Научная статья

УДК 619.576.895.132

https://doi.org/10.31016/1998-8435-2024-18-2-170-178

Анализ наличия резистентности у паразитических нематод *Haemonchus contortus* к антигельминтным препаратам бензимидазольного ряда методом гнездовой изотермической амплификации (ПЦР)

Илья Александрович Пименов [1], Анастасия Ивановна Варламова [2], Алексей Дмитриевич Афанасьев [3], Ирина Михайловна Одоевская [4]

[1–4] Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук» (ВНИИП – фил. ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), Москва, Россия

[1] mr.pimenov123@yandex.ru

[2] arsphoeb@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-8364-5055

[3] a.afanasyev@avgust.com

[4] odoevskayaim@rambler.ru, https://orcid.org/0000-0002-3644-5592

Аннотация

Цель исследования – провести мониторинг фермерских хозяйств, расположенных на территории Европейской части РФ, на предмет выявления резистентности к воздействию антигельминтных препаратов из группы бензимидазолов в популяциях нематод *Haemonchus contortus*, паразитирующих в желудочно-кишечном тракте у мелкого рогатого скота.

Материалы и методы. Исследования проводили в 2023–2024 гг. на убойных пунктах, расположенных в Московской области. На первом этапе была проведена таксономическая идентификация паразитических нематод и личинок (L3), определена видовая принадлежность стронгилят от овец. Материалом для исследования служили сычуги с фрагментами 12-перстной кишки и дистальный фрагмент прямой кишки с содержащимися в ней фекалиями. Для молекулярных исследований были использованы половозрелые нематоды и личинки L3 *H. contortus*, выделенные из сычугов и фекалий мелкого рогатого скота, привезённого на убойные пункты в Московской области из 8 регионов Европейской части РФ – Московской, Астраханской, Орловской, Липецкой, Тульской, Брянской областей, Ставрополья и Дагестана. Исследования проводили на базе лаборатории молекулярной биологии Всероссийского НИИ фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – фил. ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. Проведена статистическая обработка полученных данных, определены средние показатели заражённости паразитическими нематодами (ИИ и ЭИ). Было исследовано 56 проб ДНК нематод *H. contortus* методом гнездовой изотермической амплификации (ПЦР) на предмет выявления наличия аллелей генов, определяющих наличие резистентности к препаратам из группы бензимидазолов.

Результаты и обсуждение. При проведении молекулярно-генетических исследований ДНК *H. contortus*, отобранных от овец, прибывших из разных регионов, гомозиготные особи (100%), резистентные к бензимидазолу, были обнаружены только в популяции паразитических нематод из Орловской области. В остальных областях были выявлены только гомозиготные и гетерозиготные особи, восприимчивые к бензимидазолу.

Ключевые слова: нематоды, *Haemonchus contortus*, антигельминтные препараты, бензимидазолы, гнездовая ПЦР, резистентность

Благодарность. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 23-26-00220.

Прозрачность финансовой деятельности: никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов отсутствует.

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License.
The content is available under Creative Commons Attribution 4.0 License.

Для цитирования: *Пименов И. А., Варламова А. И., Афанасьев А. Д., Одоевская И. М.* Анализ наличия резистентности у паразитических нематод *Haemonchus contortus* к антигельминтным препаратам бензимидазольного ряда методом гнездовой изотермической амплификации (ПЦР) // Российский паразитологический журнал. 2024. Т. 18. № 2. С. 170–178.

https://doi.org/10.31016/1998-8435-2024-18-2-170-178

© Пименов И. А., Варламова А. И., Афанасьев А. Д., Одоевская И. М., 2024

Original article

Analysis of benzimidazole anthelmintic resistance in parasitic nematodes *Haemonchus contortus* using nested isothermal amplification (PCR)

Ilya A. Pimenov [1], Anastasiya I. Varlamova [2], Alexey D. Afanasyev [3], Irina M. Odoevskaya [4]

[1–4] All-Russian Scientific Research Institute for Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plant – a branch of the Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV" (VNIIP – FSC VIEV), Moscow, Russia

[1] mr.pimenov123@yandex.ru

[2] arsphoeb@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-8364-5055

[3] a.afanasyev@avgust.com

[4] odoevskayaim@rambler.ru, https://orcid.org/0000-0002-3644-5592

Abstract

The purpose of the research is to monitor farms located in the European part of the Russian Federation to identify resistance to effects of benzimidazole anthelmintics in populations of nematodes *Haemonchus contortus* dwelling in the gastrointestinal tract of small cattle.

