

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL**

**ESTUDO DO IMPACTO DA INFECÇÃO POR NEMATÓDEOS
GASTRINTESTINAIS NO DESEMPENHO DE CORDEIROS
MORADA NOVA PARA DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO
SELETIVO DE CONTROLE PARASITÁRIO**

**Isabella Barbosa dos Santos
Médica Veterinária**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL**

**ESTUDO DO IMPACTO DA INFECÇÃO POR NEMATÓDEOS
GASTRINTESTINAIS NO DESEMPENHO DE CORDEIROS
MORADA NOVA PARA DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO
SELETIVO DE CONTROLE PARASITÁRIO**

Isabella Barbosa dos Santos

Orientadora: Dra. Ana Carolina de Souza Chagas

Tese de doutorado apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Patologia Animal.

FICHA CATALOGRÁFICA

S237e

Santos, Isabella Barbosa dos

Estudo do impacto da infecção por nematódeos gastrintestinais no desempenho de cordeiros Morada Nova para desenvolvimento de método seletivo de controle parasitário / Isabella Barbosa dos Santos.

-- Jaboticabal, 2022

94 p. : tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Ana Carolina de Souza Chagas

1. Parasitologia Veterinária. 2. Helmintologia Veterinária. 3.
Anti-helmíntico. 4. NIRS. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESTUDO DO IMPACTO DA INFECÇÃO POR NEMATÓDEOS GASTRINTestinaIS NO DESEMPENHO DE CORDEIROS MORADA NOVA PARA DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO SELETIVO DE CONTROLE PARASITÁRIO

AUTORA: ISABELLA BARBOSA DOS SANTOS

ORIENTADORA: ANA CAROLINA DE SOUZA CHAGAS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:

Ana Carolina Chagas

Pesquisadora Dra. ANA CAROLINA DE SOUZA CHAGAS (Participação Virtual)
EMBRAPA / São Carlos/SP

Ana Carolina Chagas

Prof. Titular ALESSANDRO FRANCISCO TALAMINI DO AMARANTE (Participação Virtual)
Depto. de Parasitologia / IBB - UNESP

Ana Carolina Chagas

Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ (Participação Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Ana Carolina Chagas

Profa. Dra. ADRIANA MELLO GARCIA (Participação Virtual)
Universidade Federal de Lavras-UFLA / Lavras/MG

Ana Carolina Chagas

Pesquisador Dr. ALESSANDRO PELEGRINE MINHO (Participação Virtual)
Departamento Sanidade Animal/Embrapa Pecuária Sudeste-CPPSE / São Carlos/SP

Jaboticabal, 02 de dezembro de 2021

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Isabella Barbosa dos Santos - nasceu em 23 de julho de 1989, na cidade de Cajuru, estado de São Paulo. Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Lavras (UFLA) em março de 2008, graduando-se em junho de 2013. Em março de 2016 iniciou o curso de mestrado em Medicina Veterinária Preventiva pelo programa de pós-graduação da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV), Campus de Jaboticabal, São Paulo. Foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Na mesma instituição, ingressou no curso de doutorado em Medicina Veterinária (Área de Patologia Animal) em março de 2018, em parceria com a Embrapa Pecuária Sudeste e foi bolsista pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Dedico aos meus pais Cássio e Adriana e aos meus avós Marcos e Hélia por todo amor, compreensão e dedicação que tiveram comigo. Ao meu noivo Anderson por toda a paciência e carinho principalmente nos momentos difíceis. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processo número 2018 16070-1 e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 1795465.

Agradeço essa conquista primeiramente a Deus que sempre iluminou o caminho que eu trilho, colocando excelentes pessoas e oportunidades nele.

Agradeço ao meu pai Cássio por sempre sonhar todos os meus sonhos comigo. À minha mãe Adriana, à minha Hélia, meu Vô Marcos, minha afilhada Mariana e meus tios Mércia, Fernanda, Marcos e Cleniro por formarem essa família.

Agradeço ao meu noivo Anderson pelo amor e companheirismo em mais essa jornada, me apoiando sempre.

Agradeço à minha irmã, amiga e sócia Carine por principalmente nos momentos de desespero ser sempre o meu ombro amigo e me dar forças.

Agradeço à minha orientadora Dra. Ana Carolina de Souza Chagas, por todo ensinamento, orientação e principalmente pela paciência enorme que teve comigo, me ajudando e apoiando muito ao longo do doutorado. Ao Dr. Sérgio Novita Esteves por ter se tornando um pai para mim durante o meu doutorado.

Agradeço à Embrapa Pecuária Sudeste pela oportunidade e todos os funcionários que contribuíram com o meu trabalho, em especial do setor de ovinos, Rafael, Tadeu, Dona Rosa, José Pereira, Didoné, Verônica, Raul e Eduardo. Aos meus amigos e parceiros de pós-graduação e aos estagiários do laboratório de Parasitologia Veterinária.

Agradeço a todos os professores que tanto em aulas quanto em bancas contribuíram muito no meu aprendizado.

Agradeço ao programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, na área de Patologia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Jaboticabal, pela oportunidade.

Agradeço aos membros da banca por compartilharem um pouco do seu vasto conhecimento comigo.

Agradeço meu amigo e Sócio Willian por essa amizade e esse foco profissional desde o mestrado.

Agradeço a todos os envolvidos no sonho “Haras Cadrisa” e no sonho “Instituto Laboratorial Elementary”.

Agradeço a todos os meus professores da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial à Profa. Adriana Mello Garcia, por ter sido o ponto inicial da minha caminhada e a pessoa que me fez pensar que um dia poderia concluir um doutorado como agora.

Agradeço aos meus companheiros animais: meus cães Lucy e Josefa (que partiram durante esta jornada), Ba, Joana, Jurema e Toddy; aos gatos Jujuba, Mister e Jubileu (também partiu); e aos meus cavalos Bailarina (que descansou), Leque, Luna, Bella, Guarany, Teodoro, Lenda e BigMac, por que eles tornam meus dias mais leves e felizes.

E finalmente agradeço aos principais responsáveis por essa conquista, os ovinos Morada Nova da Embrapa Pecuária Sudeste.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço a todos de coração.

SUMÁRIO

Certificado do Comitê de Ética	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE FIGURAS	16
Capítulo 1 – Considerações gerais	18
1. Introdução.....	18
2. Revisão bibliográfica.....	19
2.1. As raças ovinas, o mercado e o potencial da raça Morada Nova	20
2.2. Nematódeos gastrintestinais e a resistência parasitária	21
2.3. Tratamento seletivo direcionado no controle parasitário.....	22
2.4. Ferramentas para detecção da anemia em ovinos	24
2.4.1 Avaliação do percentual de hematócrito ou volume globular (VG)	24
2.4.2 Método FAMACHA	24
CAPÍTULO 2 – Investigating the benefits of target selective treatment by average daily weight gain against gastrointestinal nematodes in Morada Nova lambs	33
1. Introduction	34
2. Material and methods	35
2.1. <i>Experimental animals and management</i>	35
2.2 <i>Experimental design</i>	36
2.3 <i>Assessment of dry matter in forage and climatic factors</i>	36
2.4 <i>Anthelmintic resistance analyses performed after 210 days of age</i>	37
2.4.1 <i>Parasitological necropsy</i>	37
2.4.2 <i>Diagnosis of levamisole resistance by the Fecal Egg Count Reduction Test (FECRT)</i>	37
2.4.3 <i>Diagnosis of levamisole resistance by the Larval Development Test (LDT) - RESISTA-Test®</i>	37
2.4.4 <i>Diagnosis of levamisole resistance by molecular testing</i>	37

2.5	<i>Statistical analyses</i>	38
3.	Results.....	39
3.1	<i>Infection analyses</i>	39
3.2	<i>Hematological analyses</i>	39
3.3.	<i>Weight measurement and DWG</i>	39
3.4.	<i>Forage and meteorological analyses</i>	40
4.	Discussion.....	41
5.	Conclusion.....	44
	References.....	45
CÁPITULO 3 - Avaliação da anemia por espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) em ovinos Morada Nova.....		
	Resumo.....	54
1.	Introdução.....	55
2.	Material e métodos	57
2.1	Animais experimentais e coleta das amostras	57
2.2	Exames parasitológicos	Erro! Indicador não definido.
2.3	Determinação de volume globular compactado (VG).....	Erro! Indicador não definido.
2.4	Método FAMACHA.....	Erro! Indicador não definido.
2.5	Coleta dos espectros NIRS e análises das amostras de sangue dos ovinos	58
2.5.1	Análise Multivariada e classificação dos dados	58
2.6.	Análise estatística dos modelos de diagnóstico	62
3.2	Espectros NIR e pré-tratamentos	63
3.3	Análises dos Componentes Principais (PCA).....	64
3.4	Método de regressão Linear dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS).....	66
4.	Discussão	71
5.	Conclusão.....	73
6.	Referências Bibliográficas	74
CÁPITULO 4 - Impacto econômico da infecção por nematódeos gastrointestinais em ovinos Morada Nova no Brasil: extrapolação da escala local para a nacional .78		
1.	Introdução.....	79
2.	Material e Métodos	80

2.1. Grupos experimentais	81
2.2. Análise econômica	82
3. Resultados.....	82
4. Discussão	85
CAPITULO 5 – Considerações finais	94

Certificado do Comitê de Ética



CERTIFICADO CEUA PRT N° 01/2020

Certificamos que a proposta de pesquisa intitulada "Estratégia de tratamento anti-helmíntico seletivo em cordeiros Morada Nova", registrado com o número 20.20.00.025.00.00, sob responsabilidade da pesquisadora Dra. Ana Carolina de Souza Chagas, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Pecuária Sudeste.

We certify that the research proposal "Target selective treatment as nematode control strategy in Morada Nova lamb" has been registered under the responsibility of Dr. Ana Carolina de Souza Chagas (number 20.20.00.025.00.00) which involves production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), is in accordance with the Brazilian Federal Law on Animal Experimentation (Law 11.794, enacted on 8th October 2008), Decree 6.899 (enacted on 15th July 2009) as well as with the corresponding rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Committee of Animal Use on Experimentation of Embrapa Southeast Livestock.

São Carlos, 15 de Setembro de 2020.

Dr Alexandre Rossetto Garcia
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Embrapa Pecuária Sudeste

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/05/2020 a 30/04/2022
Espécie / Linhagem / Raça	Ovis aries (ovino de corte, carneiro)
Número de Animais	480
Peso / Idade	1-12 meses
Sexo	Macho+Fêmea
Origem	Embrapa Pecuária Sudeste

**ESTUDO DO IMPACTO DA INFECÇÃO POR NEMATÓDEOS
GASTRINTESTINAIS NO DESEMPENHO DE CORDEIROS MORADA NOVA
PARA DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO SELETIVO DE CONTROLE
PARASITÁRIO**

RESUMO

Os nematódeos gastrintestinais (NGI) são um grande entrave para a ovinocultura. Cordeiros da raça Morada Nova são resilientes aos NGI, podendo apresentar elevadas infecções sem manifestação de sinais clínicos, tais como a anemia, afetando o uso do método FAMACHA. Diante desses fatores, o objetivo deste trabalho foi adequar um método para realizar o controle de NGI dos animais da raça Morada Nova por meio de tratamento seletivo (TST), utilizando a média de ganho de peso diário (GMD) dos cordeiros como parâmetro. Além disso, verificou-se a aplicabilidade da espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) no diagnóstico da infecção por NGI. A partir dos dados obtidos, realizou-se estimativa das perdas econômicas advindas da infecção por NGI nos diferentes grupos experimentais. Para tanto, 114 cordeiros na estação chuvosa e 102 na estação seca foram randomizados em três tratamentos: Controle (TC – sem tratamento), Rotineiro (TR - tratados a cada 42 dias) e Seletivo (TST - tratados de acordo com o GMD). Do 63º dia de vida (D63) até o D210, a cada 21 dias, os animais foram pesados e foram coletadas amostras de sangue (mensuração do volume globular (VG) e avaliação de espectros NIRS), de fezes (contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) e coproculturas) e leitura do grau FAMACHA. Para averiguar a resistência dos parasitos ao anti-helmíntico utilizado nos grupos experimentais (levamisol 9,4 mg/kg), realizou-se o teste de redução da contagem de OPG (TRCOF), o RESISTA-Test[®] para o cálculo das concentrações letais (CLs) e o teste molecular (detecção de indel de 63 bp no gene *acr-8* em *H. contortus*). No estudo econômico foram analisados e comparados os parâmetros de custo operacional dos tratamentos anti-helmínticos e o resultado econômico advindo destes. Nos grupos TC, TR e TST, respectivamente, as médias de OPG ($p \leq 0,05$) foram 4665,1, 3063,5 e 3462,1 na estação chuvosa e de 4475,1, 1341,7 e 2863,4 na estação seca. As médias do VG foram 32,1%, 33,4% e 32,3% na estação chuvosa e 33,9%, 36,0% e 35,1% na estação seca. Os GMD médios foram 0,087 Kg, 0,101 Kg e 0,094 Kg na estação chuvosa e 0,102 Kg, 0,113 Kg e 0,112 Kg na estação seca. A

eficácia do levamisol no TRCOF foi de 66,4%, 24,1% e 76,4% nas chuvas e de 90,7%, 12,4% e 64,8% na seca, respectivamente. No RESISTA-Test® as CL₅₀ foram 0,482, 1,926 e 0,117 µg/mL na estação chuvosa e 0,437, 0,851 e 0,045 µg/mL na estação seca, respectivamente. No teste molecular, a frequência do genótipo homozigoto de resistência foi de 57,1%, 71,4% e 40,0% na estação chuvosa e de 47,8%, 55,9% e 41,9% na seca. Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos TST e TR em relação à média de ganho de peso, peso final e GMD, especialmente na estação seca, na qual a carga parasitária foi menor. A eficácia do tratamento anti-helmíntico reduziu de forma mais drástica no TR. Especificidades das raças ovinas e das condições ambientais precisam ser avaliadas antes da aplicação do TST por GMD no controle de NGI. O estudo dos espectros NIRS foi realizado a partir da classificação dos cordeiros Morada Nova entre doentes e saudáveis para a infecção parasitária e apresentou uma sensibilidade de 93,33% e especificidade de 73,21%. A técnica foi capaz de interagir os componentes do sangue e fazer classificações, demonstrando ser uma técnica mais sensível que o FAMACHA, bem como rápida e versátil para aplicação a campo. Em relação ao levantamento econômico, os animais do TR chegaram no D210 mais pesados em relação ao TC, gerando maior faturamento bruto em ambas as estações. Em relação ao TC, pode-se verificar um resultado econômico expressivo a favor do TR de R\$ 33,00 por cabeça na estação chuvosa e de R\$ 28,45 na estação seca. O TR apresentou resultado econômico 14,4% e 10,9% superior ao TC e 7,2% e 1,9% superior ao TST, no período das águas e da seca, respectivamente, mas o rápido desenvolvimento da resistência inviabilizou seu uso. Os gastos com o uso de anti-helmínticos são estimados em torno de 1,3% no resultado econômico total do sistema de produção. Considerando-se a redução no ganho de peso desencadeada pelos NGI nos rebanhos nacionais, estima-se um potencial impacto econômico R\$ 472,6 milhões/ano e que as perdas por mortes na ovinocultura Brasileira sejam de R\$ 65 milhões/ano.

Palavras-chave: *Haemonchus contortus*, TST, Happy Factor™, RESISTA-Test, gene *acr8*, NIRS, impacto econômico.

STUDY OF THE IMPACT OF GASTROINTESTINAL NEMATODES INFECTION ON THE PERFORMANCE OF MORADA NOVA LAMBS FOR DEVELOPMENT OF A TARGETED SELECTIVE TREATMENT

ABSTRACT

Gastrointestinal nematodes (GIN) are a major obstacle to sheep farming. Morada Nova lambs are resilient to GIN, and may present high infections without clinical signs, such as anemia, affecting the use of the FAMACHA method. In view of these factors, the objective of this study was to adapt a method to GIN control in Morada Nova animals through selective treatment (TST), using the average daily weight gain (DWG) of the lambs as a parameter. In addition, the applicability of near-infrared spectroscopy (NIRS) in the diagnosis of *Haemonchus contortus* infection was verified. Based on the data obtained, estimates of economic losses resulting from GIN infection were made in the different experimental groups. For this, 114 lambs in the rainy season and 102 in the dry season were randomized into three treatments: Control (CT – without treatment), Routine (RT - treated every 42 days), and Selective (TST - treated according to DWG). From the 63rd day of life (D63) to the D210, each 21 days, the animals were weighed and blood samples (packed cell volume (PCV) measurement and NIRS spectra evaluation), feces (egg count per gram of feces (EPG) and coprocultures) and FAMACHA grade reading were collected. To investigate the resistance of parasites to anthelmintic used in the experimental groups (levamisol 9.4 mg/kg), the EPG count reduction test (FECRT), the RESISTA-Test[®] for lethal concentration (LC) calculation and the molecular test (detection of indel 63 bp in the gene *acr-8* in *H. contortus*) were performed. In the economic study, the parameters of operational cost of anthelmintic treatments and the economic result from them were analyzed and compared. In the CT, RT and TST groups, respectively, the mean EPG ($p \leq 0.05$) were 4665.1, 3063.5 and 3462.1 in the rainy season and 4475.1, 1341.7 and 2863.4 in the dry season. The averages of the PCV were 32.1%, 33.4% and 32.3% in the rainy season and 33.9%, 36.0% and 35.1% in the dry season. Mean DWG was 0.087 Kg, 0.101 Kg and 0.094 Kg in the rainy season and 0.102 Kg, 0.113 Kg and 0.112 Kg in the dry season. The efficacy of levamisole in the FECRT was 66.4%, 24.1% and 76.4% in rainy and 90.7%, 12.4% and 64.8% in dry, respectively. In the RESISTA-Test[®] the LC₅₀ were 0.482, 1.926 and 0.117 $\mu\text{g/mL}$ in the rainy season and

0.437, 0.851 and 0.045 µg/mL in the dry season, respectively. In the molecular test, the frequency of homozygous resistance genotype was 57.1%, 71.4% and 40.0% in the rainy season and 47.8%, 55.9% and 41.9% in the dry season. No significant difference was observed between the TST and RT treatments in relation to the mean weight gain, final weight and DWG, especially in the dry season, in which the parasite load was lower. The efficacy of the anthelmintic treatments was more drastically reduced in the RT. Specificities of sheep breeds and environmental conditions need to be assessed prior to the application of TST by DWG for GIN control. The study of the NIRS spectra was performed based on the classification of Morada Nova lambs among sick and healthy for parasitic infection and presented a sensitivity of 93.33% and specificity of 73.21%. The technique was able to interact with blood components and make classifications, demonstrating that it can be more sensitive than FAMACHA, as well as a quick and versatile technique for field application. In relation to the economic survey, the animals of the RT arrived in the D210 heavier in relation to the CT, generating higher gross sales in both seasons. In relation to CT, one can verify an expressive economic result in favor of RT of R\$ 33.00 per head in the rainy season and R\$ 28.45 in the dry season. The RT presented economic results 14.4% and 10.9% higher than the CT and 7.2% and 1.9% higher than the TST, in the rainy and dry periods, respectively, but the fast development of resistance made its use unfeasible. Expenses with the use of anthelmintics are estimated at around 1.3% in the total economic result of the production system. Considering the reduction in weight gain triggered by GIN in national flocks, it is estimated a potential economic impact of R\$ 472.6 million/year and that losses from deaths in the Brazilian sheep production are of R\$ 65 million/year.

Keywords: *Haemonchus contortus*, TST, Happy Factor™, RESISTA-Test, gene *acr8*, NIRS, economic impact.

LISTA DE ABREVIATURAS

Cad = custo dos animais à desmama

CLs = concentrações letais

Cmo = custo da mão de obra utilizada

Cmp = custo de manutenção da pastagem (terminação no período das águas/animais desmamados na época das águas)

COPT = custo operacional por tratamento

Csm = custo do suplemento mineral

Csupv = custo dos suplementos (volumosos e concentrados) empregados na alimentação dos animais no período seco do ano (terminação no período seco do ano/animais desmamados na época seca)

Cver = custo da desverminação

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

FBV = Faturamento bruto com a venda de animais

GMD = ganho de peso diário

LBT= lucro bruto por tratamento

MAPA = Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MS = matéria seca

NGI = nematódeos gastrintestinais

NIRS = técnica de espectroscopia na região do infravermelho próximo

OPG = exame de contagem de ovos de nematódeos por gramas de fezes

P = quilogramas de peso vivo pelo preço

PABL = peso total dos animais ao abate

PV = peso vivo

TC = Tratamento Controle

TDL = Teste de Desenvolvimento Larvar

TRCOF = teste de redução da contagem de OPG

TR = Tratamento Rotineiro

TST = Targeted Selective Treatment

VG: volume globular

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Table 1: Means and standard error (SE) of eggs per gram of feces (EPG) counts in control (CT), routine (RT) and targeted selective (TST) treatments, in the different experimental days, in Morada Nova lambs, during the rainy (R) and dry (D) seasons (S).	51
Table 2: Means and standard error (SE) of packed cell volume (PCV) in the control (CT), routine (RT) and targeted selective (TST) treatments, in different experimental days, in Morada Nova lambs, during the rainy (R) and dry (D) seasons (S).	51
Table 3: Means and standard error (SE) of average live weight in control (CT), routine (RT) and targeted selective (TST) treatments, in different experimental days, in Morada Nova lambs, during the rainy (R) and dry (D) seasons (S).	51
Table 4: Means and standard error (SE) of average daily weight gain (DWG) in control (CT), routine (RT) and targeted selective (TST) treatments, in different experimental days, in Morada Nova lambs, during the rainy (R) and dry (D) seasons (S).	52
Table 5: Number (percentage) of anthelmintic treatments used in control (CT), routine (RT) and targeted selective (TST) treatments, in different experimental days, in Morada Nova lambs, during the rainy (R) and dry (D) season (S).	52
Table 6: Lethal concentrations (LC, µg/mL) obtained in RESISTA-Test [®] , percentages of anthelmintic efficacy in FECRT and percentages of <i>Haemonchus contortus</i> with resistant genotypes by PCR (D63 and D210) in control (CT), routine (RT) and targeted selective (TST) treatments in the rainy (R) and dry (D) seasons (S).	52
Table 7: Nematode classification, sex and mean after necropsy of the lambs in control (CT), routine (RT) and targeted selective (TST) treatments in the rainy (R) and dry (D) seasons (S).	53

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Critérios adotados para o diagnóstico dos cordeiros Morada Nova em doentes e saudáveis a partir dos valores de VG, OPG e GMD.	60
---	----

Tabela 2. Ocorrência dos parâmetros de classificação em amostras de cordeiros Morada Nova infectados por NGI, diagnosticados como doentes (combinação de pelo menos dois dos três critérios: $VG \leq 26\%$, $OPG \geq 4000$, $GMD \leq 0,049$ kg) e saudáveis (combinação de pelo menos dois dos três critérios: $VG \geq 26\%$, $OPG \leq 3999$, $GMD \geq 0,050$ kg).	63
Tabela 3. Comparativo entre o volume globular (VG) obtido pelo hematócrito e os valores preditos para VG pela análise de PLS.	69
Tabela 4. Matriz de confusão obtida pelos métodos de referência (VG, OPG, GMD e FAMACHA) e pelo modelo PCA-LDA construídos à partir dos espectros NIR coletados em amostras de sangue de ovinos classificados como doentes ou saudáveis em relação à infecção por NGI.	70

CAPÍTULO 4

Tabela 1: Resultado econômico dos tratamentos empregados na desverminação de ovinos Morada Nova nas estações chuvosa e seca.	84
Tabela 2: Diferença entre os tratamentos no resultado econômico (R\$) por cabeça na estação chuvosa (C) e na estação seca (S) para cordeiros Morada Nova em crescimento.	85
Tabela 3: Número estimado de ovinos do Brasil em 2019 (IBGE, 2019) e estimativa das perdas por redução de peso e por morte causadas pelos nematódeos gastrintestinais por ano e por região.	87

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figure 1: Means of eggs per gram of feces (EPG), packed cell volume (%PCV), live weight (LW/kg), daily weight gain (DWG/kg), dry matter of the forage in pasture (DM/kg) and climatic conditions (air relative humidity (%), rainfall (mm) and temperature (°C) for Morada Nova lambs in control (CT), suppressive (ST) and targeted selective treatments (TST), in the rainy and dry seasons at Embrapa Pecuária Sudeste in São Carlos, SP, Brazil.....50

CAPÍTULO 3

Figura 1: A) Espectros NIR originais: amostra de sangue de ovinos classificados como doentes (---) ou saudáveis (—) quanto à infecção por NGI, de acordo com todos os métodos de referência (VG, OPG e GMD). B) Espectros NIR pré- tratados (média móvel, SNV e 1ª derivada): para as mesmas amostras, classificadas como doentes (---) ou saudáveis (—).64

Figura 2: Análise de Componentes Principais dos espectros NIR (900 – 1700 nm) provenientes de amostras de sangue de ovinos classificados como doentes ou saudáveis em relação à infecção por NGI. A) Gráfico de escores entre as componentes principais PC2 e PC4 indicando a separação entre os espectros de animais doentes (vermelho) e saudáveis (azul). B) Análise de Loadings com as variáveis com a contribuição majoritária dos comprimentos de onda para as componentes principais (PC1 até a PC4).65

Figura 3: Método de regressão PLS dos espectros NIR (900 – 1700 nm) provenientes de amostras de sangue de ovinos classificados como doentes ou saudáveis em relação à infecção por NGI. A) Gráfico da variação da raiz quadrada do erro médio da calibração e raiz quadrada do erro médio da validação cruzada em função de diferentes números de fatores latentes. B) Gráfico de escores entre os fatores latentes FL1 e FL2, indicando uma separação entre os espectros de animais doentes (vermelho) e saudáveis (azul).67

Figura 4: Espectros NIR (900 – 1700 nm) pré-tratados provenientes de amostras de sangue de ovinos classificados como doentes (---) ou saudáveis (—) quanto à infecção por NGI, em todos os métodos de referência (VG, OPG e GMD).68

Figura 5: Modelo de regressão PLS: Valores obtidos pelo hematócrito versus valores preditos pelo modelo NIRS para o volume globular (VG). A) Modelo obtido pelo conjunto de calibração e validação cruzada. B) Avaliação do modelo a partir da validação externa.68

Figura 6: Gráfico do modelo de calibração para a análise discriminante linear (PCA-LDA) obtido dos espectros NIR (900 – 1700 nm) provenientes de amostras de sangue de ovinos classificados como doentes e saudáveis quanto à infecção por NGL.....70

Capítulo 1 – Considerações gerais

1. Introdução

O Brasil atualmente possui um rebanho ovino em torno de 19,7 milhões de cabeças, um aumento de 4,18% de 2018 para 2019, estando 71,05% do rebanho concentrado na região Nordeste (IBGE, 2020). Entretanto, por uma questão organizacional da cadeia produtiva, a produção brasileira de ovinos ainda não abastece o mercado interno com eficiência e qualidade. Um dos maiores problemas está relacionado à falta de oferta constante de ovinos, o que dificulta a estruturação do setor, incluindo a formação de escalas de abate, levando à importação de carne ovina (Zen et al., 2014).

