

São Carlos, SP / Outubro, 2025

Metodologia para a detecção da resistência aos benzimidazóis em *Haemonchus contortus* utilizando amostras em *pool*

Simone Cristina Méo Niciura⁽¹⁾, Adriana Mercia Guaratini Ibelli⁽¹⁾, Lorrane Gabriele Pinheiro Corrêa⁽²⁾, Cintia Hiromi Okino⁽¹⁾, Ana Carolina de Souza Chagas⁽¹⁾

⁽¹⁾ Pesquisador, Embrapa Pecuaría Sudeste, São Carlos, SP. ⁽²⁾ Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, UNESP, Dracena, SP

Resumo — A alta prevalência do nematoide gastrointestinal *Haemonchus contortus*, cujo controle é dificultado pela resistência anti-helmíntica, leva a grandes prejuízos econômicos na criação de ovinos. A genotipagem de polimorfismos associados à resistência anti-helmíntica em parasitas é uma das maneiras mais precoces de detecção da resistência, e o uso de amostras em *pool* pode reduzir custos e tempo de processamento e beneficiar sua aplicabilidade a campo. Entretanto, a determinação da frequência alélica de resistência (R) a partir de *pool* de amostras é bastante desafiadora. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para a genotipagem do polimorfismo F200Y associado à resistência ao anti-helmíntico benzimidazol, em *pool* de larvas de três populações de *H. contortus*. Por meio de PCR em tempo real (qPCR), foram avaliadas as técnicas de *high-resolution melting* e discriminação alélica com sondas de hidrólise marcadas com fluorescência (FAM e HEX) seguida da análise por três métodos (curva sigmoide, ΔC_t e log), utilizando-se curva padrão de DNA sintético (0, 20, 40, 60, 80 e 100% R) ou de larvas individuais (0, 50 e 100% R). A discriminação alélica com sondas de hidrólise, com curva padrão de larvas individuais, seguida de análise de fluorescência por log(FAM/HEX) promoveu melhor estimativa da frequência do alelo de resistência das amostras em *pool*, com discordância variando de 2,8 a 5,0% em relação aos valores observados na genotipagem de larvas individuais. A validação dessa técnica de genotipagem em amostras em *pool* poderá ser usada para a detecção da resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos e para a melhoria das medidas de controle da verminose, proporcionando melhor direcionamento do tratamento anti-helmíntico.

Termos para indexação: diagnóstico molecular, ovinos, resistência anti-helmíntica, verminose.

Benzimidazole resistance detection in pooled samples of *Haemonchus contortus*

Abstract — *Haemonchus contortus* is a high prevalent gastrointestinal nematode, whose control is hindered by anthelmintic resistance, leading to economic losses in sheep production. Genotyping of anthelmintic resistance-associated polymorphisms in parasites is an earlier method to

Embrapa Pecuaría Sudeste

Rod. Wasghinton Luiz, Km 234
13560-970, São Carlos, SP
www.embrapa.br/pecuaría-sudeste
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente
André Luiz Monteiro Novo
Secretário-executivo
Luiz Francisco Zafalon

Membros
Aisten Baldan, Gisele Rosso,
Maria Cristina Campanelli
Brito, Silvia Helena Picirillo
Sanchez

Revisão de texto
Gisele Rosso

Normalização bibliográfica
Aisten Baldan (CRB-1/2757)

Projeto gráfico
Leandro Sousa Fazio
Diagramação
Maria Cristina Campanelli Brito

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados à Embrapa.

detect resistance, and the use of pooled samples can reduce costs and expended time and benefit its applicability at the field. However, determining the resistance allele frequency (R) in pooled samples is quite challenging. Thus, the objective of this study was to develop a methodology for genotyping the F200Y polymorphism associated with benzimidazole resistance in pooled larvae from three *H. contortus* populations. Based on real-time PCR (qPCR), two methods were investigated: high-resolution melting and allelic discrimination with fluorescent (FAM and HEX) hydrolysis probes, followed by fluorescence analysis through sigmoid curve, ΔC_t and $\log(\text{FAM}/\text{HEX})$. Synthetic DNA (0, 20, 40, 60, 80 and 100% R) or individual larvae (0, 50 and 100% R) were used as a standard curve. Allelic discrimination with hydrolysis probes with the individual larvae standard curve and fluorescence analysis by $\log(\text{FAM}/\text{HEX})$ resulted in a better estimation of R frequency in pooled samples, varying 2.8 to 5.0% from the observed values in genotyped individual larvae. Validating this genotyping technique in pooled samples will allow its use for the detection of anthelmintic resistance in sheep flocks and improvement of nematode control practices, providing better targeting of anthelmintic treatments.

Index terms: anthelmintic resistance, gastrointestinal nematodes, molecular test, sheep.

Introdução

A importância econômica da produção de ovinos baseia-se, principalmente, no aproveitamento de pequenas propriedades rurais e de áreas inadequadas para a agricultura ou bovinocultura (Sargison, 2012). Dados recentes indicam que o Brasil possuía 21,8 milhões de cabeças ovinas (IBGE, 2024), mas que o rebanho nacional não era suficiente para atender à demanda do mercado consumidor interno, levando à importação anual de 4.164,86 toneladas de carne ovina (FAO, 2022). Assim, pesquisas buscam não só aumentar a produção de ovinos no Brasil como também levar à redução de custos e aumentar a lucratividade dos produtores.

Os principais desafios enfrentados pela ovinocultura em regiões de clima tropical são as condições climáticas adversas, a escassez ou a competição por água e alimentos e a alta prevalência de nematoides gastrintestinais (McManus et al., 2011). No Brasil, o parasitismo por helmintos leva a perdas econômicas e produtivas estimadas em US\$ 107,5 milhões/ano (Chagas et al., 2022), decorrentes

da redução de crescimento, ganho de peso e qualidade da carne e da lã, além da mortalidade e dos custos com tratamentos veterinários.

Dentre os nematoides parasitas de ovinos, *Haemonchus contortus* destaca-se como o mais prevalente e patogênico (Waller, 2004). Trata-se de um parasita hematófago de abomaso, que pode ingerir até 30 μL de sangue do hospedeiro por dia, e que é altamente prolífico, uma vez que as fêmeas adultas podem depositar de três mil a 15 mil ovos por dia (Hansen; Perry, 1994; Emery et al., 2016). O controle desse helminto é feito, principalmente, pelo tratamento anti-helmíntico dos ovinos infectados. Entretanto, apesar da diversa gama de vermífugos comerciais, eles pertencem a somente cinco grupos químicos de amplo espectro: benzimidazóis, levamisol, closantel, lactonas macrocíclicas e monepantel (Chagas et al., 2013), sendo que o último não é mais comercializado no Brasil. Além disso, o fácil acesso, o baixo custo e a falta de orientações adequadas levaram ao uso indiscriminado e em larga escala dos anti-helmínticos, reduzindo a eficácia e promovendo a resistência (Doyle; Cotton, 2019).

Em termos gerais, a resistência é definida como o aumento da proporção de parasitas que são capazes de resistir a dosagens de fármacos habitualmente letais a outros indivíduos da mesma espécie (Sangster; Gill, 1999). Assim, as opções de anti-helmínticos são limitadas, uma vez que poucos compostos químicos são efetivos e que, como *H. contortus* apresenta alta diversidade genética e grande capacidade de mutações (Gilleard, 2013), as populações rapidamente desenvolvem resistência a esses compostos, levando a falhas no combate da verminose e a consequentes prejuízos econômicos (Costa et al., 2007; Miller et al., 2012).

A resistência anti-helmíntica é uma característica genética que é transmitida ao longo das gerações dos parasitas e que, portanto, pode ser detectada por testes moleculares antes que por testes *in vivo* ou por outros testes *in vitro* (revisado por Hassan; Ghazy, 2022). Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) são as principais fontes de variação no genoma. Assim, nos parasitas, os testes moleculares identificam polimorfismos gênicos nos sítios alvos das drogas que interferem na ligação e na ação desses compostos. O polimorfismo mais conhecido está associado à resistência aos benzimidazóis e consiste no SNP T > A no isotipo 1 do gene da β -tubulina, que leva à substituição de fenilalanina por tirosina na posição 200 da proteína (polimorfismo F200Y) em *H. contortus* (Kwa et al., 1994).

A determinação dos alelos de um SNP presentes em um indivíduo pode ser feita por diferentes técnicas moleculares de genotipagem. Em geral, os métodos baseiam-se na reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de fragmento contendo o SNP, seguida de sequenciamento ou digestão com enzima de restrição (PCR-RFLP), ou também pela amplificação simultânea dos dois alelos na mesma reação (ARMS-PCR) ou em reações separadas (AS-PCR) e observação do padrão de bandas após eletroforese (Ye et al., 2001; Kim; Misra, 2007). Outras técnicas requerem equipamento de PCR em tempo real (qPCR) e baseiam-se na detecção de diferenças na temperatura de *melting* (*high-resolution melting* - HRM) ou na hibridização com sondas marcadas com fluorescências específicas para cada alelo (Shi et al., 1999; Kim; Misra, 2007). Assim, a escolha da técnica de genotipagem depende dos objetivos, dos equipamentos, da escala de análise e dos recursos disponíveis.

Apesar das técnicas baseadas em PCR convencional serem menos onerosas, elas são mais trabalhosas e demoradas em comparação às técnicas em qPCR. Além disso, para que as frequências alélicas e genotípicas de resistência sejam estimadas, parasitas precisam ser avaliados individualmente. Isso torna o trabalho laboratorial bastante árduo, demorado, caro e de difícil aplicabilidade a campo. Assim, a possibilidade de determinar as frequências alélicas utilizando *pool* de amostras tem o potencial de promover a expansão do uso das técnicas moleculares e reduzir seus custos (Breen et al., 2000).

Por ser a maneira mais precoce de detecção da resistência (revisado por Hassan; Ghazy, 2022), as técnicas moleculares podem ser utilizadas tanto para a identificação e monitoramento, quanto para a tomada de decisão e a aplicação de medidas de controle da verminose em rebanhos ovinos, assegurando a escolha de anti-helmínticos eficazes e retardando o desenvolvimento da resistência. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia rápida e eficiente em qPCR, que seja aplicável a *pools* de larvas de *H. contortus* em substituição a larvas individuais, para a detecção das frequências alélicas do polimorfismo F200Y, associado à resistência aos benzimidazóis.

Metodologia

Neste estudo, foram analisadas três populações de *H. contortus* derivadas de um experimento de substituição parasitária total (TR), parcial (PR) e controle (C) (Bello et al., 2025). Essas populações foram mantidas em ovinos hospedeiros e, para a recuperação de larvas infectantes (L₃), fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos ovinos e destinadas à coprocultura (Roberts; O'Sullivan, 1950), a 27°C, por 7 dias.