Materials and methods. The studies were conducted in slaughterhouses located in the Moscow Region in 2023–2024. At the first stage, taxonomic identification of parasitic nematodes and larvae (L3) was made, and Strongylata species was determined from sheep. The study material was the abomasum with duodenum fragments and a distal rectum fragment with feces. For molecular studies, we used mature nematodes and *H. contortus* L3 larvae isolated from the abomasum and feces of small cattle brought to slaughterhouses in the Moscow Region from 8 regions of the European part of the Russian Federation: Moscow, Astrakhan, Oryol, Lipetsk, Tula, Bryansk regions, Stavropol and Dagestan. The studies were conducted at the premises of the Laboratory of Molecular Biology, the VNIIP – FSC VIEV. Statistical processing of the obtained data was made, and mean infection rates of parasitic nematodes (infection intensity and prevalence) were determined. Fifty-six DNA samples of nematodes *H. contortus* were examined using nested isothermal amplification (PCR) to identify gene alleles that determine resistance to benzimidazole drugs.

Results and discussion. Molecular genetic studies of *H. contortus* DNA sampled from sheep brought from different Regions only detected homozygous individuals (100%) resistant to benzimidazole in the parasitic nematode population from the Oryol Region. Other regions identified only homozygous and heterozygous individuals susceptible to benzimidazole.

Keywords: nematodes, *Haemonchus contortus*, anthelmintics, benzimidazoles, nested PCR, resistance

Acknowledgments. The study was conducted with financial support from the Russian Science Foundation Grant 23-26-00220.

Financial Disclosure: none of the authors has financial interest in the submitted materials or methods.

There is no conflict of interests.

For citation: Pimenov I. A., Varlamova A. I., Afanasyev A. D., Odoevskaya I. M. Analysis of benzimidazole anthelmintic resistance in parasitic nematodes *Haemonchus contortus* using nested isothermal amplification (PCR). *Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2024; 18(2):170–178. (In Russ.).

https://doi.org/10.31016/1998-8435-2024-18-2-170-178

© Pimenov I. A., Varlamova A. I., Afanasyev A. D., Odoevskaya I. M., 2024

Введение

Паразитарные инвазии пищеварительного тракта мелкого рогатого скота наносят непоправимый ущерб сельскохозяйственной отрасли экономики многих стран. Распространение лекарственной устойчивости к препаратам группы бензимидазолов (БЗ) в популяциях нематод семейства Trichostrongylidae, паразитирующих в желудочно-кишечном тракте овец и коз, является серьёзной проблемой для животноводческой отрасли экономики многих стран мира и требует внедрения в ветеринарную практику чувствительных, практичных и стандартизированных тестов для раннего выявления антигельминтной резистентности [5, 16].

В настоящее время полевые популяции трихостронгилид проявляют устойчивость ко всем основным классам антигельминтных препаратов, включая БЗ [3, 4, 9, 16]. Общепринятым определением устойчивости (резистентности) у паразитических нематод является способность особи выдерживать дозу антигельминтного препарата, которая обычно приводит к гибели гельминта того же вида и стадии развития. Наиболее простыми, доступными и широко используемыми в полевых условиях исследованиями, широко применяемыми ветеринарными врачами во всём мире для выявления резистентности к антигельминтным препаратам, являются тесты *in vivo* FECRT [13].

Первый препарат из БЗ был разработан и внедрен в ветеринарную практику в 1962 г. под названием тиабендазол [20, 21]. Повсеместное использование этого препарата оказало сильное селективное давление на трихостронгилид, обитающих в желудочно-кишечном тракте сельскохозяйственных животных, и привело к появлению резистентных популяций по всему миру [16, 20].

Сегодня резистентность к двум наиболее широко используемым БЗ, альбендазолу и фенбендазолу, широко распространена и встречается во всем мире [11, 12, 18]. В последнее время появляется всё больше сообщений о перспективности применения сочетания молекулярных, *in vitro* и *in vivo*, методов анализа для изучения фенотипических и генотипических изменений в полевой популяции нематод, что позволяет лучше понять эпидемиологию развития устойчивости к антигельминтным препаратам [11].

Для оценки распространения фенотипов лекарственной устойчивости у паразитических нематод домашнего скота был разработан ряд лабораторных методов *in vitro* и *in vivo*, которые включают тесты: на вылупление яиц (EHT), на снижение числа яиц в фекалиях (FECRT), подвижности личинок и анализа развития личинок (FECPAK) [7, 8, 13]. Однако, эти анализы требуют свежих проб фекалий, трудоемки и недостаточно эффективны, поскольку могут выявить резистентных к воздействию антигельминтика стронгилят только тогда, когда в популяциях паразитических нематод присутствует более 25% устойчивых к действию препарата особей [2, 7, 8, 17]. Использование только тестов *in vitro* и *in vivo*, без генотипирования аллелей кодонов β-тубулина, может привести к потенциальной недооценке начальной стадии развития антигельминтной резистентности у трихостронгилид желудочно-кишечного тракта жвачных животных при проведении молекулярных исследований на популяционном уровне [14, 19]. Но, поскольку в данных исследованиях использовали исключительно биоматериал от овец, полученный на убойных пунктах, проведение корреляции результатов тестов на наличие резистентности (FECRT и аллель-специфической изотермической ПЦР) не предусматривалось.