As doenças parasitárias por nematódeos gastrintestinais (NGI) estão entre os fatores que limitam a produção de pequenos ruminantes no mundo inteiro, sendo responsabilizadas por elevadas perdas econômicas, em decorrência de crescimento retardado, inapetência, redução no ganho de peso, queda na produção de leite, baixa fertilidade e, nos casos de infecções maciças, altas taxas de mortalidade. Esses sinais clínicos devem-se a lesões na mucosa gastrintestinal, que provocam distúrbios na digestão e absorção dos nutrientes, e à espoliação hematófaga, que leva a infecções sub-clínicas, em alguns casos associada à diarreia sanguinolenta e anemia e, conseqüentemente, à baixa condição corporal e rendimento de carcaça (Amarante et al., 2004; Cavalcante et al., 2009; Chagas et al., 2013).

No Brasil, *Haemonchus contortus* é o nematódeo de maior importância clínica e econômica nas criações de pequenos ruminantes (Amarante et al., 2004; Cavalcante et al., 2009; Chagas et al., 2013). Estima-se que por ano são perdidos dezenas de milhões de dólares apenas com medicamentos anti-helmínticos e, desta forma, o aprimoramento de um tratamento seletivo geraria um menor impacto nos gastos da ovinocultura (Roeber et al., 2013). Nos países desenvolvidos as perdas anuais para o controle de nematódeos em pequenos ruminantes superam todos os outros custos para o controle de doenças endêmicas. Nos três países de maior produção em ovinos, Austrália, África do Sul e Uruguai, as perdas devido à resistência parasitária são de cerca de US\$ 222 milhões, US\$ 45 milhões e US\$ 42 milhões,

respectivamente (Waller, 2006). Em um levantamento das doenças parasitárias diagnosticadas em ovinos de diferentes raças da região Sul do Rio Grande do Sul, 42,7% dos casos diagnosticados foram de infecção por NGI, que geraram mortalidade de aproximadamente 16.800 animais ao ano, acarretando em impacto econômico estimado em R\$ 2 milhões/ano (Oliveira et al., 2017).

Morada Nova é uma raça nativa de ovinos deslanados do Nordeste do Brasil (Lobo et al., 2011). Os animais adultos são resistentes aos NGI e possuem ótimas características para produção (Facó et al., 2008; Gomes et al., 2013). Entretanto, os cordeiros são resilientes, sofrendo os impactos da infecção (Toscano et al., 2019a, 2019b) e das complicações advindas da resistência parasitária, altamente disseminada no estado de São Paulo (Veríssimo et al., 2012). Assim, existem estudos abordando estratégias de controle de NGI, que podem ser mais eficientes e que reduzem perdas na produção. Deve-se priorizar o controle das doenças parasitárias por meio de estratégias de administração de anti-helmínticos que permitam a redução de seu uso e a manutenção do desempenho animal, preservando a eficácia dos medicamentos existentes. Também se deve utilizar o conceito *in refugia*, em que parte da população parasitária não é exposta ao tratamento antiparasitário e, portanto, alelos susceptíveis são mantidos dentro da população, retardando o surgimento da resistência. Dessa forma, o tratamento seletivo dos animais pode ser feito, por exemplo, por meio do ganho de peso, do grau FAMACHA, do valor de Volume Globular (VG), dentre outros valores zootécnicos (Van Wyk, 2001; Edith et al., 2018).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo adequar um método para realizar o controle de NGI dos animais da raça Morada Nova por meio de tratamento seletivo (TST), utilizando a média de ganho de peso diário (GMD) dos cordeiros como parâmetro. Além disso, verificou-se a aplicabilidade da espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) no diagnóstico da infecção por NGI. A partir dos dados obtidos, realizou-se estimativa das perdas econômicas advindas da infecção por NGI nos diferentes grupos experimentais.

2. Revisão bibliográfica

2.1. As raças ovinas, o mercado e o potencial da raça Morada Nova

No Brasil existe uma diversidade de raças exóticas, tais como Texel, Ile de France, Suffolk e Dorper, e seus cruzamentos, bem como raças deslanadas adaptadas aos trópicos, como Santa Inês e Morada Nova. As deslanadas são consideradas resistentes à verminose, característica extremamente importante diante do impacto dessa doença na ovinocultura (Amarante et al., 2004; Rocha et al., 2005; Veloso et al., 2004). A raça Morada Nova foi composta de raças de ovinos africanos trazidos ao Brasil, apresentando quase nenhuma descendência das raças lanadas europeias. Devido a esta descendência, são animais de porte menor, que se adaptaram ao clima tropical e assim tornaram-se mais resistentes aos parasitos e outras enfermidades tropicais. As ovelhas não apresentam ciclo estral estacional, sendo férteis durante todo o ano em clima tropical, e também apresentam excelente habilidade materna. Estudos ressaltaram o potencial do uso da Morada Nova para a produção de carne, levando em consideração sua resistência aos parasitos gastrintestinais (McManus et al., 2013). Outro ponto favorável é que possuem menor tamanho que os Santa Inês e, portanto, possibilitam maior lotação/área e, além disso, como o peso do animal está fortemente associado à quantidade de alimento ingerida (Lobo et al., 2011), os custos de manutenção desses animais dentro do sistema de produção são menores. Em estudo comparando as duas raças supracitadas, com taxa de 350 kg de PV animal/ha, para as matrizes Santa Inês obteve-se lotação de 6,8 UA/ha, enquanto para Morada Nova foi de 10,3 UA/ha. Isso significa aumento próximo a 50% em número de animais/ha, resultando também em maior número de cordeiros produzidos por hectare (Issakowicz et al., 2016).

Os NGI são um entrave na produção de pequenos ruminantes. Estudo realizado no estado de São Paulo demonstrou que a infecção gastrintestinal em ovinos deslanados ocorreu principalmente por *H. contortus*, com aumento no período de pré e pós-parto. Entretanto, esse aumento, que normalmente causa bastante impacto nos sistemas de produção de países tropicais, não chegou a afetar a saúde de ovinos das raças Santa Inês e Morada Nova, com destaque para a última, cujas matrizes tiveram menor infecção no período de 30 dias pós-parto (Issakowicz et al.,

2016). Isso demonstra a necessidade permanente de estudos direcionados para hospedeiros resistentes à verminose, com o intuito de disponibilização futura de animais com características desejáveis, uma vez que, de acordo com Zen et al. (2014), a atividade ainda é pouco explorada, havendo, assim, potencial expressivo para se desenvolver.

Ao longo dos anos, as matrizes Morada Nova da Embrapa Pecuária Sudeste têm demonstrado ser mais resistente à verminose, evidenciado pelo baixo índice de vermifugações. Pode-se dizer que muitas vezes o rebanho deixa de ser monitorado devido à baixa necessidade de tratamento, embora existam indivíduos que naturalmente sejam mais susceptíveis à infecção. Além disso, em alguns estudos observou-se que os parâmetros sanguíneos desses animais estão sempre mais elevados que os das outras raças, nas mesmas condições de manejo (Ex: VG = 36,3% Morada Nova, 29,5% Santa Inês, 25,9% Dorper, 26,9% Texel - Chagas et al., 2015). Isso chamou a atenção para a possibilidade de melhor exploração desse recurso tão valioso: a resiliência do hospedeiro aos NGIs.

2.2. Nematódeos gastrintestinais e a resistência parasitária

A resistência parasitária aos fármacos anti-helmínticos é um grande obstáculo ao crescimento da ovinocultura e tem feito com que alguns criadores abandonem a atividade em São Paulo (Amarante et al., 2004). As principais causas do surgimento de resistência estão relacionadas ao uso intensivo e inadequado de medicamentos antiparasitários, como o curto intervalo entre tratamentos, a utilização de uma mesma classe de anti-helmíntico por longos períodos, a sub-dosagem, a rápida alternância de diferentes grupos de vermífugos, o uso de tratamentos não-seletivos, a movimentação frequente do rebanho para pastos limpos combinado com desverminação, o uso de medicamentos de longa persistência e a aquisição de animais contaminados com cepas resistentes, que sejam introduzidos no rebanho sem quarentena e tratamento antiparasitário prévio (Köhler, 2001; Silvestre et al., 2002; Besier, 2006).

A resistência aos anti-helmínticos em regiões de clima temperado também vem se tornando fator determinante na criação de ovinos. Em levantamento recente em rebanhos ovinos na Bélgica foi possível constatar ineficácia de todos os fármacos

utilizados (Claerebout et al., 2020). A multirresistência, que é uma realidade mundial, também tem sido observada em rebanhos do estado de São Paulo, para todos os grupos químicos disponíveis (Nagata et al., 2019; Veríssimo et al., 2012). O monepantel, anti-helmíntico de disponibilidade mais recente no mercado e de alto custo (R\$1000,00/L ou cerca de US\$200,00/L), constituía a única alternativa de controle de helmintos em muitos rebanhos, entretanto, vários relatos de ineficácia já foram publicados (Cintra et al., 2016; Albuquerque et al., 2017; Ciufila et al., 2017; Martins et al., 2017). Associado à resistência anti-helmíntica múltipla e às perdas econômicas, os riscos advindos da presença de resíduos de anti-helmínticos no ambiente e em produtos de origem animal também constituem uma das maiores preocupações da sociedade e de entidades relacionadas à saúde pública e preservação ambiental (Mota et al., 2003).

2.3. Tratamento seletivo direcionado no controle parasitário

O uso de anti-helmínticos sem critérios é um dos fatores que vem ampliando a resistência e tornando estes fármacos um recurso cada vez mais escasso (Calvete et al., 2020). Entretanto, ferramentas práticas para o uso racional e seletivo de antiparasitários ainda necessitam ser validadas e disponibilizadas para a ovinocultura nas diferentes regiões do Brasil. Conforme discutido por McBean et al. (2016), pesquisas têm se concentrado na manutenção de parasitos *in refugia* através de estratégias de tratamento seletivo direcionado (Targeted Selective Treatment - TST), usando indicadores de doenças como anemia - FAMACHA (Van Wyk e Bath, 2002), contagem de ovos por grama de fezes - OPG (Leathwick et al., 2006; Gallidis et al., 2009), parâmetros de produção como peso vivo – Happy Factor™ (Greer et al., 2009; Kenyon et al., 2013) e escore de condição corporal (Gallidis et al., 2009), a fim de identificar e tratar somente os indivíduos em risco de doença parasitária, deixando parasitos *in refugia* em hospedeiros não tratados. Entretanto, tais modelos precisam ser bem investigados, pois quando a população *in refugia* é pequena, os hospedeiros são reinfetados com a progênie de parasitos que sobreviveram ao tratamento anti-helmíntico, que, mesmo com menos sobreviventes, produzem descendentes resistentes, que serão responsáveis pela reinfecção (Bartley et al., 2015).

A escolha de uma metodologia mais adequada deve levar em consideração a um modelo simples e prático e que proporcione um ótimo custo-benefício para o

produtor (Kenyon et al., 2009). Em casos em que o FAMACHA não pode ser adotado, como em países onde *H. contortus* é menos prevalente (ou quando o VG não é um bom indicativo da carga parasitária dos animais), o acompanhamento da redução do ganho de peso (método Happy Factor™) foi considerado o mais efetivo dentre os vários indicadores de infecção avaliados (Chylinski et al., 2015). O desenvolvimento de resistência pode ser drasticamente reduzido com o uso dessa abordagem. No Reino Unido, o Happy Factor™ indicou que o peso foi um indicador eficaz, mantendo a produtividade e reduzindo o uso de anti-helmínticos (McBean et al., 2016). Apesar deste trabalho ter sido bem sucedido, foi avaliada apenas uma raça ovina em uma propriedade. Assim, este método foi revisado com o objetivo de se determinar se o limite padrão utilizado pode ser adotado com o mesmo sucesso em outras propriedades (McBean et al., 2021).

Estudos na Escócia demonstraram que cordeiros criados a pasto e tratados pelo Happy Factor™ receberam 50% menos tratamentos anti-helmínticos em relação ao controle, sem perdas significativas no ganho de peso diário ou aumento do tempo para atingir o peso de abate (Busin et al., 2014). Segundo Busin et al. (2013), a redução do ganho de peso ocorre no início da infecção, antes do aparecimento dos sinais clínicos, pois os NGI reduzem a ingestão alimentar voluntária e a eficiência da conversão do alimento. Dessa forma, o ganho de peso apresenta-se como um indicador sensível, afetando a performance animal e a rentabilidade do sistema de produção. Assim, o desenvolvimento de um parâmetro para avaliar essa técnica na estratégia do controle de nematódeos na raça Morada Nova poderá indicar uma ferramenta alternativa ao método FAMACHA. Para a maioria dos NGI, interações mais complexas, incluindo clima e manejo, tornam o uso dessas ferramentas de previsão mais desafiadoras, havendo necessidade de estudo de modelos que sustentem os TST (Charlier et al., 2014).

O Happy Factor™ consegue diferenciar animais com maiores chances de responder favoravelmente ao tratamento anti-helmíntico (que não ganham peso) e aqueles que não necessitariam ser tratados e, portanto, a metodologia tem fornecido uma estimativa quantitativa da resposta esperada. 87% dos animais que o modelo indicou como não eficientes na conversão alimentar, antes do tratamento anti-helmíntico, responderam positivamente ao tratamento (Greer et al., 2009).

Cintra et al. (2018) descreveram dificuldade em encontrar o ponto na curva de ganho de peso em que deve ser feito o tratamento, devido à falta de estudos com os dados parasitológicos dos animais. Toscano e colaboradores (2019) avaliando cordeiros da raça Morada Nova, criados a pasto do nascimento até os 9 meses de vida, observou forte correlação entre o ganho de peso e a baixa contagem de OPG. Animais considerados resistente, que não apresentaram altas contagens de OPG, obtiveram maior ganho de peso, já animais susceptíveis, com alta carga parasitária, tiveram menor ganho de peso.

2.4. Ferramentas para detecção da anemia em ovinos

2.4.1 Avaliação do percentual de hematócrito ou volume globular (VG)

A avaliação hematológica é o método mais eficaz para detectar a ocorrência de anemia. Para esta avaliação o principal componente avaliado é o VG, que consiste no percentual de componentes sólidos existentes no sangue. O sangue deve ser coletado por punção venosa em frasco contendo anticoagulante, sendo o mais utilizado o EDTA. Em seguida o sangue deve ser direcionado para um laboratório, onde é depositado em um capilar, centrifugado para a separação da parte líquida e sólida e em seguida realizada a leitura com o auxílio de um cartão específico para determinar a porcentagem. Os valores normais para o VG de ovinos são de 27% a 45% e valores inferiores representam um animal anêmico (Weiss e Wardrop, 2010).

O VG é considerado um parâmetro útil no controle dos NGI em ovinos quando as infecções são predominantemente do gênero *Haemonchus*. No entanto, estudos mais recentes com a raça Morada Nova demonstraram uma porcentagem baixa de animais com VG inferior a 24%, mesmo com OPG elevados e predominância de *Haemonchus* nas coproculturas (Toscano et al., 2019a).

2.4.2 Método FAMACHA

O método FAMACHA é um recurso importante no controle de *H. contortus*, que pode causar extrema anemia devido à hematófagia, e sua vantagem mais significativa é a redução do número de tratamentos aplicados, o que auxilia na diminuição do desenvolvimento da resistência aos anti-helmínticos. É um método de tratamento seletivo, ou seja, objetiva desverminar somente os animais do rebanho que apresentam anemia, visualizada na mucosa ocular dos ovinos. O método se baseia em informações científicas normalmente ignoradas pelo método de controle tradicional, de que somente parte do rebanho necessita realmente de tratamento anti-helmíntico, isto é, aproximadamente 17% das fêmeas secas, 29% das fêmeas gestantes e 55% das fêmeas lactantes (Malan et al., 2001).

Esse método foi criado com o intuito de facilitar a identificação de animais no rebanho que necessitam de controle dos NGI, permitindo tratamento seletivo. Trata-se de uma avaliação da mucosa da conjuntiva ocular dos pequenos ruminantes, relacionando os graus de coloração da mucosa com graus de anemia (Pereira et al., 2016). O cartão FAMACHA direciona a classificação dos animais nos graus: 1 - vermelho robusto, animal não necessita de tratamento; 2 - vermelho róseo, animal não necessita de tratamento; 3 - rosa, aconselha o tratamento, no entanto não é urgente; 4 - rosa pálido, animal deve ser tratado e 5 - branco, o animal deve ser tratado com urgência e corre sério risco de óbito (Malan et al., 2001).

Realizou-se na Embrapa Pecuária Sudeste o projeto FAPESP intitulado “Caracterização genética e de respostas imunes associadas ao fenótipo de resistência parasitária em rebanho ovino da raça Morada Nova” (processo nº 2016/25519-7). Concluiu-se que os cordeiros, mesmo com carga parasitária elevada, apresentavam média de VG dentro dos valores de referência. Tal resultado indicou fragilidade do uso do método FAMACHA na raça Morada Nova, visto que animais com OPG muito elevados não apresentaram anemia, não indicaram necessidade de desverminação e permitiram elevada contaminação da pastagem. Os cordeiros se mostraram então resilientes, necessitando de atenção quanto à infecção parasitária do nascimento ao desmame, pois a redução no ganho de peso nessa fase teve impacto direto no peso final. Esse estudo revelou que mesmo sendo considerada uma raça mais resistente, os cordeiros Morada Nova, assim como nas demais raças, se encontram mais vulneráveis devido à sua imunidade ainda estar em fase de desenvolvimento

(Toscano et al., 2019a, b). Outro estudo também concluiu que o método FAMACHA não foi eficaz para a tomada de decisão no tratamento seletivo de cordeiros da raça Ile de France no Paraná, Sul do Brasil, indicando a necessidade de mais pesquisas. Observou-se OPG muito elevados, baixos valores para VGs e queda na performance animal (Cintra et al., 2018).

2.4.3 Espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS)

O NIRS é um método de análise multicomponente, rápido, que requer o mínimo de preparo das amostras, não é destrutivo, não consome reagentes e não gera resíduos (Pasquini, 2003). A técnica NIRS tem sido amplamente utilizada para determinar os constituintes majoritários de diversas matrizes agrícolas (forrageiras, milho, trigo, soja, etc.) (Tibola et al., 2018). O NIRS foi utilizado para identificar o teor de glicose em sangue de camundongos (Jintao et al., 2017), na identificação de alterações no sangue para o diagnóstico de câncer (Raja et al., 2019) e na quantificação de VG em sangue humano, indicando seu grande potencial para determinação de anemia (Sakudo et al., 2009).

As técnicas espectroscópicas resgatam informações qualitativas e quantitativas das amostras através da interação de ressonância do campo elétrico oscilante da radiação eletromagnética incidente e o momento de dipolo elétrico permanente das moléculas da amostra. Entretanto, sua acurácia ainda depende dos métodos analíticos tradicionais, visto que é necessária a sua calibração a partir de resultados oriundos de um, ou mais, testes de referência. A energia transportada pela onda eletromagnética e absorvida pela molécula é dada pela equação: $E = h \cdot \nu$ onde h é a constante de Planck e ν é a frequência da onda eletromagnética em Hertz. Dois átomos ligados covalentemente se comportam como um oscilador anarmônico, em que os níveis excitados de energia vibracional se tornam menos espaçados nos níveis vibracionais mais elevados e a transição direta do nível fundamental para os níveis vibracionais mais elevados é possível ($0 \rightarrow 2$ primeiro sobretom, $0 \rightarrow 3$ segundo sobretom etc.)

A técnica NIRS refere-se à faixa do espectro eletromagnético com um comprimento de onda que se situa entre 750 nm e 2.500 nm (entre $4,0 \times 10^{14}$ Hz e

1,2 x 10¹⁴ Hz), onde é possível observar as transições vibracionais de sobretons das ligações: C-H, N-H, S-H e O-H, bem como as combinações entre os modos vibracionais (estiramentos, deformações angulares e torções). A técnica usa a resposta da interação da matéria irradiada (amostras) com a luz emitida pelo equipamento para gerar um conjunto de variáveis resposta (espectro) que, graças ao emprego da estatística multivariada, tem permitido acessar a informação química (Quimiometria) presente nas matrizes e associá-las a diversos parâmetros inerentes à mesma. Informações químicas como tipo e/ou teor de proteínas, teor de água e outras substâncias orgânicas, normalmente portadoras de C-H, N-H, S-H e O-H, podem responder ao estímulo da luz no infravermelho próximo e gerar variáveis fortemente correlacionadas às características da amostra analisada (neste caso o sangue) que serão associadas ao fenótipo do animal. Pretende-se desenvolver modelos multivariados e utilizar a análise de componentes principais associada à análise discriminante linear para classificar diferentes graus de anemia dos animais. A técnica poderia discriminar e agrupar indivíduos em função da composição química do sangue, correlacionando esta informação com resultados dos testes de VGs convencionais, sendo mais preciso que os métodos clássicos de diagnóstico, incluindo o método FAMACHA.

3. Referências bibliográficas

Albuquerque ACA, Bassetto CC, Almeida FA, Amarante AFT (2017) Development of *Haemonchus contortus* resistance in sheep under suppressive or target selective treatment with monepantel. **Veterinary Parasitology** 15:112-117.

Amarante AFT, Bricarello PA, Rocha RA, Genari SM (2004) Resistance of Santa Inês, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology** 120:91–106.

Bartley DJ, Devin L, Nath M, Morrison AA (2015) Selection and characterisation of monepantel resistance in *Teladorsagia circumcincta* isolates. **International Journal Parasitology Drugs and Drug Resistant** 5: 69–76.

Besier B (2006) New anthelmintics for livestock: the time is right. **Trends Parasitology** 23: 21–24.

Busin V, Kenyon F, Laing N, Denwood MJ, McBean D, Sargison ND, Ellis K (2013) Addressing sustainable sheep farming: application of a targeted selective treatment

approach for anthelmintic use on a commercial farm. **Small Ruminant Research** 110: 100–103.

Busin V, Kenyon F, Parkin T, McBean D, Laing N, Sargison N, Ellis K (2014) Production impact of a targeted selective treatment system based on live weight gain in a commercial flock. **Veterinary Journal** 200: 248–252.

Calvete C, González JM, Ferrer LM, Ramos JJ, Lacasta D, Delgado I, Uriarte J (2020) Assessment of targeted selective treatment criteria to control subclinical gastrointestinal nematode infections on sheep farms. **Veterinary Parasitology** 277: 109018.

Cavalcante ACR, Vieira LS, Chagas ACS, Molento MB (2009) Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 603p.

Chagas ACS, Katiki LM, Silva IC, Giglioti R, Esteves SN, Oliveira MCS, Barioni-Júnior W (2013) *Haemonchus contortus*: A multiple-resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. **Parasitology International** 62:1–6.

Chagas ACS, Zaia MG, Domingues LF, Rabelo MD, Politi FAZ, Aníbal FF, Chagas JR (2015). Desparasitación racional: estudio comparativo de técnicas para ladetección de la anemia causada por nemátodos gastrointestinal en pequeños rumiantes. **Anais do VII Congreso Argentino de Parasitología**.

Charlier J, Morgan ER, Rinaldi L, van Dijk J, Demeler J, Höglund J, Hertzberg H, Ranst BV, Hendrickx G, Vercruysse J, Kenyon F (2014) Practices to optimise gastrointestinal nematode control on sheep, goat and cattle farms in Europe using targeted (selective) treatments. **Veterinary Records** 175: 250-255.

Chylinski C, Cortet J, Neveu J, Cabaret J (2015) Exploring the limitations of patho physiological indicators used for targeted selective treatment in sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology** 207: 85–93.

Cintra MC, Ollhoff RD, Weber SH, Sotomaior CS (2018) Is the Famacha system Always the best criterion for targeted selective treatment for the control of haemonchosis in growing lambs? **Veterinary Parasitology** 266: 67-72.

Cintra MC, Teixeira VN, Nascimento LV, Sotomaior CS (2016) Lack of efficacy of monepantel against *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Veterinary Parasitology** 216: 4-6.

Ciuffa AZ, Urzedo MCC, Silva DM, Pires BC, Rezende LM, Brasão SC, Macedo Junior GL, Rosalinski-Moraes F (2017) Effectiveness of monepantel and levamisole to control gastrointestinal strongylid parasites of sheep. **Bioscience Journal** 33: 639-643.

Claerebout E, Wilde N, Mail E V, Casaert S, Velde FV, Roeber F, Veloz PV, Levecke B, Geldhof P (2020) Anthelmintic resistance and common worm control practices in sheep farms in Flanders, Belgium. **Veterinary Parasitology** 20.

Edith R, Hari Krishnan TJ, Balagangatharathilagar M (2018) Targeted selective treatment (TST): A promising approach to combat anthelmintic resistance in farm animals. **Journal of Entomology and Zoology Studies** 6: 844-847.

Facó O, Paiva SR, Alves LRN, Lôbo RNB, Villela LCV (2008) Raça Morada Nova: origem, características e perspectivas. Sobral: **Embrapa Caprinos**, p.43.

Gallidis E, Papadopoulos E, Ptochos S, Arsenos G (2009) The use of targeted selective treatments against gastrointestinal nematodes in milking sheep and goats in Greece based on parasitological and performance criteria. **Veterinary Parasitology** 164: 53–58.

Gomes EF, Louvandini H, Dallago BSL, Canozzi MEA, Melo CB, Bernal FEM, McManus C (2013) Productivity in ewes of different genetic groups and body sizes. **Journal of Animal Science Advance** 3: 243–255.

Greer AW, Kenyon F, Bartley DJ, Jackson EB, Gordon Y, Donnan AA, McBean DW, Jackson F (2009) Development and field evaluation of a decision support model for anthelmintic treatments as part of a targeted selective treatment (TST) regime in lambs. **Veterinary Parasitology** 164: 12–20.

