



UFRPE

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM NEMATÓDEOS
GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES NO
ESTADO DE PERNAMBUCO**

RODOLFO LUIZ GODOY DO AMARAL

**RECIFE - PE
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

RODOLFO LUIZ GODOY DO AMARAL

**RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM NEMATÓDEOS
GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES NO
ESTADO DE PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida da Gloria Faustino

**RECIFE - PE
2016**

Ficha catalográfica

A485r Amaral, Rodolfo Luiz Godoy do
Resistência anti-helmíntica em nematódeos gastrintestinais
de pequenos ruminantes no Estado de Pernambuco / Rodolfo Luiz
Godoy do Amaral. – Recife, 2016.
75 f. : il.

Orientadora: Maria Aparecida da Gloria Faustino.
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de
Medicina Veterinária, Recife, 2016.
Inclui anexo(s) e referências.

1. Eficácia anti-helmíntica 2. Diagnóstico molecular 3. Caprino
4. Ovino 5. Haemonchus contortus 6. PCR I. Faustino, Maria
Aparecida da Gloria, orientadora II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM NEMATÓDEOS
GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES NO
ESTADO DE PERNAMBUCO

Tese de Doutorado elaborada por
RODOLFO LUIZ GODOY DO AMARAL

Aprovada/...../.....

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida da Gloria Faustino
Orientadora

Dr^a. Vânia Lucia de Assis Santana
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA/PE

Prof^a. Dr^a. Marilene Maria de Lima
Unidade Acadêmica de Serra Talhada – UFRPE

Prof^a. Dr^a. Gílcia Aparecida de Carvalho
Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE

Prof. Dr. José Pompeu dos Santos Filho
Departamento de Biologia - UFRPE

Dedico:
Àqueles que
fazem da minha vida uma grande caminhada:
Ao meu grandioso Deus,
aos meus queridos pais(Amaral e Edileuza Godoy),
à minha amada esposa (Ericka Alves)
e aos meus queridos filhos
(Júlia Godoy, Rafael Godoy e o pequeno Benício Godoy)

Agradecimentos

Em 2012, eu entrava no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais domésticos do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE. Iniciava uma nova etapa da minha vida, meu tão sonhado doutorado. Hoje, terminando o Doutorado, neste período adquiri conhecimentos essenciais para a minha formação profissional e pessoal. Nesta pequena jornada fortaleci amizades existentes e conquistei amigos, pessoas para as quais vão os meus sinceros agradecimentos e que nunca esquecerei.

Antes de tudo agradeço a **Deus** pela grande obra que fez e faz na minha vida.

Ao meu pai, **Luiz Benicio do Amaral**. Sem sua ajuda nada disso seria possível. Tornou meu sonho em realidade. Meu agradecimento ao meu velho marinheiro, pessoa fundamental na minha formação profissional e pessoa que sou.

À minha mãe, **Edileuza Godoy do Amaral**. Hoje falo: “quem diria ... aquele que teve dificuldades em nascer, hoje termina um doutorado”. Quanto trabalho dado a esta mulher maravilhosa e paciente. Eu te amo, minha mãe! Sem você nada seria.

Aos meus irmãos, **Carmem Albertina Godoy do Amaral** e **Fábio Luiz Godoy do Amaral**, meu muito obrigado.

A minha prima irmã querida **Evanily Godoy Laureano** e a minha grande amiga **Dona Sônia Ribeiro** (GBrennand), destas duas pessoas recebi durante este tempo palavras de conselho e incentivos diversos.

Aos meus filhos, **Júlia V. Godoy do Amaral**, **Rafael V. Godoy do Amaral**, e ao pequeno **Benício A. Godoy do Amaral**, esses são responsáveis pela força que recebo de Deus. Por eles acordo e luto incansavelmente todos os dias da minha vida.

À minha esposa, **Ericka Patricia Alves Godoy do Amaral**, mulher que pegou em minha mão e me levantou. Minha amada, muito obrigado por tudo que me fez e faz.

Aos meus familiares pelo apoio e incentivo.

Jamais poderia esquecer de duas pessoas que me levaram a descobrir como é bom pesquisar, como é bom descobrir um novo mundo. Estas pessoas foram minhas

orientadoras na iniciação científica/PIBIC, **Dr^a. Alzira Maria Paiva de Almeida** e **Dr^a. Nilma Cintra Leal**, ambas pesquisadoras do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães /FIOCRUZ/RECIFE.

Também gostaria de agradecer aos meus ex-orientadores do mestrado, **Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza** e **Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota**, estou aqui hoje graças a eles também.