Целью исследований было провести мониторинг фермерских хозяйств, расположенных на территории Европейской части РФ, на предмет выявления резистентности к воздействию антигельминтных препаратов из группы бензимидазолов в популяциях нематод *Haemonchus contortus*, паразитирующих в желудочно-кишечном тракте у мелкого рогатого скота.

Материалы и методы

Исследования проводили в 2023–2024 гг. на убойных пунктах, расположенных в Московской области. На первом этапе была проведена таксономическая идентификация паразитических нематод и личинок (L3), определена видовая принадлежность стронгилят от овец в возрасте от 8 месяцев до 2-3 лет, поступивших из разных фермерских хозяйств – Московской, Астраханской, Орловской, Липецкой, Тульской, Брянской областей, Ставрополья и Дагестана. Методом свободной выборки из каждой партии отбирали по 10 животных,

при убое из туш которых для исследований были взяты сычуги с фрагментами 12-перстной кишки и дистальный фрагмент прямой кишки с содержащимися в ней фекалиями. Для сохранности пат. материала при транспортировке в лабораторию были наложены лигатуры на краниальные и пилорические области сычугов, а также на фрагменты тонкого кишечника и прямой кишки. Проведена статистическая обработка полученных данных, определены средние показатели заражённости паразитическими нематодами (ИИ и ЭИ) для каждого хозяйства [1].

Морфологическую идентификацию самцов и инвазионных личинок (L3) паразитических нематод проводили классическими методами с использованием световой микроскопии. Из всех самок нематод от одного животного была выделена геномная ДНК. У самцов, перед выделением ДНК, фотографировали головной конец для дальнейшей таксономической идентификации каждой отдельной особи генетическими и морфологическими методами.

Для молекулярных исследований были использованы наборы для выделения ДНК из микроколичеств тканей (фирмы: «Синтол», «Qiagen», «diaGene»). Извлечённую ДНК определяли количественно с помощью прибора Fluorometer Qubit 3,0, Invitrogen. Аликвоты геномной ДНК сохраняли вплоть до использования при -20 °С. Мультиплексную ПЦР проводили в соответствии с рекомендациями Zarlenga et al, 2001, используя праймеры к внутренним (ITS) и внешним (ETS) транскрибируемым спейсерам и последовательностям, выбранным из малых и больших субъединиц генов рибосомальной ДНК. Последовательности прямых и обратных праймеров были гомологичны нуклеотидным последовательностям, депонированным в ГенБанке под номерами: AF 343971 (для *Haemonchus contortus*), AF343972 (для *Trichostrongylus colubriformis*) и AF044933 (для *Teladorsagia circumcincta*). Для амплификации ДНК использовали термоциклер T-100 Bio-Rad и коммерческий набор реактивов Master Mix, Евроген. Режим проведения ПЦР: 96 °С – 2 мин; 95 °С – 45 с; отжиг при 57 °С – 55 с, 72 °С – 65 с; элонгация цепи 72 °С – 35 циклов; последний раунд 72 °С – 5 мин; сохранение продукта – при 8 °С. Анализ продуктов амплификации проводили в 3%-ном агарозном геле в ТВЕ буфере, окрашенном бромистым этидием при УФ-излучении в гель-документирующей системе GelDoc, Bio-Rad. Полученные размеры амплификонов (176, 243 и 257 н.п.) соотносили с ранее проведённой по морфологическим критериям таксономической идентификацией единичных личиночных и половозрелых стадий *H. contortus, T. colubriformis, T. circumcincta*. Все дальнейшие исследования проводили, используя в качестве матрицы геномную ДНК *H. contortus*, ранее выделенную из личинок L3 и половозрелых особей.

Результаты и обсуждение

Было установлено, что доминирующим видом фауны паразитических нематод овец является *H. contortus*. Именно с этим видом были проведены дальнейшие молекулярно-генетические исследования.

По результатам морфологической идентификации методом свободной выборки было отобрано для выделения геномной ДНК и последующих молекулярно-генетических исследований по 7 взрослых нематод *H. contortus* и личинок L3 от овец из восьми регионов Европейской части РФ – всего 56 экз.

Современные методы молекулярной биологии, основанные на множестве разновидностей полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяют не только подтверждать или корректировать результаты ранее проведённой морфологической идентификации всех стадий развития *H. contortus*, но и успешно выявлять наличие мутаций в генах, приводящих к появлению резистентных к воздействию БЗ особей в популяции паразитических нематод у жвачных животных.