IBGE, 2014. Sistema do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística de Recuperação Automática—SIDRA. IBGE, Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?z=t&o=26&i=P>>. Acesso em: 29 mar. 2020.

Issakowicz J, Issakowicz ACKS, Bueno MS, Costa RLD, Katiki LM, Geraldo AT, Abdalla AL, McManus C, Louvandini H (2016) Parasitic infection, reproductive and productive performance from Santa Inês and Morada Nova ewes. **Small Ruminant Research** 136: 96–136.

Jintao X, Liming Y, Yufei L, Chunyan L, Han C (2017) Noninvasive and fast measurement of blood glucose infrared (NIR) spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** 179: 250-254.

Kenyon F, Greer A, Coles GC, Grinoli E, Papadopoulos E, Cabaret J, Berrag M, Varady M, Van Wyk JA, Thomas E, Vercruyssen J, Jackson F (2009) The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. **Veterinary Parasitology** 164: 3–11.

Kenyon F, McBean D, Greer A, Burgess C, Morrison A, Bartley D, Bartley Y, Devin L, Nath M, Jackson F (2013) A comparative study of the effects of four treatment regimes on ivermectin efficacy: body weight and pasture contamination in lambs naturally infected with gastrointestinal nematodes in Scotland. **International Journal Parasitology: Drugs and Drug Resistant** 3: 77–84.

Köhler P (2001) The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. **International Journal Parasitology** 31: 336–345.

Leathwick DM, Waghorn TS, Miller CM, Atkinson DS, Haack NA, Oliver AM (2006) Selective and on-demand drenching of lambs: impact on parasite populations and performance of lambs. **New Zealand Veterinary Journal** 54: 305–312.

Lobo RNB, Pereira IDC, Facó O, McManus CM (2011) Economic values for production traits of Morada Nova sheep in a pasture based production system in semi-arid Brazil. **Small Ruminant Research** 96: 93–100.

Malan FS, Van Wyk JA, Wessels CD (2001) Clinical evaluation in sheep: early trials. **Onderstepoort Journal Veterinary Research** 68: 165-174.

Martins AC, Bergamasco PLF, Felippelli G, Tebaldi JH, Moraes MFD, Testi AJP, Lapera IM, Hoppe EGL (2017) *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep: fecal egg count reduction tests and randomized controlled trials. **Seminário: Ciências Agrárias** 38: 231-238.

McBean D, Nath M, Lambe N, Morgan-Davies C, Kenyon F (2016) Viability of the Happy Factor TM targeted selective treatment approach on several sheep farms in Scotland. **Veterinary Parasitology** 218: 22–30.

McBean DW, Greer AW, Kenyon F (2021) The Happy Factor treatment threshold, used to determine Targeted Selective Treatment decisions for lambs, is transferable between farms. **Animal: The international Journal of animal biosciences** 15.

McManus C, Hermuche P, Paiva SR, Moraes JCF, Melo CB, Mendes C (2013) Geographical distribution of sheep breeds in Brazil and their relationship with climatic and environmental factors as risk classification for conservation. **Brazilian Journal Science Technology** 1: 2–15.

Mota MA, Campos AK, Araújo JV (2003) Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 23.

Nagata WB, Panegossi MFC, Bresciani KDS, Gomes JF, Kaneto CN, Perri SHV (2019) Resistance of gastrointestinal nematodes to five different active principles in sheep infected naturally in São Paulo State, Brazil. **Small Ruminant Research**, 172: 48-50.

Oliveira PA, Ruas JL, Riet-Correa F, Coelho ACB, Santos BL, Marcolongo-Pereira C, Sallis ESV, Schild, AL (2017) Doenças parasitárias em bovinos e ovinos no sul do Brasil: frequência e estimativa de perdas econômicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 37: 797-801.

Pasquini C (2003) Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications **Journal Of the Brazilian Chemical Society** 14: 198-219.

Pereira JFS, Mendes JB, Jong G, Maia D, Teixeira VN, Passerino AS, Garza JJ, Sotomaior CS (2016) FAMACHA scores history of sheep characterized as resistant/resilient or susceptible to *H. contortus* in artificial infection challenge. **Veterinary Parasitology** 218: 102-105.

Raja P, Aruna P, Koteeswaran D, Ganesan S (2019) Characterization of blood plasma of normal and cervical cancer patients using NIR raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy** 102: 1-7.

Rocha RA, Amarante AFT, Bricarello PA (2005) Resistance of Santa Inês and Ile de France suckling lambs to gastrointestinal nematode infections. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária** 14: 17–20.

Roeber F, Jex AR, Gasser RB (2013) Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. **Parasitology Vectors** 6: 1-13.

Sakudo A, Kato YH, Kuratsune H, Ikuta K (2009) Non-invasive prediction of hematocrit levels by portable visible and near-infrared spectrophotometer. **Clinica Chimica Acta** 408: 123-127.

Silvestre A, Leignel V, Berrag B, Gasnier N, Humbert JF (2002) Sheep and goat nematode resistance to anthelmintics: pro and cons among breeding management factors. **Veterinary Research** 33: 465–480.

Tibola CS, Medeiros EP, Simione MLF, Oliveira MA (2018) Espectroscopia no infravermelho próximo para avaliar indicadores de qualidade tecnológica e contaminantes em grãos /editores técnicos. – Brasília, DF: **Embrapa**. 200 p.

Toscano JHB, Okino CH, Santos IB, Giraldeiro LA, von Haehling MB, Esteves SN, Chagas, ACS (2019b) Innate Immune Responses Associated with Resistance against *Haemonchus contortus* in Morada Nova Sheep. **Journal Immunology Research** 9: 1–10.

Toscano JHB, Santos IB, von Haehling MB, Giraldeiro LA, Lopes LG, Silva MH, Figueiredo A, Esteves SN, Chagas ACS (2019a) Morada Nova sheep breed: Resistant or resilient to *Haemonchus contortus* infection? **Veterinary Parasitology X** 2: 100019.

Van Wyk JA (2001) Refugia-overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. **Onderstepoort Journal Veterinary Research** 68: 55–67.

Van Wyk JA, Bath GF (2002) The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. **Veterinary Research** 33: 509–529.

Veloso CFM, Louvandini H, Kimura EA, Azevedo CR, Enoki DR, França LD, McManus CM, Dell'Porto A, Santana AP (2004) Efeitos da suplementação proteica no controle da verminose e nas características de carcaça de ovinos Santa Inês. **Ciência Animal Brasileira** 5: 131–139.

Veríssimo CJ, Niciura SCM, Alberti ALL, Rodrigues CFC, Barbosa CMP, Chiebao DP, Cardoso D, Silva GS, Pereira JR, Margatho LFF, Costa RLD, Nardon RF, Ueno TEH, Curci VCLM, Molento MB (2012) Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology** 187: 209–216.

Waller PJ (2006) From Discovery to development: current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. **Veterinary Parasitology** 139: 1–14.

Weiss DJ, Wardrop KJ, Schalm OW (2010) **Scham's Veterinary Hematology**. 6^a Ed.

Zen S, Santos MC, Monteiro CM (2014) Evolução da caprino e ovinocultura. **Boletim Ativos da Pecuária de Caprino e Ovinocultura** 9: 1-3.

CAPÍTULO 2 – Investigating the benefits of target selective treatment by average daily weight gain against gastrointestinal nematodes in Morada Nova lambs¹

Isabella Barbosa dos Santos¹, Luís Adriano Anholeto², Gustavo Avelar de Sousa¹, Alessandra da Silva Nucci³, Yousmel Aleman Gainza¹, Amanda Figueiredo¹, Leonardo Aparecido Lima dos Santos¹, Alessandro Pelegrine Minho², Waldomiro Barioni-Junior², Sérgio Novita Esteves², Simone Cristina Méo Niciura², Ana Carolina de Souza Chagas^{2*}

¹Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP), via Prof. Paulo Donato Castellane, Zip Code 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

²Embrapa Pecuária Sudeste, Rodovia Washington Luiz, Km 234, PO Box 339, Zip Code 13560-970, São Carlos, SP, Brazil. *e-mail: carolina.chagas@embrapa.br

³Centro Universitário Central Paulista, Rua Miguel Petroni, 5111, Zip Code 13568-250, São Carlos, SP, Brazil.

ABSTRACT - Gastrointestinal nematodes (GIN) are a major obstacle to sheep farming, and their rational control depends on reliable parameters that guarantee both productivity and animal health. Thus, the objective of this study was to evaluate a method of targeted selective treatment (TST) of Morada Nova lambs, using the average daily weight gain (DWG). For this, 114 lambs in the rainy and 102 in the dry season were randomized into three treatments: Control (CT), Routine (RT - treated every 42 days), and Targeted Selective (TST - treated according to DWG). From the 63rd day of age (D63) to the D210, every 21 days, the animals were weighed and blood samples (packed cell volume - PCV) and fecal samples were collected (eggs per gram of feces (EPG) and fecal cultures). Intending to investigate the resistance of parasites to the anthelmintic used in the experimental groups (levamisole), the EPG count reduction test (FECRT), RESISTA-Test[®] and molecular test (detection of a 63 bp indel in the *acr-8* gene in *Haemonchus contortus*) were performed. For CT, RT and TST groups, the following results were obtained: mean EPG ($p \leq 0.05$) were 4665.1, 3063.5 and 3462.1 in the rainy season and 4475.1, 1341.7 and 2863.4 in the dry season, respectively; mean PCV were 32.1%, 33.4% and 32.3% in the rainy season and 33.9%, 36.0% and 35.1% in the dry season; mean DWG were 0.087 kg, 0.101 kg and 0.094 kg in the rainy season and 0.102 kg, 0.113 kg and 0.112 kg in the dry season; efficacies of levamisole in FECRT were 66.4%, 24.1% and 76.4% in the rainy and 90.7%, 12.4% and 64.8% in the dry season, respectively; in the RESISTA-Test[®] LC₅₀ were 0.482, 1.926 and 0.117 µg/mL in the rainy and 0.437, 0.851 and 0.045 µg/mL in the dry season, respectively; in the molecular test, the frequencies

¹ Artigo científico submetido e em avaliação para publicação/ article submitted and under review.

of the homozygous resistant genotype were 57.1%, 71.4% and 40.0% in the rainy season and 47.8%, 55.9% and 41.9% in the dry season. No significant difference was observed between the TST and RT in relation to the mean weight gain, final weight and DWG, mainly in the dry season (lower parasite load). Thus, TST allowed less resistance development through *refugia* maintenance, without productive losses, contributing to the sustainability of the sheep chain. Particularities of sheep breeds and environmental conditions need to be assessed before TST application by DWG for GIN control.

Key-words: *Haemonchus contortus*, Happy Factor™, RESISTA-Test®, acr-8 gene.

1. Introduction

Infections caused by gastrointestinal nematodes (GIN) cause significant health problems and decrease in the productivity of small ruminants (Busin et al., 2013). Linked to the damage caused by these parasites, anthelmintic resistance to the main chemicals is also a huge constrain (Kaplan and Vidyashankar, 2012). Adult animals of the Morada Nova breed are resistant to GIN (Issakowicz et al., 2016; Lôbo et al., 2011), but the lambs, in the growth phase, are considered resilient, needing attention concerning GIN control, because the reduction in weight gain in this stage has a direct impact on final weight (Haehling et al., 2020; Toscano et al., 2019a, 2019b).

Anthelmintic resistance has led to the search for more rational methods of parasite control, including selective treatment. Leaving part of the parasitic population without exposure to antiparasitic treatment (*in refugia*) is considered of critical importance to delay the evolution of resistant parasites (Van Wyk and Van Schalkwyk, 1990; Van Wyk, 2001). Parasites *in refugia* are those that have not been exposed to anthelmintics, and include the stages of free living in the environment, parasites from untreated individuals, and those at any stage of the host life cycle that are not affected by anthelmintic treatments (Greer et al., 2020). Barnes et al. (1995) suggest a selective treatment method leaving out of the anti-helmintic treatment 20% of the animals with greater weight gain in the flock. With this new approach, the *refugia*'s conservation is extremely important to slow the establishment of resistance, as a portion of parasitic genetic material is not exposed to anthelmintics, which leads to the dilution of resistant genotypes present in helminth population (Greer et al., 2009).

In order to preserve *refugia* on farms it is necessary to design a selective treatment for sheep. This treatment, more personal, should be easy to implement and present a favorable cost-benefit to producers (Kenyon et al., 2013). To this end, a mathematical model must be developed with a production indicator that represents less loss to the flock and *refugia* maintenance (Berk et al., 2016). The Happy Factor™ is a targeted selective treatment (TST), which considers the average weight gain of developing lambs, the quality and quantity of the pasture and climatic factors (Greer et al., 2009). This model was considered efficient, because the reduction in weight gain occurs right at the beginning of infection, before the onset of clinical signs, when there is a reduction in voluntary food intake and in food

conversion (Busin et al., 2013). Thus, weight gain is a sensitive indicator, affecting animal performance and the profitability of production systems. For most GIN, more complex interactions, including climate and management, make the use of these predictive tools more challenging, with the need to study models that support TST (Charlier et al., 2014). The consequences of anthelmintic treatment also depend on biology and ecology of parasites. Therefore, the validation of friendly and sustainable indicators at regional levels is essential (Edith et al., 2018).

As far as we're concerned, there are no studies aimed at developing TST in the Morada Nova sheep breed or that have evaluated it at tropical conditions. Thus, the objective of this study was to assess whether the average daily weight gain (DWG) can be a parameter for TST in Morada Nova lambs, favoring *refugia* and slowing down the establishment of anthelmintic resistance.

2. Material and methods

2.1. Experimental animals and management

The study was conducted at Embrapa Pecuária Sudeste - CPPSE, São Carlos, São Paulo, Brazil (22°01'S and 47°53'W). The region's climate is classified as Cwa (Koëppen), with two well-defined seasons: rainy from October to March and dry from April to September. The average annual temperature is 21.2°C and the average annual air humidity is 75.6%.

The Morada Nova ewes were kept in 2.5 ha pasture, predominantly of *Panicum maximum* cv. Aruana, and managed in a rotational grazing system, with a period of occupation of 7 days and rest of 21 days. During the rainy season the ewes' feeding was composed by pasture and supplementation with 300 g concentrate/animal. In the dry season, corn silage was also provided. Water and mineral salt were kept *ad libitum*.

To study the growth of lambs in the rainy season, the ewes were mated in March and April, so the births occurred in August and September. 100 ewes with 114 lambs in natural suckling, from single and twin births, were selected. Weaning occurred in the rainy season, in January. In the dry season, the mate was held in October and November, so that the ewes delivered between March and April. In this season, 76 females with 102 lambs met the same selection criteria. The animals were weaned in August, mid-dry season.

Immediately after birth, lambs were identified by conventional ear tags and by subcutaneous electronic chips, and were weighed. Natural weaning was performed at 150 days of age in average. The ewes were removed from the Aruana pasture and the lambs remained in the same pasture until 210 days of age (D210) in average, under natural infections. The concentrate was supplied in a ratio of 1% of live weight (LW) per day and, in the dry season, corn silage was also provided gradually, as the supply of pasture decreased. Water and mineral salt were kept *ad libitum*.

2.2 *Experimental design*

At 63 days of age (D63), all lambs received anthelmintic treatment with Ripercol® L - 150F (levamisole 18.8% injectable, 9.4 mg/kg) in order to initiate the experiment with all animals at the same parasitological conditions. This dose was higher than the recommended (6.2 mg/kg) in order to reach a better efficacy in the sheep nematode control in Brazil (Costa et al., 2017) and make this trial possible. Levamisole presented the highest efficacy (81%) (albendazole - 54%, closantel - 79%, ivermectin - 44%, moxidectin - 35% and monepantel - 62%) in the FECRT performed with the Morada Nova lambs. These results reflect the resistance situation of the parasites from the Brazilian flocks (Veríssimo et al., 2012), as well as from the tropical countries (Sepúlveda-Vázquez et al., 2021), demonstrating the difficulty of carrying out experiments that require the use of highly effective anthelmintics.

The lambs were separated into three experimental groups in order to obtain similar means for: birth weight, type of birth (twin or single), sex, EPG and PVC, considering the data at D63 for the last traits. Anthelmintic treatments throughout the experimental period were performed with levamisole (9.4 mg/kg), according to the criteria adopted for each treatment:

- 1) Control (CT): animals without anthelmintic treatment.
- 2) Routine (RT): animals treated every 42 days from D105 to D210, as usual at São Paulo state (Belluzzo et al., 2001).
- 3) Targeted Selective (TST): animals treated according to the formula: lamb's DWG \leq DWG of the TST group - standard deviation*0.5 (adapted from Cintra et al., 2018), every 21 days, from D105 to D210.

From D63 to D210, every 21 days, blood samples were collected for packed cell volume (PCV) determination, and feces samples for individual EPG counts (Ueno and Gonçalves, 1998) and for group fecal cultures (Roberts and O'Sullivan, 1950). In addition, the lambs were weighed every 21 days from birth to D210. To prevent deaths, precautionary anthelmintic treatment with the same drug was administered to lambs wherever they presented PCV \leq 21% (adapted from Starling et al. (2019); CEUA CPPSE/ Protocol No. 01/2020), which occurred only in the CT. Their post-treatment data were removed from the statistical analyses.

2.3 *Assessment of dry matter in forage and climatic factors*

Forage collections occurred every 15 days in the rainy season and every 30 days in the dry season. All the material contained in a 1 m square was cut to 20 cm of the ground level and weighed for the determination of green matter production. After this procedure, sub-samples were placed in a forced-air oven at 65°C for 72 h, in order to determine the production of dry matter (DM), expressed in kg/ha (Nogueira and Souza, 2005).

Climate data were assessed by the climate station at Embrapa Pecuária Sudeste. Temperature (°C), relative humidity (%) and rainfall (mm) were measured.

2.4 Anthelmintic resistance analyses performed after 210 days of age

2.4.1 Parasitological necropsy

Two lambs from the rainy season and three from the dry season were selected from each treatment with the highest EPG counts. These animals were euthanized after stunning for parasitological necropsy according to technical criteria of the Ministry of Livestock Agriculture and Supply (MAPA), following humanitarian slaughter rules. The abomasum was recovered and cut into the larger curvature, and the small and large intestines were lined up and opened. The contents were then washed with water and recovered in a 0.297 mm sieve. Using a magnifying glass, the parasites were separated by genus and sex and stored in 70% alcohol for morphological identification (Van Wyk et al., 2004).

2.4.2 Diagnosis of levamisole resistance by the Fecal Egg Count Reduction Test (FECRT)

After D210, the lambs that were not selected for parasitological necropsy and had EPG higher than 200 were randomized for FECRT. The objective was to verify levamisole efficacy in each group, after its differential use.

Randomization for FECRT was based on EPG, PVC and animal weight data obtained on D210. Within each of the three treatments, the animals were separated into the control group (without treatment) and the group treated with levamisole. On post-treatment D7, feces were collected for individual EPG counts, fecal cultures and drug resistance evaluation according to the formula: % Efficacy = (Mean of EPG in the control group - Mean of EPG in the treated group/ Mean of EPG in the control group) x 100.

2.4.3 Diagnosis of levamisole resistance by the Larval Development Test (LDT) - RESISTA-Test[®]

This test was performed on D210 with eggs from a pool of the feces collected from each experimental group and recovered by sequential sieves. About 70 GIN eggs were added to each well of a 96-well culture plate, which also received nutritive medium (*Escherichia coli* [EC11303] and amphotericin B [A9528] - Sigma-Aldrich). The plates were identified, sealed with PVC film and kept in an incubator for 24 h (27°C, RH 80%) for larval development (L₁). After this period, wells received 12 dilutions of levamisole hydrochloride (RESISTA-Test[®]; Gainza et al., 2020; 2021). The plates were incubated for another six days. The negative control was composed of distilled water and nutritive medium. After the incubation period, first, second and third stage larvae (L₁, L₂, L₃) of each well were quantified using an inverted microscope to calculate the efficacy and lethal concentrations (LCs) of levamisole. All anthelmintic concentrations and negative control were evaluated in duplicate (Gainza et al., 2020; 2021).

2.4.4 Diagnosis of levamisole resistance by molecular testing

Fecal samples collected on D63 and D210 were submitted to fecal culture. After obtaining L₃, DNA extraction and genotyping of the 63 bp indel in the *acr-8* gene was performed by polymerase chain

reaction (PCR) specific for *Haemonchus contortus*, to evaluate the resistance to levamisole (Chagas et al., 2016).

In the rainy season, genotypes were assessed in 20 L₃ of all treatments (group-pooled fecal culture) on D63 and in 35, 21 and 20 L₃ on D210 for CT, ST and TST, respectively. In the dry season, 39, 27 and 30 L₃ were used on D63, and 69, 35 and 43 L₃ on D210, respectively. The L₃ were submitted to DNA extraction according to Silvestre and Humbert (2000) and Coles et al. (2006) with modifications by Niciura et al. (2012). For DNA extraction, sodium hypochlorite solution was used for exsheathing, and larvae were individually collected and incubated in digestion buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM EDTA pH 8.0, 50 mM NaCl, 2% SDS, 40 mM DTT and 0.4 mg/mL proteinase K) at 56°C overnight. DNA was extracted with Phenol solution: Chloroform: Isoamyl alcohol (25:24:1), precipitated with 100% isopropanol and washed with 70% ethanol. DNA was then suspended in water, incubated at 37 °C for 30 minutes and stored at -20 °C (adapted from Sambrook et al., 2000).

PCR to detect the 63 bp deletion in the *acr-8* gene associated with levamisole resistance was performed according to Barrère et al. (2014) with LEVF (5'-ACCTTACCTATACACCCGTC-3') and LEVR (5'-CTTGCCGTTATTACACCCTCG-3') primers. It consisted of 1x buffer, 0.25 µM each primer, 0.2 mM each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 1U Taq DNA polymerase and 2 µL DNA, in a final volume of 20 µl. Thermocycling conditions were initial denaturation at 94°C for 2 minutes and 40 amplification cycles at 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds, followed by final extension at 72°C for 10 minutes.

Genotypes were attributed by banding pattern (256 bp for deletion and 319 bp no deletion) after 2% agarose gel electrophoresis in TBE buffer, ethidium bromide staining and observation in a UV transilluminator. The positive control was previously standardized (Chagas et al., 2016) and the negative control consisted of distilled water without DNA. The resistance genotype was assigned to animals homozygous for the 63 bp deletion.

2.5 Statistical analyses

Weight, DWG, PVC and EPG data were submitted to variance analysis by the SAS Proc Mixed procedure (SAS, 2016) considering in the model the effects of treatments (CT, ST and TST), Day (from 0 to 210) and the respective interactions following a Split-Plot with repeated measurement in time. In selecting the best covariance matrix structure, the AIC (Smaller is Better - Akaike's Information Criterion) criterion was used. Mean comparisons were performed by Tukey's test at a significance level of 5%. The variable EPG was submitted to LOG (X+25) transformation.

Anthelmintic efficacy in RESISTA- Test® was determined based on the arithmetic mean of larval development according to the following equation (Coles et al., 1992):

$Inhibition(\%) = 100(\bar{X}_{test} / \bar{X}_{total})$, where \bar{X}_{test} refers to the number of larvae that has not reached the

L₃ phase and \bar{X}_{total} corresponds to the number of L₁ + L₂ + L₃. The results were analyzed by the Probit logistic regression model to determine the values of LC₅₀, LC₉₀, LC₉₅ and LC₉₉, which were defined as the anthelmintic concentrations in which 50%, 90%, 95% and 99% of larval development were inhibited. The analyses were performed with XLSTAT-Premium 2019.2.2 (Addinsoft 2019 - XLSTAT, Boston, USA) and a significance level of $p \leq 0.05$ was considered. In the molecular test, Chi-square test was used to compare differences in frequency of the resistant genotype between D63 and D210 in each treatment group.

3. Results

3.1 Infection analyses

Figure 1 presents the means of EPG obtained in CT, RT and TST groups. For 114 lambs (n = 38 animals/treatment) in the rainy season and 102 lambs (n = 34 animals/treatment) in the dry season, eight samples were taken. The EPG means were higher in the CT group, while the RT means were lower in both seasons. CT and TST did not differ on any experimental date of the rainy season, but were different in the dry season ($p \leq 0.05$). There was a statistical difference in the overall EPG mean between CT and RT in the rainy season and among the three treatment groups in the dry season (Table 1).

In addition to Trichostrongyloidea, eggs of *Strongyloides* sp. (only in the rainy season), *Moniezia* sp. and oocysts of *Eimeria* spp were also identified in EPG. Nematode genera frequencies in feces cultures were extremely homogeneous throughout the experimental period, in both seasons. Thus, the results are presented as means. The genera *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Cooperia* and *Oesophagostomum* were identified, with averages of 81.6%, 10.3%, 5.0% and 3.1% in the rainy season and 83.3%, 12.6%, 3.5% and 0.6% in the dry season, respectively.

3.2 Hematological analyses

Blood collection for PCV also occurred on eight experimental dates, and the averages are shown in Figure 1. In lambs raised in the rainy season, PCV values did not undergo many changes, even with high EPG counts. The three treatments showed similar PCV until D105 in both seasons. From then on, CT maintained the lowest PCV and RT the highest, especially in the dry season. In the general mean, RT was statistically similar to TST only in the rainy season ($p > 0.05$) (Table 2).

3.3 Weight measurement and DWG

The weight measurement of lambs occurred every 21 days, from birth to D210, totaling 10 samples for each animal (Fig. 1). In the rainy season, statistical differences in mean weights were observed only in the two final dates. On D210, the mean RT weight exceeded those of the other treatments ($p \leq 0.05$). In the dry season, CT averages were the lowest in relation to the other treatments

on three dates ($p \leq 0.05$). In D210 of the dry season and in the general average of both seasons, however, there was no difference between treatments ($p > 0.05$) (Table 3).

DWG in each treatment is shown in Figure 1. RT presented mean DWG statistically higher ($p \leq 0.05$) than the other treatments in the rainy season, but it was not different from TST in the dry season (Table 4).

Table 5 shows the number of anthelmintic treatments performed in the experimental groups and its percentages. In a comparison with RT (100% of anthelmintic treatment), the TST presented an average percentage of 27.2% of lambs dewormed in the rainy season and 32.8% in the dry season, while the CT presented 10.5% and 4.4%, respectively, when $PCV \leq 21\%$.

