FERNANDA ROSALINSKI MORAES

PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS G E E OVINAS ANTI-*Haemonchus contortus*, SEU USO NA SELEÇÃO DE ANIMAIS RESISTENTES À VERMINOSE GASTRINTESTINAL E NA COMPREENSÃO DOS FENÔMENOS IMUNOLÓGICOS QUE DECORREM DA INTERAÇÃO ENTRE HOSPEDEIRO E PARASITO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Processos Biotecnológicos, Área de Concentração: Saúde Animal e Humana.

Orientadora:
Prof. Dr.ª Vanete Thomaz Soccol - UFPR

CURITIBA
2007

Dedico este trabalho a todos aqueles que acreditam e trabalham pelo desenvolvimento da ovinocaprinocultura no Estado do Paraná.

AGRADECIMENTOS

À professora Dr.ª Vanete Thomaz Soccol, não apenas pela devotada orientação e apoio em todos os momentos de minha vida acadêmica, que culminaram com a execução deste trabalho, mas também pelo exemplo de competência e amor à pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, PPGPB, na pessoa de seu coordenador Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol e sua vice-coordenadora, Prof.ª Dr.ª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional e científico, além de sua disponibilidade e apoio na execução deste trabalho.

A Aparecida Celina Jarletti, secretária do Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos por sua atenção e disponibilidade.

To Mr. Richard Shaw, from AgResearch - Wallaceville Research Centre, for sharing the IgE methods, supplying the IgE mAbs and also for the suggestions to this study.

Ao professor Doutor Luiz Mário Fedalto, diretor da Fazenda Experimental do Canguiri, por possibilitar o abate dos animais utilizados para a obtenção do antígeno.

Ao professor Doutor Paulo Rossi Júnior, responsável pelo setor de Ovinocultura da Fazenda Experimental do Canguiri, por possibilitar a coleta dos soros controle negativos.

À professora Doutora Rosângela Locatelli Dittrich e à tecnologista Nara Schimanski, pelo uso do Laboratório de Patologia Clínica da UFPR e auxílio na realização dos exames hematológicos.

Ao Tenente Mário Barbosa, do Quartel General da V Região Militar em Curitiba, pela cessão dos ovinos e apoio na realização deste trabalho.

Aos soldados Reinaldo José dos Santos, José Ananias Carneiro e Alexandre Trindade, do Quartel General da V Região Militar em Curitiba, pelo cuidado no manejo dos animais e a ajuda na realização das coletas de material.

Ao professor Doutor José Domingos Fontana, do Departamento de Bioquímica da UFPR, pela utilização do sonicador para obtenção do antígeno.

Ao SIMEPAR, por fornecer os dados meteorológicos do período experimental.

Aos professores do Laboratório de Parasitologia Animal Dr.ª Edilene Alcântara de Castro, Dr. João Carlos Minozzo e Dr.ª Rosângela Clara Paulino, cujo auxílio técnico e sugestões possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

A Juliana Tracz Pereira e Luciane Henning, funcionárias do Laboratório de Parasitologia Animal, pelo suporte laboratorial em todas as fases de execução deste experimento, além de sua amizade e companhia.

A todos os mestrandos, Doutorandos e estagiários do laboratório de Parasitologia Animal e do Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR, pela amizade, paciência e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

A todos os colegas do PPGPB, em especial a Débora Brand, Michelle Rigon Spier, Andrea Canutto, Elza Maria Galvão Ciffoni e Nelson Fernandes pela amizade e apoio.

Às amigas Cristina Sotomaior, Viviane Milczewski e Samira Chahad Ehlers pelas sugestões, incentivo e companhia em todas as fases deste trabalho.

À direção dos Cursos de Medicina Veterinária e Bacharelado em Ciências Biológicas da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Campus Toledo, na pessoa da Prof.Dr.ª Rosana Richter e da Prof. Dr.ª Maria Cristina Zborowski de Paula, por terem permitido a compatibilização de minhas atividades docentes com as do PPGPB.

A meus colegas da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e Universidade do Oeste de Santa Catarina, em especial a Renato Herdina Erdmann, Sonia Hefler, Maria Anúzia Duarte, Mateus Matiuzzi da Costa, Marina Tie Shimada, Vanessa Yuri de Lima, Ana Cristina Pinto Juhaz e Andréa Christina Meirelles pela amizade e auxílio na reposição de aulas, sem o qual este trabalho não poderia ter sido executado.

A meus pais, Glória Regina Rosalinski Moraes e José Moraes Neto, pelo carinho e dedicação constantes.

Ao Panthro, ao Harry e ao Nero, meus companheiros peludos e de quatro patas, por tolerarem minhas ausências por vários dias, mesmo sem compreender bem o porquê.