Após a recuperação, as L₃ de *H. contortus* foram submetidas à remoção da cutícula, destinadas à extração de DNA com solvente orgânico (Niciura et al., 2012), individualmente ou em *pool* de duas mil larvas, e ressuspendidas em água (10 µL para L₃ individuais e 40 µL para *pool*). Para a obtenção do *pool* de larvas, as amostras foram homogeneizadas por agitação e quantificadas sob microscopia óptica, com o cálculo da média do número de larvas em 10 amostras de 10 µL. O DNA do *pool* de larvas foi quantificado em NanoDrop e diluído em água para a concentração de 5 ng/µL.

Para a determinação das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo F200Y, inicialmente L₃ individuais (n=22-24 de cada população) foram genotipadas por ARMS-PCR (Niciura et al., 2012) e por qPCR com oligos *Locked Nucleic Acid* (LNA) e sondas de hidrólise e marcadas com fluorescência (Walsh et al., 2007). Recomenda-se o número mínimo de 10 larvas avaliadas por amostra (Niciura et al., 2012). Brevemente, na ARMS-PCR, foram usados os *primers* externos controle *forward* (79: 5'-AAATAAGTCTCACCCCTGTAAAC-3') e *reverse* (RO: 5'-CCAGACATTGTGACAGACACTTCA-3') e os *primers* internos para resistência – alelo A (Ph3: 5'-CTGGTAGAGAACCCGATGAAACATA-3') e susceptibilidade – alelo T (RIT: 5'-CAGAGCTTCGTTGTCAATACGGA-3'). A reação de PCR consistiu de 1X mastermix RED (Ampliqon, A180301), 0,2 µM dos *primers* 79 e RO, 0,15 µM dos *primers* Ph3 e RIT e 2 µL de DNA de L₃ individuais, em volume de 20 µL. A termociclagem seguiu as etapas de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de desnaturação (94°C), anelamento (58°C) e extensão (72°C) por 30 segundos cada, e extensão final a 72°C por 10 minutos. O genótipo de cada larva foi atribuído pelo padrão de bandas observado após eletroforese em gel de 2,5% de agarose corado com brometo de etídeo, com o homocigoto resistente (RR) apresentando bandas de 296 e 198 bp, o homocigoto suscetível (SS) com bandas de 296 e 146 bp, e o heterocigoto (RS) com bandas de 296, 198 e 146 bp.

Para a qPCR com as sondas de hidrólise e oligos LNA foram utilizados os *primers forward* (F200Y_For: 5'-CCCTTTCCGTCCATCAACTG-3') e *reverse* (F200Y_Rev: 5'-AGGTTGGATTTGTGAGTTTCAAAG-3'), amplificando fragmento de 108 bp, e as sondas para o alelo de resistência A (sonda R: HEX-TGAAA+C+AT+ACT+GT+ATT+GACA-BHQ1) e de susceptibilidade T (sonda S: FAM-ATGAAA+CAT+T+CTG+TA+TTGA+CAA-BHQ1). A reação consistiu de 1X de mastermix TaqPath ProAmp (ThermoFisher, A30865), 1 μ M das sondas R e S, 0,5 μ M do *primer* F200Y_For, 1,5 μ M do *primer* F200Y_Rev e 2 μ L de DNA de L₃ individuais, em volume de 10 μ L. A termociclagem foi feita com a pré-leitura a 60°C por 30 segundos, desnaturação a 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de amplificação a 95°C por 15 segundos e a 64°C por 1 minuto, seguidos por pós-leitura a 60°C por 30 segundos, no equipamento 7500 *Real Time PCR System* (ThermoFisher). Os resultados foram analisados no software Design & Analysis (DA2), versão 2.8. (ThermoFisher).

Em seguida, foram utilizados dois *pools* de larvas de cada população de *H. contortus*: o primeiro *pool* (P1) foi feito a partir do DNA das mesmas L₃ individuais usadas na genotipagem; e o segundo *pool* (P2), analisado em duplicata, foi feito a partir do DNA extraído de duas mil larvas de cada população. A genotipagem dos *pools* de larvas foi feita por duas técnicas de qPCR: *high-resolution melting* (HRM) e discriminação alélica com sondas de hidrólise marcadas por fluorescência.

Para a HRM de amostras em *pool*, segundo Capper et al. (2015) e Muneeswaran et al. (2024), foi amplificado fragmento de 108 bp com os *primers* F200Y_For e F200Y_Rev originais (Walsh et al., 2007) e acrescidos de cauda M13 (F200Y_For_M13: 5'-TGTAACGACGGCCAGTCCCTTTCCGTCCATCAACTG-3' e F200Y_Rev_M13: 5'-CAGGAAACAGCTATGACAGGTTGGATTTGTGAGTTTCAAAG-3', respectivamente). A reação foi composta por 1X de mastermix MeltDoctor HRM (ThermoFisher, 4415440), 0,25 μ M do *primer forward*, 0,75 μ M do *primer reverse* e 10 ng de DNA, em volume de 10 μ L. A termociclagem consistiu em 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto, seguidos de curva de *melting* de 95°C por 10 segundos, 60°C por 1 minuto e incrementos de 0,025°C/s de 60°C a 95°C, no equipamento QuantStudio 6 Pro (ThermoFisher) com modo de leitura padrão ("continuous"). Buscando incrementar os resultados obtidos com o protocolo de HRM, foram

testados os seguintes ajustes: uso de 1X EvaGreen supermix (Biorad, 1725201), incremento de 0,5°C/s na curva de *melting* e outras duas opções de leitura ("step and hold" e "datapoints").

Para a discriminação alélica, a qPCR com sondas de hidrólise e oligos LNA para *pool* de larvas seguiu o mesmo protocolo descrito para L₃ individuais, utilizando 2 μ L do P1 e 10 ng de DNA do P2. Em seguida, a análise dos dados de fluorescência foi feita por três diferentes métodos:

- modelagem dos dados de fluorescência do ciclo um ao 40 a uma curva sigmoide de quatro parâmetros, que corrige para variações na eficiência de ligação e amplificação de sondas fluorescentes diferentes (Chen et al., 2014; Zhu et al., 2017);
- cálculo da diferença nos valores de Ct (ΔC_t) entre as fluorescências FAM e HEX (Walsh et al., 2007); e
- cálculo do $\log(\text{FAM/HEX})$ da fluorescência detectada no ciclo 40 da qPCR (Lo et al., 2003).

Adicionalmente, dois DNA sintéticos (gBLOCK; IDT, 000688), um contendo o alelo de susceptibilidade (T) e outro o alelo de resistência (A) para o polimorfismo F200Y foram diluídos em água e utilizados à concentração de 10⁻⁶ como controles positivos nas reações de genotipagem por qPCR e para a criação de uma curva padrão, analisada em duplicata, contendo as concentrações de 0, 20, 40, 60, 80 e 100% do alelo de resistência (R). Para garantir a ausência de contaminação, reações sem DNA foram utilizadas como controles negativos.

A correlação de Pearson entre as frequências alélicas de resistência observadas nas larvas L₃ individuais e as estimadas nas amostras do *pool* P1 pelos diferentes métodos de análise de fluorescência foi calculada e plotada com a função ggcorr() do pacote GGally (Schloerke et al., 2024) no software R (R Core Team, 2025).

Resultados e Discussão

Frequências alélicas e genotípicas em larvas L₃ individuais

As frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo F200Y nas larvas L₃ individuais, genotipadas por ARMS-PCR (Figura 1) e por qPCR com sondas de hidrólise (Figura 2), estão apresentadas na Tabela 1. Houve concordância de 100% entre os genótipos atribuídos às L₃ individuais pelas duas técnicas.

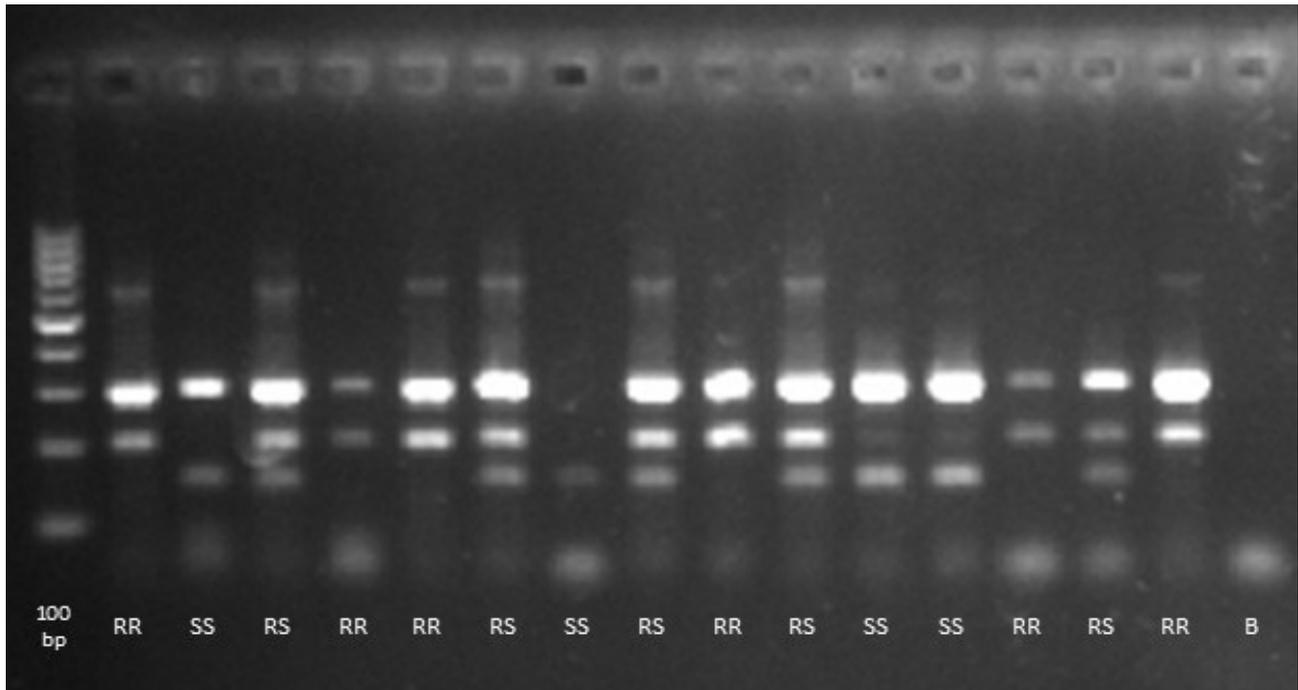


Figura 1. Genótipos de larvas individuais de *Haemonchus contortus* para o polimorfismo F200Y por ARMS-PCR. RR: homocigoto resistente com bandas de 296 e 198 bp; SS: homocigoto suscetível com bandas de 296 e 146 bp; RS: heterocigoto com bandas de 296, 198 e 146 bp; 100 bp: *ladder* padrão de tamanho; B: controle negativo ou branco.

