

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**JESSICA MARIA LEITE DOS SANTOS**

**POLIMORFISMOS RESPONSÁVEIS PELA RESISTÊNCIA A  
BENZIMIDAZÓIS EM POPULAÇÕES DE *Haemonchus contortus*  
ISOLADAS NO ESTADO DO CEARÁ**

**FORTALEZA  
2013**

**JESSICA MARIA LEITE DOS SANTOS**

**POLIMORFISMOS RESPONSÁVEIS PELA RESISTÊNCIA A  
BENZIMIDAZÓIS EM POPULAÇÕES DE *Haemonchus contortus*  
ISOLADAS NO ESTADO DO CEARÁ**

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

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de pequenos ruminantes.

Orientador(a): Profa. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua

**FORTALEZA  
2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**  
**Universidade Estadual do Ceará**  
**Biblioteca Central Prof. Antônio Martins Filho**  
**Bibliotecário (a) Leila Cavalcante Sátiro – CRB-3 / 544**

S237p Santos, Jessica Maria Leite dos.  
Polimorfismos responsáveis pela resistência a benzimidazóis em populações de *Haemonchus contortus* isoladas no estado do Ceará / Jessica Maria Leite dos Santos. — 2013.  
CD-ROM 62f. : il. (algumas color.) ; 4 ¾ pol.  
“CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slin (19 x 14 cm x 7 mm)”.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2013.  
Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.  
Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Maria Leal Bevilaqua.  
Co-orientação: Dr. Jomar Patrício Monteiro.  
1. Nematóides. 2. Resistência anti-helmíntica. 3. SNP. 4. PCR em tempo real. 5. Ovinos. I. Título.

CDD: 633

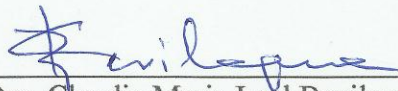
**JESSICA MARIA LEITE DOS SANTOS**

**POLIMORFISMOS RESPONSÁVEIS PELA RESISTÊNCIA A  
BENZIMIDAZÓIS EM POPULAÇÕES DE *Haemonchus contortus*  
ISOLADAS NO ESTADO DO CEARÁ**

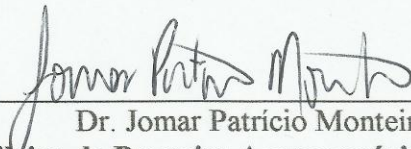
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 15/07/2013

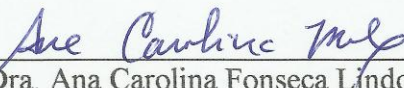
**BANCA EXAMINADORA:**



**Profa. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua**  
**Universidade Estadual do Ceará**  
**Orientadora**



**Dr. Jomar Patrício Monteiro**  
**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Caprinos e Ovinos**  
**Co-orientador**  
**Examinador**



**Profa. Dra. Ana Carolina Fonseca Lindoso Melo**  
**Universidade Federal do Piauí**  
**Examinadora**



**Dra. Luciana Magalhães Melo**  
**Universidade Estadual do Ceará**  
**Examinadora**

**FORTALEZA**

**2013**

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

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, e sim em ter novos olhos”.

Marcel Proust

## **AGRADECIMENTOS**

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

A Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa (FUNCAP) pelo fornecimento de bolsa de Pós-Graduação.

A Deus por sempre ter me dado força para enfrentar todos os obstáculos, por ter me guiado para atingir todos os meus planos. Obrigada Senhor por mais essa conquista!

Agradeço a minha mãe, Edineide Leite dos Santos, por ser uma grande mãe, amiga, companheira e me apoiar em todas as minhas decisões, inclusive na que me fez hoje estar longe de dela, por toda a educação que me deu, pelo amor incondicional, incentivo e acima de tudo por acreditar nos meus sonhos e lutado sempre comigo para que eles se tornem realidade. Agradeço a toda minha família por ter me apoiado, em especial ao meu irmão Hugo Fernando Leite dos Santos Belo, a minha cunhada Marcela Bezerra Tavares Santos e ao meu sobrinho Davi Santos, muito obrigada!

A minha orientadora, Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua, por ter me aceitado e recebido de braços e coração abertos no LABODOPAR. Por toda a sua atenção, amizade e dedicação durante esses dois anos e pelo constante incentivo que foi imprescindível para realização desse trabalho.

A todos ICs, mestrandos e doutorandos e demais membros do LABODOPAR pela cooperação no trabalho e pela amizade: Ana Caroline, Eudson, Juliana Ribeiro, Vilemar Araújo, Rafaele Almeida, Jota Júnior, Kaline Chagas, Mayara e Lorena Mayana. Em especial a Dra. Ana Lourdes (Aninha), Dra. Iara Tersia Freitas Macedo e a Wesley Lyeverton C. Ribeiro, meus companheiros de estrada mais presentes... agradeço pelo apoio incondicional, o meu muito obrigada!

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

Ao Dr. Luiz da Silva Viera pela sua dedicação e atenção durante todo o período que estive na Embrapa. Agradeço também aos ICs do Dr. Jomar, Janice Fontanele e Edilson Freitas, pela dedicação no laboratório. À Dona Helena e ao seu Felipe, técnicos do laboratório de parasitologia da EMBRAPA, pelo apoio técnico. Agradeço a todos os estagiários (as) e pós-graduandos (as) da EMBRAPA por toda a amizade e pelos muitos momentos de descontração.

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

A Iarle Feitosa Reis, Eudson Júnior, Aline Vieira, Guedes Neto, Fernando Henrique e Paulo pela disponibilidade em indicarem ou forneceram as fazendas para a realização dos experimentos de campo.

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

Aos demais membros da banca, Profa. Dra. Ana Carolina Fonseca Lindoso Melo e Dra. Luciana Magalhães Melo por terem aceitado o convite e por suas contribuições.

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

Muito obrigada!



## RESUMO

*Haemonchus contortus* é o nematóide mais prevalente na região Nordeste do Brasil. O seu controle é baseado na utilização de benzimidazóis de forma generalizada e o uso inadequado acelera a seleção de parasitos resistentes. Métodos fenotípicos, tais como, o teste de redução na contagem de ovos nas fezes (FECRT) e o teste de eclosão de ovos (TEO) são amplamente utilizados para caracterizar a resistência anti-helmíntica (RA), embora com baixa sensibilidade. Os métodos baseados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) são também utilizados para diagnosticar a resistência a benzimidazóis em *H. contortus*. Estes métodos detectam polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) F200Y, F167Y e E198A no gene codificante para o isotipo 1 da  $\beta$ -tubulina, que são conhecidos por estarem associados à resistência a benzimidazóis. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de polimorfismos responsáveis pela resistência a benzimidazóis em populações de *Haemonchus contortus* isoladas no estado do Ceará. A PCR em tempo real (qPCR) foi realizada para identificação de cada SNP conhecido no gene codificante para o isotipo 1 da  $\beta$ -tubulina, para tanto foi utilizado DNA de um *pool* de 10 adultos de *H. contortus* do sexo masculino obtidos de um animal por rebanho. O FECRT e o TEO foram usados para determinar a resistência original presente na população. As amostras testadas foram obtidas a partir de 6 fazendas localizadas em 5 municípios do estado do Ceará (Nordeste do Brasil): Tauá (TA1 e TA2), Boa Viagem (BV), Quixadá (QX), Santa Quitéria (SQ) e Solonópole (SO). O isolado *inbred-susceptible-Edinburgh* (ISE), previamente caracterizado como susceptível a benzimidazóis, foi utilizado como referência para fins de comparação na qPCR. A resistência a benzimidazóis foi detectada no FECRT em todas as fazendas com valores que variam de 0 a 50% de redução de OPG. Os valores das concentrações inibitórias de 50% da eclosão das larvas (CE50) determinados no TEO foram todos superiores a 1,62  $\mu$ g/mL. Nos resultados da qPCR foram observadas altas frequências dos SNP F200Y e F167Y. As maiores frequências de alelos resistentes nas populações estudadas foram para o SNP F167Y e não foram detectados alelos resistentes para o SNP E198A. As frequências de alelos resistentes para o isolado ISE foram 1,7%, 0% e 0% para os SNP F200Y, F167Y e E198A, respectivamente. Os resultados sugerem que os SNP F167Y e F200Y são importantes para a resistência a benzimidazóis nas populações estudadas e devem ser incluídos no diagnóstico molecular de resistência anti-helmíntica no Ceará.

**Palavras-chave:** Nematóides. Resistência anti-helmíntica. SNP. PCR em tempo real. Ovinos.

## ABSTRACT

*Haemonchus contortus* is the most prevalent nematode in Northeast Brazil. Control based on benzimidazole utilization is widespread and its inadequate use accelerates the selection of resistant parasites. Phenotypic methods such as faecal egg count reduction test (FECRT) and egg hatch assay (EHA) are widely used to characterize anthelmintic resistance (AR) albeit with low sensitivity. PCR based methods are also used to diagnose resistance to benzimidazoles in *H. contortus*. These methods detect single nucleotide polymorphisms (SNPs) F200Y, F167Y and E198A in the  $\beta$ -tubulin isotype 1 gene that are known to be associated with benzimidazole resistance. The objective of this study was to investigate the presence of polymorphisms responsible for resistance to benzimidazoles in *Haemonchus contortus* populations isolated in the state of Ceará. Real time (qPCR) was performed to identify each known SNP in the  $\beta$ -tubulin isotype 1 gene. DNA was extracted from a pool of 10 adult male *H. contortus* from a single animal per farm. FECRT and EHA were used to determine the original resistance present in the population. Tested samples were obtained from 6 farms located in 5 counties in the Ceará State (Northeast Brazil): Tauá (TA1 and TA2), Boa Viagem (BV), Quixadá (QX), Santa Quitéria (SQ) and Solonópole (SO). The inbred-susceptible-Edinburgh (ISE) isolate, previously reported as benzimidazole susceptible, was used as reference for comparison purposes in the qPCR assay. Benzimidazole resistance was detected by FECRT in all farms with values ranging from 0 to 50%. Half maximal effective concentration (EC50) values as determined by EHA were all above 1.62  $\mu$ g/mL. Real-time PCR results showed high frequencies of the SNPs F200Y and F167Y. The most frequent resistant allele in the studied populations was SNP F167Y and resistance for SNP E198A was not detected. Resistant allele frequencies for the ISE isolate were 1.7%, 0% and 0% for SNPs F200Y, F167Y and E198A, respectively. Our results suggest that the SNPs F167Y and F200Y are both important for benzimidazole resistance in the studied populations and should be included in the molecular diagnosis of anthelmintic resistance in the Ceará.

**Keywords:** Nematodes. Anthelmintic resistance. SNP. Real-time PCR. Sheep.

## LISTA DE FIGURAS

### DISSERTAÇÃO

Figura 1 - Esquema de microtúbulo evidenciando as subunidades proteicas:  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulinas.....21

### CAPÍTULO I

Fig. 1. Locations, within Ceará State, of the counties and farms where the studied *H. contortus* isolates were obtained.....35

Fig. 2. Example of a melting curve from isolate BV after qPCR amplification of products containing SNP F200Y resistant (dashed line) and sensitive (continuous line) alleles. The Y axis represents the height of the derivative peaks ( $- dl/dt$ ) while the X axis represents the temperatures ( $^{\circ}\text{C}$ ) where fluorescence measures were taken.....42

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Table 1 – Real-time PCR primers used to detect <i>H. contortus</i> SNPs F200Y; F167Y and E198A. In the primer name column, F stands for forward and R for reverse.....	37
Table 2 - Mean egg counts in farms before (Day 0) and after (Day 8) treatment with oxfendazole, efficacy (%) obtained from faecal egg count reduction test results and EC50 determined by egg hatch test.....	39
Table 3 - Genera identification and frequencies (%) of third-stage larvae (L3) from faecal cultures pre-treatment (Pre) (day 0) and post-treatment (Post) (day 8) with oxfendazole.....	39
Table 4 - Quantitative PCR mean Cts, standard deviation and SNP F200Y, F167Y e E198A allele frequencies from pools of adult male <i>H. contortus</i> .....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RA – resistência anti-helmíntica