Генетической детерминированностью появления устойчивости к препаратам БЗ являются точечные мутации в кодоне TAC в положении 200 гена β-тубулина, изотипа1, которые приводят к замене аминокислоты фенилаланина (Phe) на тирозин (Tyr). На первом этапе исследований, для выявления наличия нуклеотидных замен в кодоне TAC, отвечающих за устойчивость нематод к БЗ, была проведена подготовка продуктов амплификации для секвенирования в ЗАО «Генотех» (Москва). Однако, при получении результатов секвенирования, было обнаружено значительное число ошибок в прочтении у большей части проб. В некоторых случаях, сравнивая небольшие «прочитанные» участки из амплифицирован-

ного фрагмента гена, удалось провести биоинформационный поиск аналогов в базе данных (GenBank) и подтвердить таксономическую принадлежность некоторых из исследуемых изолятов стронгилят. Однако, получить достоверные данные наличия или отсутствия генетических изменений в кодоне гена β-тубулина с использованием секвенирования продуктов амплификации нам не удалось. Поэтому, для выявления наличия однонуклеотидных замен в гене β-тубулина у *H. contortus*, приводящих к появлению резистентности к препаратам бензимидазольного ряда, были проведены серии гнездовых (вложенных) ПЦР, обеспечивающих повышение чувствительности и специфичности изотермических реакций. Для этого были использованы праймеры (F: 5’ GGC AAA TAT GTC CCA CGT GC 3’; R: 5’ GAA GCG CGA TAC GCT TGA GC 3’). Затем, полученный продукт использовали в качестве матрицы для другой пары праймеров (F: 5’ GTG CTG TTC TTG TTG ATC TC 3’; R: 5’ GAT CAG CAT TCA GCT GTC CA 3’) в ПЦР. В результате был амплифицирован фрагмент гена размером 840 н.п. Полученный амплификон подвергали расщеплению эндонуклеазой Rsa I в сайте узнавания GT↓AC и CA↑TG. Электрофорез в 2,5%-ном геле позволил визуализировать наличие трех нуклеотидных фрагментов размером 440, 190 и 150 н.п., что согласуется с ранее проведенной морфологической идентификацией личинок (L3) и взрослых особей *H. contortus*.

Для выявления гомо- и гетерозиготных аллелей у *H. contortus*, отвечающих за наличие восприимчивости или резистентности к препаратам бензимидазольного ряда была проведена двойная мультиплексная ПЦР с использованием праймеров (F: 5’ GGA ACG ATG GAC TCC TTT CG 3’; R: 5’ GGG AAT CGA AGG CAG GTC GT 3’ и F: 5’ CTG GTA GAG AAC ACC GAT GAA ACA TA 3’) и (F: 5’ GGA ACG ATG GAC TCC TTT CG 3’; R: 5’ GGG AAT CGA AGG CAG GTC GT 3’ и R: 5’ ATA CAG AGC TTC GTT GTC AAT ACA GA 3’). Электрофорез в 2,5%-ном геле результатов аллель-специфической ПЦР продемонстрировал наличие у исследованных изолятов *H. contortus* как гомозиготных, так и гетерозиготных аллелей гена β-тубулина. Резистентные по отношению к БЗ гомозиготные особи характеризовались наличием полос в геле размером 750 и 223 н.п., а восприимчивые – 750 и 603 н.п. (рис.).

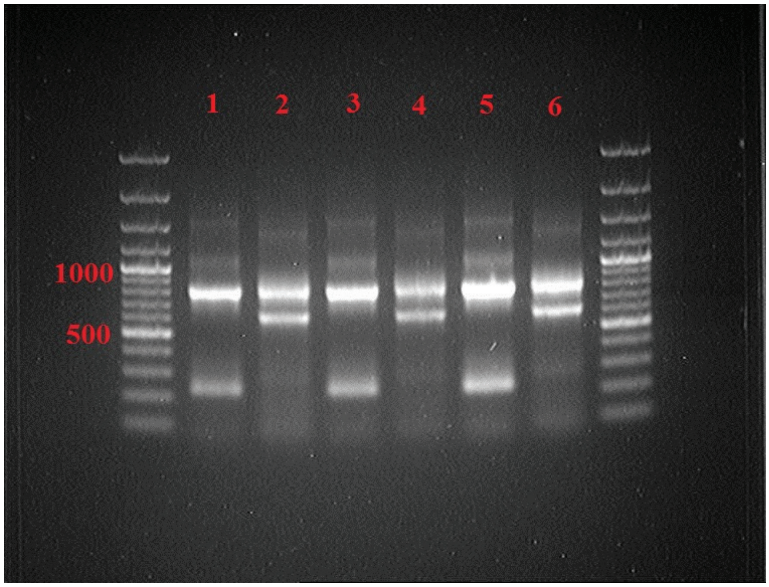

Рис. Результаты аллель-специфической ПЦР для выявления резистентности к бензимидазолу (электрофорез в 2,5%-ном геле):
треки 1, 8 – маркеры молекулярной массы (100 н.п.); треки 2, 4, 6 – амплифицированные фрагменты ДНК восприимчивых к бензимидазолам *H. contortus* (750 и 603 н.п.); треки 3, 5, 7 – амплифицированные фрагменты ДНК резистентных к бензимидазолу *H. contortus* (750 и 223 н.п.)