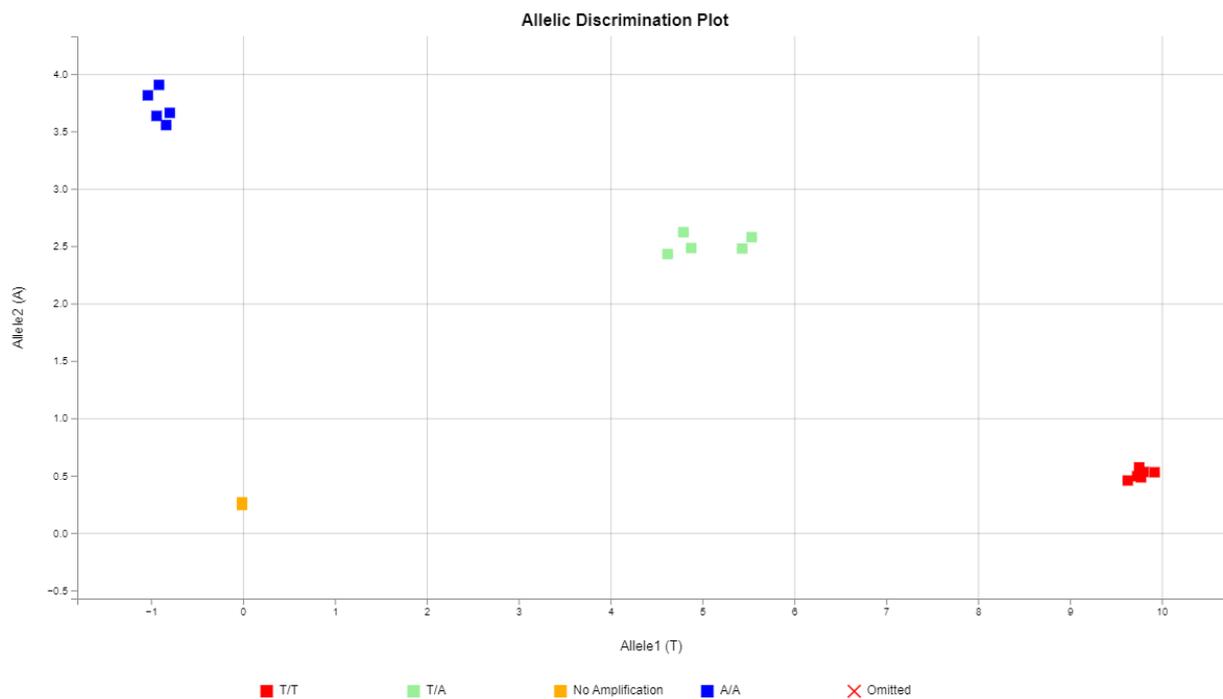


Figura 2. Genótipos de larvas individuais de *Haemonchus contortus* para o polimorfismo F200Y por discriminação alélica com sondas de hidrólise marcadas com fluorescência em qPCR.

Tabela 1. Número de larvas individuais e frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo F200Y associado à resistência aos benzimidazóis, em *Haemonchus contortus* das populações de substituição total (TR), parcial (PR) e controle (C).

População de <i>H. Contortus</i>	Frequência genotípica			Frequência alélica	
	RR (%)	RS (%)	SS (%)	% R	% S
TR	9 (40,9%)	10 (45,5%)	3 (13,6%)	63,6%	36,4%
PR	14 (63,6%)	7 (31,8%)	1 (4,6%)	79,5%	20,5%
C	13 (53,2%)	11 (45,8%)	0 (0,0%)	77,1%	22,9%

Frequências alélicas de resistência em larvas em pool por high-resolution melting (HRM)

Como a estabilidade térmica de um produto de PCR é determinado pela sua sequência de bases, quando há algum polimorfismo, a estabilidade da dupla fita é alterada, levando a diferentes padrões de *melting* (Montgomery et al., 2007). Dessa maneira, a HRM utiliza a temperatura de *melting* dos amplicons para diferenciar as variações genéticas existentes (Kristensen et al., 2012).

Assim, na HRM, inicialmente foi padronizada a reação com DNA sintético. Para tanto, foi feita a mistura entre DNA sintético para o alelo de susceptibilidade T (S) e DNA sintético para o alelo de resistência A (R), criando uma curva padrão com concentrações de 0, 20, 40, 60, 80 e 100%

do alelo R. Era esperado que a curva padrão de *melting* progredisse proporcionalmente à alteração da concentração do alelo R, mas a concentração 0% R ficou acima da concentração 100% R e a concentração 40% R ficou fora das curvas formadas pelas demais concentrações (Figura 3). Apesar da HRM identificar a população C do pool 2 (C_P2) com a frequência do alelo R entre 60 e 80% (Figura 3), dentro do esperado de 77,1% encontrado para as larvas individuais do grupo C (Tabela 1), os resultados não foram confiáveis uma vez que a curva de *melting* não apresentou padrão adequado. As alterações feitas ao protocolo de HRM (mastermix, temperatura de incremento e modos de leitura) não melhoraram os resultados obtidos.

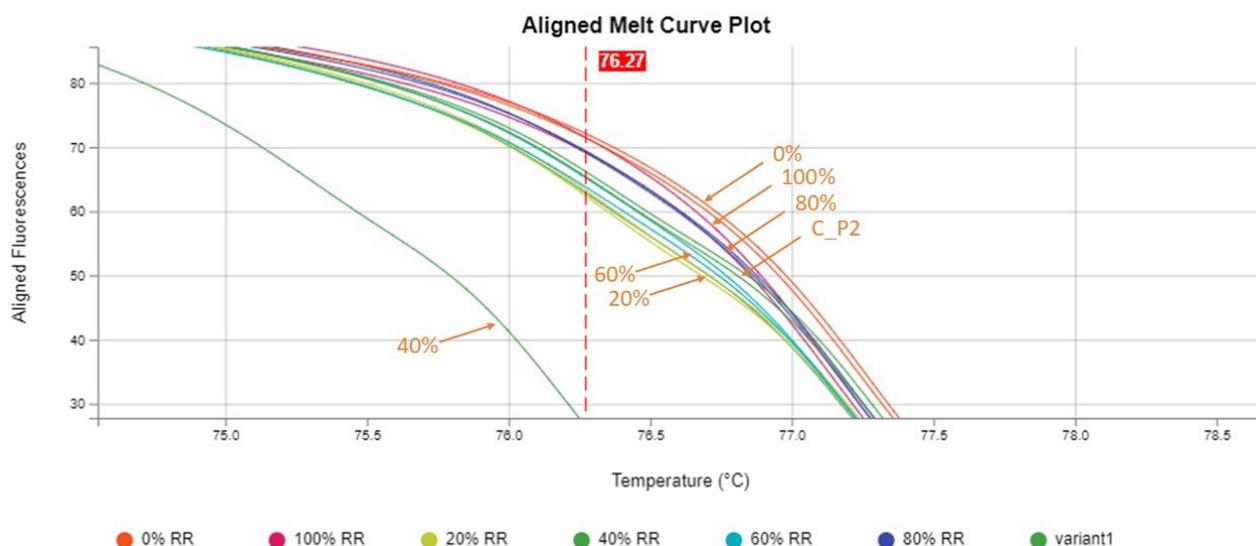


Figura 3. Curva normalizada de *high-resolution melting* (HRM) para o gradiente de concentrações (0, 20, 40, 60, 80 e 100%) do alelo de resistência do polimorfismo F200Y, utilizando DNA sintético. C_P2: pool 2 da população controle de *Haemonchus contortus*.

Como os resultados obtidos com HRM não foram satisfatórios, foram investigadas as possíveis causas. Inicialmente, verificamos que a mutação em estudo (T>A) pertence à classe IV e causa alteração mínima na temperatura de *melting*, o que torna a análise por HRM bastante desafiadora (Muneeswaran et al., 2024).

Em seguida, conferimos se os *primers* (com e sem cauda M13) atendiam aos parâmetros ideais de

conteúdo de 40-60% GC e temperatura de *melting* de 55-65°C (Muneeswaran et al., 2024). Utilizando o Oligo Analyzer (<https://www.idtdna.com/calc/oligoanalyzer>), observamos que o *primer* F200Y_For não possuía conteúdo ideal de GC e que os *primers* com a cauda M13 (F200Y_For_M13 e F200Y_Rev_M13) não se enquadravam nos limites de temperatura ótima de *melting* (Tabela 2).

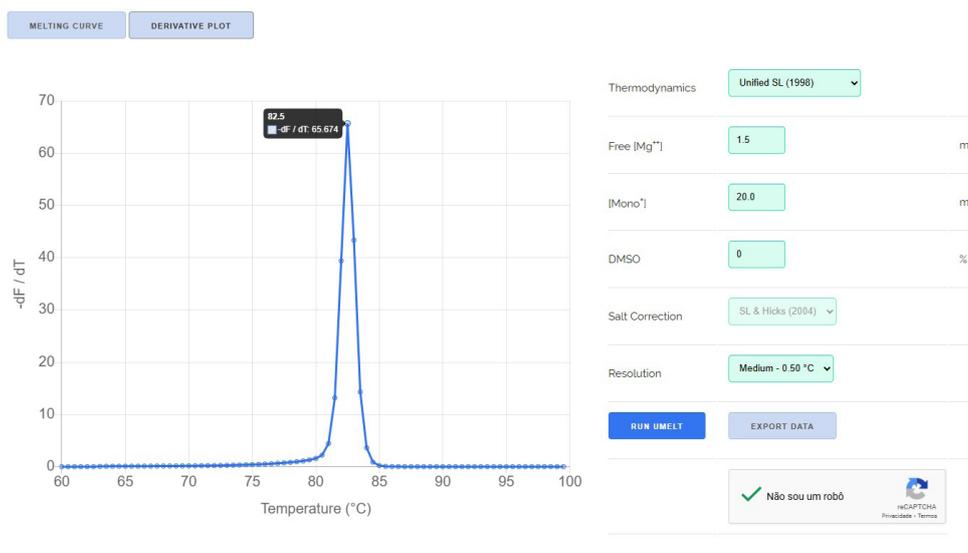
Tabela 2. Análise do conteúdo GC e da temperatura de *melting* (T_m) dos *primers* utilizados para a genotipagem do polimorfismo F200Y associado à resistência aos benzimidazóis em *Haemonchus contortus* por *high-resolution melting*.

Primer	Concentração (μ M)	Tamanho (bp)	GC (%)	T_m ($^{\circ}$ C)
F200Y_For	0,25	20	55,0%	61,8
F200Y_Rev	0,75	24	37,5%	62,8
F200Y_For_M13	0,25	38	52,6%	74,8
F200Y_Rev_M13	0,75	41	41,5%	72,1

Em vermelho estão destacadas as condições fora das ideais.

Para que sejam diferenciados na HRM, os amplicons precisam apresentar diferenças na temperatura de *melting* de pelo menos 1°C (Muneeswaran et al., 2024). Assim, a termodinâmica dos amplicons para os alelos T e A foi investigada no uMelt (<https://www.dna-utah.org/umelt/quartz/um.php>; Dwight et al., 2011) (Figura 4). Esse software permite a utilização de diferentes métodos de correção de termodinâmica e, na maioria deles,

observamos que os amplicons para o alelo T e para o alelo A apresentaram a mesma temperatura predita de *melting* (Tabela 3). A única diferença detectada foi 0,5°C de diferença na temperatura de *melting* entre os amplicons, estimada com correção de Weber (2015) (Tabela 3), no entanto, esse valor é inferior à diferença mínima necessária para a correta diferenciação dos amplicons por HRM.