L1 – larva de 1º estágio

L2 – larva de 2º estágio

L3 – larva de 3º estágio

SNP – polimorfismo de nucleotídeo único

Tyr – Tirosina

Phe – Fenilalanina

TEO – Teste de eclosão de ovos

FECRT – Teste de redução na contagem de ovos nas fezes

OPG – ovos por grama de fezes

PCR – reação em cadeia pela polimerase

RFLP-PCR – *restriction fragment length polymorphism PCR*

AS-PCR – *Allele-specific PCR*

*H. contortus* – *Haemonchus contortus*

qPCR – PCR em Tempo Real Quantitativo

DNA – Ácido desoxirribonucleico

TA1 – Tauá 1

TA2 – Tauá 2

BV – Boa Viagem

QX – Quixadá

SQ – Santa Quitéria

SO – Solonopóle

ISE – *Inbred-susceptible-Edinburgh*

BZ – *Benzimidazoles*

mm – milímetro

DMSO – dimetilsulfóxido

SDS – *sodium dodecil sulfato*

EDTA – ethilenodiamonotetraacetato

mM – milimolar

TE – Tris EDTA

HCl – ácido clorídrico

ng – nanograma

WAAVP – *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*

EC50 – concentração inibitória de 50% da eclosão das larvas

Ct – *threshold cycle*

Tm – *melting temperature*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
2.1 <i>Haemonchus contortus</i> .....	17
2.2 Fatores que promovem a resistência anti-helmíntica.....	18
2.3 Situação atual da resistência anti-helmíntica.....	19
2.4 Anti-helmínticos benzimidazóis e pró-benzimidazóis.....	20
2.4.1 Mecanismo de ação.....	20
2.4.2 Mecanismo de resistência.....	21
2.5 Diagnóstico de resistência a benzimidazóis.....	22
2.5.1. Teste de redução na contagem de ovos nas fezes (FECRT).....	22
2.5.2 Teste de eclosão de ovos (TEO).....	23
2.5.3 Diagnóstico molecular .....	23
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>26</b>
<b>4 HIPÓTESE CIENTÍFICA.....</b>	<b>27</b>
<b>5 OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
5.1 Objetivo Geral.....	28
5.2 Objetivos Específicos.....	28
<b>6 CAPÍTULO I.....</b>	<b>29</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>52</b>
<b>9 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>53</b>
<b>10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No Nordeste brasileiro, a ovinocaprinocultura é uma das principais fontes de proteína animal. O Brasil, em 2010, apresentou um rebanho de 17.380.581 ovinos e de 10.046.888 caprinos, e neste mesmo período, o Nordeste concentrou aproximadamente 91% e 57% do rebanho caprino e ovino, respectivamente. O estado do Ceará, por sua vez, é responsável por 12% do efetivo de ovinos e 10% do rebanho caprino nacional (IBGE, 2010). Estas duas culturas são importantes fontes de renda, principalmente para os pequenos produtores rurais, devido à exploração da carne, leite e pele. Entretanto, um dos principais fatores limitantes a essa atividade é o parasitismo por nematóides gastrintestinais por causar diminuição na produção e mortalidade no rebanho, principalmente no período chuvoso (PINHEIRO et al., 2000; MELO, 2005; SECHI et al., 2010) e aumento nos custos com tratamentos com anti-helmínticos (FORBES et al., 2002).

Os nematóides de maior importância para os pequenos ruminantes no Brasil são: *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides* spp., *Cooperia curticei* e *Oesophagostomum columbianum* (AMARANTE et al., 2004). Dentre estes, merece destaque *H. contortus*, nematóide localizado no abomaso de ovinos e caprinos. No Nordeste, este parasito vem sendo relatado como o mais prevalente entre os nematóides gastrintestinais (MELO et al., 2009) e a sua patogenia deve-se principalmente ao hematofagismo (ANGULO-CUBILLÁN et al., 2007). Em virtude desse hábito, os animais com elevada carga parasitária desenvolvem um quadro clínico de anemia grave e em um curto período de tempo podem vir a óbito (VIEIRA, 2008).

O controle dos nematóides em pequenos ruminantes é realizado, basicamente, com a utilização de anti-helmínticos pertencentes a diversos grupos químicos (VIEIRA; CAVALCANTE, 1999). Os benzimidazóis, as lactonas macrocíclicas e os imidazotiazóis são os mais utilizados, por serem considerados de amplo espectro. Os benzimidazóis merecem destaque por representarem uma classe de anti-helmínticos mundialmente utilizada no tratamento de doenças parasitárias de animais. Estes fármacos apresentam uma ampla variedade de formulações e alta margem de segurança (KRÍZOVÁ-FORSTOVÁ et al., 2011). Logo, são considerados importantes fontes para o controle de nematóides de pequenos ruminantes. No estado do Ceará os benzimidazóis foram os anti-helmínticos mais utilizados por criadores de caprinos e ovinos (MELO et al., 2009). Contudo, o uso incorreto com a adoção de formas inadequadas de tratamento levou rapidamente ao aparecimento da resistência anti-helmíntica (RA). Poucos produtores realizam um esquema racional de



alternância de drogas anti-helmínticas associado ao tratamento seletivo, como consequência, o uso inadequado de anti-helmíntico seleciona indivíduos resistentes (KENYON et al., 2009). A RA já foi relatada em nematóides de caprinos e ovinos em vários países, incluindo o Brasil, nesse contexto o estado do Ceará não foge a esta realidade (VIEIRA; CAVALCANTE, 1999; MELO et al., 2003, MELO et al., 2009).

Devido à grande importância da RA, alguns métodos de detecção foram desenvolvidos com o intuito de estabelecer um diagnóstico precoce de resistência e promover mudanças no controle. Para benzimidazóis, os principais métodos de diagnóstico da RA são técnicas fenotípicas que apresentam baixa sensibilidade (MARTIN et al., 1989; COLES et al., 2006; PAPADOPOULOS, 2008). Sendo assim, as pesquisas têm investido na padronização de técnicas moleculares para identificar a RA (PAPADOPOULOS, 2008). Neste sentido, foram elaborados métodos para identificação de nematóides resistentes aos benzimidazóis, baseados em polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) identificados no gene codificante para  $\beta$ -tubulina de trichostrongilídeos (KWA et al., 1994; PRICHARD et al., 2000; GHISI et al., 2007). Contudo, a maioria desses métodos são aplicáveis apenas quando se conhece os polimorfismos existentes em uma dada população (GHISI et al., 2007).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Haemonchus contortus*

*Haemonchus contortus* é um nematóide monóxeno, hematófago que se estabelece no abomaso de caprinos e ovinos. Apresenta cerca de 30 mm, reprodução sexuada em um ciclo de vida direto (PRICHARD, 2001; BOWMAN et al., 2006). Apresenta uma fase de vida livre no ambiente e outra parasitária nos pequenos ruminantes. A fase no ambiente inicia-se com a postura de ovos que contém um embrião no estágio de mórula. Estes ovos são eliminados nas pastagens juntamente com as fezes, e em condições ideais, a mórula se desenvolve em larva de primeiro estágio (L1). Após se alimentar a L1 sofre a primeira muda passando para larva de segundo estágio (L2). Na segunda muda, a cutícula do segundo estágio fica temporariamente retida com uma bainha que protege a larva infectante (L3). A L3 então migra para fora da massa fecal em direção à vegetação adjacente. O ciclo parasitário inicia-se quando os animais ingerem as L3 junto com a pastagem. Após o desembainhamento no rúmen, as larvas sofrem duas mudas, evoluindo no tubo digestivo até adulto. Um pouco antes da muda final estes nematóides desenvolvem a lanceta perfurante que lhes permite a obtenção do sangue dos vasos da mucosa do abomaso. Devido a essa característica, a Hemoncose, enfermidade provocada por *H. contortus*, se caracteriza principalmente por anemia severa com palidez da pele e das mucosas e uma progressiva perda de peso. A população de *H. contortus* pode remover até um quinto do volume circulante de eritrócitos de cordeiros. Os efeitos patogênicos resultam da incapacidade do hospedeiro de compensar a perda sanguínea. Pois, caso a perda sanguínea exceda a capacidade hematopoiética, resultará em doença evidente e poderá levar o animal rapidamente a óbito. Além da perda de hemácias, também ocorre redução das proteínas plasmáticas, que conseqüentemente se manifesta externamente por edema submandibular e ascite. O período pré-patente é de 14 a 21 dias (ONYIAH; ARSLAN, 2005; BOWMAN et al., 2006).

Em relação à distribuição de *H. contortus*, geralmente está presente na maioria dos animais do rebanho e tem representado, no mínimo, 80% da carga parasitária. Especialmente no estado do Ceará existem vários relatos de alta prevalência em pequenos ruminantes (VIEIRA; CAVALCANTE, 1999; MELO et al., 2003; MELO et al., 2004; MELO et al., 2009). Essa característica pode ser justificada em parte pelo fato das fêmeas serem altamente prolíferas, pois são capazes de produzir até 10.000 ovos por dia. *H. contortus* apresentam grande variabilidade genética, seja dentro de uma população ou entre populações

geograficamente separadas. Além disso, é um nematóide extremamente bem sucedido, encontrado em diferentes populações de pequenos ruminantes desde os trópicos úmidos até as áreas de clima temperado. As populações no ambiente são mais elevadas do que nos hospedeiros. A taxa de polimorfismos nesta espécie está diretamente relacionada à migração dos nematóides, que é favorecida pelo grande comércio de pequenos ruminantes no mundo (PRICHARD, 2001). Estudos têm demonstrado que o alto potencial biótico associado ao elevado tamanho da população efetiva, rápido ciclo de vida, taxa de infecção e fluxo gênico podem ser responsáveis pela alta variabilidade genética destes nematóides, o que sem dúvida pode contribuir para disseminação da RA (PRICHARD, 2001; BRASIL et al., 2012).

## **2.2 Fatores que promovem a resistência anti-helmíntica**

Os novos conhecimentos sobre RA, envolvendo os fatores de seleção e mecanismos genéticos, demonstraram que muitas considerações e recomendações, disseminadas no passado sobre o uso de anti-helmínticos, contribuíram para a emergência dessa resistência (TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008). Tendo em vista a utilização dos anti-helmínticos sintéticos é a principal forma de controle de nematóides gastrintestinais, surgiram diversas propostas de esquemas de tratamento para pequenos ruminantes. Dentre elas, destacam-se o tratamento supressivo e o estratégico (PINHEIRO, 1983, EMBRAPA, 1994). Embora tenham sido amplamente divulgados e eficientes no controle do parasitismo, quando as drogas eram altamente eficazes, foi uma das causas do rápido desenvolvimento de populações resistentes em um curto período de tempo (MELO; BEVILAQUA, 2002; TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008). No tratamento supressivo eram realizadas vermifugações regulares a cada 2 a 3 semanas, ou seja, antes do final do período pré-patente de parasitas, com o objetivo de uma quase total eliminação dos nematóides (TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008). O controle estratégico indicava o tratamento de todo o rebanho em épocas desfavoráveis a sobrevivência das larvas nas pastagens. Esta estratégia tinha como objetivo prevenir as nematodioses e ao mesmo tempo, promover a descontaminação das pastagens (VIEIRA, 2008). Porém nenhum anti-helmíntico é eficaz sobre 100% dos nematóides e desta forma as populações resistentes foram sendo selecionadas a cada administração do tratamento.

Além das formas de tratamento, algumas práticas de manejo foram identificadas como favorecedoras do desenvolvimento da RA, como a subdosagem, a utilização da mesma família de anti-helmínticos por um longo período de tempo, a alta frequência de tratamentos e também a rápida rotação de princípio ativo (PAPADOPOULOS, 2008; TORRES-ACOSTA;

HOSTE, 2008).

O uso inadequado de anti-helmínticos por criadores de caprinos e ovinos no estado do Ceará é exemplificado por práticas, como a utilização de dois a três princípios ativos durante o mesmo ano e em média, três vermifugações ao ano. Além disso, cerca de 48% dos criadores desse estado, tratavam todos os animais principalmente no período seco, ou seja, quando a população de nematóides está em sua maioria no hospedeiro (MELO et al., 2009). É importante ressaltar que esse manejo incorreto pode levar a uma grande redução da população *in refugia*, que corresponde aos nematóides não submetidos ao tratamento. Dessa forma, quanto maior for o número de tratamentos sobre essa população, maior será a pressão de seleção para resistência (KENYON et al., 2009).

### **2.3 Situação atual da resistência anti-helmíntica**

Em virtude do uso intenso e inadequado dos anti-helmínticos, em poucas décadas ocorreu o desenvolvimento de populações resistentes a todas as famílias de anti-helmínticos de amplo espectro disponíveis no mercado. O primeiro relato de RA do mundo foi a um benzimidazol em populações de *H. contortus* nos Estados Unidos (DRUDGE et al., 1964). Desde então, esse problema vem sendo detectado no mundo (WEST et al., 2004; ALKA et al., 2004; LE JAMBRE et al., 2005; SARGISON et al., 2007; PALCY et al., 2008; GEORGE et al., 2011; KAPLAN; VIDYASHANKAR, 2012).

Especificamente no Brasil, os primeiros relatos de RA foram descritos no Sul do país (SANTOS; GONÇALVES, 1967). No Nordeste brasileiro, o primeiro relato de suspeita de RA foi em nematóides gastrintestinais de caprinos a benzimidazóis no Estado do Ceará (VIEIRA et al., 1989). A partir desse trabalho, não faltaram relatos de resistência a todos os fármacos de amplo espectro comercialmente utilizados em vários estados dessa região: Alagoas (AHID et al., 2007), Maranhão (BRITO et al., 2009), Paraíba (RODRIGUES et al., 2007), Pernambuco (CHARLES et al., 1989; SANTOS et al., 1993; LIMA et al., 2010), Rio Grande do Norte (PEREIRA et al., 2008; COELHO et al., 2010), Piauí (COSTA JÚNIOR et al., 2005). Especialmente no Ceará, existem alguns trabalhos que relataram a RA, em sua maioria a benzimidazóis (VIEIRA; CAVALCANTE, 1999; MELO et al., 2003; MELO et al., 2004; MELO et al., 2009).

Em estudo realizado em 25 propriedades pertencentes à região semi-árida do Estado do Ceará, foi identificada prevalência de resistência a benzimidazóis de 88%. Associado a

esse fato, foi verificado que o anti-helmíntico oxfendazol era o fármaco mais utilizado para controle de nematóides gastrintestinais nesta área (MELO et al., 2009).