Às ovelhas e aos cordeiros que possibilitaram este estudo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta tese.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....xi

LISTA DE FIGURAS.....xiii

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....xv

RESUMO.....xvi

ABSTRACT.....xvii

PREFÁCIO.....01

CAPÍTULO 1 - PRODUÇÃO DE ANTÍGENO SOMÁTICO DE *Haemonchus contortus* ADULTOS E SEU USO EM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO PARA DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G OVINA.....14

RESUMO 14

ABSTRACT.....14

INTRODUÇÃO 15

MATERIAL E MÉTODOS..... 17
Obtenção do antígeno..... 17
Soros-controle 18
*Padronização da Técnica de Ensaio Imunoenzimático para detecção de IgG ovina anti-*Haemonchus contortus *(H.c.)*..... 18
Determinação de reações inespecíficas 19
Ponto de corte..... 19
*Padronização da Técnica de Ensaio Imunoenzimático para detecção de IgE ovina anti-*Haemonchus contortus *(H.c.)*..... 20

RESULTADOS 21
Quantidade de antígeno para sensibilização da placa no ensaio para detecção de IgG anti- H.c 21
Padronização da diluição do soro..... 21
Padronização da diluição do conjugado 22
Concentração de antígeno para ensaio imunoenzimático de detecção de IgE anti-H.c.. 22
Ponto de corte..... 22

DISCUSSÃO 23

CONCLUSÃO 24

REFERÊNCIAS..... 25

CAPÍTULO 2 - USO DE MARCADORES PARASITOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS NA SELEÇÃO DE OVELHAS RESISTENTES ÀS PARASITOSES 34

RESUMO 34

SUMMARY 34

INTRODUÇÃO 35

MATERIAL E MÉTODOS 36
Animais 36
Coleta de fezes e sangue 36
Métodos parasitológicos 37
Contagem de eosinófilos 37
*Determinação do nível de anticorpos da classe IgG anti-*Haemonchus contortus 37
*Determinação do nível de anticorpos da classe IgE anti-*Haemonchus contortus 38
Determinação do hematócrito 39
Controle parasitário 39
Análise estatística 39

RESULTADOS E DISCUSSÃO 41
Avaliação parasitológica 41
Eosinófilos sanguíneos 43
*IgG anti-*Haemonchus contortus 45
*IgE anti-*Haemonchus contortus 46
Hematócrito 46
Análise de correlação 47
Seleção das ovelhas 50
a)Classificação das ovelhas em resistentes e susceptíveis à parasitose gastrintestinal com base no marcador parasitológico (OPG) 50
b) Classificação das ovelhas em resistentes e susceptíveis à parasitose gastrintestinal com base em mais de um marcador 52
c) Classificação das ovelhas em resistentes e susceptíveis com base em marcadores imunológicos 53
d) Classificação das ovelhas em resilientes e susceptíveis com base no hematócrito . 53

CONCLUSÕES 59

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 60

CAPÍTULO 3 – SURGIMENTO DA RESPOSTA IMUNE DE CORDEIROS LANADOS TIPO CARNE CRIADOS A PASTO DO DESMADE A UM ANO DE IDADE AOS PARASITOS GASTRINTESTINAIS.....65

INTRODUÇÃO 65

MATERIAL E MÉTODOS..... 67
Animais 67
Coleta de fezes e sangue 67
Métodos parasitológicos 68
Contagem de eosinófilos 68
Determinação do nível de anticorpos da classe IgG anti-Haemonchus contortus 69
Determinação do nível de anticorpos da classe IgE anti-Haemonchus contortus..... 69
Determinação do nível total de anticorpos da classe IgE 70
Determinação do hematócrito 72
Controle parasitário 72
Análise estatística 72

RESULTADOS E DISCUSSÃO 73
Avaliação parasitológica 73
Avaliação hematológica 77
Avaliação imunológica 79

CONCLUSÕES 86

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 86

CAPÍTULO 4 - USO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS NA SELEÇÃO E NO ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE E DE CORDEIROS RESISTENTES E RESILIENTES ÀS PARASITOSES 90

INTRODUÇÃO 90

MATERIAL E MÉTODOS 91
Animais 91
Marcadores de seleção 92
Análise estatística 92

RESULTADOS 94
Acompanhamento parasitológico e imunológico 94
Classificação dos cordeiros em resistentes e susceptíveis ao parasitismo com base no marcador parasitológico (número de ovos de helmintos por grama de fezes) 95
*Seleção indireta dos cordeiros em resistentes e susceptíveis ao parasitismo com base na IgE sérica total e na IgE anti-*Haemonchus contortus 102
Seleção dos cordeiros em resilientes e susceptíveis ao parasitismo com base no hematócrito 108