[**Fig.** Results of allele-specific PCR to detect benzimidazole resistance (2.5% gel electrophoresis):
tracks 1, 8 – molecular mass markers (100 bp); tracks 2, 4, 6 – amplified DNA fragments of *H. contortus* susceptible to benzimidazoles (750 and 603 bp); tracks 3, 5, 7 – amplified DNA fragments of benzimidazole-resistant *H. contortus* (750 and 223 bp)]

Гомозиготные особи (100%), резистентные к БЗ, были обнаружены только в популяции *H. contortus* из Орловской области. В остальных областях, согласно полученным данным, были выявлены только восприимчивые к БЗ особи, причем процент гетерозиготных аллелей среди исследованных нами популяций паразитических нематод был незначителен.

В 2021 г. были опубликованы результаты проведённых исследований по сравнению эффективности выявления резистентности к БЗ у *H. contortus* посредством проведения таких тестов, как: тест на вылупление яиц (EHT) *in vitro*, тест на развитие личинок в микроагаре (MALDT) и тест на снижение числа яиц в фекалиях (FECRT) *in vivo* [14, 15, 19]. В опытах участвовали козы и овцы, зараженные *H. contortus*. Результаты тестов *in vivo* и *in vitro* сравнивали с детектируемыми частотами аллелей гена β-тубулина, обусловливающими формирование резистентности у *H. contortus* к БЗ. Генотипирование проводили с использованием цифровой dPCR, методом Pyrosequencing™. В результате экспериментов было показано, что тесты FECRT, MALDT и EHT не обладают достаточной эффективностью для раннего обнаружения формирования резистентности к БЗ в популяциях паразитических нематод. Наряду с этим, генотипирование подтвердило присутствие у 10% тестируемых особей *H. contortus* наличие аллелей кодона 200 β-тубулина, обеспечивающих устойчивость к БЗ [14].

Исходя из имеющихся литературных данных, можно заключить, что эффективное выявление формирования резистентности к БЗ на ранней стадии при популяционном уровне исследований предпочтительно проводить молекулярными методами, а регулярный ветеринарный мониторинг эффективности проводимых дегельминтизаций жвачных животных – с применением методов *in vivo* [3, 6, 9].

Заключение

Молекулярно-генетические методы позволяют проводить эпизоотические исследования нематод желудочно-кишечного тракта мелкого рогатого скота на предмет выявления числа резистентных особей в популяциях трихостронгилид даже на ранней стадии формирования резистентности к антигельминтным препаратам в конкретном стаде. Некоторые ограничения существующих классических тестов на резистентность к антигельминтным препаратам *in vivo* и *in vitro* потенциально можно преодолеть за счет параллельного использования молекулярных тестов, выявляющих специфические генетические мутации, связанные с возникновением резистентности к антигельминтным препаратам. В настоящее время продолжаются молекулярно-генетические исследования резистентности паразитических нематод семейства Trichostrongylidae Европейской части РФ к препаратам группы БЗ.

Список источников

1. *Пименов И. А., Кузнецов Д. Н., Одоевская И. М., Афанасьев А. Д., Варламова А. И., Архипов И. А.* К фауне нематод пищеварительного тракта овец в Европейской части России // Российский паразитологический журнал. 2023. Т. 17. № 2. С. 206–213. https://doi.org/10.31016/1998-8435-2023-17-2-206-213
2. *Avramenko R. W., Redman E. M., Windeyer C., Gilleard J. S.* Assessing anthelmintic resistance risk in the post-genomic era: a proof-of-concept study assessing the potential for widespread benzimidazole-resistant gastrointestinal nematodes in North American cattle and bison. Parasitology. 2020; 147 (8): 897–906. https://doi.org/10.1017/S0031182020000426
3. *Baltrušis A., Claude L., Halvarsson P., Mikko S., Höglund J.* Using droplet digital PCR for the detection of hco-acr-8b levamisole resistance marker in *H. contortus*. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. 2021; 15. 168-176. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.03.002
4. *Baltrušis A., Halvarsson P., Höglund J.* Exploring benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* by next generation sequencing and droplet digital PCR. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. 2018; 8 (3): 411-419. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.09.003
5. *Charlier J., Rinaldi L., Musella V., Ploeger H. W., Chartier C., Vineer H. R., Hinney B., Samson-Himmelstjerna G., Ba čescu B., Mickiewicz M.* Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. Prev. Vet. Med. 2020; 182. 105103. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105103
6. *Dilks C. M., Hahnel S. R., Sheng Q., Long L., McGrath P. T., Andersen E. C.* Quantitative benzimidazole resistance and fitness effects of parasitic nematode beta- tubulin alleles. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. 2020; 14. 28–36. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.08.003
7. *Dobson R. J., Hosking B. C., Jacobson C. L., Cotter J. L., Besier R. B., Stein P. A., Reid S. A.* Preserving new anthelmintics: a simple method for estimating