## **2.4 Anti-helmínticos benzimidazóis e pró-benzimidazóis**

### **2.4.1 Mecanismo de ação**

Os benzimidazóis são os anti-helmínticos mais utilizados no mundo. A história desta classe de fármacos começou com a introdução do tiabendazol em 1961, o primeiro anti-helmíntico de amplo espectro (BROWN et al., 1961). Desde então, foram desenvolvidos uma variedade de drogas que se dividem em tiazólicos (tiabendazol e cambendazol); metilcarbamatos (parbendazol, mebendazol, flubendazol, ciclobendazol, albendazol, fenbendazol, oxfendazol, oxibendazol, luxabendazol e ricobendazol); halogenados (triclambendazol) e pró - benzimidazóis (febantel, tiofanato e netobimin) (LANUSSE, 1996). São anti-helmínticos que apresentam baixa toxicidade e atuam sobre uma grande variedade de nematóides (KRÍZOVÁ-FORSTOVÁ et al., 2011).

O mecanismo de ação dos benzimidazóis se deve à capacidade de se ligar com alta afinidade à  $\beta$ -tubulina, subunidade proteica dos microtúbulos (Figura 1.), inibindo sua polimerização ao mesmo tempo que processos de degradação na extremidade oposta do microtúbulo acabam por causar o colapso do citoesqueleto (LACEY, 1988; HAN et al., 1998; KOHLER, 2001). Os microtúbulos são altamente dinâmicos e participam de uma variedade de funções vitais, incluindo a motilidade, mitose e transporte de moléculas intracelulares em todos os eucariontes. Muitas destas estruturas existem em estado de equilíbrio dinâmico em que a montagem e desmontagem das subunidades são equilibradas. Em tais sistemas, a interação do benzimidazol com a tubulina leva a dano ao estado estacionário com uma perda de microtúbulos e acúmulo de tubulina livre. Em vista dos papéis cruciais que os microtúbulos desempenham em muitos processos celulares, a sua destruição induzida por fármacos, leva inevitavelmente à morte dos nematóides sensíveis (LACEY, 1988; KOHLER, 2001). O princípio da elevada toxicidade seletiva de benzimidazóis, pode ser justificado por uma interação muito mais forte e irreversível de ligação dos fármacos com tubulinas de helmintos, em comparação com tubulinas de mamíferos (LACEY, 1988).

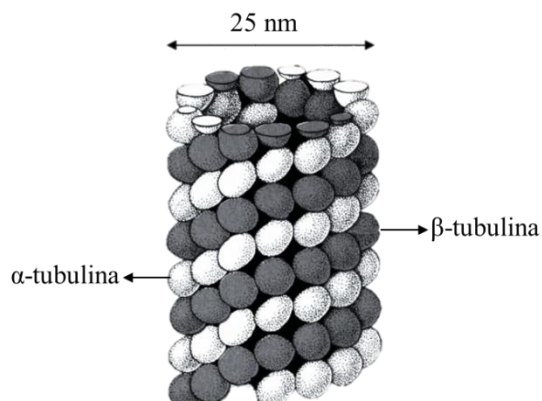


Figura 1 - Esquema de microtúbulo evidenciando as subunidades proteicas:  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina.

Fonte: [http://www.cytoskeleton.com/media/wysiwyg/MT\\_schematic\\_2.jpg](http://www.cytoskeleton.com/media/wysiwyg/MT_schematic_2.jpg)

#### 2.4.2 Mecanismo de resistência

Os mecanismos de resistência a benzimidazóis, apesar de não totalmente elucidados, são os mais bem caracterizados. Alguns SNP já foram descritos como responsáveis pela resistência a benzimidazóis em trichostrongilídeos. Estes polimorfismos levam a modificações estruturais na  $\beta$ -tubulina que impedem a ligação dos benzimidazóis (KWA et al., 1994; PRICHARD et al., 2000; GHISI et al., 2007). O primeiro SNP descrito foi no códon 200, que se refere a uma transversão de timina por adenina, resultando na tradução de tirosina (Tyr, TAC) ao invés de fenilalanina (Phe, TTC) (F200Y) na  $\beta$ -tubulina (KWA et al., 1994). O segundo SNP foi descrito no códon 167 (F167Y) que ocorre devido à mesma transversão da base nitrogenada e troca de aminoácidos traduzidos do F200Y (SILVESTRE; CABARET, 2002). O último e mais incomum SNP descrito foi no códon 198, caracterizada por uma transição de base nitrogenada adenina por citosina levando a mudança do aminoácido traduzido de glutamato (GAA) para alanina (GCA) (E198A) na  $\beta$ -tubulina de alguns isolados resistentes de *H. contortus* (GHISI et al., 2007).

Em nematóides gastrintestinais, existem três hipóteses que explicam o aparecimento de SNP para resistência aos benzimidazóis. A primeira hipótese sugere que os alelos para resistência já estariam presentes na população por um longo período como raros. De acordo com a segunda hipótese podem ocorrer mutações espontâneas que geram novos alelos na população de parasitas. A última hipótese afirma que a recombinação sexual entre alelos suscetíveis e resistentes podem ter gerado novas variantes de um alelo resistente

(SILVESTRE et al., 2009).

Esses SNPs foram relatados em nematóides provenientes da Austrália e em países da Europa e da África (KWA et al., 1994; ELARD et al., 1999; ELARD; HUMBERT, 1999; PRICHARD et al., 2000; PRICHARD, 2001; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2001; SILVESTRE; CABARET, 2002; NJUE; PRICHARD, 2003; TIWARI et al., 2006; GHISI et al., 2007; RUFENER et al., 2009). No entanto, são escassos os trabalhos que relataram estas alterações genéticas em nematóides de pequenos ruminantes no Brasil (BRASIL et al., 2012; NICIURA et al., 2012).

## **2.5 Diagnóstico de resistência a benzimidazóis**

O aumento da RA ameaça a sustentabilidade da indústria pecuária em todo o mundo (SUTHERLAND; LEATHWICK, 2011). Por isso, há uma necessidade crescente de monitorar os níveis de resistência com técnicas apropriadas. Sendo assim, alguns métodos de detecção foram desenvolvidos com o intuito de estabelecer um diagnóstico e promover mudanças no controle. Para benzimidazóis, os principais métodos de diagnóstico da resistência são o teste *in vivo* de redução na contagem de ovos nas fezes (FECRT) e o teste *in vitro* de eclosão de ovos (TEO). Apesar de serem indicados pela “*World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*” (COLES et al., 2006), esses métodos fenotípicos detectam a resistência apenas quando no mínimo de 25% da população de nematóides apresenta alelos para resistência, tardiamente para promover mudanças nos níveis de resistência (MARTIN et al., 1989; PAPADOPOULOS, 2008). Leignel et al. (2010), verificaram que os genes da resistência quando em alta prevalência podem permanecer durante no mínimo 2 anos na população de *H. contortus*, mesmo com a suspensão do uso de benzimidazóis. Dessa forma, as pesquisas mais recentes têm focado na detecção dos SNP responsáveis pela resistência a benzimidazóis com o intuito de desenvolver técnicas moleculares para diagnóstico precoce da resistência.

### **2.5.1. Teste de redução na contagem de ovos nas fezes (FECRT)**

O teste de redução na contagem de ovos nas fezes (FECRT) foi o primeiro desenvolvido para avaliar a eficácia anti-helmíntica e continua a ser o mais amplamente utilizado para diagnóstico de rotina em rebanhos comerciais. O teste fornece uma estimativa da eficácia do anti-helmíntico por comparação da contagem de ovos eliminados nas fezes

(OPG) em animais tratados e não tratados ou antes e após o tratamento (CABARET; BERRAG, 2004). No entanto, é importante ressaltar que o FECRT não é capaz de detectar a resistência em níveis baixos e ainda seus resultados podem não estimar com precisão a eficácia do anti-helmíntico porque a produção de ovos de nematóides nem sempre se correlaciona com os números de adultos (TAYLOR et al., 2002; MELO, 2005).

### **2.5.2 Teste de eclosão de ovos (TEO)**

Este teste é utilizado para detectar a resistência a benzimidazóis, pois é baseado na capacidade que estes fármacos possuem de impedir o desenvolvimento embrionário dos ovos e a eclosão (TAYLOR et al., 2002; COLES et al., 2006). No TEO os ovos são cultivados na presença de uma série de diluições de tiabendazol. Apesar de ser amplamente utilizado para detecção de resistência aos benzimidazóis, o TEO têm certas limitações, tais como baixa sensibilidade, é uma técnica laboriosa e para sua realização é necessário utilização de ovos frescos coletados por no máximo 3 horas ou mantidos em condições de anaerobiose por até 7 dias (COLES et al., 2006; CUDEKOVÁ et al., 2010).

### **2.5.3 Diagnóstico molecular**

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) detecta a resistência a benzimidazóis quando apenas 1% da população de nematóides apresenta genes resistentes (ROOS et al., 1995). Os testes moleculares, com base na análise de resistência associada à presença de SNP por meio da utilização de PCR, são altamente sensíveis (VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009). Apesar de serem consideradas técnicas caras, o seu uso é justificado para o diagnóstico precoce de resistência, visando à concepção de estratégias que objetivem retardar o desenvolvimento da resistência dos nematóides aos anti-helmínticos (COLES et al., 2006; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, 2006).

Algumas mutações já foram descritas como responsáveis pela resistência a benzimidazóis em trichostrongilídeos no mundo (KWA et al., 1994; PRICHARD et al., 2000; GHISI et al., 2007). No Brasil existem poucos trabalhos que relataram estas alterações genéticas. Os SNP F167Y e F200Y foram encontraram em populações de *H. contortus* resistentes a benzimidazóis isoladas em alguns estados da região Sul e Sudeste (BRASIL et al., 2012; NICIURA et al., 2012). Na região Nordeste, populações resistentes de *H. contortus* isolados por Melo (2005) no estado do Ceará, não foram amplificadas por meio da PCR,



utilizando primers para SNP F200Y da  $\beta$ -tubulina (J. CABARET, comunicação pessoal, 2011). O fato de substituições que conduzem à resistência a benzimidazóis existirem em diferentes locais na sequência da  $\beta$ -tubulina indica claramente que outras mutações independentes podem ocorrer (BEECH et al., 2011). Além disso, a presença de diferentes SNP pode estar relacionada aos níveis de resistência e a localização geográfica das populações (KOTZE et al., 2012).

O controle de *H. contortus* depende diretamente do sucesso do diagnóstico da resistência às drogas. Os testes baseados em DNA genômico são simples e podem ser realizados em qualquer estágio da vida dos nematóides (GHISI et al. 2007). É importante ressaltar que já existem técnicas moleculares padronizadas para o diagnóstico da resistência a benzimidazóis, como, sequenciamento genético (SILVESTRE; HUMBERT, 2002; KOTZE et al., 2012), RFLP-PCR (TIWARI et al., 2006), PCR em tempo real (ALVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2005; WALSH et al., 2007; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009), AS-PCR (CUDEKOVÁ et al., 2010) e pirosequenciamento (BARRERE et al., 2012), dentre outras. Contudo, a maioria destas técnicas são aplicáveis apenas quando os SNP responsáveis pela resistência são conhecidos.

A análise genética tem um significativo impacto sobre o diagnóstico de resistência à droga (MOLENTO et al., 2011). Da mesma forma, o conhecimento de como as mutações associadas à resistência podem surgir e se difundir em populações de nematóides é um objetivo importante no estabelecimento de estratégias que retardem o desenvolvimento da resistência (SKUCE et al., 2010). Sendo assim, é essencial o conhecimento dos SNP que provocam a RA em nematóides gastrintestinais para subsidiar a confecção de um diagnóstico rápido de resistência a benzimidazóis (GHISI et al., 2007), por meio de técnicas moleculares como a PCR em tempo real (qPCR). A qPCR é um avanço da PCR convencional, em que a amplificação e detecção de produtos amplificados são realizadas em uma única reação. Para fins de aplicabilidade prática, este processo representa um grande passo, uma vez que elimina a necessidade do laborioso processamento pós-amplificação, a eletroforese em gel. Existem algumas formas de mensurar a quantidade de DNA durante a amplificação, as mais utilizadas são: a sonda fluorescente TaqMan, que se liga especificamente a uma região do DNA alvo durante a amplificação e corantes fluorescentes que se intercalam com o DNA, tais como SYBR-Green, que se ligam não especificamente a cadeia dupla de DNA durante a amplificação. Independente do formato escolhido, a cada ciclo é emitido um sinal fluorescente com a intensidade proporcional a quantidade de produto amplificado, isso permite quantificar indiretamente o DNA. As vantagens práticas da qPCR sobre a PCR

convencional incluem maior sensibilidade, velocidade, simplicidade, reprodutibilidade e capacidade quantitativa (YANG; ROTHMAN, 2004).

Esta técnica permite calcular a proporção de cada variante alélica e pode ser realizada utilizando DNA extraído de nematóides individualmente ou em *pool* (ALVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2005; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009). Uma variedade de diferentes abordagens para qPCR são utilizadas para a detecção e quantificação da frequência dos SNP (VON SAMSON-HIMMELSTJERNA; BLACKHALL, 2005). Trabalhos recentes têm demonstrado a capacidade da qPCR em identificar os alelos resistentes e susceptíveis no códon 200 do gene codificante para  $\beta$ -tubulina em *H. contortus* utilizando a sonda TaqMan (WALSH et al., 2007; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009) e o SYBR Green (ALVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2005).