At the end of the experiment, it was evaluated whether the criterion used in the TST ($DWG \leq DWG$ of the TST group - standard deviation*0.5) was adequate to identify lambs with higher reduction in body weight gain due to infection. The comparative criterion was that animals with $EPG \geq 4000$ need anthelmintic treatment. For the TST group in the rainy season, 71% of the lambs would not have been treated because they had $DWG >$ that formula; 69% of them agreed with the EPG, as they had $EPG < 4000$. Moreover, from the 29% who would have received anthelmintic treatment by DWG, 40% had $EPG \geq 4000$. Therefore, there was 61% of agreement between DWG and EPG. In relation to the total number of evaluations performed in the TST ($n = 217$), 22% of the animals were at risk, that is, despite $EPG \geq 4000$, they would not have received anthelmintic treatment because they presented high DWG, but at the same time they did not present symptoms, such as anemia or weight loss. In the dry season, 67% of the lambs would not have been treated for having $DWG >$ that formula; 71% of them agreed because presented $EPG < 4000$. From the 33% who would have received treatment by DWG, 24% had $EPG \geq 4000$. Therefore, there was a 55% of agreement between DWG and EPG, and of total performed evaluations, 20% of the animals were at risk in this season.

3.4. Forage and meteorological analyses

The average dry matter production (DM) of the pasture at the beginning of the rainy season was 1612 kg/ha. With the increase in rainfall rates from D84, DM production increased gradually, reaching an average of 4735 kg/ha on D168 to D210 (Fig. 1). In the dry season, an initial mean of 3262 kg/DM/ha was obtained, and as the rainfall declined throughout the experiment, on D210 the average was 1132 kg/DM/ha. In this period, the animals received corn silage supplementation with 6.5% crude protein and 63% total digestible nutrients.

The measured meteorological parameters indicated that the rainy season had higher rainfall rate, temperature and relative humidity. For the dry season, very low rainfall rates were observed (0 mm on three consecutive dates), associated with lower temperature and relative humidity (Fig. 1)

3.5 Diagnosis of resistance and infection profile on D210

Once the D210 data collection was completed, the separation into subgroups was established for FECRT. In the rainy season, levamisole presented an efficacy of 66.4% in CT, 24.1% in RT and 76.4% in TST, while in the dry season its efficacy was 90.7%, 12.4% and 64.8%, respectively. LCs obtained in both seasons in the RESISTA-Test[®] showed a very high degree of resistance for RT. TST, on the other hand, was the one that presented the smallest values, demonstrating greater susceptibility to the anthelmintic treatment. There was no significant difference ($p > 0.05$) in the frequency of the resistant genotype between D63 and D210 in all treatment groups and in both seasons (Table 6). The Hardy-Weinberg Equilibrium test - HWE (data not shown) indicated that the polymorphism was under selection pressure ($p \leq 0.05$) on D210 in the three treatments and in the two seasons.

In the parasitological necropsy, *H. contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Oesophagostomum columbianum* and *Cooperia curticei* were observed. Four lambs (66.6%) in the rainy season and two (22.2%) in the dry season presented *C. curticei*. One lamb (16.6%) presented *O. columbianum* (Table 7). In the rainy season there was a predominance of *H. contortus* (68.9%), while in the dry season *T. colubriformis* was the most prevalent (66.4%). The two species were responsible for practically all parasitic burden recovered from necropsied animals (98.1% - rainy season and 99.6% - dry season). Fecal cultures (D210) indicated predominance of *H. contortus* in the three experimental treatments, in the rainy and dry season. On D210, the percentages for *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Cooperia* and *Oesophagostomum*, whose averages were 68%, 21%, 8% and 3% in the rainy season and 76%, 23%, 1% and 0% in the dry season, respectively, were extremely homogeneous in CT, RT and TST.

4. Discussion

In the present study, TST approach was used to optimize weight gain for low-performance lambs and ensure longer life of anthelmintic drugs, by reducing the number of antiparasitic treatments. It was observed that the number of treatments in TST was almost half of the number in RT and, on average, 30% of the TST lambs received anthelmintics. Such findings are in agreement with those in a study in Scotland, in which DWG-treated lambs (or TST) received 50% less anthelmintic treatments than lambs submitted to the treatment recommended on the farm (every 42 days), without significant losses in DWG or time to reach the slaughter weight (Busin et al., 2014). In Great Britain, by means of a questionnaire answered by 383 sheep farmers, those who adopted the TST used significantly fewer drugs and reported less resistance than producers who did not adopt TST (Williams et al., 2021). For TST adoption, it's important to highlight that the DWG is as a parameter easier obtained than EPG or PCV. Other studies have also shown that weight can be a reliable parameter for the decision-making of anthelmintic treatment (Greer et al., 2009; McBean et al., 2016).

The parasites identified in the fecal cultures in the present study were extremely aligned and corroborate with the previous studies conducted in the region, indicating higher percentage of *H. contortus* (Amarante et al., 2004; Chagas et al., 2008). However, the results from L₃ identification and necropsy also showed an important parasitism by *Trichostrongylus*, because despite the percentage being lower than *Haemonchus*, it's important to consider that the *Trichostrongylus* female egg laying is around 200 eggs per parasite while for *Haemonchus* female is around 5000, e.i., 25 times more than that of *Trichostrongylus* (Ueno and Gonçalves, 1998). Thus, if fecal cultures demonstrate 50% of each species for instance, it may mean the presence of one *Haemonchus* female and 25 *Trichostrongylus* females. The meteorological parameters showed that the two periods in which this study occurred were very typical of the rainy and dry seasons of tropical regions. The rainy season presented favorable conditions for the L₃ survival in the environment and, thus, greater sheep infection. Many L₄ were also collected in the rainy season from the necropsied animals. These immature forms are probably due to the phenomenon of hypobiosis, in which they remain in a state of dormancy until the host presents better conditions. Immature forms may promptly replace adult parasites for instance and the phenomenon also avoids food disputes in cases of high infection, ensuring the helminth survival (Costa et al., 2011). On the other hand, dry season presented more unfavorable conditions for the L₃ survival in the environment. As a consequence, there was less infection of the lambs, visualized in the average EPG and in the number of parasites recovered from necropsy.

The results obtained for EPG indicated that anthelmintic treatments every 42 days (D105, D147 and D189) in RT generated a decrease in EPG counts on the subsequent dates (D126, D168 and D210), leading to statistical differences among groups. A similar pattern was observed for PCV, as those treatments promoted the maintenance of higher PCV in the RT throughout the experiment. The main clinical sign of the predominant infection by *H. contortus* is anemia, detected by PCV. Although Morada Nova breed is considered resistant to GIN (Issakowicz et al., 2016), such results prove that the lambs are resilient, that is, they remain healthy and productive despite high levels of infection. Even with high EPG counts, the mean PCV were similar to the one of healthy animals in the three groups, as already verified by Okino et al. (2021) and Toscano et al. (2019b) in Morada Nova breed.

In the weight gain evaluation, all groups presented similar averages in both seasons. The RT-treated animals showed better performance on D210 of the rainy season, but similar to the others in the dry season. Moreover, the animals reached higher mean live weights, demonstrating that the lowest infection, confirmed by mean EPG and post-necropsy counts, had a lower impact on production in this season. For DWG, there was a similarity between TST and RT in the dry season, with lower parasitic challenge. The amount of forage available in this season showed the need for animals' supplementation, as expected. The concentrate was given throughout the experimental period of the two seasons and the silage was modulated according to the amount of dry matter measured in the pastures. Sheep should

receive a supply of 2.8 kg DM/animal in Brazilian climatic conditions and also with adequate management and rotation of pastures (Pinto Filho et al., 2019). Such information corroborates with the management adopted in the present study, in which the average offer of 2.5 kg DM/animal/day was maintained during the dry season. Therefore, with corn silage supplementation offered in the dry season, it was verified that there was no deficit in the food supply that could reduce weight gain or DWG in the animals, reinforcing the hypothesis of a direct impact of GIN infection.

There are two studies evaluating the use of weight in the TST treatment in the South region of Brazil, in Ile de France and Texel animals. Both adopted the treatment of lambs raised in pasture with DWG lower than the mean DWG of the CT - standard deviation. The results indicated difficulty in achieving an ideal formula to decide to perform or not the anthelmintic treatment. Still, they concluded that DWG is a good parameter for decision-making, promoting significantly higher weight gain (Cintra et al., 2018; 2019). However, the adoption of the CT's DWG as a reference in those studies, instead of the TST's DWG, does not take into account the specific conditions of the parasitic management of this group over time. The good results obtained in those studies are probably directly related to the evaluated breeds, which are larger and more susceptible to GIN than Morada Nova.

On D210 in the rainy season, TST presented lower DWG than RT and higher than CT. It also showed lower resistance rates, which ensures longer use of anthelmintic drugs. Although there was not a highlighted agreement between DWG and EPG, the weight measurement seems to be a more reliable parameter of the impact of infection than EPG counts. According to Love et al. (2017), EPG counts, performed by different methods, failed in the correct decision-making for the control of parasites, and it also interferes negatively in the use of the anthelmintics through FECRT. Therefore, a TST not based on EPG count can be a differential, especially in flocks with a predominance of resilient animals, and also, may be an important tool in the selection of more susceptible animals to be discarded. Mcbean et al. (2021) conducted studies altering the Happy Factor™ coefficient in order to optimize the efficiency of this method to increase animal productivity in farms with different conditions and sheep breeds. The authors suggest that, if necessary, further refinements can be made from locally generated data. Thus, new studies would evaluate different situations, such as the benefits of avoiding anthelmintic treatment in a percentage of the animals with higher DWG.

FECRT, RESISTA-Test® and molecular test indicated development of higher anthelmintic resistance in RT, mainly in the rainy season. The results were in agreement among RESISTA-Test®, FECRT and molecular in the rainy season (RT > CT > TST). In the dry season, however, while RESISTA-Test® and molecular test were concordant (RT > CT > TST), the FECRT was not so aligned (RT > TST > CT). In a study conducted in Brazilian flocks with a historical use of levamisole, the resistance detected was aligned in both FECRT and RESISTA-Test® (Gainza et al., 2021). It is worth noting that the RESISTA-Test® and molecular test have been validated so far for *H. contortus* and, in

the dry season, the necropsy indicated a higher percentage of *T. colubriformis*, which may explain this divergence.

Regarding the molecular evaluation, the observed differences in frequency of the homozygous resistant genotype was not significant between D63 and D210 for all treatment groups and in both seasons. It may suggest that the short interval (147 days) between evaluations was not enough to detect differences, even considering that the polymorphism was under selective pressure tested by HWE. Santos et al. (2019) detected 76.7% of the resistance allele frequencies after continuous use of the drug, which was similar to the values presented in the rainy season for the ST group. The allele for resistance was identified in properties in Bangladesh with a percentage ranging from 25% to 47% (Dey et al., 2020). However, as the characterization of levamisole resistance was not possible in some *H. contortus* parasitic populations, studies suggest that the role of this polymorphism should be better investigated (Santos et al., 2019).

The present study exposes the need for local improvement of TST strategies in order to prolong efficacy of anthelmintics. Prioritize weight gain and ignore resistance development is the main factor affecting the sustainability of sheep production chain in several tropical and subtropical countries. The adoption of TST would imply in the acquisition of a scale that, in turn, reduces the need for animal management involving EPG and VG measurements, also resulting in less impact on the environment and less drug residues in animal products. Thus, it is possible to infer that, although not perfect for all situations, TST is useful. The fine-tuning to be carried out must take into account, in addition to climate factors, different breeds and production systems, and the balance between resistance mitigation and DWG, that is, to obtain the highest animal performance with the lowest selection pressure on GIN.

5. Conclusion

The adoption of DWG in the TST allowed good weight performance, reduction in the use of anthelmintics and deceleration of resistance development in *H. contortus* in relation to the RT approach. The method provided the maintenance of zootechnical control of the flock, especially in the dry season, in which the parasite load was lower. The results suggest the need for studies to evaluate TST in various breeds and in environmental conditions with different parasitic challenges.

Ethical approval

The experimental protocols that were developed in this study fully complied with the ethical principles of animal experimentation prepared by Ethical Use of Animals Committee of Embrapa Pecuária Sudeste (CEUA CPPSE/ Protocol No. 01/2020).

Declaration of Competing Interest

The authors declare they have no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank to the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – project no. 2019/02929-3) for financial support and scholarships (grant no. 2018/16070-1), and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the scholarship (grant no. 131537/2018-0).

References

- Amarante, A.F.T., Bricarello, P.A., Rocha, R.A., Gennari, S.M., 2004. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Vet. Parasitol.* 120, 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.12.004>
- Barnes, E.H., Dobson, R.J., Barger, I.A., 1995. Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. *Parasitol. Today.* [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(95\)80117-0](https://doi.org/10.1016/0169-4758(95)80117-0)
- Barrère, V., Beech, R.N., Charvet, C.L., Prichard, R.K., 2014. Novel assay for the detection and monitoring of levamisole resistance in *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 44, 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.12.004>
- Berk, Z., Laurenson, Y.C.S.M., Forbes, A.B., Kyriazakis, I., 2016. Modelling the consequences of targeted selective treatment strategies on performance and emergence of anthelmintic resistance amongst grazing calves. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 6, 258–271. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2016.11.002>
- Berluzo, C. E. C., Kaneto, C.N., Ferreira, G.M., 2001. Curso de atualização em ovinocultura. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (UNESP), 110p.
- Busin, V., Kenyon, F., Laing, N., Denwood, M.J., McBean, D., Sargison, N.D., Ellis, K., 2013. Addressing sustainable sheep farming: Application of a targeted selective treatment approach for anthelmintic use on a commercial farm. *Small Rumin. Res.* 110, 100–103. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.11.013>
- Busin, V., Kenyon, F., Parkin, T., McBean, D., Laing, N., Sargison, N.D., Ellis, K., 2014. Production impact of a targeted selective treatment system based on liveweight gain in a commercial flock. *Vet. J.* 200, 248–252. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.02.012>
- Chagas, A.C.S., Oliveira, M.C.S., Esteves, S.N., Oliveira, H., Giglioti, R., Giglioti, C., Carvalho, C.O., Ferrezini, J., Schiavone, D., 2008. Parasitismo por nematóides gastrintestinais em matrizes e cordeiros criados em São Carlos, São Paulo. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 18, 50–58.

- Chagas, A.C.S., Domingues, L.F., Gainza, Y.A., Barioni-Junior, W., Esteves, S.N., Niciura, S.C.M., 2016. Target selected treatment with levamisole to control the development of anthelmintic resistance in sheep flock. *Parasitol. Research*, 115: 1131-1139.
- Charlier, J., Morgan, E.R., Rinaldi, L., Van Dijk, J., Demeler, J., Höglund, J., Hertzberg, H., Van Ranst, B., Hendrickx, G., Vercruysse, J., Kenyon, F., 2014. Practices to optimise gastrointestinal nematode control on sheep, goat and cattle farms in Europe using targeted (selective) treatments. *Vet. Rec.* <https://doi.org/10.1136/vr.102512>
- Cintra, M.C.R., Ollhoff, R.D., Sotomaior, C.S., 2018. Sensitivity and specificity of the FAMACHA© system in growing lambs. *Vet. Parasitol.* 251, 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.005>
- Cintra, M.C.R., Ollhoff, R.D., Weber, S.H., Sotomaior, C.S., 2019. Is the Famacha © system always the best criterion for targeted selective treatment for the control of haemonchosis in growing lambs? *Vet. Parasitol.* 266, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.12.015>
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., Von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruysse, J., 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.11.019>
- Costa, V.M.M., Simões, S.V.D. Riet-Correa, F., 2011. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 31, 65-71.
- Costa, P.T., Costa, R.T., Mendonça, G., Vaz, R.Z., 2017. Eficácia anti-helmíntica comparativa do nitroxinil, levamisol, closantel, moxidectina e febendazole no controle parasitário em ovinos. *Bol. Ind. Anim.* 74, 72-78. <https://doi.org/10.17523/bia.v74n1p72>
- Dey, A.R., Begum, N., Anisuzzaman, Alim, M.A., Alam, M.Z., 2020. Multiple anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of small ruminants in Bangladesh. *Parasitol. Int.* 77. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102105>
- Edith, R., Harikrishnan, T., Balagangatharathilagar, M., 2018. Targeted selective treatment (TST): A promising approach to combat anthelmintic resistance in farm animals. *J. Entomol. Zool. Stud.* 6, 844–847.
- Gainza, Y.A., Santos, I.B., Figueiredo, A., Amarante, A.F.T., Esteves, S.N., Barioni Junior, W., Chagas, A.C.S., 2020. Improvement of an in vitro test for *Haemonchus contortus* resistance diagnosis in small ruminant (RESISTA-test©). *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 44 38.
- Gainza, Y.A., Santos, I.B., Figueiredo, A., Santos, L.A.L., Esteves, S.N., Barioni Junior, W., Minho, A.P. Chagas, A.C.S., 2021. Anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* from sheep flocks in Brazil: concordance of in vivo and in vitro (RESISTA-Test©) methods. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 30, e025120. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120201093>
- Greer, A.W., Kenyon, F., Bartley, D.J., Jackson, E.B., Gordon, Y., Donnan, A.A., McBean, D.W.,

- Jackson, F., 2009. Development and field evaluation of a decision support model for anthelmintic treatments as part of a targeted selective treatment (TST) regime in lambs. *Vet. Parasitol.* 164, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.04.017>
- Greer, A.W., Van Wyk, J.A., Hamie, J.C., Byaruhanga, C., Kenyon, F., 2020. Refugia-Based Strategies for Parasite Control in Livestock. *Vet. Clin. North America: Food Animal Practice.* 36, 31–43.
- Haehling, M.B., Cruvinel, G.G., Toscano, J.H.B., Giraldeho, L.A., Santos, I.B., Esteves, S.N., Benavides, M. V., Barioni Júnior, W., Niciura, S.C.M., Chagas, A.C.S., 2020. Four single nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with resistance and resilience to *Haemonchus contortus* in Brazilian Morada Nova sheep. *Vet. Parasitol.* 279, 109053. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2020.109053>
- Issakowicz, J., Issakowicz, A.C.K.S., Bueno, M.S., da Costa, R.L.D., Katiki, L.M., Geraldo, A.T., Abdalla, A.L., McManus, C., Louvandini, H., 2016. Parasitic infection, reproductive and productive performance from Santa Inês and Morada Nova ewes. *Small Rumin. Res.* 136, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.01.015>
- Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N., 2012. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 186, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.048>
- Kenyon, F., McBean, D., Greer, A.W., Burgess, C.G.S., Morrison, A.A., Bartley, D.J., Bartley, Y., Devin, L., Nath, M., Jackson, F., 2013. A comparative study of the effects of four treatment regimes on ivermectin efficacy, body weight and pasture contamination in lambs naturally infected with gastrointestinal nematodes in Scotland. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 3, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2013.02.001>
- Lôbo, R.N.B., Pereira, I.D.C., Facó, O., McManus, C.M., 2011. Economic values for production traits of Morada Nova meat sheep in a pasture based production system in semi-arid Brazil. *Small Rumin. Res.* 96, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.01.009>
- Love, J.W., Kelly, L.A., Lester, H.E., Nanjiani, I., Taylor, M.A., Robertson, C., 2017. Investigating anthelmintic efficacy against gastrointestinal nematodes in cattle by considering appropriate probability distributions for faecal egg count data. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 7, 71–82. <https://doi.org/10.1016/J.IJPDDR.2017.01.002>
- McBean, D., Nath, M., Lambe, N., Morgan-Davies, C., Kenyon, F., 2016. Viability of the Happy Factor™ targeted selective treatment approach on several sheep farms in Scotland. *Vet. Parasitol.* 218, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.01.008>
- McBean, D.W., Greer, A.W., Kenyon, F., 2021. The Happy Factor treatment threshold, used to determine Targeted Selective Treatment decisions for lambs, is transferable between farms. *Animal* 15. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100178>
- Niciura, S.C.M., Veríssimo, C.J., Gromboni, J.G.G., Rocha, M.I.P., de Mello, S.S., Barbosa, C.M.P.,

- Chiebao, D.P., Cardoso, D., Silva, G.S., Otsuk, I.P., Pereira, J.R., Ambrosio, L.A., Nardon, R.F., Ueno, T.E.H., Molento, M.B., 2012. F200Y polymorphism in the β -tubulin gene in field isolates of *Haemonchus contortus* and risk factors of sheep flock management practices related to anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 190, 608–612. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.07.016>
- Nogueira, A.R.A., Souza, G.B., 2005. Manual de Laboratório: Solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos.
- Okino, C.H., Méo Niciura, S.C., Barbosa Toscano, J.H., Esteves, S.N., dos Santos, I.B., von Haehling, M.B., Figueiredo, A., de Sena Oliveira, M.C., Chagas, A.C. de S., 2021. Ovine β -globin gene: A new qPCR for rapid haplotype identification and association with susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. *Vet. Parasitol.* 294. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109434>
- Pinto Filho, J.S., Cunha, M. V., Souza, E.J.O., Santos, M.V.F., Lira, M.A., Moura, J.G., Rodrigues, J.M.C.S., Silva, C.S., 2019. Performance, carcass features, and non-carcass components of sheep grazed on Caatinga rangeland managed with different forage allowances. *Small Rumin. Res.* 174, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.03.010>
- Roberts, F.H.S., O'sullivan, J.P., 1950. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Aust. J. Agric. Res.* 1, 99–102.
- Sambrook, J. Russell, D. W., 2000. Molecular Cloning, a Laboratory Manual - vol. 1, 2 e 3, 3ª edição.
- Santos, J.M.L. dos, Vasconcelos, J.F., Frota, G.A., Freitas, E.P. de, Teixeira, M., Vieira, L. da S., Bevilaqua, C.M.L., Monteiro, J.P., 2019. Quantitative molecular diagnosis of levamisole resistance in populations of *Haemonchus contortus*. *Exp. Parasitol.* 205. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107734>
- Sepúlveda-Vázquez, J., Lara-Del Rio, M.J., Vargas-Magaña, J.J., Quintal-Franco, J.A., Alcaraz-Romero, R.A., Ojeda-Chi, M.M., Rodríguez-Vivas, R.I., Mancilla-Montelongo, G., González-Pech, P.G., Torres-Acosta, J.F. de J., 2021. Frequency of sheep farms with anthelmintic resistant gastrointestinal nematodes in the Mexican Yucatán peninsula. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* 24. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100549>
- Silvestre, A., Humbert, J.F., 2000. A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites. *Exp. Parasitol.* 95, 271–276. <https://doi.org/10.1006/expr.2000.4542>
- Starling, R.Z.C., Almeida F.A., Viana, M.V.G., Castilhos, A.M., Amarante, A.F.T., 2019. Losses caused by gastrointestinal nematode infections in Dorper lambs under two nutrition status. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 28: 652-660.
- Toscano, J.H.B., dos Santos, I.B., von Haehling, M.B., Giraldeho, L.A., Lopes, L.G., da Silva, M.H., Figueiredo, A., Esteves, S.N., Chagas, A.C. de S., 2019a. Morada Nova sheep breed: Resistant or resilient to *Haemonchus contortus* infection? *Vet. Parasitol.* X 2.

<https://doi.org/10.1016/j.vpoa.2019.100019>

- Toscano, J.H.B., Okino, C.H., dos Santos, I.B., Giraldeho, L.A., von Haehling, M.B., Esteves, S.N., de Souza Chagas, A.C., 2019b. Innate Immune Responses Associated with Resistance against *Haemonchus contortus* in Morada Nova Sheep. *J. Immunol. Res.* 2019, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/3562672>
- Ueno, H., Gonçalves, P.C., 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. Japan International Cooperation Agency, Tokyo.
- Van Wyk, J.A., Cabaret, J., Michael, L.M., 2004. Morphological identification of nematoides larvae of small ruminants and cattle simplified. *Vet. Parasitol.* 119: 277-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.11.012>. PMID:15154594.
- Van Wyk, J.A. Refugia - overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 68, 55-67, 2001.
- Van Wyk, J.A., Van Schalkwyk, P.C. A novel approach to the control of anthelmintic-resistant *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 35, 61-69, 1990.
- Veríssimo, C.J., Niciura, S.C.M., Alberti, A.L.L., Rodrigues, C.F.C., Barbosa, C.M.P., Chiebao, D.P., Cardoso, D., Silva, G.S., Pereira, J.R., Margatho, L.F.F., Costa, R.L.D., Nardon, R.F., Ueno, T.E.H., Curci, V.C.L.M., Molento, M.B., 2012. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. *Vet. Parasitol.* 187, 209–216.
- Williams, E.G., Brophy, P.M., Williams, H.W., Davies, N., Jones, R.A., 2021. Gastrointestinal nematode control practices in ewes: Identification of factors associated with application of control methods known to influence anthelmintic resistance development. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* 24. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100562>

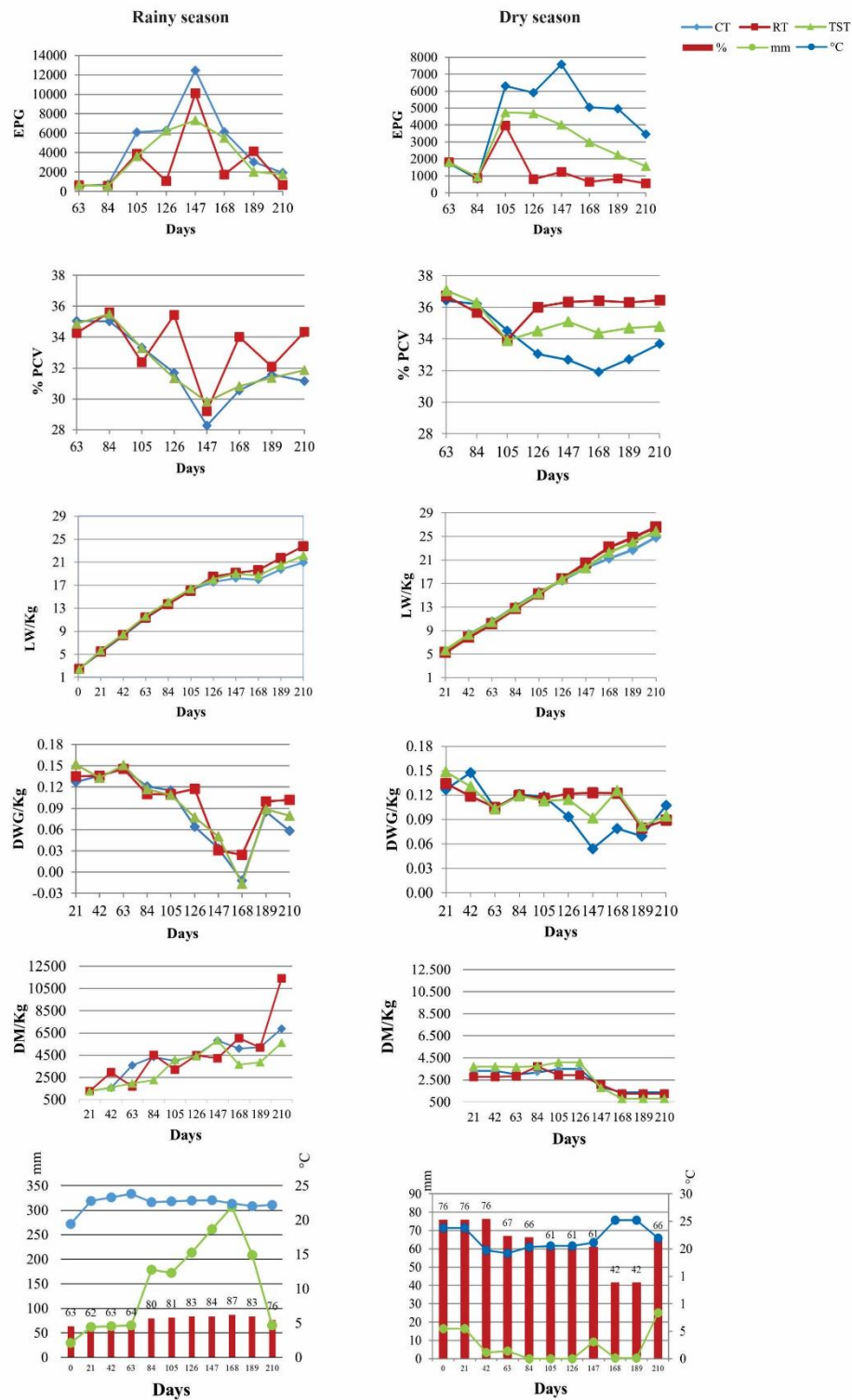


Figure 1: Means of eggs per gram of feces (EPG), packed cell volume (%PCV), live weight (LW/kg), daily weight gain (DWG/kg), dry matter of the forage in pasture (DM/kg) and climatic conditions (air relative humidity (%), rainfall (mm) and temperature (°C) for Morada Nova lambs in control (CT), routine (RT) and targeted selective treatments (TST), in the rainy and dry seasons at Embrapa Pecuária Sudeste in São Carlos, SP, Brazil.

