilidade ou seja, à resistência a este antihelmíntico.

Santos et al. (2014) identificaram morfológica e molecularmente espécimes de *H. contortus* e *H. placei* com o intuito de resolver a identificação ambígua gerada por medidas intermediárias entre as duas espécies. E empregaram o par de *primers* 75 e 86 descrito por

Zarlenga et al. (1994), mas algumas das amostras de *H. placei* e *H. contortus* não puderam ser amplificadas, embora houvesse presença de DNA, comprovada com a utilização de outro par de *primers* (DORRIS et al., 2002).

Enfatiza-se que, para a obtenção dos espécimes de *H. contortus*, Santos et al. (2014 a,b) empregaram o isolado denominado de RsHco1, obtido em ovinos criados no estado do Rio Grande do Sul. Este isolado é bastante interessante, pois é suscetível a todas as classes de anti helmínticos (ECHEVARRIA et al. 1991) destoando das amostras de *H. contortus* obtidas a campo no estado de São Paulo, pois as mesmas tem se mostrado resistentes a todos os princípios ativos: albendazol, closantel, levamisol, ivermectina e monepantel (ALMEIDA et. al., 2010; GAINZA et al., 2021).

Diante do que foi destacado, esse trabalho tem como finalidades: identificar molecularmente os espécimes de *H. contortus* (identificados morfológica e molecularmente por SANTOS et al., 2014), com o emprego do par de *primers* espécie-específico descrito por Amarante et al. (2017); bem como testar o par de *primers* descrito por Barrère et al (2014) para a identificação da resistência e/ou susceptibilidade ao levamisol, nestes espécimes.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 AMOSTRAS DE *Haemonchus*

Neste estudo, 152 amostras, provenientes de espécimes adultos machos de *Haemonchus*, foram previamente analisadas morfológicamente por Santos *et al.* (2014), que realizaram extração de DNA e identificaram estas amostras molecularmente, empregando Polymerase Chain Reaction (PCR) convencional com a utilização do par de *primers* 75 e 86 descrito por Zarlenga *et al.* (1994).

Essas análises foram repetidas, no presente estudo, com outro par de *primers*, que é descrito de modo pormenorizado abaixo (item 2.2)

### 2.2 ANÁLISES MOLECULARES

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular de Helminthos, localizado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) - Botucatu. E para tanto, foi empregada a PCR convencional para amplificar regiões específicas do DNA das amostras de *Haemonchus*. O par de *primers* *HcBotuF1/R2*, descrito por Amarante *et al.* (2017), foi utilizado para a identificação de *Haemonchus contortus* e o par de *primers*, aqui denominado de *LevF/R*, e descrito por Barrère *et al.* (2014) foi empregado para a identificação dos espécimes que apresentaram bandas de amplificação relacionadas à resistência e/ou à susceptibilidade ao antihelmíntico levamisol.

Cada amostra de DNA, extraída individualmente de cada um dos espécimes de *Haemonchus*, foi testada com ambos os pares de *primers*, duas vezes. Em caso de dúvida ou banda de amplificação fraca, as reações foram repetidas.

O termociclador Gene Amp PCR System 9700® (Applied Biosystems) foi empregado para as reações e cada reação foi constituída por 10 µl dos seguintes constituintes: 10mM de Tris-HCl, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 50mM de KCl (pH 8.0); 100µM de cada desoxinucleosídeo trifosfatado (dNTP); 2µl de DNA genômico (na concentração que variou de 20–50 ng) e 0,5 U de Taq polimerase (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos da América).

Para o par de *primers* *HcBotuF1/R2* as condições de PCR foram: 95°C por 5 minutos

(m); seguidos por 35 ciclos a 95°C por 30 segundos (s), 59°C por 40 s e 72°C por 30s; seguidos por 5m a 72°C e 4°C para finalização das ampliações. As condições para o par de *primers* LevF/R foram basicamente as mesmas, exceto pela temperatura e tempo de anelamento que foram de 55°C por 45s.

Os produtos de PCR (bandas de amplificação de DNA) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) contendo Brometo de Etídeo, e fotografados sob a luz ultravioleta (UV) com o emprego da câmera digital Sony Cyber-shot DSC-HX1 camera (Sony Electronics, San Diego, Califórnia, Estados Unidos da América).

### 3. RESULTADOS

Das 152 amostras de DNA provenientes dos espécimes machos de *Haemonchus*, previamente identificados morfológica e molecularmente por Santos *et al.* (2014) com o emprego do par de *primers* 75 e 86 descrito por Zarlenga *et al.* (1994), 14 delas apresentaram medidas intermediárias às medidas características para *Haemonchus contortus* e *H. placei* e através do uso desse par de *primers* foram identificadas como *H. placei*.