Agradeço a todos os amigos conquistados durante o doutorado, em especial; **Ivanise Santana, Gisele Ramos, Débora Miranda, Silvia Marques, Carol Messias, Jussara Alencar, Victor Fernando, Rodrigo Tenório, Cristiane Maia, Neurisvan Guerra, Edenilse Romeiro e Glenda Marinho.**

Ao **Prof. Dr. Marcelo Beltão Molento** / Universidade Federal Paraná - UFPR, pela fundamental contribuição na realização desta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Leucio Câmara Alves**, meu muito obrigado pelo auxílio durante doutorado, de extrema importância.

Agradeço imensamente, à Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida da Gloria Faustino. Não tenho palavras para expressar o respeito e admiração que lhe tenho. Meu eterno agradecimento, por toda dedicação, paciência. Foram diversos os momentos difíceis enfrentados, mas sempre guiados da melhor forma por sua orientação.

À **FACEPE**, pela bolsa concedida durante o doutorado.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, pela oportunidade de realização do doutorado e toda atenção recebida durante o curso.

A vocês, minha gratidão !

*Você não sabe o quanto eu caminhei,
pra chegar até aqui.
Percorri milhas e milhas antes de dormir.
Eu nem cochilei,
os mais belos montes escalei,
nas noites escuras de frio
chorei, ei, ei.*

“Cidade Negra”

RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES NO ESTADO DE PERNAMBUCO

RESUMO

A caprinovinocultura sofre grande prejuízo econômico devido ao parasitismo por nematódeos gastrintestinais, chegando a inviabilizar esta exploração em algumas regiões. O controle desse parasitismo é feito basicamente com a utilização de drogas anti-helmínticas. A ineficiência neste tipo de controle são os primeiros sinais do aparecimento de resistência anti-helmíntica (RA), que se constitui em um dos principais fatores negativos e limitantes para a produção animal, uma vez que inviabiliza o controle efetivo da helmintose dos pequenos ruminantes, com reflexos desfavoráveis nos índices produtivos. A resistência anti-helmíntica em nematódeos de pequenos ruminantes para os três grupos de drogas mais comumente utilizados: benzimidazóis (BZs), imidazotiazóis (LEV) e lactonas macrocíclicas (LMs) vem sendo relatada e têm crescido rapidamente em diferentes regiões do mundo. O controle eficiente destes parasitos e o diagnóstico precoce da resistência anti-helmíntica, especialmente em *Haemonchus contortus*, devem ser preconizados a fim de viabilizar economicamente a criação de ovinos e caprinos. O conhecimento dos vários aspectos genéticos deste fenômeno poderá aumentar a vida útil dos fármacos atualmente utilizados, e consequentemente tentar preservar a susceptibilidade dos parasitos. Neste trabalho tem-se como objetivo diagnosticar a resistência anti-helmíntica em propriedades de criação de ovinos e caprinos e analisar a relação com o manejo instituído nas propriedades e identificar a presença do DNA responsável pela resistência anti-helmíntica em populações de helmintos de pequenos ruminantes no estado de Pernambuco. Os procedimentos metodológicos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – UFRPE. Amostras de espécimes adultos de *H. contortus* foram obtidas de animais naturalmente parasitados por helmintos gastrintestinais pertencentes a propriedades localizadas nas cidades do estado de Pernambuco: Sairé (Agreste), Recife (Região Metropolitana), Bonito (Agreste), Moreno (Região Metropolitana), Gameleira (Mata Sul), Camocim de São Félix (Agreste), Serra Talhada (Sertão). Nas propriedades de Recife e Bonito criavam-se apenas caprinos e nas demais apenas ovinos. Para realização da PCR, amostras de espécimes adultos de *H. contortus* foram obtidas de animais naturalmente parasitados por helmintos gastrintestinais, os quais foram estocados em tubos de eppendorf com PBS a 4°C, identificados e sexados no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos – UFRPE. Formou-se um pool de 20 indivíduos machos adultos de *H. contortus* de cada propriedade, dos quais procedeu-se à extração de DNA. As amostras de DNA extraídas foram analisadas no Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal do Paraná. Foi realizada a PCR com o objetivo amplificar fragmentos de genes que codificam o isotipo 1 da β -tubulina que possuíam as sequências de códon 200, realizando-se também uma PCR para identificação das espécies dos helmintos coletados. As duas reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti Life com gradiente. Uma amostra de 20 μ l de cada reação foi analisada sobre um gel de agarose 0,8 % e visualizada sob luz UV. Os produtos de PCR foram purificados com o kit comercial PureLink® Quick Gel Extraction (Invitrogen, USA) e sequenciados por eletroforese capilar (Método de Sanger) utilizando a plataforma ABI3130 (Life Technologies, USA).