Sequence >> GC Content = 43%, Length = 108bp

```
CCCTTCCGTCATCAACTGGTAGAAGAACCCGATGAAACATCTGTATTGACAAAGAACTCTGTATGATATCTGC
TTCCGCACTTTGAACCTGACAAATCCAACT
```

Figura 4. Software uMelt usado para a análise preditiva da temperatura de *melting* de amplicons para a genotipagem por *high-resolution melting*.

Tabela 3. Termodinâmica dos amplicons para os alelos A e T do polimorfismo F200Y em *Haemonchus contortus* com os primers forward e reverse sem ou com cauda M13.

Amplicon	Tamanho (bp)	Tm – SL (°C)	Tm – BD (°C)	Tm – SU (°C)	Tm – HU (°C)	Tm – WE (°C)
Alelo T	108	82,5	79,5	86,0	84,0	82,5
Alelo A	108	82,5	79,5	86,0	84,0	83,0
Alelo T_M13	143	85,0	81,5	88,0	86,0	85,0
Alelo A_M13	143	85,0	81,5	88,0	86,0	85,5

Parâmetros de termodinâmica segundo: SL (SantaLucia Junior, 1998), BD (Blake; Delcourt, 1998), SU (Sugimoto et al., 1995), HU (Huguet et al., 2010) e WE (Weber, 2015).

Esses achados demonstram que a genotipagem do polimorfismo F200Y (T>A) por HRM com os primers utilizados, com ou sem cauda M13, é inviável. Por esse motivo, avaliamos a aplicabilidade da qPCR com sondas de hidrólise para a genotipagem e a determinação da frequência alélica de resistência utilizando *pool* de larvas.

Frequências alélicas de resistência em larvas em *pool* por discriminação alélica com sondas de hidrólise marcadas com fluorescência e análise em curva sigmoide de quatro parâmetros

Após a qPCR com as sondas de hidrólise, os dados de fluorescência foram avaliados por três diferentes métodos. O primeiro método consistiu na utilização dos dados brutos de fluorescência para o cálculo da razão de fluorescência transformada (k') no ponto de inflexão baseada numa curva sigmoide de quatro parâmetros (Chen et al., 2014). Adicionalmente, para reduzir o viés da estimativa do parâmetro causado pelo número variável de ciclos de PCR na fase de platô, os dados brutos de fluorescência foram ajustados à curva sigmoide duas vezes, a primeira com todos os pontos (40 ciclos de

qPCR), e a segunda com um *slope* após o ponto de inflexão (ciclo $b + c$) (Chen et al., 2014).

Para tanto, os dados de fluorescência obtidos do ciclo um ao ciclo 40 para cada amostra foram modelados à seguinte função sigmoide (Equação 1):

$$y(x) = \frac{a}{1 + \exp\left(-\frac{x-b}{c}\right)} + y_0 \quad (\text{Equação 1}),$$

em que:

x é o ciclo da qPCR,

$y(x)$ é a fluorescência bruta do ciclo x ,

y_0 é a fluorescência background (fluorescência do primeiro ciclo),

a é a altura máxima da curva (diferença entre fluorescência do último ciclo e a fluorescência do primeiro ciclo),

b é a primeira derivada máxima da função (ponto de inflexão da curva), e

c é a inclinação (*slope*) da curva.

A modelagem dos dados de fluorescência à curva sigmoide foi feita tanto no software R, com a função `nls()` do pacote `stats` (R Core Team, 2025) fornecendo os parâmetros de partida a , b , c e y_0 (Figuras 5 e 6), quanto com a ferramenta “solver” do Excel (Figura 7) minimizando a soma de quadrados dos resíduos.

```

1
2 # Primeiro ajuste FAM
3 y0FAM = amostra[1,"FAM"]
4 aFAM = amostra[40,"FAM"] - y0FAM
5 x = amostra$cycle
6 y= amostra$FAM
7
8 # Modelo
9 fitmodel <- nls(y ~ (a/(1 + exp(-(x-b)/c)))+d, start=list(a=aFAM,b=35,c=4,d=y0FAM))
10 fitmodel
11
12 # Coeficientes da função
13 params=coef(fitmodel)
14 params
15 params[2]+params[3] # bFAM + cFAM
16
17 # Função para visualização dos dados
18 sigmoid = function(params, x) {
19   (params[1] / (1 + exp(-(x-params[2])/params[3]))) + params[4]
20 }
21
22 # Visualização
23 y1 <- sigmoid(params,x)
24 plot(y,col="red") #Dados brutos
25 lines(y1,col="green") #Primeiro ajuste
26
27 # segundo ajuste FAM, modelo, coeficientes e visualização
28 y0FAM = amostra[1,"FAM"]
29 aFAM = amostra[(round(params[2]+params[3])),"FAM"] - y0FAM
30 x = amostra$cycle[1:(round(params[2]+params[3]))]
31 y= amostra$FAM[1:(round(params[2]+params[3]))]
32
33 fitmodel2 <- nls(y ~ (a/(1 + exp(-(x-b)/c)))+d, start=list(a=aFAM,b=35,c=4,d=y0FAM))
34 fitmodel2
35 params2=coef(fitmodel2)
36 params2
37
38 y2 <- sigmoid(params2,x)
39 plot(y,col="red") #Dados brutos
40 lines(y1,col="green") #Primeiro ajuste
41 lines(y2,col="blue") #Segundo ajuste
42

```

Figura 5. Códigos no software R para o ajuste dos dados de fluorescência de qPCR a uma curva sigmoide de quatro parâmetros.

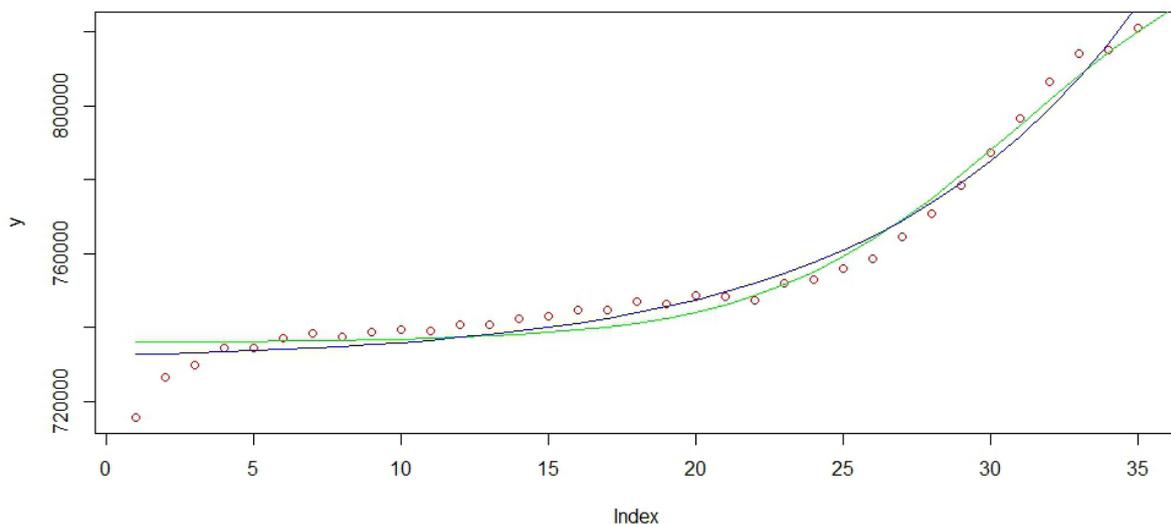


Figura 6. Dados brutos de fluorescência (círculos vermelhos) por ciclo de qPCR e primeiro (linha verde) e segundo (linha azul) ajuste dos dados à curva sigmoide.

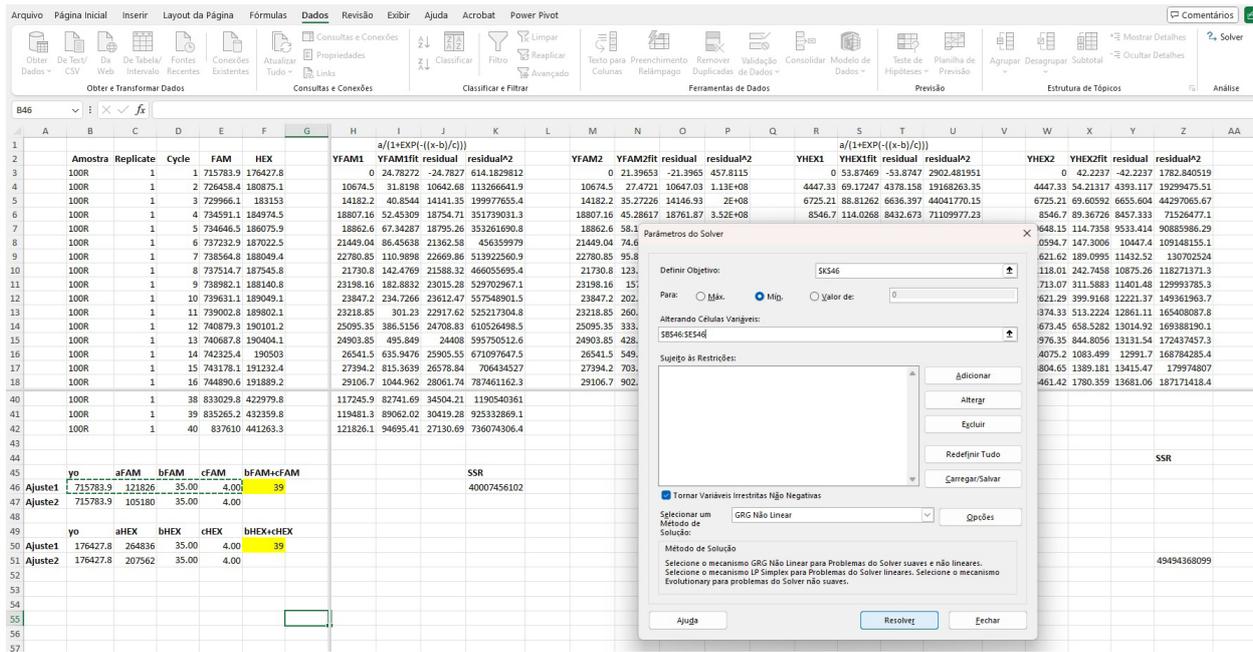


Figura 7. Dados brutos de fluorescência (círculos vermelhos) por ciclo de qPCR e primeiro (linha verde) e segundo (linha azul) ajuste dos dados à curva sigmoide.