Na primeira parte deste estudo, visando dirimir problemas na amplificação e ambiguidades na identificação dos espécimes de *Haemonchus*, as análises moleculares foram repetidas com o par de *primers* *HcBotuF1/R2* (AMARANTE *et al.*, 2017). E a análise em gel de agarose possibilitou a observação de uma banda de amplificação de 260 pares de base (pb), o que resultou na identificação molecular das 152 amostras de DNA como *Haemonchus contortus* (Figura 1 e Tabela 1).

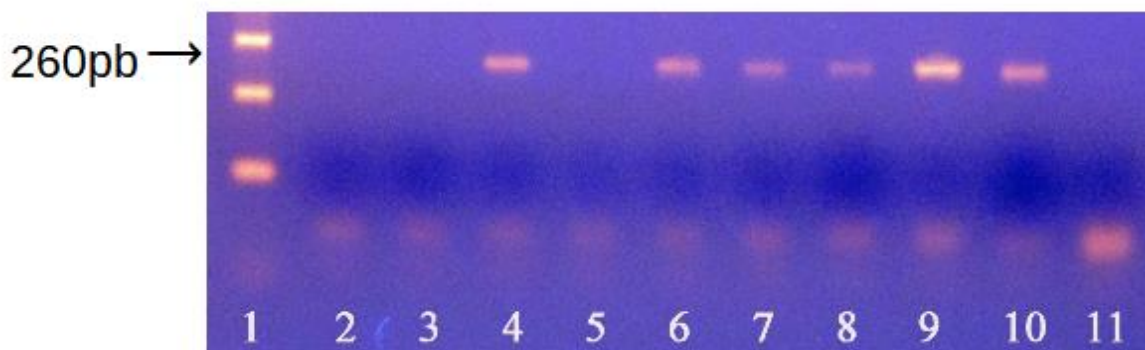


Figura 1. Reações de PCR com o par de primers *HcBotuF1/R2* (AMARANTE *et al.*, 2017). Poço 1 - marcador de peso molecular 100 pb (GE Healthcare); Poço 2 - DNA Bovino (hospedeiro); Poço 3 - DNA Ovino (hospedeiro); Poço 4 - DNA controle de *Haemonchus contortus* (Hc); Poço 5 - DNA controle de *Haemonchus placei*; Poços 6 a 10 – amostras de Hc; Poço 11 - sem DNA.

Tabela 1. Análise molecular (PCR convencional), visando a identificação espécie específica de amostras provenientes de espécimes machos de *Haemonchus*, com o emprego de dois pares de *primers*: 75 e 86 (ZARLENGA *et al.*, 1994), realizada por Santos *et al.* (2014); e *HcBotuF1/R2* (AMARANTE *et al.*, 2017).

Espécimes machos adultos (n=152)	<i>Haemonchus placei</i>	<i>Haemonchus contortus</i>
<i>Primers</i> 75 e 86 (ZARLENGA <i>et al.</i> , 1994 )	14	138
<i>Primers HcBotuF1/R2</i> (AMARANTE <i>et al.</i> , 2017)	0	152

Na segunda parte do estudo, também empregando PCR convencional com o par de *primers* *LevF/R* (BARRÈRE *et al.*, 2014), realizou-se a verificação de quais amostras de *H. contortus* apresentariam a banda de amplificação de 256pb, relacionada à resistência e a de 319 pb, à susceptibilidade ao antihelmíntico levamisol. E as análises resultaram em 96 amostras que apresentaram bandas de 256 pb, ou seja, os respectivos espécimes de *H. contortus* foram considerados resistentes ao levamisol. Bandas de 319 pb foram observadas em 44 amostras e esses espécimes foram considerados susceptíveis a este antihelmíntico. E 12 espécimes, apresentaram ambas as bandas de amplificação, sendo considerados molecularmente heterozigotos quanto ao levamisol (Figura 3). É possível observar as referidas bandas de amplificação no poço 5 da Figura 2.