O desenvolvimento de métodos rápidos e sensíveis como a qPCR para detecção de resistência é uma ferramenta valiosa para monitorar o aparecimento e a propagação de nematóides potencialmente resistentes a benzimidazóis (VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009). Dessa forma, com a utilização dessas técnicas provavelmente será possível monitorar a resistência em diferentes níveis de pressão de seleção, permitindo a escolha de formas de controle adequadas que retardem o aparecimento da resistência através do manejo integrado, tratamentos alternativos e da redução do número de tratamentos (MOLENTO, 2009).

### 3 JUSTIFICATIVA

A ovinocultura no estado de Ceará é uma importante atividade econômica. Contudo, o parasitismo por nematóides gastrintestinais associado à RA é um dos principais fatores limitantes ao desenvolvimento dessa atividade. Nesse contexto, os benzimidazóis são uma das classes de anti-helmínticos mais utilizadas no controle de nematóides e conseqüentemente existem muitos relatos de resistência a esses fármacos. Contudo, os mecanismos genéticos de resistência a benzimidazóis em nematóides ainda não estão esclarecidos no Ceará. Dessa forma, fica evidente a necessidade de realizar um estudo que objetive investigar a presença de SNP responsáveis pela resistência a benzimidazóis em populações *H. contortus* de ovinos no Ceará, para que se possa estabelecer diagnóstico precoce de RA por meio de uma ferramenta molecular sensível e específica como a qPCR, visando à futura concepção de estratégias adequadas de controle.

#### **4 HIPÓTESE CIENTÍFICA**

As populações de *Haemonchus contortus* resistentes a benzimidazóis isoladas em ovinos no estado do Ceará apresentam no mínimo um dos três SNP F200Y, F167Y e E198A no gene codificante para o isotipo 1 da  $\beta$ -tubulina .

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo Geral

Investigar a presença de polimorfismos responsáveis pela resistência a benzimidazóis em populações de *H. contortus* isoladas no estado do Ceará.

### 5.2 Objetivos Específicos

- Avaliar *in vivo* e *in vitro* a resistência a benzimidazóis em *H. contortus* de ovinos;
- Isolar populações de *H. contortus* resistentes a oxfendazol;
- Investigar a presença dos SNP F200Y; F167Y e E198A no gene codificante para o isotipo 1 da  $\beta$ -tubulina em populações de *H. contortus* resistentes a benzimidazóis isolados em rebanhos no Ceará.

## 6 CAPÍTULO I

Identificação e quantificação de polimorfismos responsáveis pela resistência a benzimidazóis em *Haemonchus contortus* isolados no Nordeste do Brasil

Identification and quantification of benzimidazole resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in the Northeastern Brazil

Periódico: Veterinary Parasitology (Submetido em junho de 2013)

**Identification and quantification of benzimidazole resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in the Northeastern Brazil**

Jessica Maria Leite dos Santos<sup>a</sup>, Jomar Patrício Monteiro<sup>b</sup>, Wesley Lyevertton Correia Ribeiro<sup>a</sup>; Iara Tersia Freitas Macedo<sup>a</sup>; Ana Lourdes Fernandes Camurça-Vasconcelos<sup>a</sup>; Luiz da Silva Vieira<sup>b</sup>; Claudia Maria Leal Bevilaqua<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Av. Dedé Brasil, 1700, CEP 60714-903, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>b</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Caprinos e Ovinos, Estrada Sobral/Groaíras, km 04. Caixa Postal 145, CEP: 62010-970, Sobral, CE, Brazil

\* Corresponding author: Dra. Claudia Bevilaqua.

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

Av. Dedé Brasil, 1700, Campus do Itaperi.

CEP 60714-903.

Fortaleza, Ceará, Brazil.

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

E-mail: claudia.bevilaqua@pq.cnpq.br or bevilaqua.uece@gmail.com

## Resumo

*Haemonchus contortus* é o nematóide mais prevalente na região Nordeste do Brasil. O objetivo deste estudo foi caracterizar populações de *H. contortus* resistentes a benzimidazóis e por meio de reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR) quanto à presença dos SNP, F200Y, F167Y e E198A, no gene codificante para o isotipo 1 da  $\beta$ -tubulina. A qPCR foi realizada utilizando o DNA de um *pool* de 10 de *H. contortus* adultos do sexo masculino coletados de um ovino por fazenda. O teste de redução na contagem de ovos nas fezes (FECRT) e o teste de eclosão dos ovos (TEO) foram utilizados para determinar a resistência original das populações. Amostras testadas foram obtidas a partir de seis fazendas localizadas em cinco municípios do Estado do Ceará: Tauá (TA1, TA2), Boa Viagem (BV), Quixadá (QX), Santa Quitéria (SQ) e Solonópole (SO). O isolado de *H. contortus* sensível a benzimidazóis, *Inbred-susceptible-Edinburgh* (ISE) foi utilizado como referência de susceptibilidade a benzimidazóis para efeitos de comparação na qPCR. A resistência a benzimidazóis foi detectada pelo FECRT em todas as fazendas com valores que variaram de 0 a 50%. Todos os valores de CE50 determinados no TEO foram superiores a 1,62 $\mu$ g/mL. Nos resultados da qPCR foram observadas altas frequências de alelos resistentes para os SNP F200Y e F167Y. O alelo resistente mais frequente nas populações estudadas estava no SNP F167Y, com uma média de 82,65%, e o SNP E198A não foi detectado. As frequências dos alelos resistentes para o isolado ISE foram 1,7%, 0% e 0% para os SNP F200Y, F167Y e E198A, respectivamente. Os resultados sugerem que os SNPs F167Y e F200Y são importantes para a resistência a benzimidazóis nas populações estudadas e devem ser incluídos no diagnóstico molecular de resistência anti-helmíntica no Ceará.

Palavras-chave: *Haemonchus contortus*; PCR em tempo real; SNP; ovelhas.



## Abstract

*Haemonchus contortus* is the most prevalent nematode in the Northeast region of Brazil. The objective of this study was to characterize populations of *H. contortus* for benzimidazole resistance and using real-time polymerase chain reaction (qPCR) for the presence of SNP, F200Y, F167Y and E198A, in the  $\beta$ -tubulin isotype 1 gene. Quantitative PCR was done using DNA from a pool of 10 adult male *H. contortus* from a single animal per farm. Faecal egg count reduction test (FECRT) and egg hatch assay (EHT) were used to determine the original resistance. Tested samples were obtained from 6 farms located in 5 counties in the Ceará State: Tauá (TA1, TA2), Boa Viagem (BV), Quixadá (QX), Santa Quitéria (SQ) and Solonópole (SO). The inbred-susceptible-Edinburgh (ISE) isolate, previously reported as benzimidazole susceptible, was used as reference for comparison purposes in the qPCR. Benzimidazole resistance was detected by FECRT in all farms with values ranging from 0 to 50%. EC50 values as determined by EHA were all above 1.62  $\mu$ g/ml. qPCR results showed high frequencies of the resistant SNPs F200Y and F167Y. The most frequent resistant allele in the studied populations was in SNP F167Y, with a mean of 82.65%, and the SNP E198A was not detected. Resistant allele frequencies for the ISE isolate were 1.7%, 0% and 0% for SNPs F200Y, F167Y and E198A respectively. Our results suggest that the SNPs F167Y and F200Y are both important for benzimidazole resistance in the studied populations and should be included in the molecular diagnosis of anthelmintic resistance in the Ceará.

Keywords: *Haemonchus contortus*; real-time PCR; SNP; sheep.

## 1. Introduction

Gastrointestinal nematodes are considered the main limiting factor to sheep production in the world. *Haemonchus contortus* is the most prevalent and pathogenic nematode infecting sheep in Brazil (Veríssimo et al., 2012). It is responsible for significant economic losses, mainly in the Northeast region, which concentrates approximately 60% of the national sheep flock (IBGE, 2010).

Generally, parasitism by gastrointestinal nematodes is controlled with the use of anthelmintics (Sangster, 2001). Inappropriate use of these drugs leads to selection of resistant *H. contortus* within populations (Falzon et al., 2013).

Benzimidazoles (BZ) are an anthelmintic class worldwide adopted in the control of nematodes in small ruminants (Alvarez-Sanchez et al., 2005; Krizova-Forstová et al., 2011). Resistance to these drugs has been globally reported (Papadopoulos et al., 2012; Torres-Acosta et al., 2012; Falzon et al., 2013). BZ is one of the most used anthelmintic in the Northeast region of Brazil and consequently, there are reports of anthelmintic resistance (AR) to these drugs (Melo et al., 2009; Coelho et al., 2010; Lima et al., 2010).

BZ is one of the best studied classes of anthelmintics; possessing wide spectrum and a variety of pharmaceutical products are commercially available for treatment and prevention of parasitic diseases in humans and food-producing animals (Krizova-Forstová et al., 2011). A number of tests have been developed to diagnose and monitor BZ resistance in nematode populations (Von Samson-Himmelstjerna et al., 2009). The faecal egg count reduction test (FECRT) and egg hatch assay (EHA) are phenotypic methods widely used to measure parasite BZ resistance (Coles et al., 2006) albeit with low sensitivity (Papadopoulos, 2008).

*H. contortus* resistance to BZ has been mainly associated with the SNP at codon 200, which refers to transversion of thymine for adenine, resulting in translation of tyrosine (Tyr, TAC) instead of phenylalanine (Phe, TTC) (F200Y) in the  $\beta$ -tubulin (Kwa et al., 1994). The same transversion is also reported at codon 167 (F167Y) (Silvestre and Cabaret, 2002). A third SNP was described at codon 198 (E198A), involving a change of glutamate (GAA) to alanine (GCA) (E198A) (Ghisi et al., 2007). Knowledge of the molecular basis of BZ resistance has allowed the development of PCR methods based on the identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the  $\beta$ -tubulin isotype 1 gene (Alvarez-Sanchez et al., 2005).

Genetic analysis has a significant impact on the diagnosis of drug resistance, leading to prompt changes in the strategies for parasite control (Molento et al., 2011, Brasil et al.,

2012). Variations of conventional polymerase chain reaction (PCR), such as AS-PCR, RFLP-PCR and ARMS-PCR, have been used in the identification of BZ resistance in *H. contortus* (Silvestre and Humbert, 2000; Tiwari et al., 2006; Niciura et al., 2012). Some drawbacks of these techniques are agarose gel electrophoresis requirement to visualize results, high number of individual nematodes must be tested to obtain meaningful allele frequencies and the necessity of previous knowledge about the SNPs to be tested (Ghisi et al., 2007; Walsh et al., 2007). Real-time PCR (qPCR) provides a viable alternative that allows rapid identification and quantification of resistant and susceptible alleles in *pools* of nematodes (Walsh et al., 2007).

The objective of this study was to identify SNPs responsible for BZ resistance through qPCR in BZ resistant *H. contortus* isolates from different locations in the Ceará State, Northeastern Brazil. Furthermore, we also obtained the allele frequencies for each tested SNP thus, establishing a new method for the diagnosis of BZ resistance in *H. contortus*.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animal welfare

The care and handling of animals were in accordance with internationally accepted standard guidelines for experimental animal use, and the protocol was approved by the Ceará State University Ethics Committee (number: 11585428-2/04).

### 2.2. Resistant isolates

The study was performed in the semiarid region of Ceará state, northeastern Brazil. BZ resistant isolates were obtained from 6 farms located in 5 counties of state: Tauá (TA1 and TA2, 06° 00' 11" S, 40° 17' 34" W), Boa Viagem (BV, 05° 07' 39" S, 39° 43' 56" W), Quixadá (QX, 04° 58' 17" S, 39° 00' 55" W), Santa Quitéria (SQ, 04° 19' 55" S, 40° 09' 24" W) and Solonópole (SO, 05° 44' 00" S, 39° 00' 27" W) (Fig 1.). A questionnaire was applied on all farms to obtain information about management practices, namely: replacement rate, management of acquired animals, rotational grazing, and health management (anthelmintic brand and frequency, FAMACHA<sup>®</sup> system and anthelmintic rotation). Furthermore, FECRT and EHT were used to determine the original resistance present in the populations.

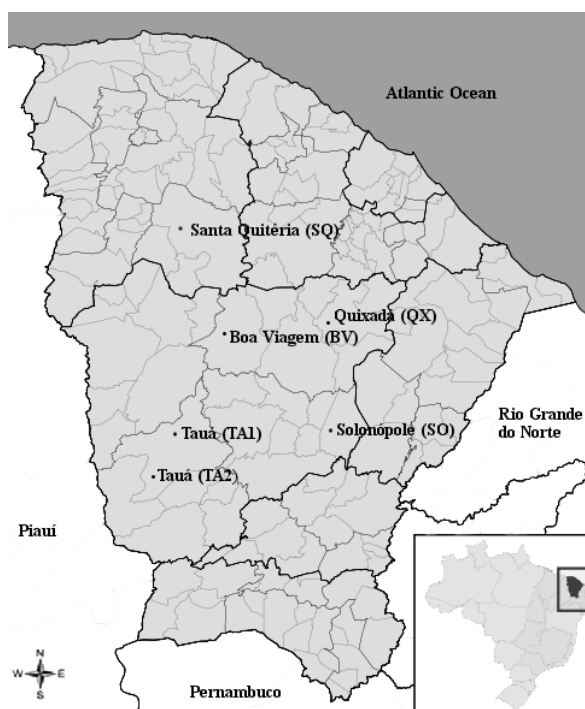


Fig. 1. Locations, within Ceará State, of the counties and farms where the studied *H. contortus* isolates were obtained.