Avaliou-se também a eficácia anti-helmíntica por método “in vivo” por meio do teste de redução do número de ovos por grama de fezes (TRCOF), usando a fórmula: % eficácia = [(média de OPG^{pré-tratamento} - média de OPG^{pós-tratamento}) / média de OPG^{pré-tratamento}] X 100. Detectou-se DNA responsável pela resistência anti-helmíntica aos benzimidazóis (BZ) em todas as propriedades analisadas. Os percentuais de eficácia anti-helmíntica para a moxidectina apresentaram-se como efetivos apenas aos sete dias pós-tratamento. Diversas falhas de manejo do controle das helmintoses gastrintestinais foram encontradas. Os resultados obtidos confirmam a resistência anti-helmíntica aos benzimidazóis em *H. contortus* de caprinos e ovinos no estado de Pernambuco, constituindo-se no primeiro registro de diagnóstico molecular da RA em ruminantes no Estado. Caracterizam também o declínio da efetividade anti-helmíntica da moxidectina nos rebanhos. Ambas as situações são favorecida por práticas de manejo inadequadas e uso indiscriminado de produtos químicos para o controle de helmintos gastrintestinais.

Palavras-chave: Eficácia anti-helmíntica, diagnóstico molecular, caprinos, ovinos, *Haemonchus contortus*, PCR

ABSTRACT

The sheep and goat farming suffer great economic losses due to parasitism by gastrointestinal nematodes, reaching derail this exploration in some regions. The control of such parasites is done primarily with the use of anthelmintic drugs. The inefficiency of this type of control are the first signs of anthelmintic resistance appearance (AR), which constitutes one of the main negative and limiting factors for animal production, since it prevents the effective control of helminths in small ruminants, with adverse consequences on production rates. The anthelmintic resistance in nematodes of small ruminants for the three groups most commonly used drugs: benzimidazole (BZs) imidazotiazóis (LEV) and macrocyclic lactones (MLs) has been reported and have grown rapidly in different regions of the world. The efficient control of these parasites and the early diagnosis of anthelmintic resistance, especially in *Haemonchus contortus* should be recommended in order to economically viable sheep and goat breeding. Knowledge of various genetic aspects of this phenomenon can increase the shelf life of drugs currently used, and therefore try to preserve the susceptibility of parasites. This work has the objective of diagnosing anthelmintic resistance in properties of sheep and goats and to analyze the relationship with the management of the properties and identify the presence of DNA responsible for anthelmintic resistance in helminth populations of small ruminants in the state of Pernambuco. The methodological procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use - CEUA - UFRPE. Samples from adult specimens of *H. contortus* were obtained from animals naturally infected with gastrointestinal helminths belonging to properties located in the cities of the state of Pernambuco: Sairé (Agreste), Recife (Metropolitan Region), Bonito (Agreste), Moreno (Metropolitan Region) Gameleira (South Forest), Camocim de São Félix (Agreste), Serra Talhada (Sertão). The properties of Recife and Bonito created only goats and the others only sheep. For PCR, samples from adult specimens of *H. contortus* were obtained from animals naturally infected with gastrointestinal helminths, which were stored in Eppendorf tubes with PBS at 4 ° C, identified and sexed in Parasitic Diseases Laboratory of Domestic Animals - UFRPE. It was performed a pool of 20 adult males of *H. contortus* from each property for the extraction of DNA. The extracted DNA samples were analyzed in Parasitic Diseases Laboratory at the Federal University of Parana. PCR in order to amplify gene fragments encoding 1 isotype of β -tubulin which held the sequence of codon 200 was performed; it was also performing a PCR to identify the species of helminths collected. Both amplification reactions were performed in a thermocycler Veriti Life gradient. A sample of 20 μ L of each reaction was analyzed on a 0.8% agarose gel and visualized under UV light. PCR products were purified with the commercial PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA) and sequenced by capillary electrophoresis (Sanger method) using the ABI3130 platform (Life Technologies, USA). Anthelmintic efficacy by "in vivo" method was also evaluated the by means of Fecal Egg Counting Reduction Test (FECRT) using the formula: % efficacy = $[(\text{mean OPG}^{\text{pre-treatment}} - \text{average OPG}^{\text{post-treatment}}) / \text{average OPG}^{\text{pre-treatment}}] \times 100$. It was detected DNA responsible for anthelmintic benzimidazole resistance (BZ) in all the evaluated properties. The percentage of anthelmintic efficacy for moxidectin presented

as effective only seven days after treatment. Several management failures of control of gastrointestinal helminths were found. The results obtained confirm the anthelmintic benzimidazole resistance in *H. contortus* goats and sheep in the state of Pernambuco - Brazil, becoming the first record of molecular diagnosis of RA in ruminants in the State. Both situations are favored by inadequate management practices and indiscriminate use of chemicals for the control of gastrointestinal helminths.