DISCUSSÃO 114

CONCLUSÕES 119

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 120

CONSIDERAÇÕES FINAIS 124

ANEXOS 128

ANEXO 1 – VALORES DE REFERÊNCIA NA ESPÉCIE OVINA 129

ANEXO 2 – PLUVIOSIDADE E TEMPERATURA NA CIDADE DE CURITIBA, DE JUNHO DE 1998 A JUHO DE 1999 130

ANEXO 3 – HIPÓTESES DE SELEÇÃO DE OVELHAS RESISTENETES OU SUSCEPTÍVEIS À VERMINOSE GASTRINTESTINAL COM BASE EM MAIS DE UM MARCADOR 131

ANEXO 4 – HIPÓTESES DE SELEÇÃO DE INDIRETA DE OVELHAS RESISTENETES OU SUSCEPTÍVEIS À VERMINOSE GASTRINTESTINAL 134

ANEXO 5 – HIPÓTESES DE SELEÇÃO DE OVELHAS resilientes OU SUSCEPTÍVEIS À VERMINOSE GASTRINTESTINAL.....135

ANEXO 6 – HIPÓTESES DE SELEÇÃO DE CORDEIROS RESISTENETES OU SUSCEPTÍVEIS À VERMINOSE GASTRINTESTINAL, BASEADAS NO MARCADOR PARASITOLÓGICO.....136

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1 – VALORES DE ABSORBÂNCIA INESPECÍFICOS E ESPECÍFICOS PARA IgG ANTI-*Haemonchus contortus* (H.c.) QUANDO DUAS DILUIÇÕES DE SORO CONTROLE FORAM ANALISADAS.....31

CAPÍTULO 2

TABELA 1 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS VALORES DE HEMATÓCRITO (HT) DAS OVELHAS, NO PERÍODO DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999 CURITIBA, PARANA 47

TABELA 2 – CORRELAÇÕES DE SPEARMAN ENTRE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG), EOSINÓFILOS CIRCULANTES (EOSINO), IgG E IgE ANTI-*Haemonchus contortus* E HEMATÓCRITO (HT) DAS OVELHAS, CONSIDERANDO TODAS AS COLETAS ENTRE NOVEMBRO DE 1998 E MAIO DE 1999 (ACIMA DA DIAGONAL) E APENAS A COLETA DE 30 DE MARCO DE 1999, CORRESPONDENTE AO PICO DE PARASITISMO (ABAIXO DA DIAGONAL) 48

TABELA 3 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO LOGARITMO DAS CONTAGENS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG), EOSINÓFILOS CIRCULANTES (Eosino), IgG E IgE ANTI- *Haemononchus contortus* E HEMATÓCRITO DAS OVELHAS CLASSIFICADAS COMO RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS PELA ANÁLISE DE CLUSTER REALIZADA COM DADOS DE OPG, NA COLETA DE 30 DE MARÇO DE 1998, REFERENTE AO PICO DE PARASITISMO 51

TABELA 4 – MÉDIAS DOS VALORES DE HEMATÓCRITO E DO LOGARITMO DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES, EOSINÓFILOS CIRCULANTES, IMUNOGLOBULINAS E e G ANTI-*Haemonchus contortus* OBTIDOS NA COLETA DE 30 DE MARÇO DE 1999 PARA AS OVELHAS CLASSIFICADAS COMO SUSCEPTÍVEIS OU resilientes PELA ANÁLISE DE CLUSTER DOS VALORES DE HEMATÓCRITO DESTA MESMA DATA 54

TABELA 5 – MÉDIAS DOS VALORES DE HEMATÓCRITO E DO LOGARITMO DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES, EOSINÓFILOS CIRCULANTES, IMUNOGLOBULINAS E e G ANTI-*Haemonchus contortus* OBTIDOS NA COLETA DE 30 DE MARÇO DE 1999 PARA AS OVELHAS CLASSIFICADAS COMO SUSCEPTÍVEIS OU RESILIENTES PELA ANÁLISE DE CLUSTER DOS VALORES DE HEMATÓCRITO DESTA MESMA DATA E DA COLETA ANTERIOR..... 55

CAPÍTULO 3

TABELA 1 – DATAS DOS TRATAMENTOS ANTI-HELMÍNTICOS NECESSÁRIOS, PRINCÍPIOS ATIVOS UTILIZADOS E PERCENTUAL DE REDUÇÃO DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DOS CORDEIROS, DURANTE O PERÍODO DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO DE 1999, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL..... 75

TABELA 2 – PERCENTUAL DE GÊNEROS DE HELMINTOS IDENTIFICADOS NAS COPROCULTURAS REALIZADAS NOS MESES DE NOVEMBRO DE 1998 JUNHO DE 1999, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL..... 76

CAPÍTULO 4

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS CORDEIROS EM RESISTENTES (R) OU SUSCEPTÍVEIS (S) DE ACORDO COM A ANÁLISE DE CLUSTER DO OPG DO SEGUNDO (HIPÓTESE 1), TERCEIRO (HIPÓTESE 2) OU QUARTO PICO DE VERMINOSE (HIPÓTESE 3) 96