### 2.3. Susceptible isolate

The BZ susceptible *H. contortus* isolate, *Inbred-susceptible-Edinburgh* (ISE) (Roos et al., 2004) kindly provided by Dr. Jacques Cabaret (INRA), was used as reference of susceptibility for comparison purposes in the qPCR. For this, one 3 month old worm-free ovine was experimentally infected with 5,000 ISE third stage larvae (L3). After the establishment of infection, the ovine was submitted to euthanasia for collection of adult male *H. contortus* to be used in molecular tests.

### 2.4. The faecal egg count reduction test (FECRT)

In each flock studied, a minimum of 10 animals were selected for the FECRT based on the egg per gram (epg) counts. The sheep were treated with 5 mg/kg body weight of oxfendazole orally. Faecal samples were obtained directly from the rectum of each animal on day zero and 8 days after anthelmintic treatment (Coles et al., 2006). Two grams of faeces were used for epg determination using the modified McMaster method (Ueno and Gonçalves,

1998). L3 were obtained before and after treatment through fecal cultures (Roberts and O'sullivan, 1950) and at minimum 100 L3 were identified (Keith, 1953).

### 2.5. Egg hatch assay (EHA)

The nematode eggs for EHT were collected by differential sieving through four-stacked sieves with 0.15, 0.10, 0.036 and 0.02 mm apertures. The material retained on the last sieve was washed in water, sedimented, and floated in sucrose saturated solution. Obtained eggs were washed in water to remove the sucrose (Hubert and Kerboeuf, 1992). Suspensions of 250µl containing approximately 100 fresh eggs were incubated in 250 µl of thiabendazole solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) in six concentrations ranging from 0.05 - 1.6 µg/ml, diluted in 0.03% dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) and distilled water. The negative control used only 0.03% DMSO. After 48 h incubation period, the larval development was stopped by the addition of two drops of Lugol solution and all eggs and 1<sup>st</sup> stage larvae were counted using a microscope (Coles et al., 2006).

### 2.6. Collection of adult male *H. contortus* BZ resistant

Experimental sheep were treated with oxfendazole prior to euthanasia in order to select BZ resistant parasites. Parasite specimens were morphologically identified according to genus and sex (Ueno and Gonçalves, 1999). *H. contortus* adult male were conserved in 80% ethanol at -20 °C until DNA extraction.

### 2.7. DNA extraction

Genomic DNA was extracted from a *pool* of 10 adult male *H. contortus* per farm. The nematodes were macerated in liquid nitrogen and incubated overnight at 56 °C in 500 µl digestion buffer (0.2% SDS, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 0.4 mg/ml proteinase K, 100 µg/ml RNase, pH 8,0). SDS was removed by precipitation during incubation in ice with 5 M potassium acetate for 2 hours followed by centrifugation. The supernatant was placed in a new microtube with the same volume of isopropanol for DNA precipitation. After centrifugation and supernatant removal, the DNA pellet was washed with 70% ethanol and resuspended in 500 µl of TE buffer (1 mM EDTA, 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0). DNA was further subjected to two rounds of phenol:chloroform (1:1) purification and DNA was

precipitated with alcohol as described above. The final pellet was resuspended in 50 µl of TE buffer and stored at -20 °C. All used reagents were molecular biology grade and were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). All centrifugation steps were done at 13,000 g for 15 minutes at room temperature, except the centrifugations with isopropanol and ethanol which were performed for 30 minutes.

## 2.8. Primers

Primers for all three SNPs were designed considering a general annealing temperature of 58 °C using the Primer3 Plus program (Untergasser et al., 2007) based on sequences obtained from GenBank (accession numbers: GQ910877.1 to GQ910916.1) (Table 1). Both isotypes were checked during primer design to avoid possible annealing within isotype 2 gene.

Table 1. Real-time PCR primers used to detect *H. contortus* SNPs F200Y; F167Y and E198A. In the primer name column, F stands for forward and R for reverse.

Primer	Sequence 5'–3'	Allele
200R2	CAGAGCTTCGTTGTCAATACAGA	Sensitive
200R1	CAGAGCTTCGTTGTCAATACAGT	Resistant
200F2	CTACCCTTTCCGTCCATCAA	Both
167F1	CCTGATAGAATTATGGCTTCGTT	Sensitive
167F2	CCTGATAGAATTATGGCTTCGTA	Resistant
167R1	GATCTCACCTTGGGTGATGG	both
198R1	CTTCGTTGTCAATACAGAATGTTT	Sensitive
198R2	CTTCGTTGTCAATACAGAATGTTG	Resistant
198F1	GAAGATGTTTTAAGGTATCCGACACT	both

## 2.9. Real-time PCR (qPCR)

Quantitative PCR assays were performed in triplicate for each sample. Reactions were designed for a total volume of 25 µl, containing 12.5 µl 2X Fast Start Universal SYBR Green Master Mix (Roche, West Sussex, UK), 0.3 pmol/µl of each primer (forward and reverse) and 25 ng of DNA. Amplifications were performed in a Mastercycler epgradient S Realplex<sup>4</sup> (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) and consisted of initial incubation at 95 °C for 10

minutes, followed by 35 cycles of denaturing at 95 °C for 15 seconds and annealing/extension at 58 °C for 30 seconds for SNPs F200Y and F167Y. SNP E198A amplification used the same parameters but only 34 cycles. PCR products were differentiated from primer dimers by melting curves with temperatures raised from 60 °C to 95 °C at a rate of 0.029 °C/s. Primers used in the reactions are described in table 1 and negative controls were performed without the DNA template.

### 2.10. Data analysis

Oxfendazole efficacy in each farm was determined based on epg data before and after treatment according to the formula described by Kochapakdee et al. (1995) using the software BootStreat (INRA, version 1.0). According to the *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (WAAVP), resistance is deemed present in a given nematode population once the percentage reduction in egg count is less than 95% and the lower limit of the 95% confidence interval is below 90% (Coles et al., 1992).

BZ resistance was also characterized using the EHT to determine effective concentrations that inhibit 50% of larvae hatching (EC50). Data analysis was done by probit analysis using SPSS for Windows version 8.0. Nematode populations were considered resistant when EC50 was equal or greater than 0.1 µg/ml (Coles et al., 1992).

The threshold cycle (Ct) for each real-time PCR reaction was determined by the software Realplex 2.2 (Eppendorf) using default parameters. Allele frequencies were estimated using a previously described formula in which the frequency of the allele resistant  $F = [1/(2^{\Delta Ct} + 1)] \times 100$ , where  $\Delta Ct = (Ct \text{ allele resistant} - Ct \text{ allele sensitive})$ . Results were expressed in percentage of resistant and sensitive alleles present in the samples analyzed (Germer et al., 2000; Alvarez-Sanchez et al., 2005). In cases where it was not possible to determine a Ct value (e.g., no amplification detected) for a given allele the frequency of its detected counterpart was approximated to 100%.

## 3. Results

### 3.1. The faecal egg count reduction test (FECRT) and egg hatch assay (EHA)

BZ resistance was present in all farms examined (table 2), especially in the county of Tauá (TA1 e TA2), in which there was an increase of 100% in mean epg after treatment,

which resulted in 0% oxfendazole efficacy. Efficacy in BV, QX, SQ and SO farms were 50, 37, 35 and 11%, respectively. *Haemonchus* spp. was the most predominant in all farms after anthelmintic treatment (Table 3).

EC50 results were above 0.1 µg/ml in all studied populations. The highest observed value was 4.62 µg/ml for nematodes from QX. The remaining EC50 values varied from 1.62 to 3.81 µg/ml and the mean of the studied isolates was 2.63 µg/ml (table 2).

Table 2. Mean egg counts in farms before (Day 0) and after (Day 8) treatment with oxfendazole, efficacy (%) obtained from faecal egg count reduction test results and EC50 determined by egg hatch test.

Farm <sup>a</sup>	Mean EPG		% of efficacy (IC 95%)	EC50 µg/ml (IC 95%)
	Day 0	Day 8	FECRT	EHT
TA1	535	1115	0 (-12 : - 235)	1.84 (1.01 : 7.62)
TA2	495	1035	0 (-12 : - 235)	1.62 (0.79 : 13.09)
BV	3325	1620	50 (18 : 68)	2.4 (1.56 : 4.64)
QX	1155	695	37 (-14 : 63)	4.62 (2,55 : 12.79)
SQ	320	210	35 (- 5 : 66)	3.81(2.00 : 12.22)
SO	1055	935	11 (55 : -66)	1.49 (1.10 : 2.28)

<sup>a</sup>TA1: Tauá 1; TA2: Tauá 2; BV: Boa Viagem; QX: Quixadá; SQ: Santa Quitéria; SO: Solonópole

Table 3. Genera identification and frequencies (%) of third-stage larvae (L3) from faecal cultures pre-treatment (Pre) (day 0) and post-treatment (Post) (day 8) with oxfendazole.

Farm <sup>a</sup>	Frequency (%) of genus							
	<i>Haemonchus</i>		<i>Trichostrongylus</i>		<i>Oesophagostimum</i>		<i>Cooperia</i>	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
TA 1	94	92	6	8	0	0	0	0
TA2	91	95	3	0	6	5	0	0
BV	95	96	3	4	2	0	0	0
QX	85	88	7	5	6	7	2	0
SQ	76	79	18	19	6	2	0	0
SO	89	88	5	8	4	3	2	1



<sup>a</sup>TA1: Tauá 1; TA2: Tauá 2; BV: Boa Viagem; QX: Quixadá; SQ: Santa Quitéria; SO: Solonópole

### 3.2. Flock management practices

Half of the studied farms follow extensive production practices and the remaining ones follow the semi-intensive system. Rotational grazing was not employed and in 83.7% of the flocks the dosage was based on visual weight estimations. Frequent acquisition of new animals without quarantine period was reported by 50% of the properties. A third of the farms treat all animals with anthelmintics around 6 times per year, mainly during the dry period. The FAMACHA<sup>®</sup> system was used in 2 flocks (33.3%). However, it is important emphasize that these farms used the strategic treatment, mass treatment of animals during the dry period, during many years. All reported the utilization of macrocyclic lactones, imidazothiazoles and BZ. BZ were mentioned as used during at least 5 years, the most commonly used were albendazole and oxfendazole. All questioned farmers reported low or no BZ efficacy and for this reason have not been using this class of anthelmintic for at least one year. All farms reported anthelmintic rotation when the used drug had no effect on decreasing clinical signs.

### 3.3. Real-time PCR (qPCR)

The qPCR results are described in table 4. In the qPCR for the identification of alleles for the SNP F200Y was verified a frequency of sensitive allele of 98.24% in the ISE isolate. Isolates TA1 and TA2 showed the highest frequencies of resistant alleles, 36.42 and 35.42 % respectively. The remaining isolates presented resistant allele frequencies ranging from 14.93 to 32.31%.

The resistant allele for SNP F167Y was not detected in the ISE isolate as qPCR reactions generated no Ct. Therefore we suggest that, under our experimental conditions, ISE presented approximately 100% frequency for the sensitive allele. Field isolate SQ showed the highest frequency of resistant alleles that was of 92.72%. The remaining frequencies ranged from 75.37 to 89.79%.

SNP E198A only resulted in the detection of sensitive alleles for all isolates. Therefore we suggest sensitive allele frequencies of approximately 100% for all studied isolates.

Table 4. Quantitative PCR mean Cts, standard deviation and SNP F200Y, F167Y e E198A allele frequencies from pools of adult male *H. contortus*.

Isolate <sup>a</sup>	SNP F200Y				SNP F167Y				SNP E198A			
	Ct <sup>b</sup> ± SD		Allele frequency (%)		Ct ± SD		Allele frequency (%)		Ct ± SD		Allele frequency (%)	
	Sensitive	Resistant	Sensitive	Resistant	Sensitive	Resistant	Sensitive	Resistant <sup>c</sup>	Sensitive	Resistant	Sensitive	Resistant
ISE	24.33 ± 0.49	30.13 ± 0.24	98.24	1.76	26.02 ± 0.38	-	100	0	23.80 ± 0.04	-	100	0
TA1	26.80 ± 0.37	27.60 ± 0.17	63.58	36.42	28.20 ± 0.21	26.59 ± 0.24	24.63	75.37	25.08 ± 0.06	-	100	0
TA2	28.05 ± 0.55	28.92 ± 0.23	64.58	35.42	29.39 ± 0.31	27.12 ± 0.24	23.95	76.05	26.36 ± 0.07	-	100	0
BV	26.40 ± 0.41	28.91 ± 0.19	85.07	14.93	29.43 ± 0.17	27.10 ± 0.66	16.65	83.35	25.68 ± 0.22	-	100	0
QX	25.29 ± 0.05	27.40 ± 0.10	81.16	18.84	28.55 ± 0.22	25.41 ± 0.09	10.21	89.79	24.42 ± 0.41	-	100	0
SQ	28.17 ± 0.19	30.20 ± 0.20	80.26	19.74	31.16 ± 0.29	27.49 ± 0.09	7.28	92.72	26.66 ± 0.26	-	100	0
SO	27.51 ± 0.17	28.58 ± 0.41	67.69	32.31	29.30 ± 0.07	27.41 ± 0.15	21.33	78.67	26.32 ± 0.23	-	100	0

<sup>a</sup> ISE: Inbred-susceptible-Edinburgh; TA1: Tauá 1; TA2: Tauá 2; BV: Boa Viagem; QX: Quixadá; SQ: Santa Quitéria; SO: Solonópole. <sup>b</sup> Mean threshold cycle (Ct) of three replicates and standard deviation (SD). <sup>c</sup> In cases where Cts could not be determined, for a given allele the frequency of its detected counterpart was approximated to 100%.