faecal egg count reduction test (FECRT) confidence limits when efficacy and/or nematode aggregation is high. Vet. Parasitol. 2012; 186. 79–92. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.049

8. *Hinney B., Wiedermann S., Bosco A., Rinaldi L., Hofer M., Joachim A., Krücken J., Steinborn R.* Development of a three-colour digital PCR for early and quantitative detection of benzimidazole resistance-associated single nucleotide polymorphisms in *Haemonchus contortus*. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. 2023; 22. 88-95. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2023.06.001
9. *Höglund J., Gustafsson K., Ljungström B. L., Engström A., Donnan A., Skuce P.* Anthelmintic resistance in Swedish sheep flocks based on a comparison of the results from the faecal egg count reduction test and resistant allele frequencies of the β-tubulin gene. Veterinary Parasitology. 2009; 161 (1–2): 60-68. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.12.001
10. K*aplan R. M*. Biology, epidemiology, diagnosis, and management of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of livestock. Veterinary Clinics: Food Animal Practice. 2020; 36 (1): 17–30. https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.12.001
11. *Kaplan R. M., Vidyashankar A. N.* An inconvenient truth: global warming and anthelmintic resistance. Veterinary Parasitology. 2012; 186. 70–78. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.048
12. *Kaplan R. M., Denwood M. J., Nielsen M. K., Thamsborg S. M., Torgerson P. R., Gilleard J. S., Dobson R. J., Vercruysse J., Levecke B.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guideline for diagnosing anthelmintic resistance using the faecal egg count reduction test in ruminants, horses and swine. Veterinary Parasitology. 2023; 318. 109936. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.109936
13. *Königová A., Urda Dolinská M., Babják M.* et al. Experimental evidence for the lack of sensitivity of in vivo faecal egg count reduction testing for the detection of early development of benzimidazole resistance. Parasitol. Res. 2021; 120. 153–159. https://doi.org/10.1007/s00436-020-06965-0
14. *Kotze A. C., Gilleard J. S., Doyle S. R., Prichard R. K.* Challenges and opportunities for the adoption of molecular diagnostics for anthelmintic resistance. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. 2020; 14. 264–273. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.11.005
15. *Kotze A. C., Prichard R.* Anthelmintic resistance in Haemonchus contortus: history, mechanisms and diagnosis. Adv. Parasitol. 2016; 93. 397–428. https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.012
16. *Levecke B., Kaplan R. M., Thamsborg S. M., Torgerson P. R., Vercruysse J., Dobson R. J.* How to improve the standardization and the diagnostic performance of the fecal egg count reduction test? Veterinary Parasitology. 2018; 253. 71–78. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.004
17. *Melville L. A., Redman E., Morrison A. A., Chen P. C. R., Avramenko R., Mitchell S., Van Dijk J., Innocent G., Sargison F., Aitken C.* Large scale screening for benzimidazole resistance mutations in Nematodirus battus, using both pyrosequence genotyping and deep amplicon sequencing, indicates the early emergence of resistance on UK sheep farms. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. 2020; 12. 68–76. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.03.001
18. *Morgan E. R., Lanusse C., Rinaldi L., Charlier J., Vercruysse J.* Confounding factors affecting faecal egg count reduction as a measure of anthelmintic efficacy. Parasite. 2022; 29. 20. https://doi.org/10.1051/parasite/2022017
19. *Umer C., Redman E. M., Kaplan R., Yazwinski T., Sargison N., Gilleard J. S.* Contrasting patterns of isotype-1 β-tubulin allelic diversity in *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* in the southern USA are consistent with a model of localized emergence of benzimidazole resistance. Veterinary Parasitology. 2020; 286. 109240. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109240
20. *Vineer H. R., Morgan E. R., Hertzberg H., Bartley D. J., Bosco A., Charlier J., Chartier C., Claerebout E., De Waal T., Hendrickx G.* Increasing importance of anthelmintic resistance in European livestock: creation and meta-analysis of an open database. Parasite. 2020; 27. 69. https://doi.org/10.1051/parasite/2020062
21. *Wolstenholme A. J., Fairweather I., Prichard R., Samson-Himmelstjerna G. von, Sangster N. C.* Drug resistance in veterinary helminths. Trends in Parasitology. 2004; 20 (10): 469–476. https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.07.010