TABELA 2 – DIFERENÇA ENTRE OS ANIMAIS CLASSIFICADOS COMO RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS COM BASE NO OPG DO SEGUNDO (HIPÓTESE 1), TERCEIRO (HIPÓTESE 2) OU QUARTO PICO DE VERMINOSE (HIPÓTESE 3) PARA AS VARIÁVEIS OPG, NÚMERO DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IGE TOTAL, IGE E IGG ESPECÍFICAS, DE ACORDO COM O TESTE T DE STUDENT.....97

TABELA 3 – DIFERENÇA ENTRE OS ANIMAIS CLASSIFICADOS COMO RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS COM BASE NO OPG DOS TRÊS PICOS DE OPG PÓS DESMAME PARA AS VARIÁVEIS OPG, NÚMERO DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IGE TOTAL, IGE E IGG ESPECÍFICAS, DE ACORDO COM O TESTE T DE STUDENT..... 100

TABELA 4 – DIFERENÇA ENTRE OS ANIMAIS CLASSIFICADOS COMO RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS AOS PARASITOS GASTRINTESTINAIS COM BASE NA IgE ESPECÍFICA DAS COLETAS 5, 8 E 14 (HIPÓTESE A); 5, 10 E 14 (HIPÓTESE B); IgE TOTAL DAS COLETAS 5, 8 E 14 (HIPÓTESE C); 5, 10 E 14 (HIPÓTESE D); PARA AS VARIÁVEIS OPG, NÚMERO DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IgE TOTAL, IgE E IgG ESPECÍFICAS, DE ACORDO COM O TESTE T DE STUDENT 107

TABELA 5 – DIFERENÇA ENTRE OS ANIMAIS CLASSIFICADOS COMO resilientes E SUSCEPTÍVEIS AOS PARASITOS GASTRINTESTINAIS COM BASE NO HEMATÓCRITO DAS COLETAS 5 (HIPÓTESE I); 10 (HIPÓTESE II); 14 (HIPÓTESE III); 5 E 14 (HIPÓTESE V); E GRAU FAMACHA© ESTIMADO CONFORME O HEMATÓCRITO DA COLETA 14 (HIPÓTESE "F")PARA AS VARIÁVEIS OPG, NÚMERO DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IgE TOTAL, IgE E IgG ESPECÍFICAS, DE ACORDO COM O TESTE T DE STUDENT 113

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 - VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS SOROS DE OVINOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA *Haemonchus contortus* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO SOMÁTICO DO PARASITO ADULTO (μg/mL), QUANDO OS SOROS FORAM DILUÍDOS 1:80 E O CONJUGADO ANTI-IgG OVINA 1:1000.....29

FIGURA 2 - VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS SOROS DE OVINOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA *Haemonchus contortus* (H.c.) EM FUNÇÃO DA DILUIÇÃO DOS SOROS CONTROLES, QUANDO A PLACA FOI SENSIBILIZADA COM SOLUÇÃO ANTÍGENO A 5 $\mu g.mL^{-1}$ E O CONJUGADO ANTI-IgG OVINA DILUÍDO 1:1000.....30

FIGURA 3 - VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS SOROS DE OVINOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA *Haemonchus contortus* EM FUNÇÃO DA DILUIÇÃO DO CONJUGADO ANTI-IgG OVINA, QUANDO A PLACA FOI SENSIBILIZADA COM 5 $\mu g.mL^{-1}$ DE ANTÍGENO E OS SOROS CONTROLES FORAM DILUÍDOS A 1:80.....32

FIGURA 4 – VALORES DE ABSORBÂNCIA DE SORO PADRÃO COM 10 μg DE IgE OVINA POR mL QUANDO SUBMETIDOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTÍGENO DE *Haemonchus contortus* EM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO.....33

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 – MÉDIA MENSAL DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DAS OVELHAS ADULTAS, POR TIPO DE OVO ENCONTRADO, NO PERÍODO DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999, CURITIBA, PARANA 41

FIGURA 2 – MÉDIA MENSAL DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG -LINHAS), EOSINÓFILOS POR MILÍMETRO CÚBICO DE SANGUE (a), ABSORBÂNCIA PARA IgG (b) E IgE ANTI-*Haemonchus contortus* (c) DAS OVELHAS ADULTAS, NO PERÍODO DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999.....44

FIGURA 3 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE CONTAGEM DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DA COLETA DE 30 DE MARÇO DE 1999, CORRESPONDENTE AO PICO DE PARASITISMO DE OUTONO EM OVELHAS 50

FIGURA 4 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE HEMATÓCRITO DAS OVELHAS NA COLETA DE 30 DE MARÇO DE 1999, CORRESPONDENTE AO PICO DE PARASITISMO.....54

CAPÍTULO 3

FIGURA 1 – MÉDIA DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG), POR TIPO DE OVO, NOS CORDEIROS ACOMPANHADOS DE JULHO DE 1998 A JUNHO DE 1999, EM CURITIBA, PARANÁ, BRASIL. 74