Após a obtenção dos dados de a, b e c (Equação 1) do segundo ajuste à curva sigmoide para cada fluorescência (FAM e HEX), a razão (R') foi calculada por meio de uma das duas seguintes equações:

a) Para os dados em que bFAM foi menor que bHEX (bFAM < bHEX), utilizou-se a Equação 2:

$$R' = 0,5 \times \frac{a_{FAM}}{a_{HEX}} \times \left(1 + \exp\left(-\frac{(b_{FAM}-b_{HEX})}{c_{HEX}}\right) \right) \quad \text{(Equação 2)}$$

em que:

- R' é a razão entre as fluorescências para FAM e HEX,
- a_{FAM} é a altura máxima da curva ajustada para FAM,
- a_{HEX} é a altura máxima da curva ajustada para HEX,
- b_{FAM} é a primeira derivada máxima da função para FAM,
- b_{HEX} é a primeira derivada máxima da função para HEX, e
- c_{HEX} é a inclinação da curva para HEX.

b) Para os dados em que bFAM > bHEX, utilizou-se a Equação 3:

$$R' = 2 \times \frac{a_{FAM}}{a_{HEX}} \times \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{(b_{HEX}-b_{FAM})}{c_{FAM}}\right)} \quad \text{(Equação 3)}$$

em que:

- R' é a razão entre as fluorescências para FAM e HEX,
- a_{FAM} é a altura máxima da curva ajustada para FAM,
- a_{HEX} é a altura máxima da curva ajustada para HEX,
- b_{HEX} é a primeira derivada máxima da função para HEX,
- b_{FAM} é a primeira derivada máxima da função para FAM, e
- c_{FAM} é a inclinação da curva para FAM.

Em seguida, foi calculada a razão de fluorescência ajustada (k') pela Equação 4, expressa por:

$$k' = \frac{R'}{R'+1} \quad \text{(Equação 4)}$$

em que:

- k' é razão de fluorescência ajustada, e
- R' é a razão entre as fluorescências para FAM e HEX.

Alguns dados da curva padrão (uma replicata de 80% R e as duas replicatas de 0% R) e dos pools de larvas um (P1) das três populações (TR, PR e C) não se ajustaram à curva sigmoide, pois o ponto de inflexão estimado para a curva foi superior ao número de ciclos de qPCR (ou seja, superior a 40). Isso pode ser devido ao número insuficiente de ciclos

utilizados na qPCR ou à concentração insuficiente de DNA na reação.

A regressão linear dos dados de k' da curva padrão de DNA sintético pela concentração do alelo de resistência (20, 40, 60, 80 e 100% R) apresentou

bom coeficiente de determinação ($R^2 = 0,95$) (Figura 8). Em seguida, a equação predita pela regressão linear foi utilizada para o cálculo das frequências do alelo R nas amostras em pool (Tabela 4), que também foram plotadas no gráfico (Figura 8).

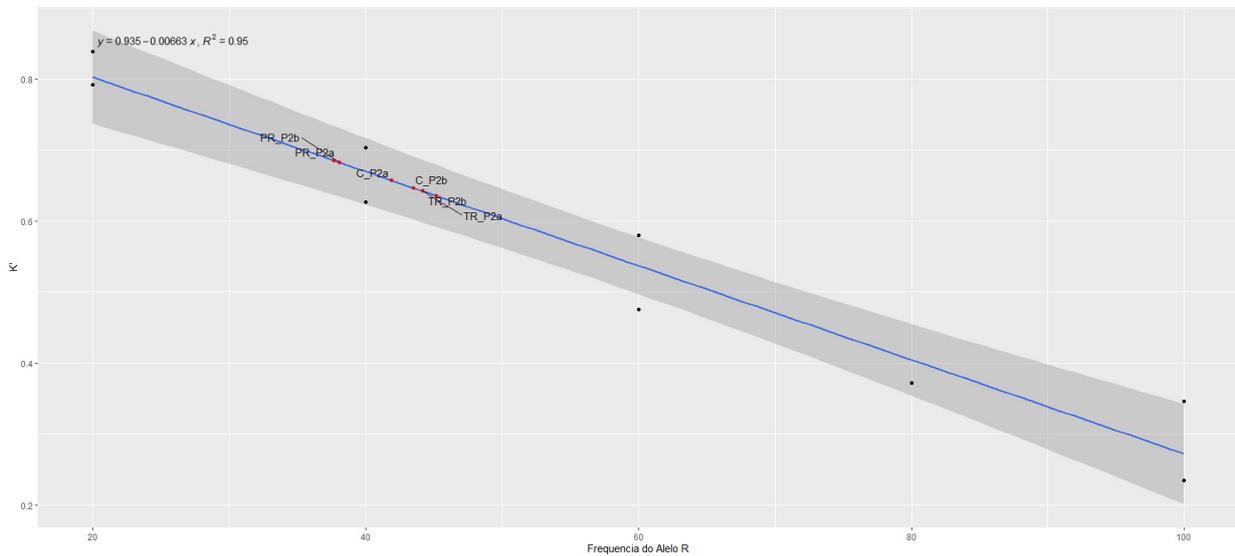


Figura 8. Regressão linear da fluorescência ajustada (k') pela frequência do alelo de resistência do polimorfismo F200Y na curva padrão de DNA sintético e sobreposição das amostras de pool de *Haemonchus contortus* (em vermelho) à curva. TR: substituição total; PR: substituição parcial; C: controle; P2a e P2b: duplicatas do pool 2 (P2) de DNA extraído de duas mil larvas.

Observou-se que as frequências para o alelo R estimadas pela curva sigmoide para as larvas em pool do P2 foram muito inferiores às frequências observadas pela genotipagem de L_3 individuais (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência observada (FreqR_obs) e estimada (FreqR_est) do alelo de resistência do polimorfismo F200Y nas amostras em pool de *Haemonchus contortus* das populações de substituição total (TR), parcial (PR) e controle (C), calculadas por ajuste à curva sigmoide de quatro parâmetros, ΔC_t e $\log(\text{FAM}/\text{HEX})$, usando curva padrão de DNA sintético (gBLOCK) ou de L_3 individuais.

<i>H. contortus</i>	FreqR_obs L_3	Pool de larvas	FreqR_est sigmoide gBLOCK	FreqR_est ΔC_t gBLOCK	FreqR_est ΔC_t L_3	FreqR_est $\log(\text{FAM}/\text{HEX})$ gBLOCK	FreqR_est $\log(\text{FAM}/\text{HEX})$ L_3
TR	63,6%	TR_P1	.	44,6%	56,1%	52,8%	66,4%
		TR_P2	44,7%	41,2%	50,3%	56,3%	71,7%
PR	79,5%	PR_P1	.	43,4%	54,0%	58,0%	74,5%
		PR_P2	37,9%	39,8%	48,0%	55,7%	70,9%
C	77,1%	C_P1	.	42,7%	52,9%	56,5%	72,1%
		C_P2	42,7%	40,1%	48,5%	57,3%	73,4%

P1: pool 1 das larvas genotipadas individualmente; P2: pool 2 de DNA extraído de duas mil larvas de *Haemonchus contortus*.

Devido à baixa capacidade preditiva obtida com a curva padrão de DNA sintético, foi avaliado se os dados de fluorescência obtidos com as L_3 individuais poderiam ser usados como curva padrão, considerando as amostras SS como 0% R, as amostras RS como 50% R e as amostras RR como 100% R. Entretanto, esses dados não puderam ser ajustados à curva sigmoide devido ao ponto de inflexão ter sido superior a 40 ciclos.

Frequências alélicas de resistência em larvas em *pool* por discriminação alélica com sondas de hidrólise marcadas com fluorescência e análise de ΔC_t

Para o segundo método de avaliação dos dados de fluorescência da qPCR, foram utilizados os valores de ΔC_t (CtFAM - CtHEX) (Walsh et al., 2007). As frequências estimadas para o alelo R nas amostras em *pool* (Figura 9), usando as diluições do DNA sintético como curva padrão ($R^2 = 0,91$), foram menores que os valores observados para as larvas individuais (Tabela 4). A utilização do ΔC_t das L_3 individuais como curva padrão levou a melhor coeficiente de determinação ($R^2 = 0,96$) (Figura 10), mas as amostras em *pool* ainda apresentaram valores estimados da frequência do alelo R menores que a frequência observada a partir da genotipagem de L_3 individuais (Tabela 4).

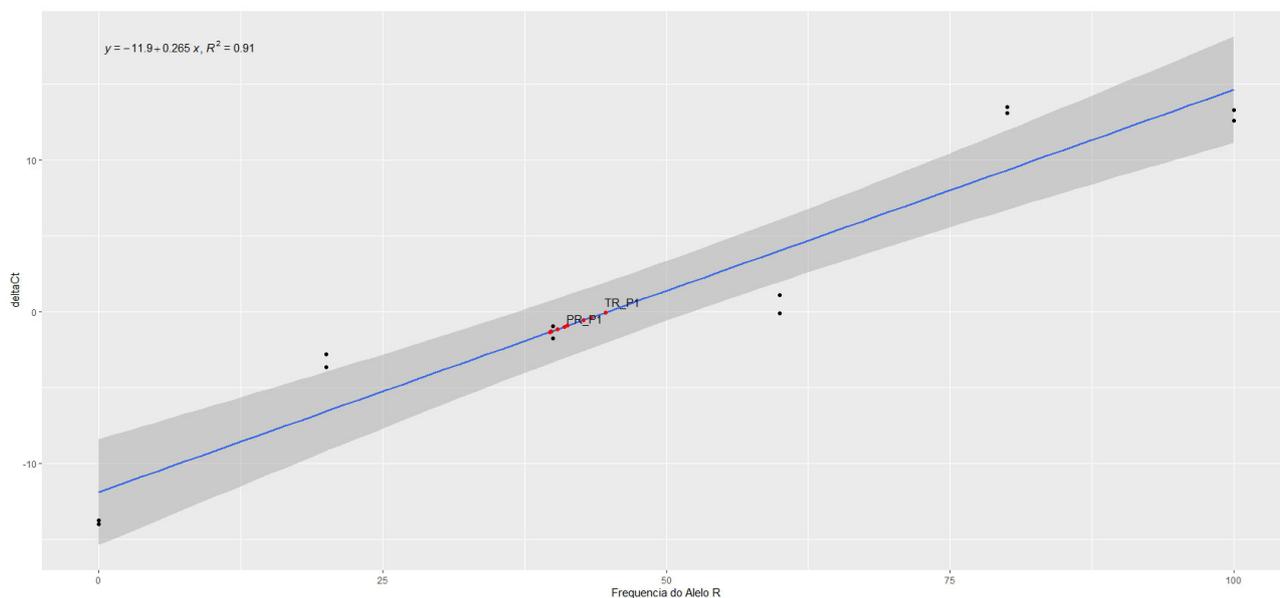


Figura 9. Regressão do valor de ΔC_t entre FAM e HEX pela frequência do alelo de resistência do polimorfismo F200Y da curva padrão de DNA sintético e sobreposição das amostras de *pool* de *Haemonchus contortus* (em vermelho). TR: substituição total; PR: substituição parcial; P1: *pool* 1 das L_3 individuais.