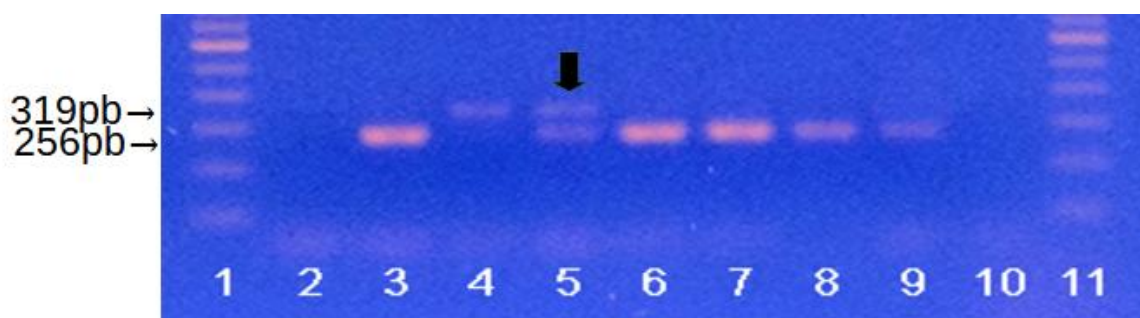


Figura 2. Reações de PCR com o par de primers *LevF/R* (Barrère *et al.*, 2014). Poços 1 e 11- marcador de peso molecular 100 pb (GE Healthcare); Poço 2-DNA ovino (hospedeiro); Poços 4–9 amostras de *Haemonchus contortus*.

Na Figura 3 observa-se que das 152 amostras analisadas, 96 apresentaram a banda de 256 pb, o que corresponde a 63,2% do total das amostras analisadas, indicando o fenótipo de resistência ao levamisol. A banda de amplificação de 319 pb foi obtida em 44 amostras,

representando 28,9% do total. Além disso, 12 amostras, o que perfaz 7,9%, apresentaram ambas as bandas de amplificação (319 pb e 256 pb), ou seja, essas amostras foram consideradas molecularmente heterozigotas.

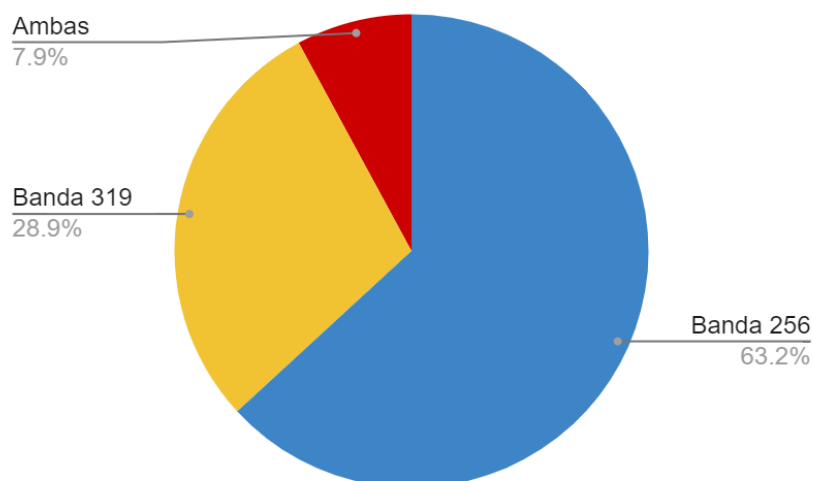


Figura 3. Gráfico de setores, no qual são especificadas as porcentagens de bandas de amplificação obtidas a partir da análise com o par de primers LevF/R (descrito por BARRÈRE et al., 2014).

## 4. DISCUSSÃO

A utilização do par de primers *HcBotuF1/R2* (AMARANTE et al., 2017) possibilitou a resolução de problemas de amplificação e ambiguidades na identificação realizada por Santos et al. (2014) e confirmou a identificação molecular de 152 amostras de DNA provenientes dos espécimes machos como sendo de *Haemonchus contortus*. É importante ressaltar que 14 das amostras, haviam sido identificadas molecularmente por Santos et al. (2014) como e *H. placei* com o emprego do par de primers 75 e 86 descrito por Zarlenga et al. (1994), (Figura 1 e Tabela 1). É importante ressaltar que Ramos et al. (2020) utilizaram os pares de primers *HcBotuF1/R2* e *BotuHpF/R* (AMARANTE et al., 2017) para a identificação de *H. contortus* e *H. placei* e a detecção de ocorrência de co-infecção dessas espécies em “pools” de larvas provenientes de bovinos e ovinos infectados naturalmente em propriedades rurais do Rio Grande do Sul. A identificação destas espécies se mostrou útil para a investigação da eficácia de tratamentos antihelmínticos em propriedades rurais que apresentaram co-infecção das duas espécies de *Haemonchus* antes e após os tratamentos. Os autores mencionaram que a identificação acurada da espécie de nematóides por técnicas moleculares é crucial para o diagnóstico e também para o estabelecimento de estratégias de controle de infecções parasitárias (RAMOS et al., 2020). A importância da identificação precisa das espécies de *Haemonchus* também é de grande importância em estudos epidemiológicos (AMARANTE et al., 1997; CHAUDHRY et al., 2015).