FIGURA 2 – MÉDIA DE OVOS DE HELMINTO POR GRAMA DE FEZES (OPG-LINHAS), HEMATÓCRITO (a), EOSINÓFILOS SANGÜÍNEOS(b), NÍVEIS DE IgE E IgG ANTI-*Haemonchus contortus* (c) E IgE TOTAL (d), EM CORDEIROS DO DESMAME A UM ANO DE IDADE, DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO DE 1999, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL 78

CAPÍTULO 4

FIGURA 1 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE IgE ANTI-*Haemonchus contortus* DA 5.ª, 8.ª E 14.ª COLETA, REALIZADAS EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998, 12 DE JANEIRO E 04 DE MAIO DE 1999 104

FIGURA 2 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE IgE ANTI-*Haemonchus contortus* DA 5.ª, 10.ª E 14.ª COLETA, REALIZADAS EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998, 09 DE FEVEREIRO E 04 DE MAIO DE 1999..... 104

FIGURA 3 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE IgE TOTAL DA 5.ª, 8.ª E 14.ª COLETA, REALIZADAS EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998, 12 DE JANEIRO E 04 DE MAIO DE 1999 105

FIGURA 4 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE IgE TOTAL DA 5.ª, 10.ª E 14.ª COLETA, REALIZADAS EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998, 09 DE FEVEREIRO E 04 DE MAIO DE 1999 105

FIGURA 5 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE HEMATÓCRITO DA 5.ª, COLETA, REALIZADA EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998..... 109

FIGURA 6 - - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE HEMATÓCRITO DA 10.ª, COLETA, REALIZADA EM 09 DE FEVEREIRO DE 1999 109

FIGURA 7 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE HEMATÓCRITO DA 14.ª, COLETA, REALIZADA EM 04 DE MARÇO DE 1999..... 110

FIGURA 8 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE HEMATÓCRITO DA 5.ª, 10.ª E 14.ª COLETA, REALIZADAS EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998, 09 DE FEVEREIRO E 04 DE MAIO DE 1999..... 111

FIGURA 9 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE HEMATÓCRITO DA 5.ª, E 14.ª COLETA, REALIZADAS EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998 E 04 DE MAIO DE 1999.....111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA – albumina sérica bovina;
CD – *cluster* de diferenciação;
EDTA – Ácido etileno-diamino-tetra-acético;
ELISA – ensaio imunoenzimático ligado a enzima;
Eosino – eosinófilo(s);
FAMACHA© - *Faffa Malan Chart*;
FcεR - receptor de cadeia ε (IgE);
H.c. – *Haemonchus contortus*;
HT – hematócrito;
IFN – interferon (α, β ou γ);
Ig - imunoglogulina;
IL – interleucina;
mAb – anticorpo monoclonal;
L_1 – Larva de primeiro estádio;
L_2 – Larva de segundo estádio;
L_3 – Larva de terceiro estádio;
L_4 – Larva de quarto estádio;
L_5 – Larva de quinto estádio;
LAK – células exterminadoras ativadas por linfocina;
OPD – orto-fenileno-diamino;
OPG – número de ovos de helmintos por grama de fezes;
PBS – tampão fosfato;
pH – potencial hidrogeniônico;
SAS – sulfato de amônio saturado;
Th – Célula T auxiliar (Tipo 1 ou 2);
TMB – Tetra-metil-benzidino;
UFPR - Universidade Federal do Paraná.

