

Genotipagem por sondas de hidrólise em qPCR de deleção no éxon 11 do gene *mptl-1* potencialmente associada à resistência ao monepantel em *Haemonchus contortus*

Alessandra da Silva Nucci¹; Gustavo Felippelli²; Cintia Hiromi Okino³; Simone Cristina Méo Niciura⁴

¹Aluna de graduação em Medicina Veterinária, Centro Universitário Central Paulista - UNICEP, São Carlos, SP. Bolsista PIBIC/CNPq, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP; alenucci.medvet@gmail.com.

²Bolsista de pós-doutorado FAPESP, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

³Analista da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP

⁴Pesquisadora Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP

Os nematoides *Haemonchus contortus* são responsáveis por grandes perdas econômicas na produção ovina devido ao parasitismo e à resistência anti-helmíntica. Em estudo genômico anterior, detectou-se uma deleção de 6 bp (c.852_857delATTGTC|p.Leu285_Ser286del) localizada no éxon 11 em uma sequência que codifica o domínio transmembrana 2 da proteína MPTL-1 em *H. contortus*. Formulou-se, assim, a hipótese da associação entre a deleção identificada e a resistência ao monepantel. O objetivo do presente estudo foi o delineamento de um protocolo complementar à metodologia anteriormente desenvolvida (PCR seguida de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida) para a genotipagem por PCR em tempo-real (qPCR) da 852_857del no gene *mptl-1* (HCON_00039360) em *H. contortus*. Para tanto, DNA de larvas individuais de terceiro estágio (L₃) de isolado de *H. contortus* resistente ao monepantel foi extraído por solvente orgânico e ressuspendido em volume final de 10 L de água. Para a amplificação em qPCR e genotipagem com sondas de hidrólise foi utilizado o ensaio TaqMan composto pelos *primers* 5'-GATCAACGATCTCAGAGAGGAGAAA-3' e 5'-ACCAATAAGAGGAATGAAGGAGGATGT-3' e pelas sondas TTGGAATTACAACACTAATGT-FAM para o alelo contendo a deleção de 6 bp e CAACACTATTGTCAATGTCT-VIC para o alelo selvagem, de modo a amplificar fragmentos de 118 bp e 124 bp, respectivamente. A reação de qPCR consistiu de 1X TaqMan ProAmp, 1X Ensaio TaqMan e 1 µL de DNA, em volume final de 10 µL e foi realizada em termociclador ABI 7500. Foram realizadas três corridas: 1) *pre-read* a 60 °C por 30 seg para a leitura da fluorescência basal de *primers* e sondas; 2) amplificação em quantificação absoluta a 95 °C por 5 min e 50 ciclos a 95 °C por 15 seg e 60 °C por 60 seg; e 3) *post-read*, corrida que subtrai a fluorescência basal e designa os alelos usando os dados de amplificação. A genotipagem de 88 larvas individuais de *H. contortus* resultou na detecção de 7 indivíduos homozigotos para o alelo contendo a deleção de 6 bp (7,95%); 74 indivíduos homozigotos para o alelo selvagem (84,1%); e 7 indivíduos heterozigotos (7,95%). Assim, foram estimadas as frequências alélicas de 88,1% para o alelo selvagem e de 11,9% para o alelo contendo a deleção de 6 bp. Os resultados obtidos com as sondas de hidrólise em qPCR, técnica que permite a genotipagem e avaliação em larga, possibilitaram a genotipagem da deleção de 6 bp no gene *mptl-1* em *H. contortus*. Entretanto, a baixa frequência da deleção de 6 bp observada na população resistente de *H. contortus* em estudo sugere a presença e a participação de outros polimorfismos gênicos no estabelecimento do fenótipo de resistência ao monepantel.

Apoio financeiro: PIBIC/CNPq (nº. 133776/2021-2); FAPESP (processo nº. 2019/02967-2)

Área: Ciências Agrárias

Palavras-chave: nematoides gastrintestinais; qPCR; sonda de hidrólise; polimorfismo

Número Cadastro SisGen: A43C096