Статья поступила в редакцию 14.03.2024; принята к публикации 15.05.2024

Об авторах:

Пименов Илья Александрович, ВНИИП – фил. ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (117218 Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28), Москва, Россия, аспирант, mr.pimenov123@yandex.ru

Варламова Анастасия Ивановна, ВНИИП – фил. ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (117218 Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28), Москва, Россия, доктор биологических наук, ORCID ID: 0000-0001-8364-5055, arsphoeb@mail.ru

Афанасьев Алексей Дмитриевич, ВНИИП – фил. ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (117218 Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28), Москва, Россия, аспирант, a.afanasyev@avgust.com

Одоевская Ирина Михайловна, ВНИИП – фил. ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (117218 Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28), Москва, Россия, кандидат биологических наук, ORCID ID: 0000-0002-3644-5592, odoevskayaim@rambler.ru

Вклад соавторов:

Пименов Илья Александрович – гельминтологическое вскрытие, сбор гельминтов, выделение ДНК, постановка гнездовой ПЦР, электрофоретическое разделение продуктов амплификации, подготовка статьи.

Варламова Анастасия Ивановна – сбор гельминтов, таксономическая идентификация паразитических нематод, критический анализ и интерпретация полученных данных, обзор литературы, оформление рукописи.

Афанасьев Алексей Дмитриевич – выделение ДНК, определение концентрации геномной ДНК, постановка гнездовой ПЦР, электрофоретическое разделение продуктов амплификации, критический анализ полученных результатов.

Одоевская Ирина Михайловна – научное руководство, подбор праймеров, разработка дизайна исследований, ресурсное обеспечение НИР, анализ и интерпретация полученных результатов, подготовка рукописи.

Авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

References

1. Pimenov I. A., Kuznetsov D. N., Odoevskaya I. M., Afanasyev A. D., Varlamova A. I., Arkhipov I. A. Fauna of gastrointestinal nematodes in sheep in the European part of Russia. *Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Parasitology.* 2023; 17 (2): 206–213. (In Russ.) https://doi.org/10.31016/1998-8435-2023-17-2-206-213
2. Avramenko R. W., Redman E. M., Windeyer C., Gilleard J. S. Assessing anthelmintic resistance risk in the post-genomic era: a proof-of-concept study assessing the potential for widespread benzimidazole-resistant gastrointestinal nematodes in North American cattle and bison. *Parasitology.* 2020; 147 (8): 897–906. https://doi.org/10.1017/S0031182020000426
3. Baltrušis A., Claude L., Halvarsson P., Mikko S., Höglund J. Using droplet digital PCR for the detection of hco-acr-8b levamisole resistance marker in *H. contortus*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance.* 2021; 15. 168-176. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.03.002
4. Baltrušis A., Halvarsson P., Höglund J. Exploring benzimidazole resistance in Haemonchus contortus by next generation sequencing and droplet digital PCR. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2018; 8 (3): 411-419. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.09.003
5. Charlier J., Rinaldi L., Musella V., Ploeger H. W., Chartier C., Vineer H. R., Hinney B., Samson-Himmelstjerna G., Ba˘cescu B., Mickiewicz M. Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. *Prev. Vet. Med.* 2020; 182. 105103. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105103
6. Dilks C. M., Hahnel S. R., Sheng Q., Long L., McGrath P. T., Andersen E. C. Quantitative benzimidazole resistance and fitness effects of parasitic nematode beta- tubulin alleles. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2020; 14. 28–36. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.08.003
7. Dobson R. J., Hosking B. C., Jacobson C. L., Cotter J. L., Besier R. B., Stein P. A., Reid S. A. Preserving new anthelmintics: a simple method for estimating faecal egg count reduction test (FECRT) confidence limits when efficacy and/or nematode aggregation is high. *Vet. Parasitol.* 2012; 186. 79–92. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.049
8. Hinney B., Wiedermann S., Bosco A., Rinaldi L., Hofer M., Joachim A., Krücken J., Steinborn R. Development of a three-colour digital PCR for early and quantitative detection of benzimidazole resistance-associated single nucleotide polymorphisms in *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2023; 22. 88-95. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2023.06.001
9. Höglund J., Gustafsson K., Ljungström B. L., Engström A., Donnan A., Skuce P. Anthelmintic resistance in Swedish sheep flocks based on a comparison of the results from the faecal egg count reduction test and resistant allele frequencies of the β-tubulin gene. *Veterinary Parasitology.* 2009; 161 (1–2): 60-68. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.12.001
10. Kaplan R. M. Biology, epidemiology, diagnosis, and management of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of livestock. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice.* 2020; 36 (1): 17–30. https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.12.001
11. Kaplan R. M., Vidyashankar A. N. An inconvenient truth: global warming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology.* 2012; 186. 70–78. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.048
12. Kaplan R. M., Denwood M. J., Nielsen M. K., Thamsborg S. M., Torgerson P. R., Gilleard J. S., Dobson R. J., Vercruysse J., Levecke B. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guideline for diagnosing anthelmintic resistance using the faecal egg count

reduction test in ruminants, horses and swine. *Veterinary Parasitology*. 2023; 318. 109936. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.109936