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram padronizar a técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos das classes IgG e IgE ovinas específicos contra *Haemonchus contortus* (H.c.) e validá-la como ferramenta no estudo da resposta imune dos ovinos aos helmintos gastrintestinais e na seleção de animais resistentes às parasitoses. Para isso, foi acompanhado um rebanho de 20 ovelhas e 25 cordeiros mestiços suffolk, na Região de Curitiba, Paraná, no período de julho de 1998 a junho de 1999, por meio de coletas mensais de sangue e fezes. Os animais estavam sujeitos à infecção natural por nematódeos durante todo o período do experimento. O marcador parasitológico utilizado foi o número de ovos de helmintos por grama de fezes (OPG); os marcadores imunológicos foram o número de eosinófilos sanguíneos, Imunoglobulina G (IgG) específica, Imunoglobulina E (IgE) total e específica. O hematócrito (HT) foi utilizado como indicativo de resiliência. Tanto para a pesquisa de IgG e quanto IgE específicas, a concentração ótima de antígeno H.c. por poço foi de 500ng e, para a detecção de IgG as diluições ótimas de soro e conjugado foram, respectivamente, 1:80 e 1:1000. As ovelhas apresentaram um padrão de resposta à verminose definido para cada animal, o que possibilitou que cada indivíduo fosse identificado como resistente ou susceptível pelo OPG. Ovelhas resistentes tiveram menores médias de OPG, maiores médias de HT e eosinófilos que as susceptíveis. O nível de anticorpos se mostrou variável entre os grupos, mas houve uma tendência do grupo susceptível em apresentar menores médias de IgE e maiores de IgG específica que o grupo resistente. Tanto o número de eosinófilos quanto a IgE específica poderiam ser utilizados concomitantemente com o OPG para a identificação de ovelhas resistentes e susceptíveis. O número de eosinófilos sanguíneos foi o único marcador imunológico capaz de classificar as ovelhas indiretamente nos mesmos grupos obtidos para o OPG. Também foi o único marcador imunológico a estar significativamente mais elevado nos indivíduos classificados como resilientes pelo HT. Os cordeiros mostraram uma estabilização no comportamento das variáveis imunológicas por volta dos seis meses e meio de idade, indicando um padrão de resposta imune aos helmintos gastrintestinais. Contudo, esta resposta não foi completa e, em alguns animais, variou conforme o pico de parasitismo. A identificação de cordeiros resistentes só foi possível com os dados de OPG de três picos de parasitose pós-desmame. Cordeiros resistentes tenderam a ter maiores médias de HT, eosinófilos circulantes, IgE total, IgE e IgG específicas que os susceptíveis, mas somente para IgE total e específica as diferenças foram significativas durante a maior parte do acompanhamento. Foi possível identificar indiretamente cordeiros de alto e baixo OPG pelos dados de IgE específica, medidos durante os três picos de parasitismo. Tanto para seleção direta pelo OPG quanto indireta pela IgE anti-*H.c.*, foram necessários dados de três picos de parasitismo pós-desmame. Portanto, para todas as hipóteses, os cordeiros somente puderam ser selecionados quando tinham uma média de dez meses de idade. Cordeiros resilientes apresentaram maiores níveis séricos de IgE total e IgG específica, indicando diferentes mecanismos de resposta ao antígeno parasitário que os animais resistentes.

Palavras-chave: resistência aos parasitos, eosinófilos, IgG, IgE, hematócrito, resiliência

ABSTRACT

This work was conducted in order to standardize an enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) to detect ovine immunoglobulin G and E anti-*Haemonchus contortus* (H.c.) to study the immune response of sheep subjected to natural challenge of gastrointestinal parasites and to verify the possibility of identifying animals that are resistant to parasites through parasitological and immunological markers. Twenty ewes and 25 lambs from a farm in Curitiba, Parana, Brazil, were sampled monthly for blood and faeces, from July of 1998 to June of 1999. Sheep were under natural infection of gastrointestinal nematodes the whole time of the experiment. Faecal egg count (FEC) was chosen as parasitological marker. The number of peripheral eosinophils, total and specific IgE and specific IgG antibodies were used as immunological markers. The packed-cell value (PCV) was used as a resilience indicator. For the specific antibody assays, the optimum concentration of antigen per well was 500 ng. For IgG anti-*H.c.* detection, serum samples and conjugate were diluted 1to 80 and 1 to 1000, respectively. Each ewe had a pattern of response to helminths during the whole experimental period. This allowed each animal to be classified as resistant or susceptible by FEC. Resistant ewes had lower FEC and higher number of peripheral eosinophils than susceptible ewes. Antibody levels were very variable in both groups, but there was a tendency of susceptible sheep to have lower IgE and higher IgG than resistant ones. Both peripheral eosinophils and specific IgE data could be joined to FEC in order to identify resistant or susceptible animals. The number of peripheral eosinophils was the only immunological maker that was able to classify high and low FEC ewes in two different groups. It was also the only immunological variable to be higher in resilient ewes. The lambs showed stabilisation in the level of immunological markers when they had reached 28 weeks of age. But this was not a definitive and complete response. Some of the animals showed a slight variation from one challenge to another. The identification of resistant or susceptible lambs was possible when data of three peaks of FEC post-weaning were analysed. There was a tendency for resistant lambs to show higher means for peripheral eosinophils, specific IgG, total and specific IgE, but only for total and specific IgE were the differences significant. It was possible to identify indirectly high and low FEC lambs using specific IgE of three peaks of FEC. Selection of lambs based both in FEC or in specific IgE required data from three peaks of parasitism post-weaning. Thus, lambs could be selected only when they had reached 10 months of age. Resilient lambs had higer total IgE and specific than the susceptible ones. This might indicate pattern of immune response different from the resistant lambs to parasite antigens.