The melting curves for every sample containing reaction (Fig. 2) resulted in only one well defined peak indicating that only one PCR product was amplified. Melting temperature ( $T_m$ ) of these products were always close to the theoretical  $T_m$  of the PCR products.

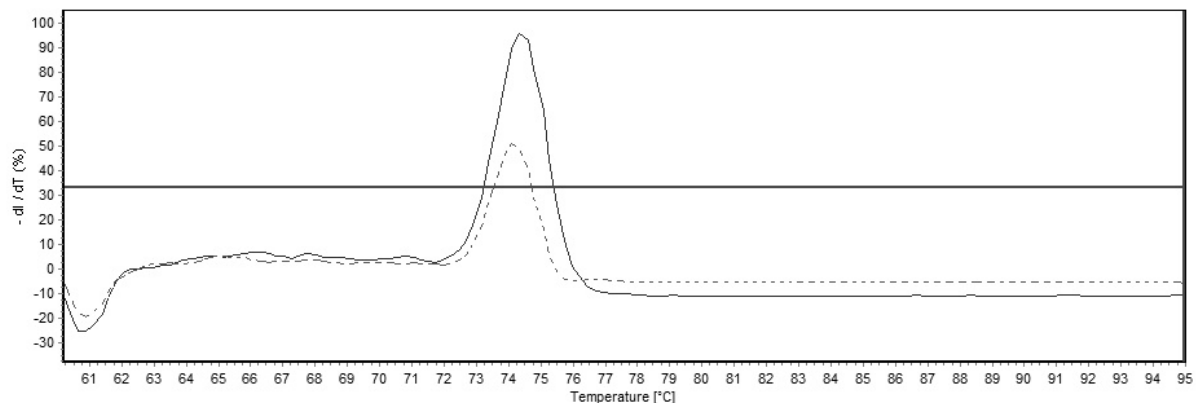


Fig. 2. Example of a melting curve from isolate BV after qPCR amplification of products containing SNP F200Y resistant (dashed line) and sensitive (continuous line) alleles. The Y axis represents the height of the derivative peaks ( $- dl/dt$ ) while the X axis represents the temperatures ( $^{\circ}C$ ) where fluorescence measures were taken.

#### 4. Discussion

Both EHT and FECRT were efficient to identify anthelmintic resistance considering the resistance levels found in the studied samples. These tests are generally indicated for the diagnosis of BZ resistance (Coles et al., 2006), despite detecting the resistance only when at least 25% of the individuals within the population are already resistant (Martin et al., 1989). However, 25% resistance is high enough to seriously impair BZ utilization as lowering resistant allele frequencies is a very slow process even if another anthelmintic molecule without any cross-resistance mechanism is used (Leignel et al., 2010). Refugia, when there is one, is not efficient enough at medium resistance level to lead to the decrease of resistant allele frequencies in the populations (Gaba et al., 2006).

*Haemonchus* spp. was the most prevalent nematode found in the evaluated flocks after treatment. Although it occurs in mixed infections with other nematodes, this parasite is the most important nematode of small ruminants in the tropics/sub-tropics (Krecek and Waller, 2006). *H. contortus* is a parasite found in a wide variety of environments and capable of infecting several ruminant species. Furthermore, it shows great biotic potential, elevated

population size, rapid life cycle, high rate of establishment and gene flow that are conducive to a wide genetic diversity. In addition, elevated animal exchange rates between farms certainly contribute to the emergence of polymorphisms and dissemination of RA by dispersion of resistance alleles (Prichard, 2001; Brasil et al., 2012).

The high levels of resistance identified in this study may be explained in part by inadequate management practices used by farmers, such as the visual weight estimations for treatment may easily lead to underdosage. The very same has also been found in other countries such as Mexico and Scotland (Torres-Acosta et al., 2003; Sargison et al., 2007). Underdosing is generally considered an important factor in anthelmintic resistance development, because heterozygous resistant worms can survive subtherapeutic doses (Sargison et al., 2007). Frequent incorporation of animals into the flock can facilitate the dispersion of resistance alleles to new areas (Niciura et al., 2012); this practice was reported as a risk factor for resistance in farms of other countries such as New Zealand and Spain (Lawrence et al., 2006; Calvete et al., 2012).

Although the frequency of treatment has been important in the development of anthelmintic resistance. The treatment performed in the drought has been considered most important to the development of anthelmintic resistance. Treatments during the dry season may explain the higher levels of resistance found in several parts of the southern hemisphere (Papadopoulos et al., 2001). In tropical areas, drought conditions can also increase mortality amongst the free living stages thus reducing the proportion of the parasite population in refugia. In this period the nematodes are located mainly in hosts and there is only a small population in the pasture (Kenyon et al., 2009). We verified that the most farmers still practiced this treatment and ignored the existence of targeted selective treatments (TST), including the FAMACHA<sup>®</sup> system (Van Wyk and Bath, 2002). BZ were mentioned as frequently utilized for nematode control in the past, but it is no longer routinely used in the studied farms due to its current low efficiency. However, the high levels of resistance found in the studied flocks, even after cessation of BZ utilization, should be expected as the reduction of resistance levels proceeds at very low rates, even with the use of other anthelmintic classes (Leignel et al., 2010).

The use of real-time PCR on the gene coding for  $\beta$ -tubulin isotype 1 allowed the determination of allelic frequencies for all resistance related SNPs and differentiate between the ISE isolate and the studied field isolates. SNP F200Y was found in frequencies similar to what has been previously found for other Brazilian regions (Brasil et al., 2012, Niciura et al., 2012). Curiously, we found the resistant allele for SNP F167Y in higher frequencies than the

resistant allele for SNP F200Y. This may explain the existence of BZ resistant isolates in Ceará State with low frequencies of the resistant allele for SNP F200Y even after experimental selection in laboratories (J. Cabaret, personal communication). It was recently shown in populations of *H. contortus* from South and Southeast of Brazil that SNP F167 was present in four of the seven isolates and had higher frequencies than SNP F200Y in one isolate from of one flock, where the benzimidazoles were utilized during five years and on average treated four times in the year (Brasil et al., 2012).

Since our samples were DNA extracted from a pool of individuals it is not possible to determine the specific genotype of each individual. However, it is interesting to observe that all field populations of this study carry resistant alleles for SNPs F200Y and F167Y, and that the sum of the resistant allele frequencies for each population is usually above 100% which points to a relatively high fraction of resistant individuals within the studied groups. Studies determined that heterozygous individuals (Phe/Tyr) for both SNPs survived three times the recommended BZ dose. In addition, the homozygous resistant genotype (Tyr/Tyr) for the two polymorphisms was not observed, same as the combination Tyr/Tyr e Phe/Tyr (Barrère et al., 2012).

The resistant allele for SNP F167Y is usually found in lower frequencies both in field and laboratory isolates (Prichard, 2000; Silvestre and Cabaret, 2002; Mottier and Prichard, 2008; Von Samson-Himmelstjerna et al., 2009). Two hypotheses were proposed to explain the rarity of the SNP F167Y. First, polymorphism could occur less frequently in position 167 of  $\beta$ -tubulin gene that would not be a hot spot mutation. Secondly, a fitness cost may be associated with SNP F167Y of  $\beta$ -tubulin gene and laboratory conditions could be too permissive to observe these counter-effects (Silvestre and Cabaret, 2002). However, it is important to note that SNP F200Y was the first polymorphism associated with BZ resistance (Kwa et al., 1994) and it is noteworthy that most of the studies for the identification of polymorphisms investigates only the presence of the SNP F200Y which may explain in part the large number of reports (Silvestre and Humbert, 2000; Tiwari et al., 2006; Garg and Yadav, 2009; Cudeková et al., 2010; Maharshi et al., 2011; Nabavi et al., 2011; Gallidis et al., 2012; Niciura et al., 2012). Thus, the fact that F167Y SNP is not being frequently addressed in studies may underestimate its true frequency. In some species of cyathostomins that infect equines, SNP F167Y presented a higher frequency than the polymorphism at codon 200 (Hodgkinson et al., 2008; Blackhall et al., 2011) and is also responsible for resistance in some fungal species, such as *Fusarium graminearum* (Hou et al., 2011).

These observations indicate that the molecular tests to BZ resistance are best executed considering at least two SNPs since allele frequencies for one locus only may not explain the levels of phenotypic resistance detected by classic techniques (Von Samson-Himmelstjerna et al., 2009; Barrère et al., 2012). In our case, if we limited ourselves to check SNP 198, the results would point to a very low frequency of resistant alleles in all populations in total opposition to the phenotypic results obtained by FECRT and EHA.

SNP E198A is the most recent finding regarding BZ resistance and it is expected that few studies have addressed it so far (Ghisi et al., 2007; Mottier and Prichard, 2008; Rufener et al., 2009). This polymorphism has been mainly found in highly resistant isolates selected within laboratories (Rufener et al., 2009). It has also been verified in *H. contortus* that as the frequency for SNP E198A increases the opposite happened to SNP F200Y suggesting that these mutations are mutually exclusive. However, this phenomenon has not been addressed in conjunction with SNP F167Y (Kotze et al., 2012). If it proceeds as true, it could be a reason for its absence in populations that already carry the other resistant SNPs in high frequencies and further studies should address this possibility

Real-time PCR has been shown to be a very sensitive technique for the detection of SNPs associated with drug resistance in other parasites such as *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *Ancylostoma caninum* (Brega et al., 2004; Vessiere et al., 2004; Schwenkenbecher and Kaplan, 2009). The technique substantially improves methods of detecting resistance to BZ, particularly in terms of time if compared with AS-PCR and of sensitivity in comparison with FECRT and EHA. Thus, the utilization of qPCR for SNP quantification in pools of nematodes makes the inclusion of other SNPs a very simple task which leads to broader results at a very low relative cost (Alvarez-Sanchez et al., 2005).

ISE is a BZ susceptible isolate originating from Scotland (Roos et al., 2004) and has been utilized in some studies as the reference isolate for BZ susceptibility in molecular diagnostic techniques (Walsh et al., 2007; Mottier and Prichard, 2008). In this study we used the non-specific fluorescent dye SYBR Green as the method to detect the amplification of PCR product which may generate false positives, depending on the design of the primers (Yang and Rothman, 2004). Thus, the use of ISE was important to evaluate the specificity of the used *primers*. The low frequency of resistant alleles for the SNP F200Y and absence of Cts for resistant alleles of the SNPs F167Y and E198A in the ISE isolate may suggest that the reactions were highly specific for each allele. Nevertheless, it is known that the resistant SNP F200Y frequency in ISE is around 3% which is in accordance with our obtained results (Walsh et al., 2007).

In conclusion, qPCR can be a useful technique for the early diagnostic of BZ resistance and could be helpful in the conception of appropriate strategies to control gastrointestinal nematodes in sheep flocks. Our results suggest that the SNPs F167Y and F200Y are both important for benzimidazole resistance in the studied populations and also support the idea that more than one SNP should be addressed in BZ resistance studies. Finally, further studies that include more farms are necessary to provide a more detailed picture of BZ resistance in Brazil.

### Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Jacques Cabaret (INRA, France), for providing the ISE isolate and FUNCAP for financial support.

### References

- Alvarez-Sánchez, M. A., Pérez-García, J., Cruz-Rojo, M. A., Rojo-Vázquez, F. A., 2005. Real time PCR for the diagnosis of benzimidazole resistance in trichostrongylids of sheep. *Vet. Parasitol.* 129, 291-298.
- 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  $\beta$ -tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 186, 344– 349.
- Blackhall, W.J., Kuzmina, T., von Samson-Himmelstjerna, G., 2011.  $\beta$ -Tubulin genotypes in six species of cyathostomins from anthelmintic-naïve Przewalski and benzimidazole-resistant brood horses in Ukraine. *Parasitol. Res.* 109, 1199–1203.
- Brasil, B.S.A.F., Nunes, R. L. A., Bastianetto, E. B., Drummonda, M.G., Carvalho, D.C., Leite, R.C., Molento, M.B., Oliveira, D.A.A., 2012. Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. *Int. J. Parasitol.* 42, 469–479.
- Brega, S., de Monbrison, F., Severini, C., Udomsangpetch, R., Sutanto, I., Ruckert, P., Peyron, F., Picot, S., 2004. Real-time PCR for dihydrofolate reductase gene single-nucleotide polymorphisms in *Plasmodium vivax* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2581–2587.