Frequências alélicas de resistência em larvas em *pool* por discriminação alélica com sondas de hidrólise marcadas com fluorescência e análise de $\log(\text{FAM}/\text{HEX})$

No terceiro método de avaliação, foi calculado o $\log(\text{FAM}/\text{HEX})$ da fluorescência no ciclo 40 da qPCR (Lo et al., 2003). A regressão linear de $\log(\text{FAM}/\text{HEX})$

pela concentração do alelo de resistência (0, 20, 40, 60, 80 e 100% R) utilizando DNA sintético resultou em menor coeficiente de determinação ($R^2 = 0,87$) e, também, não conseguiu estimar adequadamente as frequências do alelo de resistência nas amostras em *pool* (Figura 11 e Tabela 4).

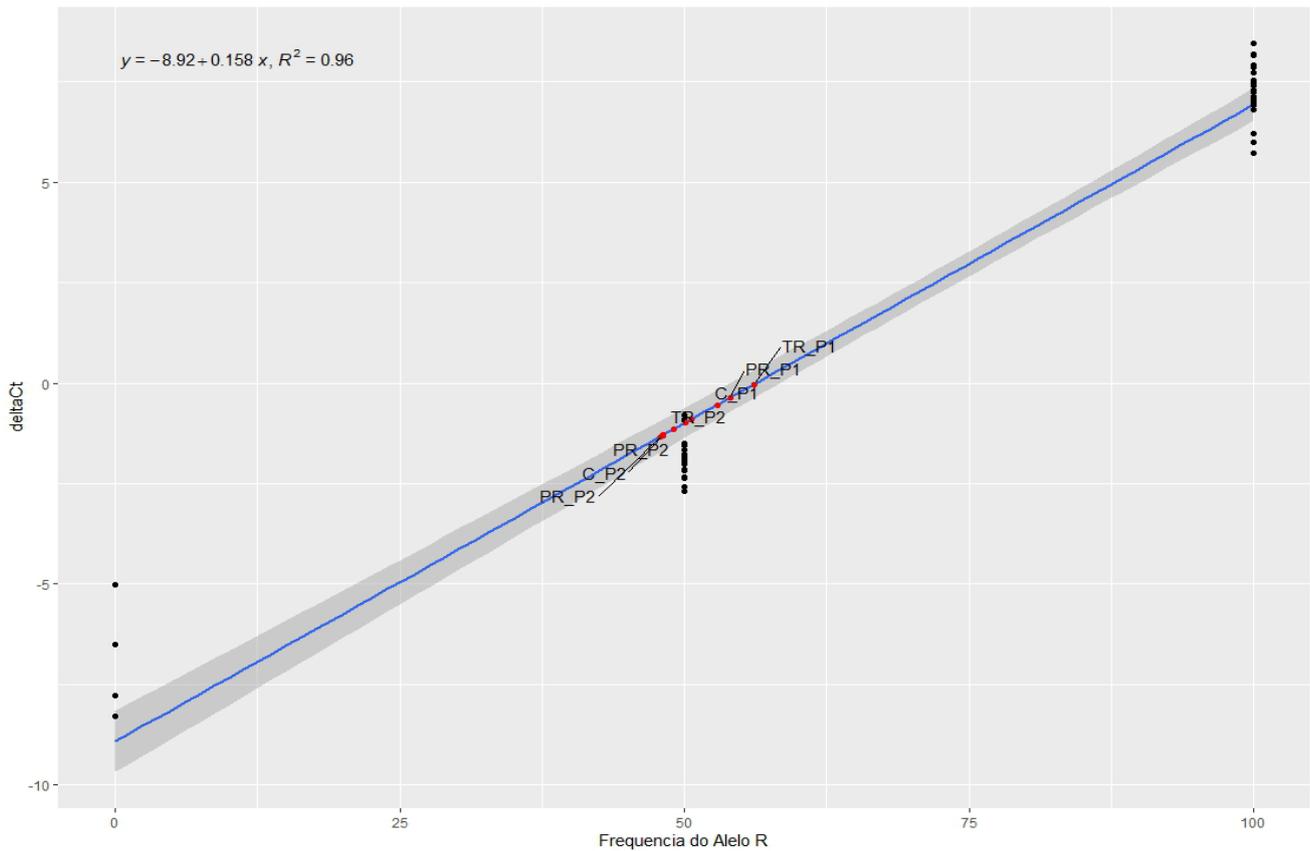


Figura 10. Regressão do ΔC_t entre FAM e HEX pela frequência do alelo de resistência do polimorfismo F200Y da curva padrão de larvas L_3 individuais e sobreposição das amostras de pool de *Haemonchus contortus* (em vermelho). TR: substituição total; PR: substituição parcial; C: controle; P1: pool 1 das L_3 individuais; P2: duplicatas do pool 2 de DNA extraído de duas mil larvas.

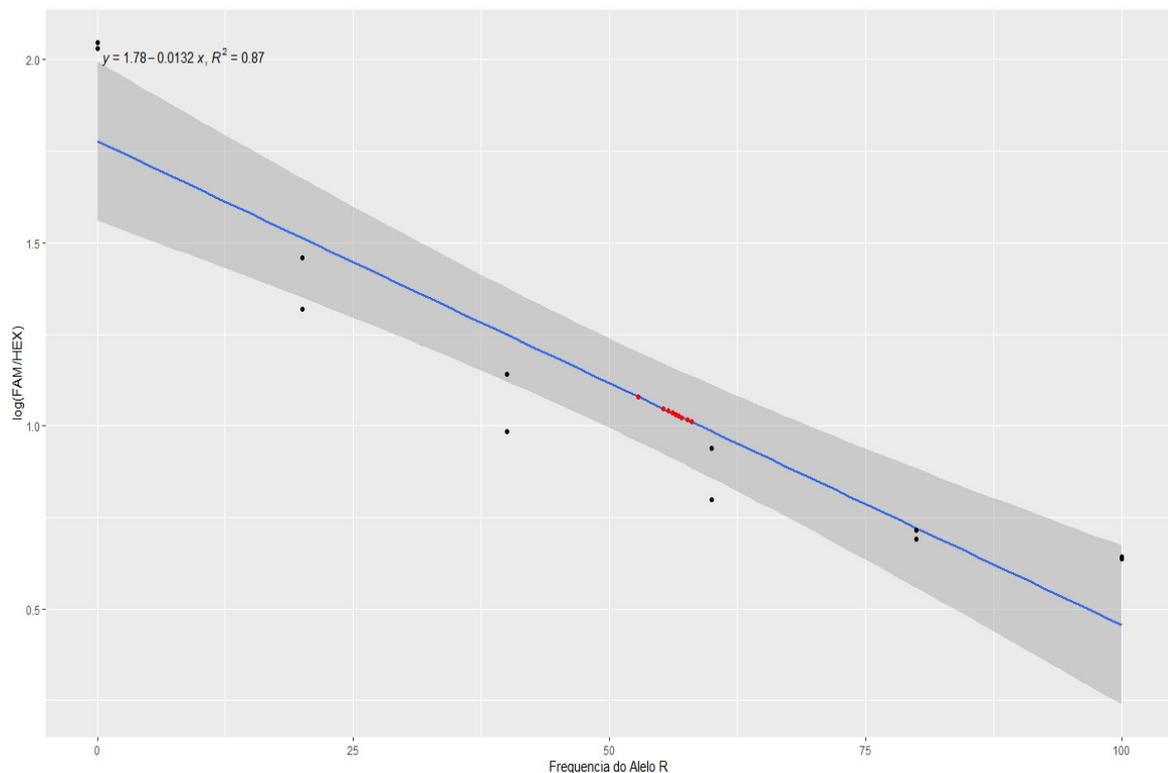


Figura 11. Regressão linear $\log(\text{FAM}/\text{HEX})$ pela frequência do alelo de resistência do polimorfismo F200Y da curva padrão de DNA sintético e sobreposição das amostras de pool de *Haemonchus contortus* (em vermelho) à curva.

Já o uso da regressão linear dos dados de $\log(\text{FAM}/\text{HEX})$ pela frequência do alelo R com a curva padrão utilizando larvas L_3 individuais (0, 50 e 100% R) resultou em $R^2 = 0,94$ (Figura 12). A equação resultante conseguiu estimar as frequências do alelo de resistência para as amostras em *pool*, principalmente para as amostras do *pool* 1 (P1), que foi composto pelas mesmas larvas genotipadas individualmente, e apresentou diferenças de 2,8 a 5,0% entre os valores estimados e observados (Tabela 4).

Correlação entre as estimativas de frequências alélicas por diferentes métodos

Adicionalmente, na comparação entre os dois últimos métodos de análise de fluorescência, observamos valores mais altos de correlação entre as frequências alélicas observadas nas larvas L_3 individuais e as frequências estimadas por $\log(\text{FAM}/\text{HEX})$ para as amostras em *pool* do P1 (Figura 13).

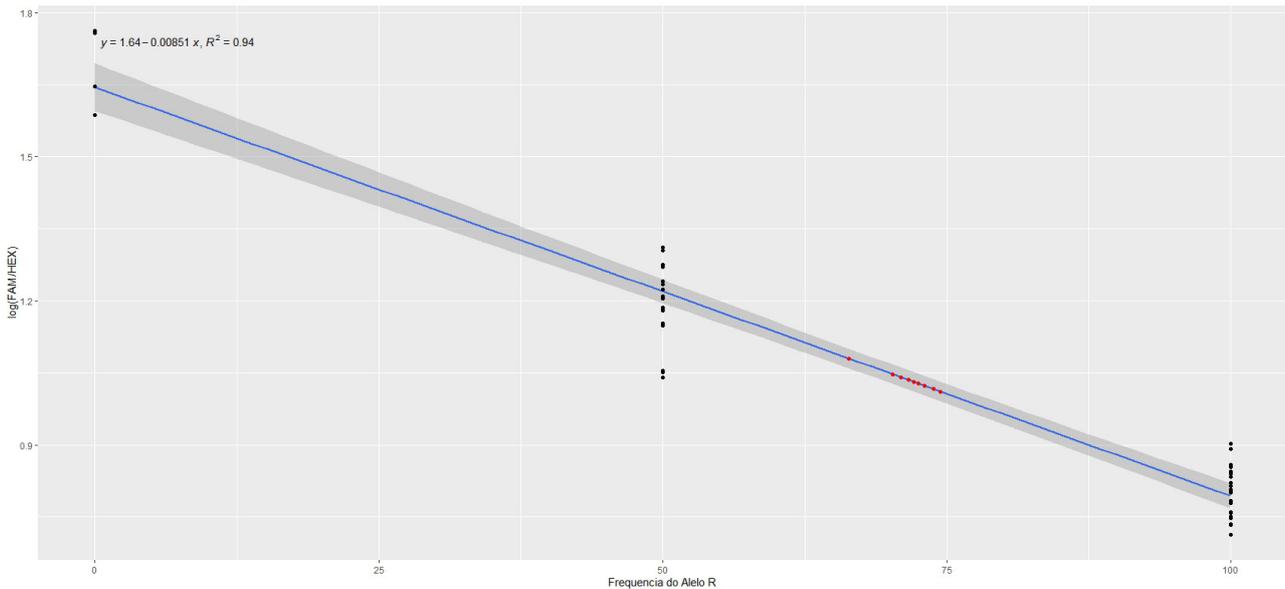


Figura 12. Regressão linear $\log(\text{FAM}/\text{HEX})$ pela frequência do alelo de resistência do polimorfismo F200Y das amostras de L_3 individuais e sobreposição das amostras de *pool* de *Haemonchus contortus* (em vermelho) à curva.