Key words: sheep; resistance to nematodes; eosinophils; IgG; IgE; PCV; resilience

PREFÁCIO

A ovinocultura é uma atividade que vem se destacando no cenário econômico paranaense. Atualmente, o rebanho estadual é estimado em 511 mil cabeças de ovinos (IBGE, 2005). Este número caracteriza um aumento no efetivo do rebanho estadual a partir da década de 80, quando houve a importação de 4.050 cabeças das raças *Suffolk* e *Hampshire Down* a fim de melhorar a genética do rebanho paranaense e definir um padrão de criação de ovinos tipo carne (SOUZA, 1997; BITTENCOURT, 2005). Nos anos 90, o Governo do Estado fomentou a introdução de 184 mil ovelhas para rebanho geral, provenientes do Rio Grande do Sul e Uruguai (PARANÁ, 1994, ***apud*** BITTENCOURT, 2005). Após um período de declínio da atividade, foi criado em 2003 o Programa de Apoio à Estruturação das Cadeias Produtivas de Ovinos e Caprinos (PAECPOC), com o objetivo de organizar o mercado e incentivar o associativismo em todo o Paraná (SEAB, 2006). Os reflexos na expansão e organização da ovinocaprinocultura foram evidentes, culminando com a criação de diversas cooperativas no interior do Estado.

Um dos principais entraves econômicos à criação de pequenos ruminantes é a verminose (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 1996; CABARET *et al.,* 2002; FAO, 2003). Embora não haja estatística oficial, sabe-se que estas perdas são significativas. No Brasil, estima-se que sejam gastos mais de 100 milhões de dólares por ano em anti-helmínticos, o que corresponde a 20% do mercado de produtos para sanidade animal (WALLER *et al.,* 1996). No Estado do Paraná, MORAES *et al.* (1998) relataram que uma propriedade paranaense com apenas 250 animais teria um gasto anual de R$ 2.850,00 com anti-helmínticos. Além do gasto com medicamentos, a verminose envolve ainda o aumento da conversão alimentar, diminuição do ganho de peso, da produção de carne, lã e leite, cujos valores são difíceis de serem estimados, especialmente quando a parasitose é subclínica (SYKES, 1978). No prejuízo total da verminose à ovinocultura, deve ainda ser contabilizada a perda de animais por óbito.

Os principais nematódeos gastrintestinais de importância econômica pertencem à Ordem Strongylida, gêneros *Haemonchus; Trichostrongylus; Teladorsagia*; *Ostertagia; Oesophagostomum, Nematodirus* e *Cooperia* (ANDERSON, 2000). De uma forma geral, esses parasitos coexistem em infecções mistas, sendo que a prevalência de um ou mais gêneros depende do clima da região, da estação do ano, da categoria animal e das condições da propriedade (SANTIAGO *et al.,* 1976; NARI e CARDOZO, 1987; ECHEVARRIA, 1996b; MORAES *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 1999).

Em regiões quentes e chuvosas, normalmente o *Haemonchus contortus* é o parasito mais importante (O'CONNOR *et al.*, 2006). De todos os parasitos citados anteriormente, este é o mais patogênico por ser altamente hematófago. Cada helminto adulto remove cerca de 0,05 ml de sangue por dia, por ingestão e extravasamento de sangue total a partir das lesões (URQUHART *et al.,* 1998). Além dos diversos graus de anemia, é comum a ocorrência de emagrecimento progressivo, edema submandibular e diarréia.

O *Trichostrongylus colubriformis* é a espécie de maior freqüência em regiões subtropicais e temperadas do mundo. Pode ser causa primária da verminose clínica em regiões temperadas (URQUHART *et al.*,1998; BISSET *et al.,* 2001). MORAES *et al.* (1998) e OLIVEIRA *et al.* (1999) mostraram que este parasito é ainda mais prevalente que o *H. contortus* em algumas regiões do Paraná. Contudo, a maior patogenicidade da segunda espécie a torna mais importante.

Os principais sinais clínicos da tricostrongilose são a diarréia, devido à lesão epitelial e conseqüente enterite e má absorção. Em decorrência da baixa absorção de proteína, gordura, cálcio e fósforo, é observada a diminuição do crescimento (SYKES, 1978; URQUHART *et al.,* 1998). SYKES (1978) relata uma redução de 38% no ganho de peso, 50% na deposição de gordura, 77% na deposição de proteína e 99% na deposição de cálcio em animais parasitados com *T. colubriformis* em níveis subclínicos, quando comparados com animais livres de helmintos.

Na tentativa de controlar os prejuízos impostos pelos nematódeos ao rebanho, o uso de drogas anti-helmínticas foi a principal ferramenta utilizada pelos produtores durante muitos anos. Seu uso freqüente, em esquemas de desverminação múltipla (de

30 em 30 dias) ou supressiva (de 15 em 15 dias), resultou em um alto custo de tratamento e no rápido surgimento da resistência dos parasitos aos vários princípios ativos (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 1996; SOUZA, 1997; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2004).