Table 1. Means and standard error (SE) of eggs per gram of feces (EPG) counts in control (CT), routine (RT) and targeted selective (TST) treatments, in the different experimental days, in Morada Nova lambs, during the rainy (R) and dry (D) seasons (S).

S	Treat	D63	D84	D105	D126*	D147*	D168*	D189*	D210*	Mean*	SE
R	CT	620.0	730.9	6109.2	6301.3a	12448.0	6138.4a	3040.3	1932.6a	4665.1 a	490.7
	RT	663.2	587.3	3884.2	1091.2b	10096.0	1736.9b	4130.4	676.2b	3063.5b	493.6
	TST	686.8	554.0	3615.8	6237.4a	7317.1	5495.5a	2036.8	1753.1a	3462.0ab	492.1
D	CT	1746.6	823.3	6298.0	5916.2a	7573.0a	5044.6a	4947.9a	3450.9a	4475.1a	286.6
	RT	1816.3	886.1	3957.9	793.7c	1227.7c	647.9c	843.0c	561.4c	1341.7c	287.3
	TST	1782.4	919.1	4748.1	4682.5b	4016.2b	2968.1b	2232.1b	1558.7b	2863.4b	285.8

* Different letters in the same column indicate statistical differences between treatments by Tukey's test ($p \leq 0.05$), within each season.

Table 2. Means and standard error (SE) of packed cell volume (PCV) in the control (CT), routine (RT) and targeted selective (TST) treatments, in different experimental days, in Morada Nova lambs, during the rainy (R) and dry (D) seasons (S).

S	Treat	63	84	105	126*	147*	168*	189*	210*	Mean*	SE
R	CT	35.0	35.0	33.3	31.7b	28.2	30.5b	31.6	31.2b	32.1b	0.2
	RT	34.3	35.6	32.4	35.4a	29.2	34.0a	32.1	34.3a	33.4a	0.2
	TST	34.9	35.5	33.3	31.3b	29.8	30.8b	31.3	31.7b	32.3b	0.2
D	CT	36.4	36.2	34.5	33.0b	32.7b	31.9c	32.7b	33.7b	33.9b	0.5
	RT	36.7	35.7	33.9	36.0a	36.3a	36.4a	36.3a	36.4a	36.0a	0.5
	TST	37.1	36.3	33.9	34.5b	35.1a	34.4b	34.7a	34.8b	35.1a	0.5

* Different letters in the same column indicate statistical difference between treatments by Tukey's test ($p \leq 0.05$), within each season.

Table 3. Means and standard error (SE) of average live weight in control (CT), routine (RT) and targeted selective (TST) treatments, in different experimental days, in Morada Nova lambs, during the rainy (R) and dry (D) seasons (S).

S	Treat	0	21	42	63	84	105	126*	147*	168*	189*	210*	Mean*	SE
R	CT	2.43	5.32	8.17	11.23	13.77	16.18	17.52	18.22	17.96	19.75b	20.94b	13.77	0.41
	RT	2.47	5.51	8.36	11.41	13.72	16.03	18.48	19.12	19.63	21.71a	23.80a	14.57	0.41
	TST	2.40	5.69	8.47	11.63	14.08	16.37	17.98	19.03	18.69	20.51ab	22.12b	14.27	0.41
D	CT	2.48	5.51	8.36	10.54	13.08	15.56	17.52b	19.63c	21.29b	22.71	24.86	14.69	0.52
	RT	2.47	5.26	7.86	10.14	12.71	15.19	17.83a	20.46a	23.17a	24.80	26.59	15.13	0.52
	TST	2.45	5.70	8.33	10.50	12.99	15.37	17.77a	19.70b	22.33a	24.02	25.90	15.01	0.52

* Different letters in the same column indicate statistical difference between treatments by Tukey's test ($p \leq 0.05$), within each season.

Table 4. Means and standard error (SE) of average daily weight gain (DWG) in control (CT), routine (RT) and targeted selective (TST) treatments, in different experimental days, in Morada Nova lambs, during the rainy (R) and dry (D) seasons (S).

S	Treat	21	42	63	84	105	126*	147*	168*	189	210*	Mean*	SE
R	CT	0.13	0.14	0.15	0.12	0.12	0.06b	0.03	-0.01b	0.09	0.06c	0.087b	0.002
	RT	0.14	0.14	0.15	0.11	0.11	0.12a	0.03	0.02a	0.10	0.10a	0.101a	0.002
	TST	0.15	0.13	0.15	0.12	0.11	0.08b	0.05	-0.02b	0.09	0.08b	0.094b	0.002
D	CT	0.13	0.15	0.10	0.12	0.12	0.09b	0.05c	0.08b	0.07	0.11	0.102b	0.004
	RT	0.13	0.12	0.10	0.12	0.12	0.12a	0.12a	0.12a	0.08	0.09	0.113a	0.004
	TST	0.15	0.13	0.10	0.12	0.11	0.11a	0.09b	0.13a	0.08	0.09	0.112a	0.004

* Different letters in the same column indicate statistical difference between treatments by Tukey's test ($p \leq 0.05$), within each season.

Table 5. Number (percentage) of anthelmintic treatments used in control (CT), routine (RT) and targeted selective (TST) treatments, in different experimental days, in Morada Nova lambs, during the rainy (R) and dry (D) season (S).

S	TRAT	D84	D105	D126	D147	D168	D189	D210	Total	Média
R	CT	0	0	2(5.3%)	7(18.4%)	3(7.9%)	0	0	12	10.5%
	RT	0	38(100%)	0	38(100%)	0	38(100%)	0	114	100%
	TST	0	8(21.1%)	10(26.3%)	11(28.9%)	12(31.6%)	12(31.6%)	9(23.7%)	62	27.2%
D	CT	0	0	1(2.9%)	1(2.9%)	2(5.9%)	2(5.9%)	0	6	4.4%
	RT	0	34(100%)	0	34(100%)	0	34(100%)	0	102	100%
	TST	0	12(35.3%)	13(38.2%)	13(38.2%)	9(26.5%)	10(29.4%)	10(29.4%)	67	32.8%

Table 6. Lethal concentrations (LC, $\mu\text{g/mL}$) obtained in RESISTA-Test[®], percentages of anthelmintic efficacy in FECRT and percentages of *Haemonchus contortus* with resistant genotypes by PCR (D63 and D210) in control (CT), routine (RT) and targeted selective (TST) treatments in the rainy (R) and dry (D) seasons (S).

Treat	Rainy						Dry							
	RESISTA-Test [®]				FECRT	PCR	RESISTA-Test [®]				FECRT	PCR		
	LC ₅₀	LC ₉₀	LC ₉₅	LC ₉₉	D210	D63*	D210	LC ₅₀	LC ₉₀	LC ₉₅	LC ₉₉	D210	D63	D210
CT	0.482	4.471	8.424	27.712	66.4	50.0	57.1	0.437	5.914	12.377	49.463	90.7	59.0	47.8
RT	1.926	17.277	32.34	105.593	24.1		71.4	0.851	11.793	24.849	100.57	12.4	51.9	55.9
TST	0.117	0.797	1.374	3.821	76.4		40.0	0.045	0.441	0.839	2.806	64.8	42.4	41.9

*Fecal culture performed in pool and not by group.

Table 7. Nematode classification, sex and mean after necropsy of the lambs in control (CT), routine (RT) and targeted selective (TST) treatments in the rainy (R) and dry (D) seasons (S).

S	Treat	<i>H. contortus</i>				<i>T. colubriformis</i>			<i>O. columbianum</i>			<i>C. curticei</i>		
		F	M	L ₄	T	F	M	T	F	M	T	F	M	T
R	CT	1445	985	1155	3585	735	510	1245	0	0	0	11	14	250
	RT	1200	1360	2500	5060	1685	1185	2870	0	0	0	5	5	10
	TST	1900	1400	1635	4935	945	690	1635	15	10	25	40	50	90
Total		4545	3745	5290	13580 (68.9%)	3365	2385	5750 (29.2%)	15	10	25 (0.1%)	15	19	350 (1.8%)
D	CT	477	397	77	951	583	493	1076	3	3	6	3	3	6
	RT	30	37	0	67	367	270	637	0	0	0	0	0	0
	TST	120	110	10	240	453	350	803	0	0	0	3	3	6
Total		627	544	87	1258 (33.2%)	1403	1113	2516 (66.4%)	3	3	6 (0.1%)	6	6	12 (0.3%)

F: female; M: male; T: total.

CÁPITULO 3 - Uso da espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) para estudo da relação do volume globular com a infecção por nematódeos gastrintestinais em ovinos Morada Nova

Resumo

Dentre as espécies de nematódeos gastrintestinais (NGI), *Haemonchus contortus* é a de maior prevalência e importância em pequenos ruminantes, por reduzir os valores de volume globular (VG) nos animais, causando anemia. O diagnóstico precoce da infecção por NGI pode ser utilizado para o tratamento seletivo direcionado (TST) de ovinos, reduzindo o uso de antiparasitários e a resistência anti-helmíntica. O objetivo deste estudo foi prever os valores de VG a partir da coleta dos espectros NIR e criar um modelo de classificação e de diagnóstico da infecção por NGI empregando valores de VG, de contagem de ovos por grama nas fezes (OPG) e de ganho médio diário de peso (GMD). Foram coletados 1728 espectros de amostras de sangue de 216 cordeiros, obtidos com equipamento portátil. Paralelamente, outros parâmetros indicativos de infecção foram medidos nos animais: o volume globular (VG), o grau FAMACHA, a contagem de ovos por grama nas fezes (OPG) e o ganho médio diário de peso (GMD). A fim de se avaliar a relação dos espectros NIR com os parâmetros avaliados, empregou-se a análise de componentes principais (PCA) como análise exploratória, a regressão pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS) para a predição dos valores de VG via NIRS e a análise discriminante linear (PCA-LDA) como modelo de classificação para o diagnóstico. Quanto à padronização da metodologia, os pré-tratamentos utilizados nos 1728 espectros NIR foram eficientes na remoção da variância indesejada dos espectros originais. Os picos de absorção na região NIR associados à excitação de sobretons de grupos funcionais NH de proteínas tiveram grande peso nas componentes principais (PCs), indicando que as proteínas no sangue, em especial a hemoglobina, podem ser estimadas pela técnica NIRS. O modelo para predição do VG pela PLS apresentou erro padrão de predição de 2,526%, raiz da média quadrática dos erros de previsão (RMSEV) de 2,48% e coeficiente de determinação R^2 de $r^2_{\text{Val}} = 0,837$, indicando boa correlação entre os valores de VG preditos pelo modelo desenvolvido e o VG obtido pelo hematócrito. A precisão e a exatidão encontradas para a técnica NIRS foram consideradas adequadas. O modelo PCA-LDA apresentou sensibilidade de 93,33% e especificidade de 73,21%, sendo que

os parâmetros de sensibilidade e acurácia foram superiores aos do método FAMACHA. Os modelos multivariados associados à técnica NIRS desenvolvidos neste trabalho poderão ser empregados futuramente como uma ferramenta rápida e versátil para o diagnóstico da infecção por NGI e para a realização do TST em cordeiros Morada Nova.

Palavras-chave: controle parasitário, pequenos ruminantes, anemia, método FAMACHA, diagnóstico, NIRS, Análise Discriminante Linear.

1. Introdução

Os nematódeos gastrintestinais (NGI) representam uma das maiores causas de perdas produtivas na criação de pequenos ruminantes no Brasil, com destaque para a espécie *Haemonchus contortus*, causadora da hemoncose (Maia et al., 2013)). *H. contortus* se adere à mucosa do abomaso e provoca lesões que alteram a secreção do ácido clorídrico e do pepsinogênio, promovendo uma falha na digestão proteica do animal. Porém, o maior prejuízo se deve ao fato deste helminto ser hematófago. Com isto, ovinos com infecção maciça por esta espécie desenvolvem um quadro de anemia, causando a perda de produtividade e elevada taxa de mortalidade (Muchiut et al., 2019). *Trichostrongylus colubriformis* provoca lesões entéricas que diminuem a eficiência no uso de alimentos (menor absorção e diarreia), o que reduz a produtividade e aumenta a ocorrência de óbitos (Roeber et al., 2013), quadro similar ao provocado por *Cooperia sp*, que em ovinos leva a infecção leve (Amarante et al., 2014). *Oesophagostomum columbianum*, por sua vez, causa enterite nodular decorrente das mudas larvais, que provocam formações calcificadas no intestino grosso (Jas et al., 2017).

A resistência parasitária aos anti-helmínticos tem sido um dos maiores desafios no controle dos NGI (Pereira et al., 2016). Os tratamentos seletivos direcionados (Target Selective Treatment – TST) têm se apresentado como uma das estratégias eficientes para desacelerar o estabelecimento da resistência parasitária (Costa et al., 2011). Portanto, ferramentas de diagnóstico rápido e preciso da anemia se tornam essenciais para a eficiência do TST e o combate da hemoncose (Muchiut et al., 2019).

O hematócrito é a principal metodologia para diagnóstico clínico da anemia em animais. Essa técnica consiste na centrifugação da amostra e mede o volume globular (VG) compactado de sangue com a separação e determinação da fração de glóbulos vermelhos (eritrócitos) presente no sangue total. O VG é considerado um método preciso, porém, requer a preparação das amostras e a realização dos ensaios em laboratório (González e Silva, 2008). O tempo de realização do método é inadequado para o TST, uma vez que o laudo só chega ao produtor após a análise clínica em laboratório. Assim, não é possível diagnosticar os animais já contidos nos currais e tratá-los imediatamente e seletivamente.

O método FAMACHA tem sido utilizado para a detecção do grau de anemia a campo, o qual é associado à coloração da mucosa conjuntival dos animais (Van Wyk e Bath, 2002; Van Wyk e Mayhew, 2013). Todavia, treinamento técnico para utilização correta do cartão, e tempo adequado para adaptação e implantação da técnica na propriedade, são requisitos indispensáveis para o sucesso da técnica (Chagas et al., 2007). Desta forma, este método pode estar sujeito a falhas devido à subjetividade, imprecisão, falta de sensibilidade e especificidade.

O diagnóstico impreciso pode levar à disseminação da hemonose, perda de produtividade, óbitos ou ainda contribuir para o uso excessivo de anti-helmínticos, favorecendo a resistência (Pereira et al., 2016). Desta forma, o estabelecimento do TST requer tecnologia de diagnóstico analiticamente precisa, rápida e acessível, que possa ser aplicada a campo no momento da coleta das amostras. A espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) emprega a radiação eletromagnética na região do infravermelho próximo com fótons que apresentam comprimentos de onda entre 750 nm e 2.500 nm, correspondente à faixa de número de onda entre 4.000 cm^{-1} e 13.333 cm^{-1} . Os espectros NIRS são formados pela absorção da radiação pelas amostras, promovendo a excitação dos sobretons e combinações dos modos vibracionais associados às seguintes ligações C-H, N-H, S-H e O-H. Métodos matemáticos como as técnicas de análise multivariada são necessários para resgatar a informação química presente nos espectros (Pasquini, 2003).

A técnica NIRS tem sido amplamente utilizada para determinar os constituintes majoritários de diversas matrizes de interesse agrícola desde a década de 80 (Jintao et al, 2017), mas seu uso como ferramenta de diagnóstico na zootecnia e na medicina

veterinária tem sido pouco explorado. Na área da saúde, o aparelho NIRS tem detectado no sangue: teor de glicose em camundongos (Jintao et al., 2017), alterações para o diagnóstico precoce de câncer (Raja et al., 2019) e anemia em humanos (Sakudo et al., 2009). O NIRS também vem sendo empregado na análise do plasma sanguíneo para diagnóstico da AIDS (Sakudo, 2005; Bahmani et al., 2009), da doença de Alzheimer (Paraskevaidi et al., 2018; Carmona et al., 2013; Burns et al., 2009), além da prenhez em ovelhas (Andueza et al., 2014) e da Doença Respiratória Bovina (DRB) em bezerros leiteiros (Santos-Rivera et al., 2021). Portanto, este estudo teve por objetivos prever os valores de VG a partir da coleta dos espectros NIR e criar um modelo de classificação e de diagnóstico empregando valores de VG, de contagem de ovos por grama nas fezes (OPG) e de ganho médio diário de peso (GMD).

2. Material e métodos

2.1 Animais experimentais e coleta das amostras

O trabalho experimental foi desenvolvido com o rebanho ovino da raça Morada Nova, da Embrapa Pecuária Sudeste - CPPSE, localizada no município de São Carlos, no estado de São Paulo. Participaram do experimento 216 cordeiros (114 no ano 1 e 102 no ano 2), sendo 117 machos e 99 fêmeas, submetidos à infecção natural por NGI. As coletas das amostras foram realizadas do 63º dia de vida (D63) aos 210º dias de vida (D210), a cada 21 dias, totalizando 8 datas de coleta (D63, D84, D105, D126, D147, D168, D189 e D210), quando foram avaliados VG, grau FAMACHA, OPG, GMD e foram coletados os espectros com o equipamento NIRS portátil. Todos os animais receberam tratamento anti-helmíntico no D63 (Ripercol® L - 150F, levamisol 18,8% injetável, 9,4 mg/kg) para estabelecer o início do experimento.

Foram coletadas 1728 amostras de fezes direto da ampola retal dos animais para realização da contagem de OPG individual (Ueno e Gonçalves, 1998) e coproculturas por pool de fezes dos animais (Roberts e O'Sullivan, 1950). Os exames coproparasitológicos foram importantes para quantificar o grau de infecção em cada animal e identificar os gêneros de parasitas mais prevalentes.

A avaliação do grau FAMACHA foi realizada por um único veterinário habilitado e experiente na realização do método na tentativa de reduzir o viés de subjetividade. Após a contenção dos cordeiros, a mucosa ocular conjuntiva foi exposta e classificada em uma das cinco categorias, variando de 1 (coloração vermelho brilhante, animal saudável) até 5 (coloração pálida, quase branco, anemia grave), que estão associadas a diferentes valores de VG (Van Wyk e Bath, 2002).

Foram coletadas 1728 amostras de sangue por punção venosa utilizando frascos (Vacutainer BD) de 4 mL, contendo o ácido etilenodiaminotetracetato dissódico (EDTA). Cada amostra foi dividida em dois frascos, sendo um deles empregado para a determinação do VG e o outro para análise pela técnica NIRS. Capilares para microhematócrito foram preenchidos com sangue e em seguida centrifugados a 10400 rpm por 6 minutos (Hettich). As células vermelhas foram então separadas das células brancas e do plasma e o VG compactado medido com o auxílio de escala padronizada (González e Silva, 2008).

2.2 Coleta dos espectros NIRS e análises das amostras de sangue dos ovinos

Uma alíquota de 1mL das amostras de sangue foram transferidas dos tubos Vacutainer para placas de cultivo de 12 poços (Kasvi). Na sequência, os espectros NIRS de cada uma das amostras foram coletados, no modo de reflectância difusa, em triplicata, com o espectrômetro portátil de infravermelho próximo DLP®NIRscan™ Nano da Texas Instruments, com faixa espectral de 900 a 1700 nm.

2.2.1 Análise Multivariada e classificação dos dados

Os espectros NIRS coletados foram tratados pelo software de análise multivariada Unscrambler X® (v.10.3, Camo Analytics). A análise exploratória dos dados foi realizada através da análise de componentes principais (PCA). Foi desenvolvido modelo de regressão multivariada pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS) para quantificação de VG a partir dos espectros NIRS e desenvolvido modelo de classificação empregando-se o método de análise discriminante linear (PCA-LDA) para o diagnóstico da infecção por NGI.

2.2.2 Análise dos Componentes Principais (PCA)

A PCA promove a redução da dimensionalidade dos dados, utilizando apenas a informação contida nos espectros infravermelhos sem empregar os dados obtidos pelos métodos diagnósticos de referência (OPG, VG, FAMACHA e GMD). Possibilita visualizar a estrutura interna dos dados, auxilia na identificação de dados anômalos e permite selecionar um número menor de espectros, preservando a variabilidade intrínseca dos dados. A matriz de dados brutos "**X**" é decomposta em um modelo PCA como o produto entre uma matriz de escores "**T**" e uma matriz de pesos (loadings) "**P**", de acordo com a equação matricial: $\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E}$, onde as componentes principais são as colunas da matriz de escores e "**E**" é a matriz de resíduos. "**E**" contém a variância dos dados que pode ser desprezada na construção do modelo após a redução da dimensionalidade. A ordem das colunas, na matriz de escores, representa as componentes principais PC1, PC2 etc. A primeira componente principal é direcionada no sentido de maior variação dos dados e possui correlação com uma determinada mudança química possível de ser visualizada através de uma variação nos espectros NIRS. A segunda componente principal está ortogonalmente orientada em relação a PC1 e está na direção de maior porcentagem da variação não explicada pela PC1 e assim por diante. Cada componente principal subsequente não está correlacionada com nenhuma outra componente principal e correspondem as outras fontes de variância química nas amostras (ISO 12099:2010).

Os escores representam as coordenadas das amostras nos eixos das componentes principais. A posição relativa das amostras indica o grau de similaridade entre as amostras no plano de projeção das PCAs. Amostras com escores semelhantes são amostras com características espectrais semelhantes e amostras com características espectrais distintas ocupam posições distantes entre si no plano de projeção. A matriz de loadings "**P**", por sua vez, compreende as contribuições das variáveis dos espectros (comprimentos de onda) na construção das componentes principais. Quando o peso (loading) de uma variável do espectro é maior para uma determinada PC, significa que aquela região do espectro deve ser importante para a mudança química que está sendo investigada.

Neste trabalho, em relação à infecção por NGI, os animais foram classificados em saudáveis ou doentes de acordo com os valores de VG, OPG e GMD conforme descritos na Tabela 1. Um dado animal foi considerado saudável quando atendeu simultaneamente a pelo menos dois dos três critérios adotados. De modo análogo, foi aplicado o conceito para diagnosticar animal doente. Dada à peculiaridade da raça Morada Nova em relação à manifestação dos sinais clínicos característicos da infecção, ou seja, animais resilientes/resistentes (Toscano et al., 2019a; 2019b, Haehling et al., 2020), esse critério pareceu adequado para a nossa abordagem. Como a porcentagem de cordeiros classificados com grau FAMACHA 3 (1,3 %), 4 (0,2%) e 5 (0%) foi muito baixa, e muitas vezes não apresentava concordância com os demais métodos de referência, optou-se por excluir este método como critério de diagnóstico para os animais doentes e saudáveis que integrariam o modelo de classificação obtido pelo PCA-LDA.

Tabela 1. Critérios adotados para o diagnóstico dos cordeiros Morada Nova em doentes e saudáveis a partir dos valores de VG, OPG e GMD.

Categorias*	VG	OPG	GMD
Doentes	$\leq 26\%$	≥ 4000	$\leq 0,049$ kg
Saudáveis	$\geq 27\%$	≤ 3999	$\geq 0,050$ kg

* atenderam simultaneamente a pelo menos dois dos três critérios adotados.

2.2.3 Método de regressão Linear dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

A regressão parcial de mínimos quadrados é uma técnica analítica que realiza a compressão dos dados diminuindo a sua dimensionalidade. No caso do PLS os fatores latentes criados maximizam a covariância entre os dados Y (Propriedade modelada, VG) com a matriz de dados X (espectros NIRS pré-tratados). Assim, cada fator latente do modelo PLS, além de maximizar a variância como a PCA, também maximiza a correlação com a propriedade Y (VG). O primeiro fator latente (FL1) é direcionado no sentido da maior covariância entre a matriz X dos espectros e o vetor Y da propriedade (VG). O segundo fator latente (FL2) está ortogonalmente orientado em relação a FL1 e está na direção da maior covariância entre X e Y não explicada pela FL1 e assim por diante para os FL seguintes.