Segundo Barrère et al. (2014), a banda de amplificação de 319 pb obtida por PCR convencional caracteriza a presença do indel de 63 pb e está associada ao fenótipo de susceptibilidade e a de 256 pb, à perda de susceptibilidade ou seja, ao fenótipo de resistência ao levamisol. Partindo dessa informação, no presente estudo, a análise do gel de agarose das reações com o par de primers *LevF/R* resultaram em 96 amostras, o que corresponde a 63,2 % dos espécimes de *H. contortus* analisados, apresentaram somente a

banda de amplificação de 256 pb (contendo a deleção de 63 pb), relacionada à resistência ao levamisol. E 44 amostras, ou seja, 28,9% dos espécimes, apresentaram somente a banda de 319 pb, que contém o segmento de 63 pb (empregado como marcador molecular), e que confere susceptibilidade ao levamisol. Somente 12 das amostras, o que corresponde a 7,9% das amostras analisadas, apresentaram ambas as bandas, resultando em heterozigose genética (Figuras 2 e 3).

Esse resultado é intrigante pois, de acordo com Barrère et al (2014) seria esperado encontrar, nas 152 amostras analisadas, uma frequência maior do alelo relacionado à susceptibilidade ao levamisol, pois os espécimes de *H. contortus* foram obtidos do isolado RsHco1 (recuperados em ovinos criados no estado do Rio Grande do Sul). E este isolado mostrou-se susceptível a todas as classes de anti helmínticos (ECHEVARRIA et al., 1991). Adicionalmente, Chagas et al. (2016) também observaram que a banda de 256 pb (contendo a deleção de 63 pb) nem sempre esteve associada à resistência ao levamisol nos isolados EMBRAPA2010 (CHAGAS et al., 2013) e GIN EMBRAPA2014, ambas linhagens resistentes a vários antihelmínticos, assim como a maioria das amostras de *H. contortus* obtidas a campo no estado de São Paulo (ALMEIDA et. al., 2010; GAINZA et al., 2021).

Os resultados obtidos neste estudo permitiram averiguar que o par de *primers* descrito por Barrère et al (2014) (aqui denominado de LevF/R) não é um marcador molecular confiável para a verificação de susceptibilidade e/ou resistência genética ao antihelmíntico levamisol. Esses resultados concordam com os obtidos por Baltrusis *et al.* (2021). Esses autores realizaram análises de espécimes de *Haemonchus contortus* obtidos a campo e também observaram que a deleção de 63 pb não foi um marcador confiável para a identificação molecular de resistência ao levamisol, uma vez que esta deleção não esteve associada com o fenótipo de resistência em todas as amostras analisadas.

É possível que o fenótipo de resistência/susceptibilidade ao antihelmíntico levamisol seja de herança poligênica, similarmente ao que foi observado para a resistência ao

Benzimidazol (COLES et al., 2006).

## 5. CONCLUSÕES

1. O par de primers *HcBotuF1/R2* (AMARANTE et al., 2017) possibilitou a resolução de problemas de amplificação e ambiguidades na identificação realizada por Santos et al. (2014) e confirmou a identificação molecular de *Haemonchus contortus* nas 152 amostras de DNA analisadas neste estudo.
2. Das 152 amostras de *Haemonchus contortus* 63,2 % apresentaram somente a banda de amplificação de 256 pb (contendo a deleção de 63 pb), relacionada à resistência ao levamisol, 28,9% apresentaram somente a banda de 319 pb, que contém o segmento que confere susceptibilidade ao levamisol e 7,9% dessas amostras apresentaram ambas as bandas, o que denota a heterozigose genética, a partir do uso do par de *primers* descrito por Barrère et al. 2014).
3. A partir dos resultados obtidos no item 2, e considerando-se que os espécimes de *H. contortus* foram obtidos do isolado RsHco1, que é susceptível a todas as classes de antihelmínticos (ECHEVARRIA et al. 1991), conclui-se que o par de *primers* descrito por Barrère et al (2014) é capaz de detectar um segmento de DNA relacionado à susceptibilidade/resistência ao Levamisol, mas este não pode ser empregado como um marcador molecular confiável, em amostras de campo, para a verificação da susceptibilidade e/ou resistência genética a este antihelmíntico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHI, Y.L. et al. Host specificity of *Haemonchus* spp. for domestic ruminants in the savanna in northern Ivory Coast. **Vet. Parasitol.**, v.116, p.151-158, 2003.

ALMEIDA F.A. et al. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**. v.59, p. 622-625, 2010.

AMARANTE, A. F. T. et al. Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil, **Vet. Parasitol.**, v.73, p.9-104, 1997.