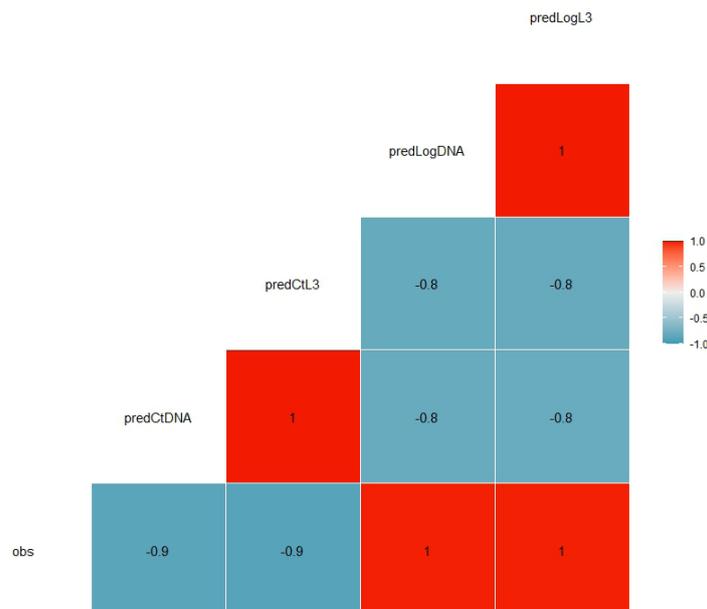


Figura 13. Correlação de Pearson entre os valores da frequência do alelo R observados nas larvas L_3 individuais (obs) e estimados para o *pool* 1 por $\log(\text{FAM}/\text{HEX})$ (predLog) e por ΔC_t (predCt) com curva padrão de DNA sintético (DNA) e de larvas individuais (L_3) de *Haemonchus contortus*.

Espera-se que o coeficiente de determinação de uma curva padrão seja superior a 0,99, o que não foi alcançado com o método $\log(\text{FAM}/\text{HEX})$ usando L_3 individuais como curva padrão (Figura 12). Para melhorar essa medida de acurácia, seria necessário padronizar as concentrações das L_3 individuais usadas na qPCR, o que não foi feito devido ao pequeno volume de DNA extraído por larva (10 μL). Além disso, a curva padrão deveria apresentar pelo menos cinco pontos e não somente os três pontos (0, 50 e 100% R) obtidos com as larvas L_3 de genótipos SS, RS e RR, respectivamente. Assim, uma alternativa seria a padronização do uso de produtos purificados e quantificados de PCR de L_3 individuais de genótipos RR e SS em mistura seriada com diferentes razões entre os dois alelos (Bang-Ce et al., 2004).

Uso de DNA sintético como curva padrão

Detectamos que, para os diferentes métodos de análises, os resultados obtidos com a curva padrão de larvas individuais foram melhores que os obtidos com DNA sintético (Tabela 4). Assim, investigamos se o uso do DNA sintético como curva padrão é adequado para a determinação das frequências alélicas das larvas em *pool*. Para tanto, utilizamos os resultados do melhor método de análise ($\log(\text{FAM}/\text{HEX})$) e plotamos as concentrações do DNA sintético à regressão linear obtida para a curva padrão de L_3 individuais (Figura 14). Observamos que os dados das concentrações 0, 80 e

100% R de DNA sintético ficaram fora da curva obtida com L_3 individuais (Figura 14). Isso indica que o DNA sintético não gerou uma curva padrão adequada para a determinação das frequências alélicas das amostras de *pool* e, por isso, nos diferentes métodos de análise com curva padrão de DNA sintético, as frequências de resistência foram subestimadas (Tabela 4).

Oligonucleotídeos sintéticos, em diluições seriadas, têm sido utilizados com sucesso para a quantificação do número de cópias em qPCR (Muñoz-Calderón et al., 2021; Han et al., 2023). Entretanto, no nosso caso, a curva padrão não foi feita pela diluição seriada do DNA sintético, mas sim por diluição entre dois DNA sintéticos diferentes, um contendo o alelo T e o outro o alelo A. Na literatura, a quantificação de frequências alélicas de amostras em *pool* é feita a partir da diluição de amostras de DNA de indivíduos homocigotos (Bang-Ce et al., 2004) ou de populações homocigotas (Walsh et al., 2007). Assim, não foram encontrados, na literatura, estudos utilizando DNA sintético como curva padrão para a quantificação de frequências alélicas em qPCR de amostras em *pool*. Sabe-se que a qualidade e a pureza do DNA extraído, decorrente do uso de diferentes matrizes ou métodos de extração e carreando potenciais inibidores, podem interferir na qPCR (Xu et al., 2019). Assim, esses fatores podem ter contribuído para as diferenças nos resultados obtidos com DNA sintético em comparação aos obtidos com larvas L_3 individuais ou em *pool*, que são provenientes de cultura de fezes e que foram submetidas à extração de DNA com solvente orgânico.

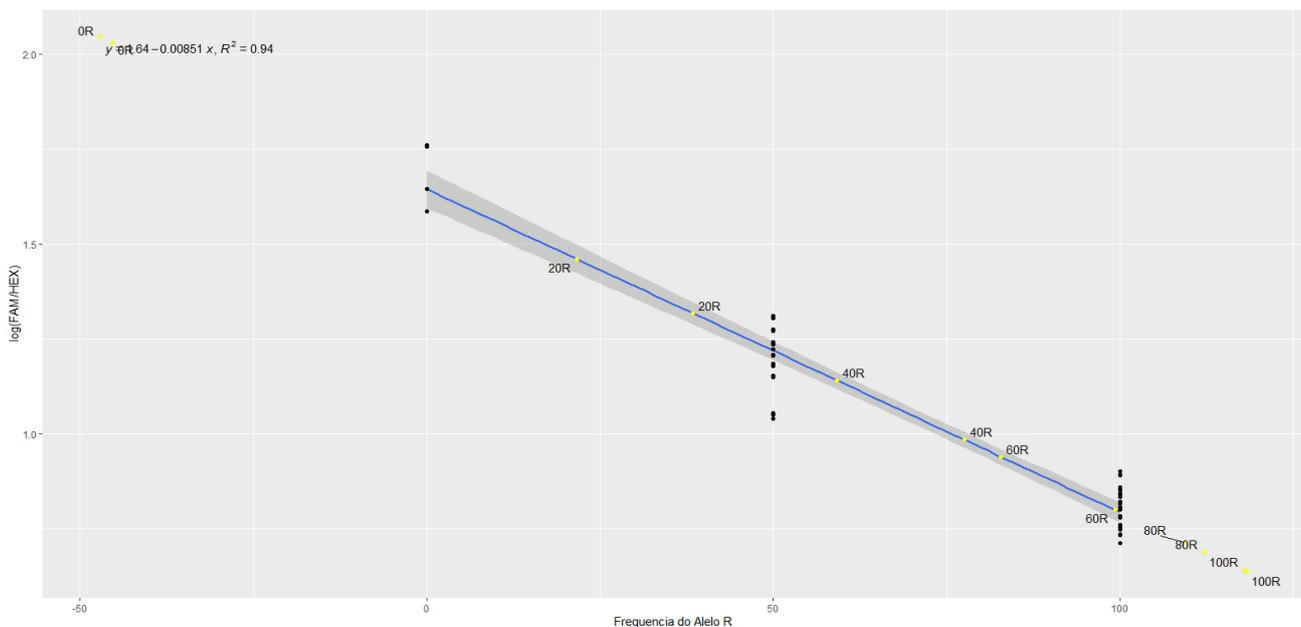


Figura 14. Regressão linear $\log(\text{FAM}/\text{HEX})$ pela frequência do alelo de resistência do polimorfismo F200Y das amostras de larvas L_3 individuais (0, 50 e 100% R) de *Haemonchus contortus* e sobreposição das concentrações do alelo de resistência em DNA sintético (0, 20, 40, 60, 80 e 100% R, em duplicata; em amarelo).

Conclusões

- 1) Concluímos, portanto, que a frequência alélica de resistência para o polimorfismo F200Y, associado à resistência aos benzimidazóis, em *H. contortus*, pode ser confiavelmente estimada a partir de amostras em *pool* utilizando-se discriminação alélica com sondas de hidrólise em qPCR, curva padrão contendo L₃ individuais de genótipos SS (0% R), RS (50% R) e RR (100% R) e análise dos dados de fluorescência com base na razão log(FAM/HEX). É importante ressaltar que uma curva padrão de DNA sintético não é adequada para determinar a frequência alélica em amostras em *pool* de larvas de *H. contortus* nas condições do presente estudo (com larvas obtidas de coproculturas e com DNA extraído com solvente orgânico).
- 2) Para a completa validação dessa técnica como ferramenta de diagnóstico da resistência anti-helmíntica e sua aplicação prática em campo, estudos adicionais são cruciais. Novos estudos devem abordar, especificamente, a otimização da concentração de DNA e do número de ciclos na qPCR, a ampliação do tamanho amostral e do número de replicatas, a avaliação de maior amplitude de frequências alélicas de resistência, considerando que a sensibilidade da técnica pode variar em função da frequência dos alelos, e o potencial uso de produtos purificados de PCR de L₃ individuais em diluições seriadas como curva padrão.

Agradecimentos

Apoio financeiro da FAPESP (processos no. 2021/02535-5 e 2021/11830-0).

Referências

BANG-CE, Y.; PENG, Z.; BINCHENG, Y.; SONGYANG, L. Estimation of relative allele frequencies of single-nucleotide polymorphisms in different populations by microarray hybridization of pooled DNA. **Analytical Biochemistry**, v. 333, n. 1, p. 72-78, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.05.016>. Acesso em: 9 out. 2025.

BELLO, H. J. S.; KAPRITCHKOFF, R. T. I.; SANTOS, J. de C.; MELITO, G. R.; NICIURA, S. C. M.; ESTEVES, S. N.; DONATONI, F. A. B.; CHAGAS, A. C. de S. Worm replacement with susceptible *Haemonchus contortus* benefits weight gain, reduces anthelmintic treatments and impacts sheep breeds differently. **Veterinary Parasitology**, v. 337, 110490, 2025. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1175765/1/2025-cppse-artigo-acsc-worm-replacement-with-susceptible-haemonchus-contortus-benefits-weight-gain-reduces-anthelmintic-treatments-impacts-sheep-breeds-differently.pdf>. Acesso em: 8 out. 2025.

BLAKE, R. D.; DELCOURT, S. G. Thermal stability of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 14, p. 3323-3332, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/26.14.3323>. Acesso em: 9 out. 2025.