O número de fatores latentes foi escolhido de forma a minimizar a raiz quadrada do erro médio de calibração (RMSEC) e a raiz quadrada do erro médio de validação (RMSEV) para a determinação do VG. Tais parâmetros são medidas da exatidão do modelo de regressão e medem o desvio médio entre os valores de VG preditos (\hat{y}_i) pelo modelo NIRS e os valores de VG experimentais (y_i) obtidos pelo hematócrito. O RMSEC mede a exatidão do ajuste do modelo ao conjunto dos dados de calibração e o RMSEV mede a exatidão do modelo frente a amostras desconhecidas (análises da rotina).

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{N_{CV}}} \quad RMSEV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{N_P}}$$

2.2.4 Análise discriminante linear (PCA-LDA)

No PCA-LDA os escores obtidos na análise de PCA dos espectros NIRS, após a redução de dimensionalidade, são empregados para construir o modelo LDA, o qual em nosso conjunto de dados determina uma função discriminante (DF) que emprega uma superfície de decisão (hiperplano). Esta superfície limite é definida para maximizar a diferença entre as classes, maximizando o número de diagnósticos de verdadeiros positivos (animais doentes) e verdadeiros negativos (animais saudáveis) (ISO 12099:2010).

A superfície de decisão calculada é um hiperplano que satisfaz a equação para n dimensões:

$$k(x) = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_nx_n = 0$$

As amostras pertencentes à classe A (saudáveis) devem possuir coordenadas de tal modo que $k(x)$ seja positivo e as amostras pertencentes à classe B (doentes) devem possuir coordenadas em que $k(x)$ resulte negativo.

Os 526 espectros pré-tratados selecionados foram divididos em um conjunto de calibração e validação cruzada (420 espectros – 80%) e em um conjunto de validação externa (105 espectros – 20%), para a construção do modelo PCA-LDA. Em seguida, 303 espectros foram analisados para testar o desempenho do modelo PCA-LDA desenvolvido com um conjunto maior de amostras. Uma matriz de confusão foi

construída para o modelo PCA-LDA dos espectros NIRS e comparada a uma matriz de confusão obtida para os métodos de referência (OPG, VG e GMD).

2.6. Figuras de mérito dos modelos de diagnóstico

O modelo de classificação PCA-LDA desenvolvido foi avaliado pelas seguintes figuras de mérito: sensibilidade, especificidade, precisão e acurácia. A sensibilidade do método de diagnóstico é a capacidade de reconhecer corretamente um resultado verdadeiro positivo para o alvo em questão (Wong et. Al, 2011), conforme a equação: $\text{Sensibilidade (\%)} = \text{VP}/(\text{VP} + \text{FN}) \times 100$, onde VP = verdadeiro positivo e FN = Falso negativo. A especificidade é definida como a capacidade de identificar corretamente uma amostra oriunda de um animal saudável, resultado verdadeiro negativo, dentre o conjunto de indivíduos sem a doença, representada pela equação: $\text{Especificidade (\%)} = \text{VN}/(\text{VN} + \text{FP}) \times 100$, onde VN = verdadeiro negativo e FP = falso positivo. Já a acurácia é a medida da proporção de indivíduos classificados corretamente (Glas et. al. 2003) conforme a equação: $\text{Acurácia (\%)} = (\text{VP} + \text{VN})/(\text{VP} + \text{VN} + \text{FP} + \text{FN}) \times 100$. Analisando a equação 3 torna-se evidente que a baixa sensibilidade e especificidade compromete a acurácia do método como um todo. A precisão é definida pela razão entre os casos classificados corretamente como positivos e o total de casos positivos, de acordo com a equação: $\text{Precisão (\%)} = \text{VP}/(\text{VP} + \text{FP}) \times 100$.

3. RESULTADOS

3.1. Diagnóstico dos animais

Dentre as 526 amostras utilizadas, 116 foram diagnosticadas como provenientes de animais doentes (22%) e 410 de animais saudáveis (78%), conforme pode ser visualizado na Tabela 2. Para os animais diagnosticados como doentes, o critério $\text{OPG} \geq 4000$ foi o mais frequente, estando presente em 104 animais que correspondeu a 89,6% das amostras deste agrupamento. Já entre os animais diagnosticados como saudáveis, o critério $\text{VG} \geq 27\%$ foi o que mais ocorreu, estando presente em 405 das 410 amostras diagnosticadas, ou seja, em 98,8% delas.

Tabela 2. Ocorrência dos parâmetros de classificação em amostras de cordeiros Morada Nova infectados por NGI, diagnosticados como doentes (combinação de pelo menos dois dos três critérios: VG \leq 26%, OPG \geq 4000, GMD \leq 0,049 kg) e saudáveis (combinação de pelo menos dois dos três critérios: VG \geq 26%, OPG \leq 3999, GMD \geq 0,050 kg).

Categorias	VG	OPG	GMD
Doentes 22% (116)	67,2% (78)	89,6% (104)	80,2% (93)
Saudáveis 78% (410)	77% (405)	66,5% (350)	72,8% (383)

Por meio das coproculturas foi possível verificar a presença dos gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Cooperia* e *Oesophagostomum*, sendo 81,6%, 10,3%, 5,0% e 3,1%, respectivamente no ano 1, e 83,3%, 12,6%, 3,5% e 0,6%, respectivamente no ano 2.

3.2 NIRS e pré-tratamentos

O trabalho resultou na construção de 2 modelos multivariados. O primeiro foi um modelo quantitativo de regressão linear por PLS, que possibilitou prever os valores de VG a partir da coleta dos espectros NIR. O segundo foi um modelo de classificação e diagnóstico que empregou os dados de VG, OPG e GMD na sua construção para a classificação entre animais doentes ou saudáveis. O FAMACHA foi excluído como parâmetro de referência na construção do modelo de classificação, mas por ser um método bastante utilizado, foi usado para comparar a qualidade do modelo gerado pelos espectros NIRS como método alternativo ao FAMACHA

Conforme esperado, os espectros NIR coletados das amostras de sangue de ovinos apresentaram espalhamento causado pela reflectância difusa da radiação NIR nas amostras, como é possível observar através do deslocamento da linha de base presente nos espectros originais (Figura 1A). Nos espectros NIR, sobretudo naqueles coletados no modo de reflectância difusa, é comum a existência de uma variância sistemática indesejável que dificulta a aquisição da variância química de interesse. Visando corrigir a variância indesejada causada pelo ruído aleatório, a reflexão especular e o efeito de espalhamento da radiação, os espectros médios originais foram submetidos aos seguintes pré-tratamentos: alisamento de média móvel com

janela de 3 pontos; o método de variação normal padrão (SNV) e a primeira derivada empregando o algoritmo de Savitzky-Golay com polinômio de grau 2 e janela simétrica de 9 pontos (Figura 1B). Os pré-tratamentos utilizados foram então eficientes para a remoção da variância indesejada, os espectros pré-tratados não apresentaram deslocamento, nem inclinação na linha de base, sendo possível observar os comprimentos de onda nos quais ocorreram as maiores mudanças na intensidade corrigida da absorbância entre os espectros pré-tratados de animais saudáveis e doentes (em destaque na Figura 1B).

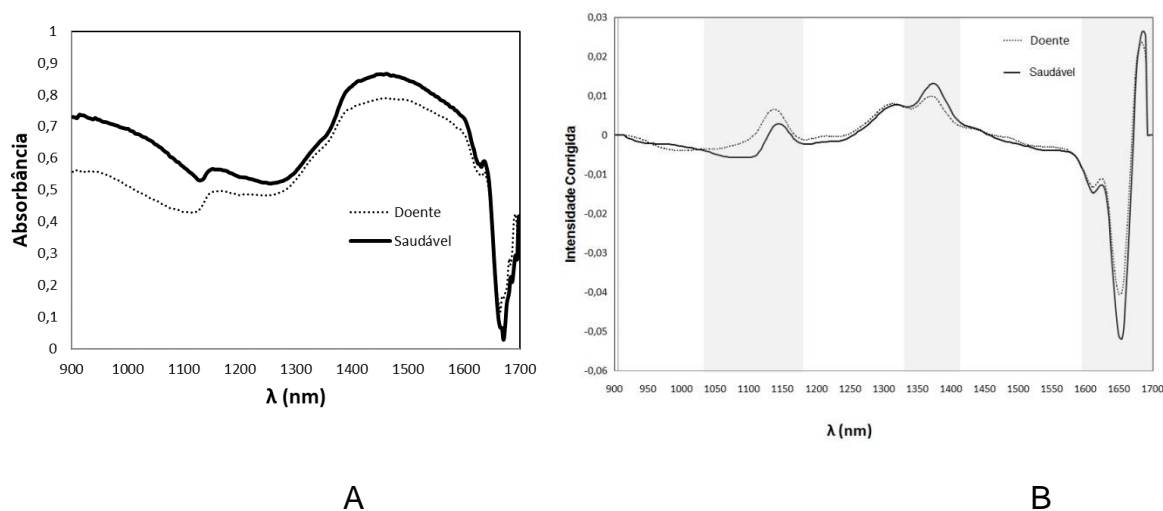


Figura 1: A) Espectros NIR originais: amostra de sangue de ovinos classificados como doentes (····) ou saudáveis (—) quanto à infecção por NGI, de acordo com todos os métodos de referência (VG, OPG e GMD). B) Espectros NIR pré-tratados (média móvel, SNV e 1ª derivada): para as mesmas amostras, classificadas como doentes (····) ou saudáveis (—).

3.3 Análises dos Componentes Principais (PCA)

Uma PCA inicial foi realizada no conjunto de dados com os 1728 espectros NIRS coletados. Para a construção dos modelos foram removidas as amostras de comportamento anômalo, isto é, muito deslocadas do resto do conjunto de dados. As 116 amostras de animais diagnosticados como doentes no conjunto de dados inicial foram mantidas no subconjunto de dados selecionados. Dentre as amostras de animais saudáveis no conjunto de dados inicial, foram selecionadas aleatoriamente 410 amostras nos quatro quadrantes da PCA, buscando-se um conjunto de dados

experimentais mais equilibrados (entre doentes e saudáveis). Esse procedimento foi fundamental para balancear o modelo, visto que o número de amostras de animais diagnosticados como saudáveis era bem superior aos diagnosticados como doentes. O subconjunto com 526 amostras resultante apresentou grande variabilidade entre as amostras e uma boa representatividade do conjunto de dados inicial.

Os 526 espectros médios pré-tratados foram inicialmente analisados pelo algoritmo iterativo de mínimos quadrados parciais interativos não lineares (NIPALS) através de 15 componentes principais, porém, a utilização das 6 primeiras PCs foram suficientes para explicar 96% da variância observada nos dados originais, indicando que um aumento na complexidade do modelo não era necessária. A projeção dos dados dos espectros nas novas coordenadas (escores) acentuou as similaridades e disparidades das diferentes amostras. Desta forma, a partir da análise do gráfico de escores da PCA (PC2 x PC4), foi possível observar a separação entre os espectros de animais doentes e saudáveis (Figura 2A). O gráfico de escores entre a segunda e a quarta PC apresentou a maior separação entre os dois agrupamentos (Figura 2A). A análise de loadings das PCs apontou os comprimentos de onda cuja variação exibem a maior contribuição para as primeiras componentes principais (PC1 a PC4) (Figura 2B).

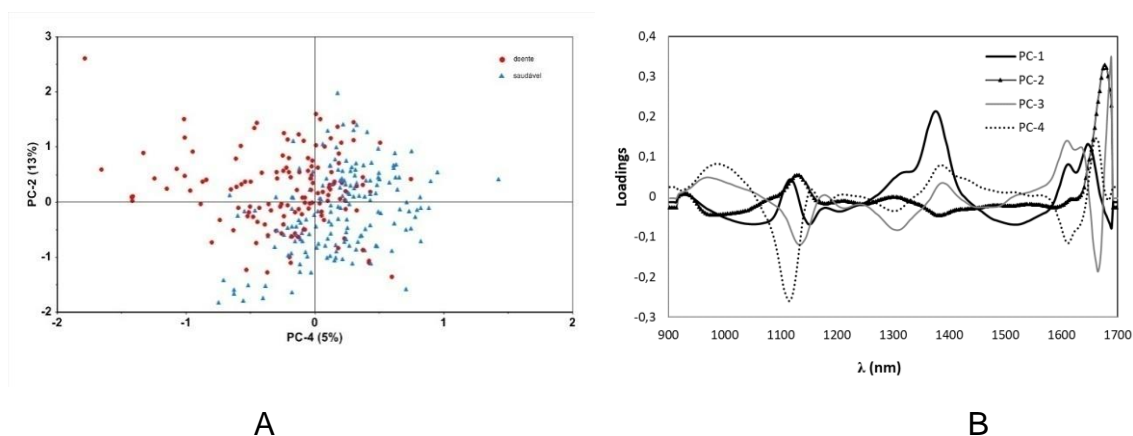
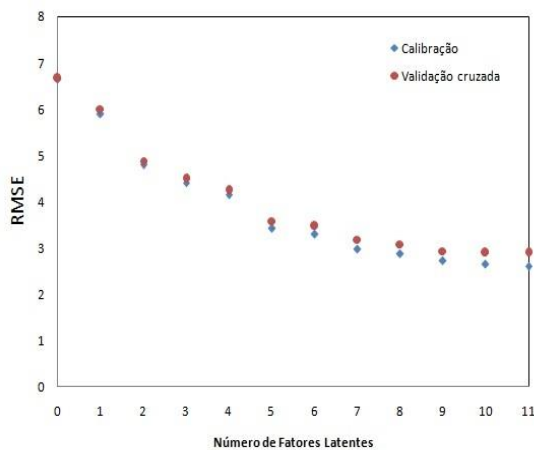


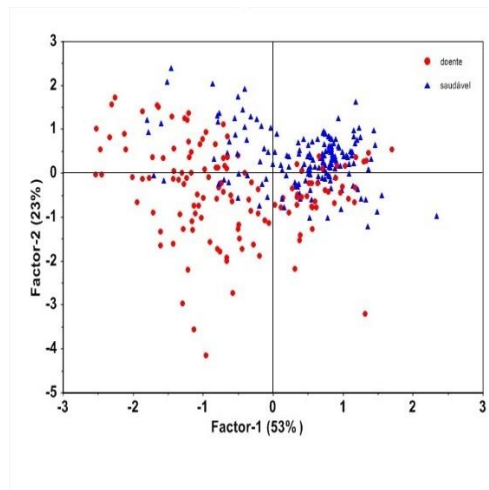
Figura 2: Análise de Componentes Principais dos espectros NIR (900 – 1700 nm) provenientes de amostras de sangue de ovinos classificados como doentes ou saudáveis em relação à infecção por NGI. A) Gráfico de escores entre as componentes principais PC2 e PC4 indicando a separação entre os espectros de animais doentes (vermelho) e saudáveis (azul). B) Análise de Loadings com as variáveis com a contribuição majoritária dos comprimentos de onda para as componentes principais (PC1 até a PC4).

3.4 Método de regressão Linear dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Os 380 espectros pré-tratados selecionados para a construção do modelo PLS foram divididos em um conjunto de calibração e validação cruzada (80%) contendo 303 espectros NIR e em um conjunto de validação externa (20%) contendo 77 espectros NIR. O modelo PLS foi desenvolvido pela associação dos espectros preditos pelo NIR e o método de VG obtido pelo hematócrito. Espectros dos dois agrupamentos foram aleatoriamente distribuídos entre o conjunto de calibração/validação cruzada e o conjunto de validação externa. Foram removidos 13 outliers do conjunto de calibração e 10 outliers do conjunto de validação externa. Para a seleção do número de fatores latentes do modelo PLS de NIRS empregado na predição do VG, observou-se que os valores das duas figuras de mérito (RMSEC e RMSEV) decrescem à medida que se aumentou o número de fatores latentes no modelo (Fig. 3A), indicando um aumento na exatidão do modelo até o 6º FL. Após o 6º fator latente os erros se estabilizaram e o aumento na complexidade do modelo (fatores latentes) não reduziu os valores de RMSEC e RMSEV (Fig. 3A). O gráfico de escores entre os fatores latentes FL1 e FL2 indicou uma separação entre os espectros de animais doentes e saudáveis (Figura 3B).



A



B

Figura 3: Método de regressão PLS dos espectros NIR (900 – 1700 nm) provenientes de amostras de sangue de ovinos classificados como doentes ou saudáveis em relação à infecção por NGI. A) Gráfico da variação da raiz quadrada do erro médio da calibração e raiz quadrada do erro médio da validação cruzada em função de diferentes números de fatores latentes. B) Gráfico de escores entre os fatores latentes FL1 e FL2, indicando uma separação entre os espectros de animais doentes (vermelho) e saudáveis (azul).

As regiões de maior variação nos espectros foram as bandas em 993, 1007 e 1139 nm, referentes ao 2º sobretom dos estiramentos dos grupos funcionais N-H, e as regiões de 1214, 1375, 1487 e 1552 nm, referentes ao 1º sobretom destes estiramentos. As absorções nas regiões 1625 e 1680 nm são referentes ao 1º sobretom dos estiramentos dos grupos funcionais C-H (Figura 4).

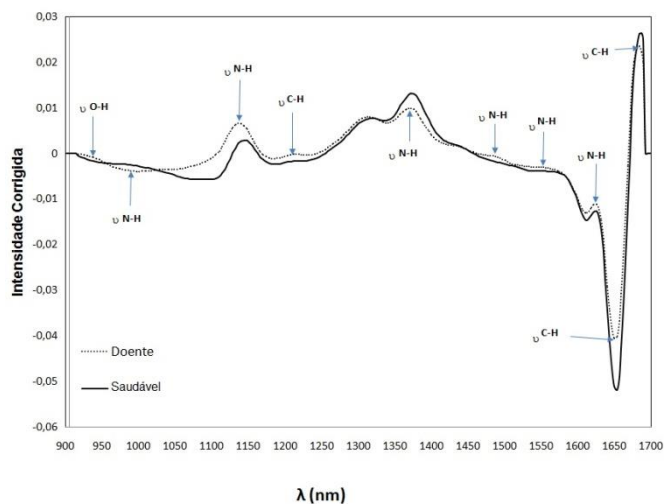


Figura 4: Espectros NIR (900 – 1700 nm) pré-tratados provenientes de amostras de sangue de ovinos classificados como doentes (⋯) ou saudáveis (—) quanto à infecção por NGI, em todos os métodos de referência (VG, OPG e GMD).

Um gráfico de regressão para o modelo PLS de quantificação de VG via NIRS é apresentado na Figura 5, onde a Figura 5A apresenta o modelo PLS de calibração e a Figura 5B ilustra a avaliação do modelo pela validação externa. Uma forte correlação entre os valores de VG preditos via NIRS e os obtidos via hematócrito foi determinada a partir do coeficiente de correlação do modelo de calibração cruzada ($r_{\text{Cal}} = 0,897$) e validação externa ($r_{\text{val}} = 0,915$).

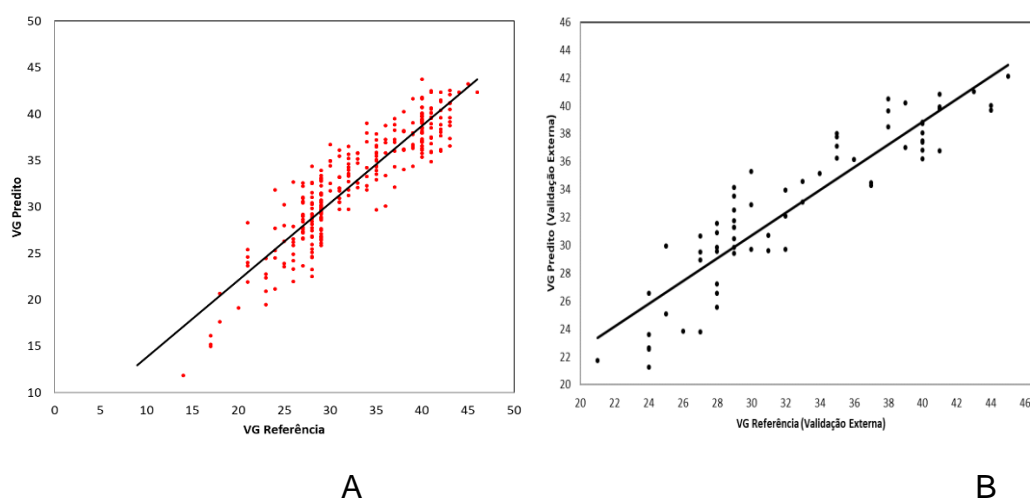


Figura 5: Modelo de regressão PLS: Valores obtidos pelo hematócrito versus valores preditos pelo modelo NIRS para o volume globular (VG). A) Modelo obtido pelo conjunto de calibração e validação cruzada. B) Avaliação do modelo a partir da validação externa.

A eficiência do modelo foi avaliada pela previsão dos resultados obtidos para o conjunto de amostras da validação externa. Estas amostras são externas, isto é, não estão incluídas no modelo de calibração, para que a avaliação do modelo seja fidedigna. O erro padrão de predição = 2,526%VG e o RMSEV = 2,48%VG, estimados pelo método de regressão linear PLS, indicaram que a informação presente nos espectros NIR é capaz de quantificar o VG com precisão e exatidão adequada para o propósito de monitoramento deste parâmetro no rebanho a campo (Tabela 3). O fato do RMSEC e o RMSEV possuírem valores similares indicou que o modelo está bem

ajustado e o número de fatores latentes selecionados foi adequado e sem sobreajuste (Tabela 3).

Tabela 3. Comparativo entre o volume globular (VG) obtido pelo hematócrito e os valores preditos para VG pela análise de PLS.

VG - Modelo PLS	Nº Espectros	Intercepto	Inclinação	r	r ²	Erro	
						Padrão	RMSE
Calibração	290	5,483	0,832	0,912	0,832	2,728	2,723
Validação Cruzada	290	5,682	0,825	0,897	0,825	2,942	2,937
Validação Externa	67	6,25	0,836	0,915	0,836	2,526	2,48

r: coeficiente de correlação, r²: coeficiente de determinação, RMSE: raiz quadrada do erro médio expresso em VG.

3.5. Análise discriminante linear (LDA)

O modelo PCA-LDA foi desenvolvido a partir dos 526 espectros NIRS selecionados pelo PCA dos 1728 espectros iniciais. O modelo PCA-LDA desenvolveu uma função discriminante (diagonal) que conseguiu separar linearmente as amostras de animais doentes das amostras de animais saudáveis, maximizando o número de diagnósticos corretos (Figura 6). Quanto mais distante as amostras estiverem da função discriminante, mais fácil para o modelo determinar a classe ao qual o espectro pertence e menor a chance de diagnosticar a classe de forma equivocada.

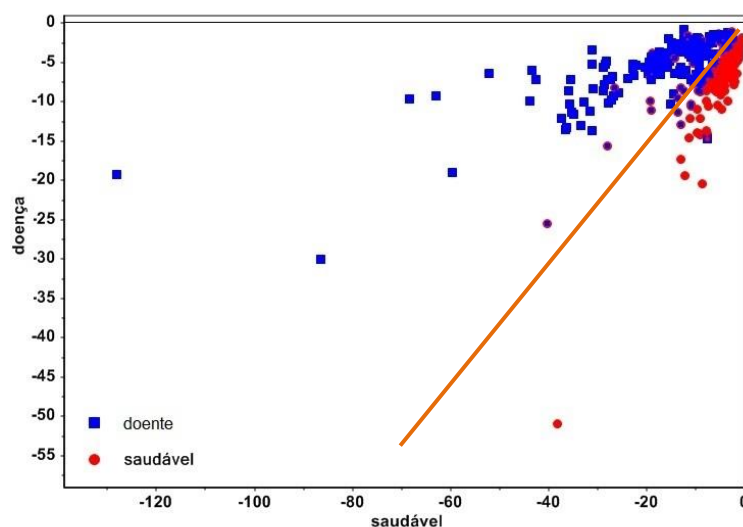


Figura 6: Gráfico do modelo de calibração para a análise discriminante linear (PCA-LDA) obtido dos espectros NIR (900 – 1700 nm) provenientes de amostras de sangue de ovinos classificados como doentes e saudáveis quanto à infecção por NGI.

A partir dos diagnósticos obtidos pelo modelo, para as 303 amostras de validação externa, foi montada a matriz de confusão do modelo PCA-LDA e comparada com as matrizes de confusão dos métodos de diagnóstico de referência (VG, OPG, GMD e FAMACHA). Observa-se que para o modelo PCA-LDA apenas 9 amostras (1,74%) foram identificadas como falso negativo (FN) e 45 amostras (8,72%) foram classificadas como falso positivo (FP). Tais resultados indicam que se o tratamento anti-helmíntico fosse realizado pelos espectros NIR, poucos animais doentes ficariam sem tratamento (FN = 2,97%), enquanto poucos seriam tratados sem necessidade (FP = 14,8%) (Tabela 4). Os valores obtidos pelos espectros NIR para acurácia, precisão e sensibilidade foram de 82,18%, 73,68% e 93,33%, respectivamente, e para o método FAMACHA, foram de 81,37%, 84,62% e 18,97%, respectivamente (Tabela 5). O modelo PCA-LDA apresentou acurácia e sensibilidade superior ao método FAMACHA.

Tabela 4. Matriz de confusão obtida pelos métodos de referência (VG, OPG, GMD e FAMACHA) e pelo modelo PCA-LDA construídos a partir dos espectros NIR

coletados em amostras de sangue de ovinos classificados como doentes ou saudáveis em relação à infecção por NGI.

MÉTODO	VP	VN	FP	FN	Acurácia (%)	Precisão (%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
GMD	93	383	27	23	90,49	77,50	80,17	93,41
OPG	109	350	60	7	87,26	64,50	93,97	85,37
VG	78	405	5	38	91,83	93,98	67,24	98,78
FAMACHA	22	406	4	94	81,37	84,62	18,97	99,02
NIRS	126	123	45	9	82,18	73,68	93,33	73,21

VP: verdadeiro positivo, VN: verdadeiro negativo, FP: falso positivo, FN: falso negativo.

4. Discussão

A introdução da tecnologia NIRS como método de diagnóstico vem ganhando espaço gradualmente na medicina humana. Estudos demonstram que a tecnologia tem potencial para ser utilizado em diagnósticos de doenças vasculares (Ozawa et al., 2019) e mesmo no diagnóstico precoce de pequenos tumores (Li et al., 2019). Sua aplicação em medicina veterinária ainda é incipiente e o presente estudo se mostra pioneiro nesse intento.