- Calvete, C.; Calavia, R., Ferrer, L.M., Ramos, J.J., Lacasta, D., Uriarte, J. 2012. Management and environmental factors related to benzimidazole resistance in sheep nematodes in Northeast Spain. *Vet. Parasitol.* 184, 193-203.
- Coelho, W.A.C., Ahid, S.M.M., Vieira, L.S., Fonseca, Z.A.A.S., Silva, I.P., 2010. Resistência anti-helmíntica em caprinos no Município de Mossoró, RN. *Ci. Anim. Bras.* 11, 589-599.
- 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, 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, 167–185.
- Cudeková, P., Várady, M., Dolinská, M., Königová, A., 2010. Phenotypic and genotypic characterisation of benzimidazole susceptible and resistant isolates of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 172, 155–159.
- Falzon, L.C., Menzies, P.I., Shakya, K.P., Jones-Bitton, A., Vanleeuwen, J., Avula, J., Stewart, H., Jansen, J.T., Taylor, M.A., Learmount, J., Peregrine, A.S., 2013. Anthelmintic resistance in sheep flocks in Ontario, Canada. *Vet. Parasitol.* 193, 150–162.
- Gaba, S., Cabaret, J., Ginot, V., Silvestre, A., 2006. The early drug selection of nematodes to anthelmintics: stochastic transmission and population in refuge. *Parasitology.* 133, 345–356.
- Gallidis, E, K A., Papadopoulos. E., 2012. First Identification of Benzimidazole Resistant *Haemonchus Contortus* in Sheep in Greece. *Small Rumin. Res.* 106, 27–29.
- Garg, R., Yadav, C. L., 2009. Genotyping of Benzimidazole Susceptible and Resistant Alleles in Different Populations of *Haemonchus Contortus* from Himalayan and sub-Himalayan Regions of North-West India. *Trop. Anim. Health Prod.* 41, 1127–1131.
- Germer, S., Holland, M.J., Higuchi, R., 2000. High-throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. *Genome Res.* 10, 258–266.
- Ghisi, M., Kaminsky, R., Mäser, 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.
- Hodgkinson, J.E., Clark, H.J., Kaplan, R.M., Lake, S.L., Matthews, J.B. 2008. The role of polymorphisms at beta tubulin isotype 1 codons 167 and 200 in benzimidazole resistance in cyathostomins. *Int. J. Parasitol.* 38, 1149–1160.



- Hou, Y., Luo, Q., Chen, C. Zhou, M., 2011. Application of Cycleave PCR to the Detection of a Point Mutation (F167Y) in the B(2)-tubulin Gene of *Fusarium Graminearum*. *Pest Manag. Sci.* 67, 1124–1128.
- Hubert, J., Kerboeuf, D. 1992. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet. Rec.* 130, 442-446.
- IBGE. 2010. Censo agropecuário 2010, Disponível em <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ce&tema=pecuaria2010>. Access in: 08 of January of 2013.
- Keith, R. K., 1953. The differentiation of infective larvae of some common nematode parasites of cattle. *Aust. J. Zool.*, 1, 223-235.
- Kenyon, F.; Greer, A.W.; Coles, G.C.; Cringoli, G.; Papadopoulos, E.; Cabaret, J.; Berrag, B.; Varady, M.; Van Wyk, J.A.; Thomas, E.; Vercruyse, J.; Jackson, F. 2009. The role of targeted selective treatments in the development of refugia based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Vet. Parasitol.* 164, 3-11.
- Kochapakdee, S., Pandey, V.S., Pralomkarm, W., Choldumrongkul, S., Ngampongsai, W., Lawpetchara, A., 1995. Anthelmintic resistance in goat in southern Thailand. *Vet. Rec.* 137, 124–125.
- Kotze A.C., Cowling, K., Bagnall, N.H., Hines, B.M., Ruffell, A.P., Hunt, P.W., Coleman, G.T., 2012. Relative level of thiabendazole resistance associated with the E198A and F200Y SNPs in larvae of a multi-drug resistant isolate of *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 2, 92–97.
- Krecek, R.C., Waller, P.J., 2006. Towards the implementation of the “basket of options” approach to helminth parasite control of livestock: Emphasis on the tropics/subtropics. *Vet. Parasitol.* 139, 270–282.
- Křížová-Forstová, V., Lamka, J., Cvilink, V., Hanušová, V., Skálová, L., 2011. Factors affecting pharmacokinetics of benzimidazole anthelmintics in food-producing animals: The consequences and potential risks. *Res. Vet. Sci.* 91, 333-341.
- Kwa, M. S., 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.
- Lawrence, K.E., Rhodes, A.P., Jackson, R., Leathwick, D.M., Heuer, C., Pomroy, W.E., West, D.M., Waghorn, T.S., Moffat, J.R., 2006. Farm management practices associated with macrocyclic lactone resistance on sheep faros in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 54, 283–288.

- Leignel V., Silvestre A., Humbert J. F., Cabaret J. 2010. Alternation of anthelmintic treatments: A molecular evaluation for benzimidazole resistance in nematodes. *Vet. Parasitol.* 172, 80-88.
- Lima, W.C., Athayde, A.C.R., Medeiros, G.R., Lima, D.A.S.D.; Borburema, J.B.; Santos, E.M.; Vilela, V.L.R.; Azevedo, S. S., 2010. Nematóides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. *Pesqui. Vet. Bras.* 30, 1003-1009.
- Maharshi, A. K., Swarnkar, C. P., Singh, D., Manohar. G. S., 2011. Correlation Between Status of Benzimidazole Resistance in *Haemonchus Contortus* on Bio and Molecular Assays. *Indian J. Anim. Sci.* 81, 110–115.
- 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.
- Melo, A. C. F. L., Bevilaqua, C. M. L., Reis, I. F., 2009. Resistência aos anti-helmínticos benzimidazóis em nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes do Semiárido nordestino brasileiro. *Ci. Anim. Bras.* 10, 294-300.
- Molento, M.B., Fortes, F.S., Pondelek, D.A.S., Borges, F.A., 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.
- Mottier, M., Prichard, R.K., 2008. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. *Pharmacogenet. Genomics.* 18, 129–140.
- Nabavi, R., Shayan, P., Shokrani, H.R., Eslami, A., Bokaie, S., 2011. Evaluation of Benzimidazole Resistance in *Haemonchus contortus* Using Comparative PCR-RFLP Methods. *Iranian J. Parasitol.* 6, 45-53.
- Niciura, S. C. M., Veríssimo, C. J., Gromboni, J. G. G., Rocha, M. I.P., Mello, S. S., Barbosa, C.M.P.; Chiebao, D.P.; Cardoso, D.; Silva, G.S.; Otsuk, I. P.; Pereira, J. R.; Ambrosio, L. A.; Nardon, R. F.; Ueno, T.E.H.; Molento, M. B.. 2012. F200Y polymorphism in the  $\beta$ -tubulin gene in field isolates of *Haemonchus contortus* and risk factors of sheep flock management practices related to anthelmintic resistance, *Vet. Parasitol.* 190, 608-612.
- Papadopoulos, E., 2008. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Rumin. Res.* 76, 99–103.
- Papadopoulos, E., Gallidis, E., Ptochos, S., 2012. Anthelmintic resistance in sheep in Europe: a selected review. *Vet. Parasitol.* 189, 85–88.
- Papadopoulos, E., Himonas, C., Coles, G.C., 2001. Drought and flock isolation may enhance the development of anthelmintic resistance in nematodes. *Vet. Parasitol.* 97, 253–259.

- Prichard, R. K., 2001. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends Parasitol.* 17, 445-452.
- Prichard, R., Hall, C. A., Kelly, I. D., Martin, I. C. A., Donald, A. D., 2000. Polymerisation and benzimidazole binding assays with recombinant  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulins from *Haemonchus contortus*. American Association of Veterinary Parasitologists, Forty-fifth Annual Meeting.
- Roberts, F.H.S., O'Sullivan, J.P., 1950. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Aust. J. Exp. Agric.* 1, 99.
- Roos, M.H., Otsen, M., Hoekstra, R., Veenstra, J.G., Lenstra, J.A., 2004. Genetic analysis of inbreeding of two strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 34, 109 - 115.
- Rufener, L., Kaminsky, R., Mäser, P., 2009. 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.
- Sangster, N.C., 2001. Managing parasiticide resistance. *Vet. Parasitol.* 98, 89–109.
- Sargison, N.D., Jackson, F., Bartley, D.J., Wilson, D.J., Stenhouse, L.J., Penny, C.D., 2007. Observations on the emergent of multiple anthelmintic resistance in sheep flocks in the south-east of Scotland. *Vet. Parasitol.* 145, 65–76.
- Schwenkenbecher, J.M., Kaplan, R.M., 2009. Real-time PCR assays for monitoring benzimidazole resistance associated mutations in *Ancylostoma caninum*. *Exp Parasitol.* 122, 6-10.
- 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.
- 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.
- 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., Dzul-Canche, U., Agui-Lar-Caballero, A. J., Rodriguez-Vivas, R. I., 2003. Prevalence of benzimidazole resistant nematodes in sheep flocks in Yucatan, Mexico. *Vet. Parasitol.* 114, 33-42.

- Torres-Acosta, J.F.J., Mendoza-De-Gives, P., Aguilar-Caballero, A.J., Cuéllar-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 helmintoses em ruminantes. 4<sup>o</sup> Ed. Rio de Janeiro: Japan International Cooperation Agency. 143p.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J.A.M., 2007. Primer3plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 35, 71-74.
- Van Wyk, J.A., Bath, G.F., 2002. The FAMACHA<sup>®</sup> system from managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Vet. Res.* 33, 509-529.
- 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., 2012. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state. Brazil. *Vet. Parasitol.* 187, 209–216.
- Vessiere, A., Berry, A., Fabre, R., Benoit-Vical, F., Magnaval, J.F., 2004. Detection by real-time PCR of the Pfert T76 mutation, a molecular marker of chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* strains. *Parasitol. Res.*, 93, 5–7.
- Von Samson-Himmelstjerna, G., Walsh, T.K., Donnan, A.A., Carrière, S., Jackson, F., Skuce, P.J., Rohn, K., Wolstenholme, A.J., 2009. Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing. *Parasitology.* 136, 349–358.
- Walsh, T. K., Donnan, A. A., Jackson, F., Skuce, P., Wolstenholme, A. J., 2007. Detection and measurement of benzimidazole resistance alleles in *Haemonchus contortus* using real-time PCR with locked nucleic acid Taqman probes. *Vet. Parasitol.*, 144, 304-312.
- Yang, S.; Rothman, R., 2004. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. *The Lancet.* 4, 337-348.

## 7 CONCLUSÕES

As populações de *H. contortus* investigadas apresentaram altos níveis de resistência a benzimidazóis nos testes fenotípicos. A resistência a benzimidazóis deve-se a presença dos SNP F200Y e F167Y no gene codificante para o isotipo 1 da  $\beta$ -tubulina. Dessa forma, sugere-se que mais de um SNP seja incluído no diagnóstico molecular de resistência a benzimidazóis. Além disso, a qPCR mostrou ser uma ferramenta útil para detecção e quantificação dos alelos sensíveis e resistentes para os polimorfismos no gene codificante para  $\beta$ -tubulina.

## 8 PERSPECTIVAS

Outros trabalhos devem ser realizados com a qPCR para identificação e quantificação de alelos para os SNP no gene codificante para  $\beta$ -tubulina em populações de *H. contortus* nas demais localidades do Brasil. Estudos são necessários para identificar a influência de cada SNP no fenótipo da resistência, assim como determinar a partir de que frequência de alelos resistentes para os SNP à resistência é expressa, para que no futuro apenas com a utilização da qPCR seja possível determinar quando e em que nível a resistência a benzimidazóis é expressa fenotipicamente.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHID, S. M. M.; CAVALCANTE, M. D. A.; BEZERRA, A. C. D. S.; SOARES, H. S.; PEREIRA, R. H. M. A. Eficácia anti-helmíntica em rebanho caprino no Estado de Alagoas, Brasil. *Acta Veterinaria Brasileira*, v.1, p. 56-59, 2007.

ALKA, GOPAL, R.M.; SANDHU, K.S.; SIDHU, P.K. Efficacy of abamectin against ivermectina-resistant strain of *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*, v. 121, p. 277-283, 2004.

ALVAREZ-SÁNCHEZ, M. A.; PÉREZ-GARCÍA, J.; CRUZ-ROJO, M. A.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A. Real time PCR for the diagnosis of benzimidazole resistance in trichostrongylids of sheep. *Veterinary Parasitology*, v. 129, p. 291-298, 2005.

AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistence of Santa Inês, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Veterinary Parasitology*, v.120, p. 91-106, 2004.

ANGULO-CUBILLÁN, F. J.; GARCIA-COIRADAS, L.; CUQUERELLA, M.; LA FUENTE, C.; ALUNDA, J. M. *Haemonchus contortus*-sheep relationship: a review. *Revista Científica*, v. XVII, p. 577-587, 2007.

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  $\beta$ -tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, v. 186, p. 344– 349, 2012.

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, p. 160–174, 2011.