BREEN, G.; HAROLD, D.; RALSTON, S.; SHAW, D.; St-CLAIR, D. Determining SNP allele frequencies in DNA pools. **Biotechniques**, v. 28, n. 3, p. 464-468, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.2144/00283st03>. Acesso em: 8 out. 2025.

CAPPER, R. L.; JIN, Y. K.; LUNDGREN, P. B.; PELOW, L. M.; MATZ, M. V.; VAN OPPEN, M. J. H. Quantitative high resolution melting: two methods to determine SNP allele frequencies from pooled samples. **BMC Genetics**, v. 16, article number 62, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12863-015-0222-z>. Acesso em: 8 out. 2025.

CHAGAS, A. C. de S.; DOMINGUES, L. F.; GAÍNZA, Y. A. **Cartilha de vermifugação de ovinos e caprinos**. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2013. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/975092/1/CartilhaVermifugacao.pdf>. Acesso em: 23 set. 2025.

CHAGAS, A. C. de S.; TUPY, O.; SANTOS, I. B. dos; ESTEVES, S. N. Economic impact of gastrointestinal nematodes in Morada Nova sheep in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, n. 3, e008722, 2022. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1145712/1/EconomicImpactGastrointestinal.pdf>. Acesso em: 7 set. 2025.

CHEN, Y.; BOGEMA, D. R.; BARCHIA, I. M.; HERRON, G. A. Quantification of the pirimicarb resistance allele frequency in pooled cotton aphid (*Aphis gossypii* Glover) samples by TaqMan SNP genotyping assay. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, e91104, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091104>. Acesso em: 8 out. 2025.

- COSTA, R. L. D.; BUENO, M. S.; VERÍSSIMO, C. J.; CUNHA, E. A.; SANTOS, L. E.; OLIVEIRA, S. M.; SPÓSITO FILHA, E.; OTSUK, I. P. Performance and nematode infection of ewe lambs on intensive rotational grazing with two different cultivars of *Panicum maximum*. **Tropical Animal Health and Production**, v. 39, n. 4, p. 255-263, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11250-007-9005-5>. Acesso em: 8 out. 2025.
- DOYLE, S. R.; COTTON, J. A. Genome-wide approaches to investigate anthelmintic resistance. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 4, p. 289-301, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.004>. Acesso em: 8 out. 2025.
- DWIGHT, Z.; PALAIS, R.; WITWER, C. T. uMELT: prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application. **Bioinformatics**, v. 27, n. 7, p. 1019-1020, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr065>. Acesso em: 9 out. 2025.
- EMERY, D. L.; HUNT, P. W.; LE JAMBRE, L. F. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? **International Journal for Parasitology**, v. 46, n. 12, p. 755-769, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.07.001>. Acesso em: 8 out. 2025.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO). FAOSTAT, 2022. Disponível em: https://www.fao.org/faostat/en/#data/SCL?countries=21&elements=2610&items=1807>&years=2022&output_type=table&file_type=csv&submit=true. Acesso em: 04 jun. 2025.
- GILLEARD, J. S. *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. **Parasitology**, v. 140, n. 12, p. 1506-1522, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182013001145>. Acesso em: 8 out. 2025.
- HAN, X.; BECK, K.; BÜRGMANN, H.; FREY, B.; STIERLI, B.; FROSSARD, A. Synthetic oligonucleotides as quantitative PCR standards for quantifying microbial genes. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, article number 1279041, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1279041>. Acesso em: 9 out. 2025.
- HANSEN, J.; PERRY, B. **The epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of ruminants**. 2. ed. Nairobi: International Laboratory for Research on Animal Diseases, 1994. Disponível em: <https://cgspace.cgiar.org/bitstreams/a17ab4bc-4e6f-4c29-828e-d02f45b0e82d/download>. Acesso em: 8 set. 2025.
- HASSAN, N. M. F.; GHAZY, A. A. Advances in diagnosis and control of anthelmintic resistant gastrointestinal helminths infecting ruminants. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 46, n. 3, p. 901-915, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12639-021-01457-z>. Acesso em: 8 out. 2025.
- HUGUET, J. M.; BIZARRO, C. V.; FORNS, N.; SMITH, S. B.; BUSTAMANTE, C.; RITORT, F. Single-molecule derivation of salt dependent base-pair free energies in DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 35, p. 15431-15436, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1001454107>. Acesso em: 9 out. 2025.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Rebanho de ovinos (ovelhas e carneiros)**, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/ovino/br>. Acesso em: 4 jun. 2025.
- KIM, S.; MISRA, A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 9, p. 289-320, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.9.060906.152037>. Acesso em: 8 out. 2025.
- KRISTENSEN, L. S.; ANDERSEN, G. B.; HAGER, H.; HANSEN, L. L. Competitive amplification of differentially melting amplicons (CADMA) enables sensitive and direct detection of all mutation types by high-resolution melting analysis. **Human Mutation**, v. 33, n. 1, p. 264-271, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/humu.21598>. Acesso em: 9 out. 2025.
- 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 I. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 63, n. 2, p. 299-303, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)90066-3](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)90066-3). Acesso em: 8 out. 2025.
- LO, H. S.; WANG, Z.; HU, Y.; YANG, H. H.; GERE, S.; BUETOW, K. H.; LEE, M. P. Allelic variation in gene expression is common in the human genome. **Genome Research**, v. 13, n. 8, p. 1855-1862, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gr.1006603>. Acesso em: 8 out. 2025.
- McMANUS, C.; LOUVANDINI, H.; PAIM, P. do T.; MARTINS, R. S.; BARDELLOS, J. O. J.; CARDOSO, C.; GUIMARÃES, R. F.; SANTANA, O. A. The challenge of sheep farming in the tropics: aspects related to heat tolerance. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, supl. esp., p. 107-120, 2011. Disponível em: www.sbz.org.br/revista/artigos/66266.pdf. Acesso em: 7 set. 2025. Disponível em: www.sbz.org.br/revista/artigos/66266.pdf. Acesso em: 7 set. 2025.
- MILLER, C. M.; WAGHORN, T. S.; LEATHWICK, D. M.; CANDY, P. M.; OLIVER, A. M. B.; WATSON, T. G. The production cost of anthelmintic resistance in lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3-4, p. 376-381, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.063>. Acesso em: 8 out. 2025.

- MONTGOMERY, J.; WITTEWER, C. T.; PALAIS, R.; ZHOU L. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. **Nature Protocols**, v. 2, n. 1, p. 59-66, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.10>. Acesso em: 9 out. 2025.
- MUNEESWARAN, K.; BRANAVAN, U.; SILVA, V. A. de; DAYABANDARA, M.; HANWELLA, R.; CHANDRASEKHARAN, N. V. Genotyping SNPs and Indels: A method to improve the scope and sensitivity of High-Resolution melt (HRM) analysis based applications. **Clínica Chimica Acta**, v. 562, article number 119897, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2024>. Acesso em: 8 out. 2025.
- MUÑOZ-CALDERÓN, A.; SILVA-GOMES, N. L.; APODACA, S.; NOYA, B. A. de; DÍAZ-BELLO, Z.; SOUZA, L. R. Q.; COSTA, A. D. T.; BRITTO, C.; MOREIRA, O. C.; SCHIJMAN, A. G. Toward the establishment of a single standard curve for quantification of *Trypanosoma cruzi* natural populations using a synthetic satellite unit DNA sequence. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 23, n. 5, p. 521-531, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.01.007>. Acesso em: 10 out. 2025.
- 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.; AMBRÓSIO, L. A.; NARDON, R. F.; UENO, T. E. H.; 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. 190, n. 3-4, p. 608-612, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.07.016>. Acesso em: 8 out. 2025.
- R Core Team. **The R project for statistical computing**. 2025. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2024. Disponível em: <https://www.R-project.org>. Acesso em: 8 out. 2025.
- ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for egg counts and larval cultures for Strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 1, p. 99-102, 1950. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/AR9500099>. Acesso em: 8 out. 2025.
- SANGSTER, N. C.; GILL, J. Pharmacology of anthelmintic resistance. **Parasitology Today**, v. 15, n. 4, p. 141-146, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(99\)01413-1](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(99)01413-1). Acesso em: 8 out. 2025.
- SANTALUCIA JUNIOR, J. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 4, p. 1460-1465, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1460>. Acesso em: 13 out. 2025.
- SARGISON, N. D. Pharmaceutical treatments of gastrointestinal nematode infections of sheep – future of anthelmintic drugs. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 1, p. 79-84, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.035>. Acesso em: 7 out. 2025.
- SCHLOERKE, B.; COOK, D.; LARMARANGE, J.; BRIATTE, F.; MARBACH, M.; THOEN, E.; ELBERG, A.; CROWLEY, J. **GGally**: extension to 'ggplot2'. 2024. R package version 2.2.1. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=GGally>. Acesso em: 8 out. 2025.
- SHI, M. M.; MYRAND, S. P.; BLEAVINS, M. R.; DE LA IGLESIA, F. A. High throughput genotyping for the detection of a single nucleotide polymorphism in NAD(P)H quinone oxidoreductase (DT diaphorase) using TaqMan probes. **Molecular Pathology**, v. 52, n. 5, p. 295-299, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/mp.52.5.295>. Acesso em: 8 out. 2025.
- SUGIMOTO, N.; NAKANO, S.; KATOH, M.; MATSUMURA, A.; NAKAMUTA, H.; OHMICHII, T.; YONEYAMA, M.; SASAKI, M. Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes. **Biochemistry**, v. 34, n. 35, p. 11211-11216, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi00035a029>. Acesso em: 10 out. 2025.
- WALLER, P. J. Management and control of nematode parasites of small ruminants in the face of total anthelmintic failure. **Tropical Biomedicine**, v. 21, n. 2, p. 7-13, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16493393/>. Acesso em: 4 set. 2025.
- WALSH, T. K.; DONNAN, A. A.; JACSON, 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, n. 3-4, p. 304-312, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.10.014>. Acesso em: 8 out. 2025.
- WEBER, G. Optimization method for obtaining nearest-neighbour DNA entropies and enthalpies directly from melting temperatures. **Bioinformatics**, v. 31, n. 6, p. 871-877, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu751>. Acesso em: 13 out. 2025.

XU, L.; CHEN, H.; CANALES, M.; CIRIC, L. Use of synthesized double-stranded gene fragments as qPCR standards for the quantification of antibiotic resistance genes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 164, article number 105670, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105670>. Acesso em: 9 out. 2025.

YE, S.; DHILLON, S.; KE, X.; COLLINS, A. R.; DAY, I. N. M. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 17, e88-8, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/29.17.e88>. Acesso em: 8 out. 2025.

ZHU, F.; SCHLUPP, I.; TIEDEMANN, R. Allele-specific expression at the androgen receptoralpha gene in a hybrid unisexual fish, the Amazon molly (*Poecilia formosa*). **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, e0186411, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186411>. Acesso em: 8 out. 2025.



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA E
PECUÁRIA