A partir do método de regressão linear de PLS via NIRS, em função das bandas nas quais ocorreram as maiores variações nos espectros, é possível inferir que a informação química presente no sangue, e que possibilita a determinação do VG, está relacionada com a concentração e variedade de proteínas presentes nos animais doentes e saudáveis, tendo provavelmente forte relação com a hemoglobina no sangue. As ligações de amida e proteínas semelhantes à da hemoglobina já foram identificadas pelos espectros NIRS em outras substâncias que apresentam ligações orgânicas (Workman, 2001). Como exemplo, na PC1, os maiores loadings estão em 1371 e 1625 nm, associados, respectivamente, à absorção do 2º e 1º sobretons dos grupos funcionais NH de aminas alifáticas (Workman, 2008). Na PC2 o maior loading ocorreu em 1680 nm, associado à região de absorção do estiramento assimétrico dos grupos CH em compostos aromáticos (Workman, 2008).

A faixa dos valores do VG empregada no presente estudo variou de 9% a 46%. Uma ampla faixa de valores de referência se reflete em um modelo mais robusto e com uma maior faixa de trabalho. No comparativo entre os valores de VG preditos pelo modelo de regressão via NIRS e o VG obtido pelo hematócrito, os coeficientes

de correlação do modelo de calibração e de validação apresentaram um coeficiente de correlação de $r \geq 0,7$ indicando forte correlação entre os métodos. Em relação à validação do modelo (validação externa), o erro padrão de predição e o RMSEV obtidos foram próximos a 2,5%. Tais valores são considerados como o desvio padrão do VG obtidos pelo hematócrito indicando a aplicabilidade do modelo na predição do VG a campo, nas análises de rotina. De acordo com Sakudo e colaboradores (2009) os percentuais do RMSEV para aferição de hematócritos em humanos pelo NIRS foi de 3,7%, corroborando com os achados neste trabalho.

Além do comparativo com o hematócrito, o comparativo com o FAMACHA indicou elevada precisão e acurácia. Neste trabalho, a utilização do modelo NIRS (PCA-LDA) para predizer o valor do VG e auxiliar no diagnóstico da infecção por NGI conseguiu promover uma classificação exata e precisa, capaz de orientar o status de saúde dos animais. Como aplicação forense, o NIRS se mostrou um método eficaz para a identificação de vestígios de sangue expostos em várias superfícies, diferenciando o sangue humano, de animais ou outros vestígios de sangue por meio do PLS-LDA (Pereira et al., 2021).

Na classificação dos animais em duas categorias, por meio da análise da PCA-LDA, foi possível avaliar que o erro na categorização foi baixo, em especialmente para falso negativo (animais doentes que foram classificados como saudáveis), mostrando que o método consegue realizar uma classificação fidedigna. A variação entre os espectros de ambas as categorias decorre do estado sanitário destes animais, indicando que a informação acessada pela técnica NIRS foi adequada ao diagnóstico. As análises de PCA são úteis por ser uma ferramenta exploratória multivariada, excelente para processar e interpretar dados de alta dimensão e em vários campos, incluindo na área biológica (Lee e Jemain, 2021). Estudo realizado na Índia caracterizou, por meio da espectrometria do plasma sanguíneo, pacientes normais e pacientes com câncer cervical. A análise de PCA-LDA apresentou precisão de 100% nas amostras utilizadas para calibração e 95,8% nas amostras utilizadas para validação (Raja et al., 2019). Estudo em bezerro experimentalmente infectado com *Anaplasma marginale* demonstrou que a espectroscopia NIRS foi capaz de monitorar o desenvolvimento da doença no animal, bem como a sua recuperação. Ondas chegando a 8000cm^{-1} , 6500cm^{-1} , 5000cm^{-1} e 4500cm^{-1} contribuíram para prever e

identificar o dia em que o animal ficou doente. A técnica NIRS se mostrou rápida (1 min/amostra) e precisa no monitoramento da anaplasiose (Luiz et al., 2021). Espectros NIR detectaram a presença de *Mannheimia haemolytica* em plasma bovino com precisão e sensibilidade de 93% e 99% para calibração e de 81% e 84% para validação, respectivamente (Santos- Riviera et al., 2021). Em trabalho utilizando os espectros NIRS para avaliar a presença do vírus da influenza em secreção nasal de humanos, por meio da análise PCA, foi possível determinar 96,7% de pacientes que não apresentavam o vírus e 100% dos indivíduos infectados pela influenza (Sakudo et al., 2012), ou seja, assim como no presente estudo, o método conseguiu ser bem eficaz na separação das amostras dos doentes e um pouco menos afetivo na detecção de indivíduos saudáveis.

Ao comparar o FAMACHA com o VG, foi possível avaliar que o primeiro não direcionou o tratamento para animais que estavam com anemia, ou seja, apenas 27,55% dos animais anêmicos ($VG \leq 21\%$) foram detectados pelo método e 72,45% não foram. O uso deste método para o TST não se mostrou eficaz em cordeiros da raça Ile de France, pois identifica, na maioria das vezes, animais que já estão clinicamente afetados (Cintra et al., 2019). Entretanto, o método FAMACHA é uma ferramenta eficaz na manutenção da *refugia*, quando realizado por pessoas bem treinadas (Greer et al., 2020). A vantagem da utilização do NIRS para o TST é o fato de ser um método não invasivo e que pode ser desenvolvido para amostragem *in loco* com equipamento portátil. Além disso, futuramente, a sua resposta também poderá ser avaliada na detecção de alterações de outros componentes do sangue e, desta forma, utilizado como ferramenta na detecção de várias enfermidades ou alterações clínicas em animais de produção, conforme já atestado por alguns estudos (Luiz et al., 2021; Santos-Rivera et al., 2021).

5. Conclusão

O método de regressão linear PLS de quantificação de VG apresentou precisão e acurácia elevadas, podendo ser considerado um método adequado para estimar o valor de VG. O método de diagnóstico via NIRS, empregando o modelo desenvolvido por PCA-LDA, também apresentou elevada sensibilidade e especificidade no

diagnóstico de animais doentes e saudáveis, se mostrando superior ao método FAMACHA na detecção de cordeiros Morada Nova infectados por NGI. O NIRS se mostrou uma técnica rápida e versátil e o modelo de análises aqui validado, associado ao desenvolvimento de equipamento portátil para amostragem *in loco*, indicou ser uma ferramenta confiável para a realização futura de TST em cordeiros Morada Nova.

6. Referências Bibliográficas

Amarante AFT (2014) **Os parasitas de ovinos**. São Paulo: Editora UNESP, 263p.

Andueza D, Alabart JL, Lahoz B, Muñoz F, Folch J (2014) Early pregnancy diagnosis in sheep using near-infrared spectroscopy on blood plasma. **Theriogenology** 81: 509–513.

Bahmani MK, Khosravi A, Miri R, Iwabu Y (2009) Spectroscopic characterization of human immunodeficiency virus type-1-infected plasma by principal component analysis and soft independent modeling of class analogy of visible and near-infrared spectra. **Molecular Medicine Reports** 2: 805–809.

Burns DH, Rosendahl S, Bandilla D, Maes OC, Chertkow HM, Schipper HM (2009) Near-infrared spectroscopy of blood plasma for diagnosis of sporadic Alzheimer's disease. **Journal Alzheimer's Disease** 17: 391–397.

Carmona P, Molina M, Calero M, Bermejo-Pareja F, Martinez-Martin P, Toledano A (2013) Discrimination analysis of blood plasma associated with Alzheimer's disease using vibrational spectroscopy. **Journal Alzheimer's Disease** 34: 911–920.

Chagas ACS, Oliveira MCS, Carvalho CO, Molento MB (2007) Método Famacha©: Um recurso para controle da verminose em ovinos Circular técnica – Embrapa Pecuária Sudeste. São Carlos (SP).

Cintra MCR, Ollhoff RD, Weber SH, Santos Sotomaior C (2019) Is the Famacha© system always the best criterion for targeted selective treatment for the control of haemonchosis in growing lambs? **Veterinary Parasitology** 266: 67-72.

Costa, VMM, Simões SVD, Riet-Correa F (2011) Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 31: 65-71.

Glas AS, Lijmer JG, Prins MH, Bossel GJ, Bossuyt PM (2003) The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. **Journal Clinical Epidemiology** 56.

Greer AW, Van Wyk JA, Hamie JC, Byaruhanga C, Kenyon F (2020) Refugia-based strategies for parasite control in livestock. **Veterinary Clinical North American - Food Animal Practical** 36(1): 31-43.

González FHD, Silva SC (2008) Patologia clínica veterinária: texto introdutório. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul 342.

Haehling MB, Cruvinel GG, Toscano JHB, Giraldeiro LA, Santos IB, Esteves SN, Benavides MV, Barioni Júnior W, Niciura SCM, Chagas ACS (2020) Four single nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with resistance and resilience to *Haemonchus contortus* in Brazilian Morada Nova sheep. **Veterinary Parasitology** 279: 109053.

ISO 12099:2010 Animal feeding stuffs, cereals and milled cereal products — Guidelines for the application of near infrared spectrometry

Jas R, Ghosh JD, Das K (2010) Polyclonal antibody based coproantigen detection immunoassay for diagnosis of *Oesophagostomum columbianum* infection on goats. **Veterinary Parasitology** 170: 262-267.

Jintao X, Liming Y, Yufei L, Chunyan L, Han C (2017) Noninvasive and fast measurement of blood glucose in vivo by near infrared (NIR) spectroscopy. **Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** 179: 250-254.

Lee LC, Jemain AA (2021) On overview of PCA application strategy in processing high dimensionality forensic data. **Microchemical Journal** 169: 106608.

Li C, Wang Q (2019) Advanced NIR-II Fluorescence Imaging Technology for in vivo precision tumor theranostics. *Advanced Therapeutics*. 9: 1900053.

Luiz LC, Teixeira VA, Campos MM, Pereira LGR, Tomich TR, Leite JLB, Bell MJV, Anjos VC (2021) Uso da espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) para acompanhar processo de Tristeza Parasitária Bovina. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research** 4: 1594-1605.

Maia D, Moraes FR, Sotomaior CS (2013) Revisão da literatura – o método FAMACHA® como tratamento seletivo de pequenos ruminantes. **Veterinária Notícia** 19: 1-66.

Muchiut SM, Fernández AS, Lloberas M, Steffan PE, Luque SE, Cardozo PA, Bernat GA, Riva E, Fiel, CA (2019) Recovery of fenbendazole efficacy on resistant *Haemonchus contortus* by management of parasite refugia and population replacement. **Veterinary Parasitology** 271: 31-37.

Ozawa S, Kanayama N, Hiraki K (2019) Emotion-related cerebral blood flow changes in the ventral medial prefrontal cortex: An NIRS study. **Brain Cognition** 134: 21-28.

Paraskevaidi M, Morais CLM, Freitas DLD, Lima KMG, Mann DMA, Allsop D, Martin-Hirsch P, Martin FL (2018) Blood-based near-infrared spectroscopy for the rapid low-cost detection of Alzheimer's disease. **Analyst** 143: 5959–5964.

Pasquini C (2003) Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 14: 198–219.

Pereira JFS, Mendes JB, De Jong G, Maia D, Teixeira VN, Passerino AS, Garza JJ, Sotomaior CS (2016) FAMACHA© scores history of sheep characterized as resistant/resilient or susceptible to *H. contortus* in artificial infection challenge. **Veterinary Parasitology** 218: 102–105.

Raja P, Aruna P, Koteeswaran D, Ganesan S (2019) Characterization of blood plasma of normal and cervical cancer patients using NIR Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy** 102: 1–7.

Roberts FHS, O'Sullivan JP (1950) Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal Agricultural Research** 1: 99–102.

Roeber F, Jex AR, Gasser RB (2013) Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminantes. **Biotechnology Advances** 31: 1135-1152.

Sakudo A, Baba K, Ikuta K (2012) Discrimination of influenza virus-infected nasal fluids by Vis-NIR spectroscopy. **Clinica Chimica Acta** 414: 130–134.

Sakudo A, Kato YH, Kuratsune H, Ikuta K (2009) Non-invasive prediction of hematocrit levels by portable visible and near-infrared spectrophotometer. **Clinica Chimica Acta** 408: 123–127.

Sakudo A, Tsenkova R, Onozuka, Morita K, Li Shuming, Warachit J, Iwabu Y, Li G, Onodera T, Ikuta K (2005) A novel diagnostic method for human immunodeficiency virus type-1 in plasma by near-infrared spectroscopy. **Microbiology and Immunology** 49: 695–701.

Santos-Rivera M, Woolums A, Thoresen M, Blair E, Jefferson E, Meyer F, Vance CK (2021) Profiling *Mannheimia haemolytica* infection in dairy calves using near infrared spectroscopy (NIRS) and multivariate analysis (MVA). **Nature Research. Scientific Reports** 11.

Toscano JHB, dos Santos IB, von Haehling MB, Giraldelo LA, Lopes LG, da Silva MH, Figueiredo A, Esteves SN, Chagas ACS (2019) Morada Nova sheep breed: Resistant or resilient to *Haemonchus contortus* infection? **Veterinary Parasitology X** 2 100019.

Toscano JHB, Okino CH, Santos IB, Giraldeho LA, Haehling MB, Esteves SN, Chagas AC, (2019b) Innate Immune Responses Associated with Resistance against *Haemonchus contortus* in Morada Nova Sheep. **Journal Immunology Research** 2019: 1–10.

Ueno H, Gonçalves PC (1998) **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. Japan International Cooperation Agency, Tokyo.

Van Wyk, JA, Bath, GF (2002) The FAMACHA© system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. **Veterinary Research**, 33: 509-529.

Van Wyk, JA, Mayhew, E (2013) Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, 80, 539.

Wong HB, Lim GH (2011) Measures of diagnostic accuracy: sensitivity, specificity, PPV and NPV. **Proceedings Singapore Healthcare** 20: 316–318.

Workman J (2001) Manual de compostos orgânicos: espectros NIR, IR, Raman e UV-Vis com polímeros e surfactantes. **Academic Press**.

Workman J; Lois W (2008) **Practical guide to interpretive near-infrared spectroscopy**. CRC Press.

CAPÍTULO 4 - Impacto econômico da infecção por nematódeos gastrintestinais em cordeiros Morada Nova no Brasil: extrapolação de escala local para nacional

Resumo - A infecção por nematódeos gastrintestinais (NGI) é uma grande preocupação nos sistemas de produção de pequenos ruminantes, entretanto os danos econômicos causados pelos mesmos não são bem conhecidos. Este estudo teve como objetivo avaliar o impacto econômico da infecção por NGI em cordeiros Morada Nova em diferentes condições de controle parasitário e, a partir desses dados, realizar uma estimativa do impacto em nível nacional. Para tanto, 144 cordeiros Morada Nova da estação chuvosa e 102 da estação seca foram randomizados em três grupos de acordo com o tratamento anti-helmíntico: controle (TC); tratamento rotineiro (TR - tratados a cada 42 dias) e tratamento seletivo (TST- tratados de acordo com GMD). Dos 63 dias de idade (D63) ao D210, a cada 21 dias, os animais foram pesados e monitorados quanto aos parâmetros de infecção por NGI. Na estação chuvosa, os animais do TR chegaram mais pesados (23,92 kg) aos 210 dias de vida em relação aos animais dos grupos TST (22,28 kg) e TC (20,94 kg), gerando faturamento bruto mais elevado (R\$9.734,62) em relação aos demais (R\$9.067,17 e R\$8.753,80, respectivamente). O mesmo ocorreu na estação seca com 26,59 kg, 25,90 kg e 24,86 kg e R\$9.979,02, R\$9.498,93 e R\$8.994,70, respectivamente. Pode-se verificar um resultado econômico por animal expressivo a favor do TR de R\$33,00 na estação chuvosa e de R\$28,45 na estação seca, devido ao maior GMD. Esse tratamento também apresentou resultado econômico 14,4% e 10,9% superior ao TC e 7,2% e 1,9% superior ao TST, no período das águas e da seca, respectivamente. Entretanto, o rápido desenvolvimento da resistência nas condições do TR inviabilizou o sistema de produção em um curto período. Os gastos com anti-helmínticos no sistema de produção foram estimados em 1,3% no resultado econômico total. Considerando-se a redução no ganho de peso desencadeada pelos NGI nos rebanhos nacionais, estima-se que o impacto econômico potencial seja de R\$472,6 milhões/ano. Considerando a mortalidade nacional de 295 mil ovinos devido às parasitoses, as perdas por mortes na ovinocultura Brasileira são estimadas em R\$65 milhões/ano. Acredita-se que tais levantamentos estejam provavelmente subestimados, visto que a raça Morada Nova é mais resiliente/resistente aos NGI e o levamisol é uma molécula

de menor custo. O panorama obtido demonstra a importância do parasitismo no Brasil e a inviabilidade de uma pecuária lucrativa e sustentável sem o controle adequado dos NGI.

Palavras-chave: perda de produção, impacto de peso, mortes, *Haemonchus contortus*, pequenos ruminantes, trópicos.

1. Introdução

O Brasil possui 19,7 milhões de ovinos, com aumento do rebanho em nível nacional da ordem de 4,05% em 2018 (IBGE, 2019). A região Nordeste apresenta 13,5 milhões de cabeças, equivalente a 71,05% do rebanho nacional, seguida das regiões Sul, Centro-Oeste e Sudeste, com 3,95 milhões, 1,0 milhão e 600 mil cabeças, respectivamente, correspondentes a 20,53%, 5,26% e 3,16% do rebanho ovino do Brasil (IBGE, 2019; Magalhães et al., 2020). Entretanto, por uma questão organizacional da cadeia produtiva, a produção de ovinos ainda não abastece o mercado doméstico com eficiência e qualidade. Um dos maiores problemas está relacionado à falta de oferta constante, o que dificulta a estruturação do setor, incluindo a formação de escalas de abate. Com isso, a importação de carne ovina se torna necessária, visto que, em 2017, foram importadas cerca de 6,5 mil ton. (Zen et al., 2014; Faostat, 2018).

As doenças parasitárias por nematódeos gastrintestinais (NGI) estão entre os fatores que limitam a produção de pequenos ruminantes no mundo inteiro, sendo responsabilizadas por elevadas perdas econômicas, em decorrência de crescimento retardado, perda de peso, redução no consumo de alimentos, queda na produção de leite, baixa fertilidade e, nos casos de infecções maciças, altas taxas de mortalidade. Esses sinais clínicos devem-se a lesões na mucosa gastrintestinal, que provocam distúrbios na absorção dos nutrientes, e à espoliação hematófaga, que leva a infecções sub-clínicas, em alguns casos associada à redução do ganho de peso e anemia e, conseqüentemente, à baixa condição corporal e rendimento de carcaça. *Haemonchus contortus* é o nematódeo de maior importância clínica e econômica nas criações de pequenos ruminantes do Brasil (Cavalcante et al., 2009; Chagas et al., 2013). As fêmeas podem liberar diariamente entre 5.000 e 10.000 ovos (Romero e

Boero, 2001) e seu período de pré-patência, entre a ingestão da L₃ pelo hospedeiro e a deposição de ovos junto às fezes, é de 18 a 22 dias (Santos et al., 2014). *H. contortus* se instala no abomaso e pode ingerir de 0,05 a 0,08 mL de sangue/dia e, por isso, quando o animal possui carga parasitária elevada, apresenta anemia, edema submandibular e pode ir a óbito (Amarante et al., 2014).

Nos países desenvolvidos as perdas anuais para o controle de NGI em pequenos ruminantes superam todos os outros custos para o controle de doenças endêmicas. Nos três países de maior produção em ovinos, Austrália, África do Sul e Uruguai, as perdas devido à resistência parasitária são de cerca de US\$ 222 milhões, US\$ 45 milhões e US\$ 42 milhões, respectivamente (Waller, 2006). No Brasil, os estudos do impacto econômico devido à verminose em ruminantes são mais abundantes em bovinos (Grisi et al., 2014). Em ovinos, um levantamento das doenças parasitárias diagnosticadas em animais da região Sul do Rio Grande do Sul indicou que 42,7% dos casos diagnosticados foram de infecção por NGI, que geraram mortalidade de aproximadamente 16.800 animais ao ano, acarretando em impacto econômico estimado em R\$ 2 milhões (Oliveira et al., 2017).

O controle dos NGI tem sido amplamente realizado por meio de anti-helmínticos. Entretanto, a excessiva dependência nessas substâncias tem levado ao desenvolvimento de resistência anti-helmíntica, evidenciando que essa abordagem não é considerada uma forma sustentável de controle (Sutherland e Leathwick, 2011; Van Wyk e Reynecke, 2011). É importante o entendimento dos fatores extrínsecos que favorecem o desenvolvimento da resistência anti-helmíntica, pois os mesmos possuem impacto direto na produtividade do rebanho (Waller, 2004). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o impacto econômico da infecção por NGI em cordeiros Morada Nova em diferentes condições de controle parasitário e, a partir desses dados, realizar uma estimativa do impacto em nível nacional.

2. Material e Métodos

2.1. Grupos experimentais

O estudo foi realizado na Embrapa Pecuária Sudeste - CPPSE, localizada no município de São Carlos, estado de São Paulo, Brasil. Durante a estação chuvosa, a alimentação das matrizes foi exclusivamente a pasto, e na estação seca, receberam suplementação de silagem de milho (gradativamente à medida que a oferta de pastagem diminuía) e 1% do peso vivo de ração concentrada. Água e sal mineral foram mantidos *ad libitum*. Os cordeiros, de ambos os sexos, foram recriados junto com suas mães até a idade média de desmame aos 150 dias de vida, quando as mães foram retiradas da área de pasto e os cordeiros permaneceram na pastagem até o final do experimento, aos 210 dias de vida em média.

Foram avaliados 144 e 102 cordeiros Morada Nova nas estações chuvosa de 2019 e seca de 2020, respectivamente. Aos 63 dias de vida (D63), todos os animais receberam tratamento anti-helmíntico (Ripercol® L - 150F, levamisol 18,8% injetável, 9,4 mg/kg) para início dos tratamentos experimentais comparativos. Do D63 ao D210, a cada 21 dias, foram coletadas amostras de sangue e fezes para realização de hematócrito (volume globular - VG), contagem de ovos por grama de fezes individual (OPG) (Ueno e Gonçalves, 1998) e coprocultura por grupo (Roberts e O'Sullivan, 1950). Todos os animais foram pesados a cada 21 dias a partir do nascimento até os 210 dias de vida. No D63 de cada estação, os cordeiros foram então divididos em três grupos (com médias homogêneas para peso ao nascimento, tipo de parto (simples ou gemelar), sexo, OPG e PVC), de acordo com o tratamento anti-helmíntico (levamisol) proposto: Controle (TC): sem tratamento, Tratamento Rotineiro (TR): tratamento de todos os cordeiros a cada 42 dias, do D105 ao D189 e Tratamento Seletivo (TST): tratados quando o ganho médio diário de peso (GMD) foi $< \text{GMD do grupo TST} - \text{desvio padrão} \times 0,5$ (adaptado de Cintra et al., 2018) a cada 21 dias, do D105 ao D189. Cordeiros que apresentassem $\text{VG} \leq 21\%$ receberam tratamento anti-helmíntico e os animais mais debilitados foram suplementados com vitamina B12 para acelerar a recuperação, a fim de se evitar óbitos. Tal fato ocorreu somente no TC.

O custo médio do tempo gasto com a mão de obra despendida com a alimentação dos animais, coleta de fezes e sangue, pesagens e demais serviços foi considerado

semelhante nos três tratamentos durante o período experimental. Estimou-se o custo da mão de obra em R\$ 0,49/animal/dia.

2.2. Resultado econômico

A análise econômica foi determinada após obtenção dos dados dos cordeiros nascidos e desmamados, no período das chuvas em 2019 e da seca em 2020, quando todos os parâmetros foram medidos e coletados. Os tratamentos experimentais foram então comparados com relação ao seu resultado econômico, obtido conforme as equações (1), (2) e (3), sendo o lucro bruto a variável utilizada para comparação.

$$\text{FBV} = \text{NA} \times \text{P} \times \text{R\$/kg pv} \quad \text{equação (1)}$$

$$\text{RE} = \text{FBV} - \text{COP} \quad \text{equação (2)}$$

$$\text{COP} = \sum(\text{Cah}; \text{Csvit}; \text{Cins}; \text{Csvit}; \text{Cmdo}) \quad \text{equação (3)}$$

Onde o faturamento bruto (FBV) com a venda de animais foi obtido pela equação: número de animais por tratamento (NA) x peso médio aos 210 dias (P) x preço pago pelo mercado em reais (R\$/kg de peso vivo). O resultado econômico bruto (RE) foi obtido pela equação: FBV- custo operacional por tratamento (COP). O RE por animal foi obtido dividindo-se o RE pelo número de animais por tratamento. O COP foi obtido pelo somatório do custo operacional por tratamento (anti-helmíntico - Cah, vitamina B12 - Csvit, insumos como seringas - Cins, agulhas etc. e mão de obra para manejo no curral - Cmdo). Os custos de manutenção das pastagens, dos suplementos alimentares, de depreciação e custo da terra não foram considerados, pois foram mantidos constantes para todos os tratamentos.

3. Resultados

Os resultados referentes à infecção por NGI (OPG e coprocultura) e seu impacto no VG, foram melhor descritos no estudo das consequências dos diferentes tratamentos anti-helmínticos (TC, TR e TST) no controle parasitário (Santos et al., 2021, submetido).

No presente estudo, os animais do TR chegaram ao D210 mais pesados (23,92 kg) em relação ao TST (22,28 kg) e TC (20,94 kg), gerando faturamento bruto mais

elevado (R\$9.734,62) quando comparado ao TST (R\$9.067,10) e ao TC (R\$8.753,80), na estação chuvosa. Acredita-se que essa diferença no ganho de peso tenha sido desencadeada pelos tratamentos anti-helmínticos, mais frequentes no TR do que no TST e TC, conforme supracitado. O mesmo padrão foi observado na estação seca para o TR (R\$9.979,02), TST (R\$9.498,93) e TC (R\$8.994,70) (Tabela 1).

Durante a estação chuvosa ocorreram 12 tratamentos anti-helmínticos no TC, 62 no TST e 114 no TR (38 animais x 3 tratamentos). Já na estação seca foram administradas 6, 67 e 102 aplicações (34 animais x 3 tratamentos), respectivamente. A partir destes dados foram calculados os gastos totais com os tratamentos anti-helmínticos por tratamento e por estação (Tabela 1).