13. Königová A., Urda Dolinská M., Babják M. et al. Experimental evidence for the lack of sensitivity of in vivo faecal egg count reduction testing for the detection of early development of benzimidazole resistance. *Parasitol. Res.* 2021; 120. 153–159. https://doi.org/10.1007/s00436-020-06965-0

14. Kotze A. C., Gilleard J. S., Doyle S. R., Prichard R. K. Challenges and opportunities for the adoption of molecular diagnostics for anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2020; 14. 264–273. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.11.005

15. Kotze A. C., Prichard R. Anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*: history, mechanisms and diagnosis. *Adv. Parasitol.* 2016; 93. 397–428. https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.012

16. Levecke B., Kaplan R. M., Thamsborg S. M., Torgerson P. R., Vercruysse J., Dobson R. J. How to improve the standardization and the diagnostic performance of the fecal egg count reduction test? *Veterinary Parasitology.* 2018; 253. 71–78. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.004

17. Melville L. A., Redman E., Morrison A. A., Chen P. C. R., Avramenko R., Mitchell S., Van Dijk J., Innocent G., Sargison F., Aitken C. Large scale screening for benzimidazole resistance mutations in Nematodirus battus, using both pyrosequence genotyping and deep amplicon sequencing, indicates the early emergence of resistance on UK sheep farms. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance.* 2020; 12. 68–76. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.03.001

18. Morgan E. R., Lanusse C., Rinaldi L., Charlier J., Vercruysse J. Confounding factors affecting faecal egg count reduction as a measure of anthelmintic efficacy. *Parasite*. 2022; 29. 20. https://doi.org/10.1051/parasite/2022017

19. Umer C., Redman E. M., Kaplan R., Yazwinski T., Sargison N., Gilleard J. S. Contrasting patterns of isotype-1 β-tubulin allelic diversity in Haemonchus contortus and Haemonchus placei in the southern USA are consistent with a model of localized emergence of benzimidazole resistance. *Veterinary Parasitology*. 2020; 286. 109240. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109240

20. Vineer H. R., Morgan E. R., Hertzberg H., Bartley D. J., Bosco A., Charlier J., Chartier C., Claerebout E., De Waal T., Hendrickx G. Increasing importance of anthelmintic resistance in European livestock: creation and meta-analysis of an open database. *Parasite.* 2020; 27. 69. https://doi.org/10.1051/parasite/2020062

21. Wolstenholme A. J., Fairweather I., Prichard R., Samson-Himmelstjerna G. von, Sangster N. C. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology.* 2004; 20 (10): 469–476. https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.07.010

The article was submitted 14.03.2024; accepted for publication 15.05.2024

About the authors:

Pimenov Ilya A., VNIIP – FSC VIEV (28, Bolshaya Cheremushkinskaya st., Moscow, 117218, Russia), Moscow, Russia, Postgraduate Student, mr.pimenov123@yandex.ru

Varlamova Anastasia I., VNIIP – FSC VIEV (28, Bolshaya Cheremushkinskaya st., Moscow, 117218, Russia), Moscow, Russia, Doctor of Biological Sciences, ORCID ID: 0000-0001-8364-5055, arsphoeb@mail.ru

Afanasyev Alexey D., VNIIP – FSC VIEV (28, Bolshaya Cheremushkinskaya st., Moscow, 117218, Russia), Moscow, Russia, Postgraduate Student, a.afanasyev@avgust.com

Odoevskaya Irina M., VNIIP – FSC VIEV (28, Bolshaya Cheremushkinskaya st., Moscow, 117218, Russia), Moscow, Russia, Candidate of Biological Sciences, ORCID ID: 0000-0002-3644-5592, odoevskayaim@rambler.ru

Contribution of co-authors:

Pimenov Ilya A. – helminthological dissection, collection of helminths, DNA isolation, nested PCR, electrophoretic separation of amplification products, article preparation.

Varlamova Anastasia I. – collection of helminths, taxonomic identification of parasitic nematodes, obtained data critical analysis and interpretation, literature review, manuscript drafting.

Afanasyev Alexey D. – DNA isolation, gDNA concentration determination, nested PCR, electrophoretic separation of amplification products, critical analysis of results.

Odoevskaya Irina M. – academic supervision, selection of primers, study design development, resource support for research work, analysis and interpretation of obtained results, manuscript preparation.

All authors have read and approved the final manuscript.