Keywords: anthelmintic efficacy, molecular diagnostics, goats, sheep, *Haemonchus contortus*, PCR

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo 1

- Fig.1.** Eletroforese em gel de agarose 0,8% com produto de PCR resultante da amplificação de fragmento do isotipo 1 da β -tubulina em amostras de *Haemonchus contortus* dos rebanhos (1. Marcador molecular, 2. Controle negativo, 3. Sairé, 4. Recife, 5. Bonito e 6. Moreno). **54**
- Fig.2.** Eletroforese em gel de agarose 0,8% com produto de PCR resultante da amplificação de fragmento do isotipo 1 da β -tubulina em amostras de *Haemonchus contortus* dos rebanhos (1. Marcador molecular, 2. Controle negativo, 3. Gameleira, 4. Camocim de São Félix e 5. Serra Talhada) **54**
- Fig.3.** Eletroforese do produto de PCR das amostras de DNA de Pernambuco para sequência NC1 dos rebanhos de (1. Sairé, 2. Recife, 3. Bonito, 4. Moreno, 5. Gameleira, 6. Camocim de São Félix e 7. Serra Talhada) **54**
- Fig.4.** Sequenciamento dos isolados de *Haemonchus contortus* do estado de Pernambuco. **55**

LISTA DE TABELAS

Artigo 2

Tabela 1 – Média e desvio-padrão das contagens de ovos por grama de fezes em ovinos dos municípios de Camocim de São Félix e Moreno – PE submetidos a tratamento com moxidectina segundo os dias pós-tratamento **61**

Tabela 2 – Média e desvio-padrão das contagens de larvas de *Haemonchus* sp. por grama de fezes em ovinos dos municípios de Camocim de São Félix e Moreno – PE submetidos a tratamento com moxidectina segundo os dias pós-tratamento **62**

Tabela 3. Eficácia anti-helmíntica (%) da moxidectina em rebanhos ovinos do estado de Pernambuco nos 7º, 14º e 21º dias pós-tratamento. **62**

ANEXO

Anexo 1 Questionário aplicado nas fazendas de ovinos e caprinos do estado de Pernambuco	69
Anexo 2 Protocolo do Kit comercial utilizando na extração de DNA	72

LISTA DE SIGLAS

µl	Microlitro
BZs	Grupo dos benzimidazóis
CIP	Controle integrado de parasitos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FECRT	Faecal egg count reduction test
HCl	Ácido clorídrico
HGI	Helmintos gastrintestinais
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IVM	Ivermectina 1%
ITS	Espaçador interno transcrito
L ₃	Larva de terceiro estágio – larva infectante
LEv	Grupo dos imidazotiazóis
LMs	Grupo das lactonas macrocíticas
LPG	Larvas por gramas de fezes
mg	miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésico
ml	mililitros
mM	Massa molar
MOX	Moxidectina
°C	Temperatura em Grau Celsius
OPG	Contagem de ovos por grama de fezes
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, “polymerase chain reaction”)
pH	Potencial hidrogeniônico
RA	Resistência Anti-helmíntica
RAM	Resistência anti-helmíntica múltipla
RDM	Resistência a múltiplas drogas
rpm	Medida de rotação por minuto
TAC	Aminoácido tirosina
TEO	Teste de eclodibilidade de ovos
TTC	Aminoácido fenilalanina
TDL	Teste de desenvolvimento larval

TRCOF

Teste de redução na contagem de ovos nas fezes

WAAVP

World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Controle de helmintos gastrintestinais	20
2.1.1 Classes de anti-helmínticos	20
2.1.2 Resistência anti-helmíntica	21
2.1.2.1 Histórico da resistência anti-helmíntica	23
2. 1.2.1.1 No mundo	23
2. 1.2.1.2 No Brasil	24
2.1.2.2 Mecanismo de instalação da resistência anti-helmíntica	24
2.1.2.3 Métodos de diagnósticos da resistência anti-helmíntica para nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes	26
2.1.3 Alternativas de controle das helmintoses	27
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	31
4 ARTIGOS	45
Artigo 1 - Detecção de DNA de resistência anti-helmíntica para benzimidazóis em <i>Haemonchus contortus</i> de caprinos e ovinos do estado de Pernambuco	46
Artigo 2 - Avaliação da eficácia do anti-helmíntico moxidectina em criações de ovinos no estado de Pernambuco	56
5 – CONCLUSÃO FINAL	67
6 – ANEXO	68