AMARANTE, A. F. T. Why is important to correctly identify *Haemonchus* species? **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.20, p.263-268, 2011.

AMARANTE, M. R. V et al. PCR primers for straightforward differentiation of *Haemonchus contortus*, *Haemonchus placei* and their hybrids. **J. Helmintol**, v.91, p.757–761, 2017.

BALTRUSIS, P. et al. Using droplet digital PCR for the detection of hco-acr-8b levamisol resistance marker in *H. contortus*. **Int. J. Parasitol.**, v.15, p.168-176, 2021.

BARRÈRE, V. et al. Novel assay for the detection and monitoring of levamisol resistance in *Haemonchus contortus*. **Int. J. Parasitol.**, v.44, p.235-241, 2014.

CHAGAS, A. C. S. et al. Target selected treatment with levamisol to control the development of anthelmintic resistance in a sheep flock. **Parasitol. Res**, v.115, p.1131-1139, 2016.

CHAUDHRY, U. et al. Genetic evidence for hybridisation between *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* in natural field populations and its implications for interspecies transmission of anthelmintic resistance. **Int. J. Parasitol.**, v.45, p.149-159, 2015.

COLES, G. C. et al. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Vet. Parasitol.**, v.136, p.167-185, 2006.

DORRIS, M. et al. Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes. **Int. J. Parasitol.**, v.32, p.1507-1517, 2002.

ECHEVARRIA, F. A. M. et al. Efficacy of some anthelmintics on a ivermectin resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. **Vet. Parasitol.**, v.39, p.279–284, 1991.

GAINZA, Y. A. et al. Anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* from sheep flocks in Brazil: concordance of in vivo and in vitro (RESISTA-Test©) methods. **REV. BRAS. PARASITOL. VET.** v. 20, 2021. e025120 | <https://doi.org/10.1590/S1984-296120201093>

GASBARRE, L. C. et al. The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the US. **Vet. Parasitol.**, v.166, p.281–285, 2009.

HOBERG, E. P. et al. Phylogeny for Species of *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongyloidea): Considerations of their Evolutionary History and Global Biogeography among Camelidae and Pecora (Artiodactyla). **J. Parasitol.**, v.90, p.1085-1102, 2004.

HOBERG, E.P.; ZARLENGA, D.S. Evolution and biogeography of *Haemonchus contortus*: Linking faunal dynamics in space and time. **Adv. Parasitol.** v.93, p.1-30. 2016.

KOTZE, A.C.; PRICHARD, R.K. Anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*: history, mechanisms and diagnosis. **Adv. Parasitol.**, v.93, p.397-438, 2016.

NEVES, J. H. et al. Diagnosis of anthelmintic resistance in cattle in Brazil: A comparison of different methodologies. **Vet. Parasitol.** v.206, p.216-226, 2014.

RAMOS et al. Field and molecular evaluation of anthelmintic resistance of nematode populations from cattle and sheep naturally infected pastured on mixed grazing areas at Rio Grande do Sul, Brazil. **Acta Parasitol.**, v. 65, p.118-127, 2020.

ROCHA, R.A. et al. Sheep and cattle alternately: Nematode parasitism and pasture decontamination. **Small. Rumin. Res.**, v.75, p.135-143, 2008.

ROEBER, F. et al. Next-generation molecular-diagnostic tools for gastrointestinal nematodes of livestock, with an emphasis on small ruminants: A turning point? **Adv. Parasitol.**, v.83, p.267-333, 2013.

SANTIAGO, M. A. M. ***Haemonchus Cobb, 1898* (Nematoda: Trichostrongylidae). Contribuição ao estudo da morfologia, biologia e distribuição geográfica das espécies parasitas de ovinos e bovinos no Rio Grande do Sul.** 1968. 89f. Tese (Livre-Docência) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

SANTOS, M. C. et al. Differentiation of *Haemonchus placei* from *Haemonchus contortus* by PCR and by morphometrics of adult parasites and third stage larvae. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.23, p.495-500, 2014.

SANTOS, M. C. et al. Establishment of co-infection and hybridization of *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* in sheep. **J. Helmentol.**, v. 93, p. 697-703, 2019.

ZARLENGA, D. S. et al. Cloning and characterization of Ribossomal RNA genes from three species of *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongyloidea) and identification of PCR *primers* for rapid differentiation. **Exp. Parasitol.**, v.78, p.28-36, 1994.

ZARLENGA, D. S. et al. Chapter Five - the identification of *Haemonchus* species and diagnosis of haemonchosis. **Adv. Parasit.**, v.93, p.145-180, 2016.