O custo total da aplicação dos anti-helmínticos, considerando materiais e mão de obra foi de R\$89,39, R\$128,60 e R\$109,40 para os tratamentos TC, TR e TST, respectivamente, no período das chuvas. TC obteve menor gasto com a aplicação de anti-helmíntico devido ao reduzido número de animais ($n=12$) que apresentaram $VG \leq 21\%$. Entretanto, devido à suplementação com vitamina B12 em animais debilitados, o custo total do tratamento TC foi acrescido de R\$43,20 totalizando R\$132,59, se apresentando superior aos demais tratamentos. Os gastos com anti-helmínticos representaram 1,5%, 1,3% e 1,2% do resultado econômico total para TC, TR e TST, respectivamente, na estação chuvosa. O tratamento TR utilizou maior quantidade de anti-helmínticos, seringas e agulhas pela aplicação a cada 42 dias, apresentando ganho econômico 14,4% superior ao TC e 7,2% superior ao TST. Entretanto, devido ao GMD superior obtido entre o D63 e D210 para esse grupo, o ganho econômico por animal foi de R\$259,62, enquanto para o TST e o TC foi de R\$242,10 e de R\$226,62, respectivamente (Tabela 1).

Já na estação seca, o custo total da aplicação dos anti-helmínticos foi de R\$85,68, R\$124,16 e R\$110,40 para os tratamentos TC, TR e TST, respectivamente. O tratamento TC obteve menor gasto, pois somente seis animais apresentaram $VG \leq 21\%$. Entretanto, com a suplementação de vitamina B12, foi acrescido R\$21,60 totalizando R\$107,28, sendo inferior aos demais tratamentos. Os gastos totais com anti-helmínticos representaram 1,2%, 1,3% e 1,2% do resultado econômico total para TC, TR e TST, respectivamente. Mesmo com o custo inferior, o TC obteve resultado econômico inferior, devido ao menor ganho de peso, enquanto o TR foi 10,9% superior

ao TC e 1,9% superior ao TST. O resultado econômico por animal para o TR, TST e TC foi de R\$289,85, R\$284,50 e R\$261,39, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Resultado econômico do controle da infecção por NGI nos tratamentos controle (TC), rotineiro (TR) e seletivo (TST) em cordeiros Morada Nova nas estações chuvosa e seca.

Variáveis	TC	TR	TST
Estação chuvosa			
Número de animais por tratamentos	38	37	37
Peso vivo inicial aos 63 dias	11,23	11,42	11,51
Peso vivo final aos 210 dias	20,94	23,92	22,28
Ganho médio diário em gramas	66	85	73
Faturamento bruto (venda dos animais - R\$)	8.753,80	9.734,62	9.067,10
Custo total com a desverminação (R\$)	132,59	128,60	109,40
Resultado econômico total (R\$)	8.621,21	9.606,02	8.957,78
Resultado econômico/cabeça (R\$)	226,87	259,62	242,10
Preço recebido por kg de peso vivo (R\$)	11,00	11,00	11,00
Estação seca			
Número de animais por tratamentos	34	34	34
Peso vivo inicial aos 63 dias	10,54	10,14	10,50
Peso vivo final aos 210 dias	24,86	26,59	25,90
Ganho médio diário em gramas	97	112	105
Faturamento bruto (venda dos animais) R\$	8.994,70	9.979,02	9.498,93
Custo total com a desverminação R\$	107,28	124,16	110,40
Resultado econômico total R\$	8.887,42	9.854,86	9.388,53
Resultado econômico/cabeça	261,39	289,85	284,50
Preço recebido por kg de peso vivo R\$	11,00	11,00	11,00

Na Tabela 2 podem ser observadas as diferenças líquidas no resultado econômico por cabeça entre os tratamentos para os dois períodos experimentais. Na estação chuvosa verificou-se resultado econômico por cabeça expressivo a favor do TR de R\$33,00/animal, quando comparado com o TC, e de R\$17,42, quando comparado ao TST. Na estação seca o TR apresentou uma diferença de R\$ 28,45

sobre o TC, contudo, a diferença em relação ao TST foi de R\$5,35, bem menor do que a observada na estação chuvosa.

Tabela 2. Diferença entre os tratamentos controle (TC), rotineiro (TR) e seletivo (TST) no resultado econômico (R\$) por cabeça na estação chuvosa (C) e na estação seca (S) para cordeiros Morada Nova em crescimento.

Estação	Tratamentos	TC	TR	TST
Chuvosa	TC	0,00	-33,00	-15,48
	TR	33,00	0,00	17,42
	TST	15,48	-17,42	0,00
Seca	TC	0,00	-28,45	-23,11
	TR	28,45	0,00	5,35
	TST	23,11	-5,35	0,00

4. Discussão

O tratamento mais intenso de todo o rebanho com anti-helmíntico (TR) a cada 42 dias se mostrou o mais interessante em termos econômicos. Tal estratégia possibilitou a obtenção de GMD mais elevado dos animais, favorecendo um nível menor de infecção pelos NGI e impactando positivamente no desempenho ponderal dos animais. O presente estudo também indicou que quando o criador faz uso do tratamento anti-helmíntico somente quando o animal já está em estado anêmico intenso pode, à primeira vista, parecer menos dispendioso, entretanto, o potencial de ocorrência de óbitos ou os gastos com medicamentos vitamínicos de suporte contrariam tal hipótese.

Por outro lado, embora o custo do tratamento anti-helmíntico intenso seja maior, obteve-se peso vivo final mais elevado dos animais no TR, favorecendo a obtenção de melhor resultado econômico por cabeça nestas condições experimentais. Entretanto, estudos realizados no Brasil comprovam que o desenvolvimento da resistência anti-helmíntica aparece rapidamente em condições de controle parasitário intenso e não seletivo. Esse tipo de manejo (TR) não deve ser implementado como prática em uma propriedade, pois inviabilizará a sustentabilidade da cadeia produtiva. Em propriedades da região Sul, nas quais os cordeiros recebiam menos de 3

tratamentos de diferentes classes de anti-helmínticos por ano, a resistência anti-helmíntica detectada foi de 6,7%, quando recebiam de 4 a 6 tratamentos anuais foi de 44,9% e quando foi superior a sete tratamentos foi de 48,3% (Echevarria et al., 1996). Já em rebanhos nos quais realizou-se TST utilizando-se o OPG como parâmetro, o estabelecimento da resistência anti-helmíntica à ivermectina demorou em torno de 4 anos e meio (Echevarria e Trindade, 1989). O rápido estabelecimento da resistência também foi detectada em cordeiros Morada Nova no estado de São Paulo após o terceiro tratamento com levamisol, realizado a cada 42 dias (TR) (Santos et al., 2021, submetido). Ovinos tratados com monepantel de forma intensa também apresentam resistência ao fármaco em três meses (Albuquerque et al., 2017). Na Holanda o primeiro relato de resistência ao monepantel ocorreu em propriedade na qual o fármaco foi administrado de forma mais criteriosa por 2 anos, em 13 ocasiões, sendo duas vezes ao ano para as matrizes e reprodutores, e em média 3 vezes ao ano para os cordeiros (Brom et al., 2015)

Os anti-helmínticos têm sido a principal ferramenta adotada para o controle de parasitos, usualmente impactando positivamente no bem-estar e na saúde de animais domésticos e de produção (Oliveira Pasiani et al., 2012). No entanto, em um cenário de parasitos altamente resistentes (Raschia et al., 2021), a preservação da *refugia* se tornou essencial para a manutenção da eficácia dos anti-helmínticos, os quais devem ser usados com critério (George et al., 2021). Portanto, o que se observa é a necessidade de mais estudos avaliando a contribuição da resistência anti-helmíntica aos danos econômicos resultantes de doenças parasitárias.

Em levantamento das doenças parasitárias mais frequentes em ovinos na região sul do Rio Grande do Sul, de 1978 a 2014, Oliveira et al. (2017) detectaram que 33,6% dos diagnósticos realizados eram parasitoses, sendo que a parasitose gastrintestinal mista (42,7%) e a hemoncose (35,4%,) juntas, representam 78,1% dos diagnósticos realizados, presentes em ovinos de todas as idades. No Paraná, um estudo realizou o diagnóstico *post-mortem* em 177 ovinos e a hemoncose foi a principal doença diagnosticada, acometendo 53 animais (20,87%) (Sprenger et al., 2015). Estudo realizado no Ceará indicou que as helmintoses correspondiam a 81,9% das enfermidades diagnosticadas em caprinos e ovinos (Pinheiro et al., 2002). A partir da estimativa da taxa de mortalidade de 5% para a espécie (SEAPA, 2010) e do

percentual de ovinos diagnosticados com parasitoses (33,6%), as perdas econômicas anuais estimadas foram de R\$2 milhões somente no rebanho da região Sul do Rio Grande do Sul, de cerca de 1 milhão de ovinos (Oliveira et al., 2017). Não foram consideradas as perdas indiretas, tais como, a queda na produção (carne, leite e lã), gastos com medicamentos e assistência veterinária. Na região Central do Rio Grande do Sul verificou-se que as parasitoses representaram 24,3% de todos os diagnósticos e a hemonose 62,5% destas parasitoses (Rissi et al., 2010).

A partir dos dados supracitados foi possível então realizar uma estimativa das perdas por parasitoses no rebanho brasileiro (Tabela 3), considerando os percentuais médios de morbidade de parasitoses de 30,0% (valor entre 24,3% e 33,6%), de mortalidade de 5,0% e de 78,1% de parasitoses observadas nos rebanhos ovinos (Rissi et al., 2010; Oliveira et al., 2017). Foi considerado também o valor médio atual de R\$220,00 por cordeiro. Estes valores somam perdas totais estimadas de 537,6 milhões de reais anuais e que podem ser ainda mais elevadas se adicionados os gastos com medicamentos e assistência veterinária na prevenção das parasitoses. No presente estudo, se considerarmos uma mortalidade nacional de 295.500 mil ovinos por ano devido às parasitoses, as perdas por mortes na ovinocultura brasileira são estimadas em R\$65 milhões por ano. Os maiores prejuízos são causados pela redução no ganho de peso e alcançam R\$472,6 milhões por ano (Tabela 3). Esse valor foi obtido pela multiplicação do número de animais acometidos de parasitoses e multiplicado pelo valor médio da diferença de ganho do tratamento TST em relação ao TC (Tabela 2) do período das águas (R\$33,00) e da seca (R\$28,45), de R\$30,72.

Tabela 3. Número estimado de ovinos do Brasil em 2019 (IBGE, 2019) e estimativa das perdas por menor ganho de peso e por morte causadas pelos nematódeos gastrintestinais por ano e por região.

Região	Número de ovinos	*Estimativa do número de ovinos mortos por parasitoses	**Estimativa do número de ovinos com redução no ganho de peso	***Prejuízos devido à redução no ganho de peso (R\$)	****Prejuízos por mortes causadas por parasitoses (R\$)	Total (R\$)
Norte	600.000	9.000	468.600	14.395.392,00	1.980.000,00	16.375.392,00
Nordeste	13.500.000	202.500	10.543.500	323.896.320,00	44.550.000,00	368.446.320,00
Sudeste	600.000	9.000	468.600	14.395.392,00	1.980.000,00	16.375.392,00

Sul	4.000.000	60.000	3.124.000	95.969.280,00	13.200.000,00	109.169.280,00
Centro-Oeste	1.000.000	15.000	781.000	23.992.320,00	3.300.000,00	27.292.320,00
Total	19.700.000	295.500	15.385.700	472.648.704,00	65.010.000,00	537.658.704,00

*considerando que 30% dos diagnósticos de doenças em ovinos são parasitoses e taxa de mortalidade de 5%; **considerando ocorrência de 78,1% de parasitoses no rebanho; ***perda estimada de R\$30,72 por animal por ano; ****considerando R\$220,00 por animal

Como as informações sobre as perdas de produção de estudos econômicos são usualmente obtidas de animais controle (mantidos sem tratamento ou que tiveram a infecção por NGI zerada), as estimativas de perdas econômicas representam perdas potenciais esperadas na ausência de medidas de controle de parasitos (Grisi et al., 2014). Por outro lado, como o cenário atual de resistência parasitária tem como consequência o tratamento anti-helmíntico frequente, com produtos comerciais sem eficácia sobre NGI, isso resulta em um aumento do prejuízo no sistema de produção por incorporar aos cálculos os custos de um controle ineficaz.

A redução no ganho de peso é uma consequência do parasitismo, bem como a ocorrência de óbitos. Este foi evitado no presente estudo em função de questões de bem-estar animal, entretanto, representa 12,1% dos prejuízos anuais causados na ovinocultura (R\$65 milhões). As perdas mais significativas para o Brasil ocorrem na região Nordeste detentora do maior efetivo de pequenos ruminantes. Em relação às perdas de peso, realizou-se estudo com cordeiros Dorper no Brasil com os seguintes grupos de animais: infectado-suplementado (G1), controle-suplementado (G2), infectado-dieta basal (G3) e controle-dieta basal (G4). Os grupos controle receberam tratamento anti-helmíntico a cada 14 dias visando minimizar sua infecção por NGI. Os cordeiros que receberam tratamento anti-helmíntico, G2 e G4, apresentaram 17,1% e 26,7% ganho de peso diários maiores, respectivamente. Para os cordeiros suplementados a diferença foi menor, pois seu grupo controle também foi suplementado (Starling et al., 2019). Os dados do presente experimento demonstraram que o peso vivo final (D210), em relação ao peso inicial (D63), foram de 28,8% e 15,5% superiores na estação chuvosa e da seca, respectivamente, valores próximos aos do estudo supracitado. Além disso, o presente estudo, ocorrido por 147 dias, demonstrou GMDs bem inferiores aos do estudo de Starling et al. (2019),

indicando a relevância das raças e do nível de suplementação alimentar nas estimativas econômicas. Como é de amplo conhecimento, o fornecimento de alimentação adequada por categoria animal, especialmente em relação à proteína bruta, possui grande importância no enfrentamento ao parasitismo e menor necessidade de tratamento anti-helmíntico, contribuindo para a sustentabilidade da cadeia (Bricarello et al., 2005; Cériac et al., 2019).

Os valores aqui estimados necessitariam ser melhor avaliados em nível regional. A ocorrência dos parasitos depende, por exemplo, de elementos tais como: temperatura, precipitação pluviométrica, solo, topografia, tipo e manejo da pastagem, espécie, raça, idade, estado fisiológico e nutricional e manejo dos animais (Ruas e Berne 2007). Cordeiros da raça Morada Nova são resilientes aos NGI e os adultos são resistentes (Issakowicz et al., 2016; Toscano et al., 2019; Haehling et al., 2021; Okino et al., 2021). Dessa forma, acredita-se que os valores aqui calculados estão subestimados em relação a raças mais susceptíveis, tais como Suffolk e Ile de France (Amarante et al., 2004). Além disso, o anti-helmíntico aqui adotado possui custo mais baixo que produtos à base de monepantel, por exemplo.

Independentemente das limitações de estudos utilizados para desenvolver estimativas econômicas, principalmente quando extrapolados de situações locais para uma escala nacional, o quadro obtido demonstra a magnitude e importância do parasitismo no Brasil e a inviabilidade de uma pecuária lucrativa sem o controle adequado dos NGI (Grisi et al., 2014). Além disso, o rápido estabelecimento da resistência anti-helmíntica, que hoje impera na maioria dos rebanhos nacionais, possui impacto importante e de difícil estimativa para incorporação aos danos econômicos resultantes das doenças parasitárias.

Conclusão

Os animais do TR chegaram aos 210 dias de vida mais pesados em relação ao TC, gerando maior faturamento bruto, em ambas as estações. Em relação ao TC, pôde-se verificar um resultado econômico por cabeça expressivo a favor do TR em ambas as estações, nas quais os gastos com o uso de anti-helmínticos foram de baixo impacto. Entretanto, em condições de uso intenso de anti-helmínticos (TR), a resistência se estabelece rapidamente nos parasitos, inviabilizando o sistema de

produção. Considerando-se a redução no ganho de peso desencadeada pelos NGI nos rebanhos nacionais, estima-se que o impacto econômico seja de R\$ 472,6 milhões/ano e que as perdas por mortes na ovinocultura Brasileira sejam de R\$ 65 milhões/ano. Devido à característica da raça Morada Nova e à utilização de uma base anti-helmíntica de baixo custo, acredita-se que as estimativas realizadas estejam subestimadas. O panorama obtido demonstra a importância do parasitismo por NGI na ovinocultura brasileira e a inviabilidade de uma pecuária lucrativa sem o controle adequado de parasitos, associado ao manejo da resistência anti-helmíntica.

Referências bibliográficas

Albuquerque ACA, Basseto CC, Almeida FA, Amarante AFT (2017) Development of *Haemonchus contortus* resistance in sheep under suppressive or targeted selective treatment with monepantel. **Veterinary Parasitology** 246: 112-117.

Amarante AFT (2014) **Os parasitas de ovinos**. São Paulo: Editora UNESP, 263p.

Amarante AFT, Bricarello PA, Rocha RA, Genari SM (2004) Resistance of Santa Inês, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology** 120: 91-106.

Bricarello PA, Amarante AFT, Rocha RA, Cabral Filho SL, Huntley JF, Houdijk JGM, Abdalla AL, Gennari SM (2005) Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. **Veterinary Parasitology** 134: 99-109.

Brom RV, Moll L, Kappert C, Vellema P (2015) *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. **Veterinary Parasitology** 209: 278-280.

Cavalcante ACR, Vieira LS, Chagas ACS, Molento MB (2009) **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle**. 1ª. Ed., Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 603p.

Cériac S, Archimède H, Feuillet D. (2019) Supplementation with rumen-protected proteins induces resistance to *Haemonchus contortus* in goats. **Sci Rep** 9, 1237.

Cintra MCR, Ollhoff RD, Sotomaior CS (2018) Sensitivity and specificity of the FAMACHA© system in growing lambs. **Veterinary Parasitology** 251: 106–111.

Chagas ACS, Katiki LM, Silva IC, Giglioti R, Esteves SN, Oliveira MCS, Barioni-Júnior W (2013) *Haemonchus contortus*: A multiple-resistant Brazilian isolate and the costs

for its characterization and maintenance for research use. **Parasitology International** 62: 1–6.

Echevarria F, Borba MFS, Pinheiro AC, Waller PJ, Hansen JW (1996) The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. **Veterinary Parasitology** 62: 199-206.

Echevarria FAM, Trindade GNP (1989) Anthelmintic resistance by *Haemonchus contortus*, to ivermectin in Brazil: A preliminary report. **Veterinary Record** 124:147-148.

Food and Agriculture Organization of United Nations – FAO. **FAOSTAT**: FAO's corporate database [online]. Rome: FAO; 2018 [cited 2020 Jun].

George MM, Vatta AF, Howell SB, Storey BE, McCoy CJ, Wolstenholme AJ, Redman EM, Gillerd JS, Kaplan RM (2021) Evaluation of changes in drugs susceptibility and population genetic structure in *Haemonchus contortus* following worm replacement as a means to reverse the impact of multiple- anthelmintic resistance on a sheep farm. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug resistance** 15: 134- 143.

Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PHD, Perez De León AA, Pereira JB, Villela HS (2014) Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 23: 150-156.

Haehling MB, Toscano JHB, Giraldelo LA, Santos IB, Esteves SN, Benavides MV, Tholon P, Chagas ACS (2021) Is selection for resistance and resilience to *Haemonchus contortus* possible in Morada Nova sheep? **Small Ruminant Research** 201.

IBGE, 2019. **Sistema do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística de Recuperação Automática—SIDRA**. IBGE, Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?z=t&o=26&i=P>> Acesso em 22 mai. 2020.

Issakowicz J, Issakowicz ACKS, Bueno MS, Costa RLD, Katiki LM, Geraldo AT, Abdalla AL, McManus C, Louvandini H (2016) Parasitic infection, reproductive and productive performance from Santa Inês and Morada Nova ewes. **Small Ruminant Research** 136: 96–136.

Magalhães KA, Holanda Filho ZF, Martins EC, Lucena CC (2020) **Caprinos e ovinos no Brasil: análise da Produção da Pecuária Municipal 2019**. Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos; Sobral. Boletim N° 11, 6p.

Oliveira PA, Ruas JL, Riet-Correa F, Coelho ACB, Santos BL, Marcolongo-Pereira C, Sallis ESV, Schild AL (2017) Doenças parasitárias em bovinos e ovinos no sul do Brasil: frequência e estimativa de perdas econômicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 37: 797-801.

Oliveira PJ, Torres P, Roniery SJ, Diniz BZ, Caldas ED (2012) Knowledge, attitudes, practices and biomonitoring of farmers and residents exposed to pesticides in Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 9.

Oliveira Pasiani J, Torres P, Silva JR, Diniz BZ, Caldas ED (2012) Knowledge, Attitudes, Practices and Biomonitoring og Farmers and Residents Exposed to Pestiides in Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 9: 3051-3068.

Pinheiro RR, Alves FSF, Andrioli A (2002) Diagnóstico precoce de doenças e sua importância na produção de caprinos e ovinos. **VI Seminário Nordestino de Pecuária – PECNORDESTE**.

Okino CH, Niciura SCM, Toscano JHB, Esteves SN, Santos IB, Von Haehling MB, Figueiredo A, Oliveira MCS, Chagas ACS (2021). Ovine β -globin gene: A new qPCR for rapid haplotype identification and association with susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. **Veterinary Parasitology** 294.

Raschia MA, Donzelli MV, Medus PD, Cetra BM, Maizon DO, Suarez VH, Periasamy K, Poli MA (2021) Single nucleotide polymorphisms from candidate genes associated with nematode resistance and resilience in Corriedale and Pampinta sheep in Argentina. **Gene** 770.

Rissi DR, Pierezan F, Oliveira Filho JC, Figuera RA, Irigoyen LF, Kommers GD Barros CSL (2010) Doenças de ovinos da região Central do Rio Grande do Sul: 361 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 30:21-28.

Roberts FHS, O'Sullivan JP (1950) Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **The Australian Journal of Agricultural Research** 1: 99–102.

Romero J, Boero C (2001) Epidemiología de la gastroenteritis verminosa de los ovinos en las regiones templadas y cálidas de la Argentina. **Analecta Veterinaria** 21: 21–37.

Ruas JL, Berne MEA (2007) Parasitoses por nematódeos gastrintestinais em bovinos e ovinos, p.584-604. In.: Riet-Correa F, Schild AL, Lemos RAA, Borges JRJ (Eds.) **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. Vol.1. Equali, Campo Grande, MS. 722p.

Santos MC, Xavier JK, Amarante, MRV, Basseto CC, Amarante AFT (2014) Immune response to *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* in sheep and its role on parasite specificity. **Veterinary Parasitology** 203: 127–138.

SEAPA/RS 2010. **Programa mais Ovinos no Campo. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Agronegócio do Rio Grande do Sul, Porto Alegre**. Disponível em <http://www.agricultura.rs.gov.br/conteudo/1033/?Mais_Ovinos_no_Campo> Acesso em 13 mai. 2020.

Sprenger LK, Risolia LW, Gabardo LB, Molento MB, Silva AWC, Sousa RS (2015) Doenças de ruminantes domésticos diagnosticados no laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Paraná: 1075 casos. **Archives of Veterinary Science** 20: 45-53.

Starling RZC, Almeida FA, Viana MVG, Castilhos AM, Amarante AFT (2019) Losses caused by gastrointestinal nematode infections in Dorper lambs under two nutritional status. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 28: 652-660.

Sutherland IA, Leathwick DM (2011) Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle – a global issue? **Trends in Parasitology** 27: 176-181.

Toscano JHB, Santos IB, Von Haehling MB, Giraldelo LA, Figueiredo A, Esteves SN, Chagas ACS (2019) Morada Nova sheep breed: resistant or resilient to *Haemonchus contortus* infection? **Veterinary Parasitology**: X 2.

Ueno H, Gonçalves PC (1998) Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. **Japan International Cooperation Agency, Tokyo** 143.

Van Wyk JA, Reynecke DP (2011) Blueprint for an automated specific decision support system for countering anthelmintic resistance in *Haemonchus* spp. at farm level. **Veterinary Parasitology** 177: 212–223.

Waller PJ (2006) From discovery to development: current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. **Veterinary Parasitology** 139: 1-14.

Zen S, Santos MC, Monteiro CM (2014) **Evolução da caprino e ovinocultura. Ativos Ovinos e Caprinos.** Disponível em <<https://correio.embrapa.br/service/home/>> Acesso em 11 de março de 2020.

CAPITULO 5 – Considerações finais

A ovinocultura vem ganhando destaque na pecuária brasileira, porém a ocorrência de endoparasitos prejudica os produtores há anos, gerando perdas milionárias. Desta forma, o presente estudo avaliou ferramentas alternativas para apoiar o controle parasitário.

Este trabalho foi feito utilizando 216 cordeiros da raça Morada Nova nascidos em estações do ano distintas (chuva e seca). Pode se observar que a utilização do GMD como um critério no tratamento de maneira seletiva dos animais foi eficaz, pois permitiu que os animais chegassem com peso de abate pouco inferior àqueles do tratamento rotineiro, porém com menor número de tratamentos anti-helmínticos. Tal redução minimiza os riscos de existência de resíduos na carne e os custos da produção. Outro fator verificado foi que o tratamento seletivo, ao reduzir o uso de fármacos, também reduziu o desenvolvimento da resistência parasitária por consequência. Tal fato foi constatado por meio do TRCOF, RESISTA-Test[®] e teste molecular.

A técnica do NIRS se mostrou uma ferramenta inovadora, versátil, rápida e com potencial para uso a campo. A metodologia apresentou precisão e acurácia próximas ao que normalmente é encontrado nos métodos de referência e permitiu interação do sangue com a radiação do infravermelho próximo.

A análise econômica mostrou que animais tratados frequentemente para o controle parasitário gerou um gasto maior, porém chegaram ao abate com o peso maior. Ao contrário, animais tratados apenas quando se apresentavam clinicamente doentes tiveram menor ganho de peso. Entretanto, o tratamento rotineiro faz com que a resistência anti-helmíntica se estabeleça rapidamente nos parasitos.

Os resultados apresentados elucidam que a helmintose ovina é umas das piores enfermidades que o produtor tem que lidar e que apresenta uma série de problemas no tratamento empregado para seu controle. A resistência anti-helmíntica, que leva à ineficácia dos fármacos, é um dos principais pontos que devem ser considerados no programa de controle integrado das parasitoses, estimulando a adoção de tratamentos seletivos.