BOWMAN D.D.; LYNN R.C.; EBERHARD M.L; ALCARAZ A. *Parasitologia Veterinária de Georgis*. 8ª ed. Editora Malone, Tamboré. 422p, 2006.

BRASIL, B.S.A.F.; NUNES, R. L. A; BASTIANETTO, E. B; DRUMMONDA, M.G.; CARVALHO, D.C.; LEITE, R.C.; MOLENTO, M.B.; OLIVEIRA, D.A.A. Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. *International Journal for Parasitology*, v. 42, p. 469–479, 2012.

BRITO, D.R.B.; SANTOS, A.C.G.; TEIXEIRA, W.C.; GUERRA, R.M.S.N.C. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da microrregião do Alto Mearim e Grajaú, no estado do Maranhão, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, p. 967-974, 2009.

BROWN, H.D.; MATZUK, A.R.; ILVES, I.R.; PETERSON, L.H.; HARRIS, S.A.; SARETT, L.H.; EGERTON, J.R.; YAKSTIS, J.J.; CAMPBELL, W.C.; CUCKLER, A.C., Antiparasitic drugs-IV. 2-(40-Thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. *Journal of the American Chemical Society*, v. 83, p. 1764-1765, 1961.

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

CHARLES, T. P.; POMPEU, J.; MIRANDA, D. B. Efficacy of three broad-spectrum anthelmintics against gastrointestinal nematode infections of goats. *Veterinary Parasitology*, v. 34, p.71-75, 1989.

COELHO, W.A.C.; AHID, S.M.M.; VIEIRA, L.S.; FONSECA, Z.A.A.S.; SILVA, I.P. Resistência anti-helmíntica em caprinos no Município de Mossoró, RN. *Ciência Animal Brasileira*, v. 11, p. 589-599, 2010.

COLES G.C.; JACKSON F.; POMROY W.E.; PRICHARD R.K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G.; SILVESTRE The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, v. 136, p. 167–185, 2006.

COSTA JÚNIOR, G. S.; MENDONÇA, I. L.; CAMPELO, J. E. G.; CAVALCANTE, R. R.; DANTAS FILHO, L. A.; NASCIMENTO, I. M. R.; ALMEIDA, E. C. S.; CHAVES, R. M. Efeito de vermifugação estratégica, com princípio ativo à base de ivermectina na incidência de parasitos gastrintestinais no rebanho caprino da UFPI. *Ciencia Animal Brasileira*, v. 6, p. 279-286, 2005.

CUDEKOVÁ, P.; VÁRADY, M.; DOLINSKÁ, M.; KÖNIGOVÁ, A. Phenotypic and genotypic characterisation of benzimidazole susceptible and resistant isolates of *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, v. 172, p. 155–159, 2010.

DRUDGE, J.H.; SZANTO, J.; WYATT, Z.N.; ELAM G. Field studies on parasite control in sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. *American Journal of Veterinary Research*, v. 25, p. 1512-1518, 1964.



ELARD, L.; 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.

ELARD, L.; HUMBERT, J.F. Importance of the mutation of aminoacid 200 of the isotype 1 beta-tubulin gene in the benzimidazole resistance of the small-ruminant parasite, *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitology Research*, v. 85, p. 452–456, 1999.

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

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

GEORGE, N.; PERSAD, K.; SAGAM, R.; OFFIAH, V.N.; ADESIYUN, A.A.; HAREWOOD, W.; LAMBIE, N.; BASU, A.K. Efficacy of commonly used anthelmintics: First report of multiple drug resistance in gastrointestinal nematodes of sheep in Trinidad. *Veterinary Parasitology*, v. 183, p. 194-197, 2011.

GHISI, M.; KAMINSKY, R.; MÄSER, 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.

HAN, Y.; MALAK, H.; CHAUDHARY, A.G.; CHORDIA, M.D.; KINGSTON, D.G.; BANE, S. Distances between the paclitaxel, colchicine, and exchangeable GTP binding sites on tubulin. *Biochemistry*, v. 37, p. 6636-6644, 1998.

IBGE 2010. *Censo agropecuário 2010*, Disponível em <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ce&tema=pecuaria2010>. Acesso em 08/06/2012.

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

KENYON, F.; GREER, A.W.; COLES, G.C.; CRINGOLI, G.; PAPADOPOULOS, E.; CABARET, J.; BERRAG, B.; VARADY, M.; VAN WYK, J.A.; THOMAS, E.; VERCRUYSSSE, J.; JACKSON, F. The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Veterinary Parasitology*, v. 164, p. 3–11, 2009.

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

KOTZE A.C.; COWLING, K.; BAGNALL, N.H.; HINES, B.M.; RUFFELL, A.P.; HUNT, P.W.; COLEMAN, G.T. Relative level of thiabendazole resistance associated with the E198A and F200Y SNPs in larvae of a multi-drug resistant isolate of *Haemonchus contortus* *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 2, p. 92–97, 2012

KŘÍŽOVÁ-FORSTOVÁ, V.; LAMKA, J.; CVILINK, V.; HANUŠOVÁ, V.; SKÁLOVÁ, L. Factors affecting pharmacokinetics of benzimidazole anthelmintics in food-producing animals: The consequences and potential risks. *Research in Veterinary Science*, v. 91, p. 333-341, 2011.

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  $\beta$ -tubulin isotype 1. *Molecular Biochemistry Parasitology*, v. 63, p. 299-303, 1994.

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

LANUSSE, C. E. Farmacologia dos compostos antihelmínticos. In: Controle dos nematódeos gastrintestinais. Terezinha Padilha, p.1-44, 1996.

LEIGNEL, V.; SILVESTRE, A.; HUMBERT J. F.; CABARET J. Alternation of anthelmintic treatments: A molecular evaluation for benzimidazole resistance in nematodes. *Veterinary Parasitology*, v. 172, p. 80-88, 2010.

LE JAMBRE, L.F.; GEOGHEGAN, M.; LYNDAL-MURPHY, M.. Characterization of moxidectin resistant *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, v. 128, p. 83–90, 2005.

LIMA, M.M.; FARIAIS, M.P.O.; ROMEIRO, E.T.; FERREIRA, D.R.A.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M. A. G. Eficácia da moxidectina, ivermectina e albendazol contra helmintos gastrintestinais em propriedades de criação caprina e ovina no estado de Pernambuco. *Ciência Animal Brasileira*, v. 11, p. 94-100, 2010.

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

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

MELO, A. C. F. L.; REIS, I. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; VIEIRA, L. S.; ECHEVARRIA, F. A. M.; MELO, L. M. Nematódeos resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. *Ciência Rural*, v. 33, p. 339-334, 2003.

MELO, A. C. F. L.; RONDON, F. C. M.; REIS, I. F.; BEVILAQUA, C. M. L. Desenvolvimento da resistência ao Oxfendazol em propriedades rurais de ovinos na região do baixo e médio Jaguaribe, Ceará, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, p.137-141, 2004.

MELO, A. C. F. L.; *Caracterização do nematóide de ovinos, Haemonchus contortus, resistente e sensível a anti-helmínticos benzimidazóis, no estado do Ceará, Brasil*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, 2005.

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

MOLENTO, M.B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. *Veterinary Parasitology*, v. 163, p. 229–234, 2009.

MOLENTO, M.B.; FORTES, F.S.; PONDELEK, D.A.S.; 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.

NICIURA, S.C.; VERÍSSIMO, C.J.; GROMBONI, J.G.; ROCHA, M.I.; DE MELLO, S.S.; BARBOSA, C.M.; CHIEBAO, D.P.; CARDOSO, D.; SILVA, G.S.; OTSUK. I.P.; PEREIRA, J.R.; AMBROSIO, L.A.; NARDON, R.F.; UENO, T.E.; MOLENTO, M.B. F200Y polymorphism in the  $\beta$ -tubulin gene in field isolates of *Haemonchus contortus* and risk factors of sheep flock management practices related to anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, v. 19, p.608– 612, 2012.

NJUE, A.I.; PRICHARD, R.K.. Cloning two full-length beta-tubulin isotype cDNAs from *Cooperia oncophora*, and screening for benzimidazole resistance-associated mutations in two isolates. *Parasitology*, v. 127, p. 579–588, 2003.

ONYIAH, L. C.; ARSLAN, O. Simulating the development period of a parasite of sheep on pasture under varying temperature conditions. *Journal of Thermal Biology*, v. 30, n. 3, p. 203-211, 2005.

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. *Veterinary Journal*, v. 183, p. 68-74, 2008.

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

PEREIRA, R.H.M.A.; AHID, S.M.M.; BEZERRA, A.C.D.S.A; SOARES, H.S.; FONSECA, Z.A.A.S. Diagnóstico da resistência dos nematóides gastrintestinais a anti-helmínticos em rebanhos caprino e ovino do RN. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 2, p. 16-19, 2008.

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

PINHEIRO, R. R. ; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F.; HADDAD, J. P. A.. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, v. 52, p. 534-543, 2000.

PRICHARD, R.; HALL, C. A.; KELLY, I. D.; MARTIN, I. C. A.; DONALD, A. D. Polymerisation and benzimidazole binding assays with recombinant  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulins from *Haemonchus contortus*. American Association of Veterinary Parasitologists, Forty-fifth Annual Meeting, 2000.

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

RODRIGUES, A.B.; ATHAYDE, A.C.R.; RODRIGUES, O.G.; ; SILVA, W.W.; FARIA, E.B. Sensibilidade dos nematóides gastrintestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 27, p.162-166, 2007.

ROOS, M.H.; KWA, M.S.G.; GRANT,W.N. New genetic and practical implications of selection for anthelmintic resistance in parasitic nematodes. *Parasitology Today*, v. 11, p. 148–150, 1995.

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 Biochemical Parasitology*, v. 168, p. 120–122, 2009.

SANTOS, N.V.M.; CHARLES, T.P.; MEDEIROS, E.M.A.M. Eficácia do cloridrato de levamisol em infestações por nematódeos gastrintestinais em caprinos. *Arquivos da Revista Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 45, p. 487-495, 1993.

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

SARGISON, N.D.; JACKSON, F.; BARTLEY, D.J.; ; WILSON, D.J.; STENHOUSE, L.J.; PENNY, C.D. Observations on the emergence of multiple anthelmintic resistance in sheep flocks in the south-east of Scotland. *Veterinary Parasitology*, v. 145, p. 65-76, 2007.

SECHI, S.; GIOBBE, M.; SANNA, G. CASU, S.; CARTA, A.; SCALA, A. Effects of anthelmintic treatment on milk production in Sarda dairy ewes naturally infected by gastrointestinal nematodes. *Small Ruminant Research*, v. 88, p. 145-150, 2010.

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

SILVESTRE, A.; HUMBERT, J. F. Diversity of benzimidazole-resistance alleles in populations of small ruminant parasites. *International Journal for Parasitology*, v. 32, p. 321-328. 2002.

SILVESTRE, A; SAUVE, C; CORTET, J, CABARET, J. Contrasting genetic structures of two parasitic nematodes, determined on the basis of neutral microsatellite markers and selected anthelmintic resistance markers. *Molecular Ecology*, v. 18, p. 5086-5100, 2009.

SKUCE, P.; STENHOUSE, L.; JACKSON, F.; HYPISA, V.; GILLEARD, J. Benzimidazole resistance allele haplotype diversity in United Kingdom isolates of *Teladorsagia circumcincta* supports a hypothesis of multiple origins of resistance by recurrent mutation. *International Journal for Parasitology*, v. 40, p. 1247–1255, 2010.

SUTHERLAND, I.A.; LEATHWICK, D.M.. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? *Trends in Parasitology*, v. 27, p. 176–181, 2011.

TAYLOR, M. A; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary parasitology*, v. 103, p. 183-94, 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.T.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Research*, v. 77, p. 159–173, 2008.

VIEIRA, L.S.; BERNE, M.E.A.; CAVALCANTE, A.C.R.; MENEZES, R.C.A.A.. Redução do número de ovos por grama de fezes (OPG) em caprinos medicados com anti-helmínticos. Sobral: *Embrapa-CNPC*, Boletim de Pesquisa nº 11, 18 p., 1989.

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

VIEIRA, L.S. Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. *Tecnologia e Ciência Agropecuária*, v. 2, p. 49-56, 2008.

VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; HARDER, A.; PAPE, M.; SCHNIEDER, T. Novel small strongyle (Cyathostominae) beta-tubulin sequences. *Parasitology Research*, v. 87, p. 122–125, 2001.

VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; BLACKHALL, W. Will technology provide solutions for drug resistance in veterinary helminths?. *Veterinary parasitology*, v. 132, p. 223-39, 2005.

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

VON 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, 2009.

WALSH, T. K.; DONNAN, A. A; JACKSON, F.; SKUCE, P.; WOLSTENHOLME, A. J. Detection and measurement of benzimidazole resistance alleles in *Haemonchus contortus* using real-time PCR with locked nucleic acid Taqman probes. *Veterinary parasitology*, v. 144, p. 304-312, 2007.

WEST, D.M.; POMROY, W.E.; LEATHWICK, D.M. Multiple resistance in *Trichostrongylus* and *Teladorsagia (Ostertagia)* in goats to oxfendazole, levamisole and moxidectin, and inefficacy of trichlorphon. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 52, p. 298-299, 2004.

YANG, S.; ROTHMAN, R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. *The Lancet*, v. 4, p.337-348, 2004.