O problema da resistência dos nematódeos aos anti-helmínticos é uma preocupação de caráter mundial (WALLER, 1994). Acredita-se que a situação seja mais severa nos países da América Latina (FAO, 2003). Pesquisas realizadas nos países do MERCOSUL (Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai) demonstraram alta prevalência de populações de nematódeos de ovinos resistentes aos vários princípios ativos de anti-helmínticos, inclusive aos de última geração, como as lactonas macrocíclicas (FAO, 2003). Na Região Sul do Brasil, a resistência anti-helmíntica já foi detectada em ovinos dos três estados: Rio Grande do Sul (ECHEVARRIA *et al*. 1996a), Santa Catarina (RAMOS *et al*., 2002; ROSALINSKI-MORAES *et al.*, 2007) e Paraná (THOMAZ-SOCCOL *et al*., 1996; THOMAZ-SOCCOL *et al*., 2004).

Uma vez que a resistência anti-helmíntica é premente, é necessário tratar os princípios ativos como um recurso não renovável. A utilização racional dos anti-helmínticos está associada a uma série de medidas que compõem o controle integrado de parasitos - CIP (FAO, 2003). Este pressupõe o uso de diversos métodos de controle conjuntamente, visando diminuir o número de tratamentos e aumentar o número de parasitos na população de refúgio (NARI e EDDI, 2002).

Refúgio é a proporção da população parasitária que não está sob ação de determinada medida de controle farmacológica, escapando da seleção para resistência (BATH *et al*., 2001). Após o uso do anti-helmíntico, a população em refúgio pode se desenvolver e competir com a população selecionada, diminuindo a freqüência dos alelos para resistência na população total. Em uma situação de campo, a população de refúgio compreende a população de estádios não parasitários presentes na pastagem bem como os parasitos presentes no trato digestório dos animais que não foram tratados com anti-helmíntico.

De acordo com conceito de CIP, diversos esforços têm sido realizados para identificar apenas os animais que necessitam tratamento ao invés de dosificar todos os animais de um mesmo lote, possibilitando o aumento da população de refúgio em cada

tratamento. Em um rebanho ovino, é possível observar vários níveis de resposta a um desafio parasitário. Enquanto grande parte dos animais apresenta-se saudável, uma minoria de indivíduos elimina um alto número de ovos de helmintos nas fezes e mostra sinais clínicos de parasitose (SOTOMAIOR, 2002). Portanto, a identificação e tratamento somente destes indivíduos reduziria a pressão de seleção de isolados resistentes e contribuiria para a redução do custo de produção, uma vez que há economia de drogas antiparasitárias.

ALBERS *et al.* (1987) definem como resistência do hospedeiro a capacidade dos ovinos em impedir o estabelecimento e/ou subseqüente desenvolvimento dos parasitos no trato gastrintestinal. Esta é uma característica que apresenta valores de herdabilidade entre 0,30 e 0,50, similares aos das variáveis produtivas, tais como ganho de peso e produção de lã (DOUCH *et al.*,1996; AMARANTE, 2004). Programas de melhoramento genético ovino que levem em consideração a resistência às parasitoses, como o Nemesis, na Austrália (CSIRO, 2006), e o WORMFEC, na Nova Zelândia (BISSET *et al.,*2001), vêm sendo desenvolvidos com sucesso. Estes programas utilizam o número de ovos de helmintos por grama de fezes (OPG) como marcador fenotípico de resistência, uma vez que este apresenta correlação negativa com a carga parasitária (AMARANTE, 2004).

A resistência genética dos ovinos ao *Haemonchus contortus* resulta da expressão de uma resposta imunológica adquirida (GILL,1991). O principal mecanismo de resposta imune aos helmintos gastrintestinais é a ativação de células T auxiliares do tipo 2 em resposta ao antígeno parasitário (TIZARD, 2002; PERNTHANER *et al.,*2006). Isso resulta na produção de anticorpos das classes IgG, IgA e, principalmente, IgE. A combinação dos antígenos do parasito com anticorpos da classe IgE conjugada aos mastócitos resulta na degranulação destes, com liberação de aminas vasoativas e fatores quimiotáticos dos eosinófilos. Em resposta a esses fatores, ocorre o aumento na permeabilidade capilar e secreção de muco intestinal, contração da musculatura lisa do trato gastrintestinal e mobilização dos eosinófilos da medula óssea para a corrente sanguínea, resultando em eosinofilia (McCLURE e EMMERY, 1994; TIZARD, 2002).

Como a eosinofilia está sob controle genético, muitos trabalhos têm sido realizados tentando correlacioná-la com a maior ou menor resistência aos helmintos (BUDDLE *et al.*, 1992; WOOLASTON *et al.,* 1996; SCHMIDT, 2000; SOTOMAIOR, 2002). Da mesma forma, vários trabalhos têm sido conduzidos de forma a correlacionar níveis séricos de IgM, IgG, IgA e IgE com o estabelecimento parasitário no hospedeiro ovino (GILL, 1991,GILL *et al.,* 1992; STEAR *et al.*, 1995a,b; PFEFER *et al.*, 1996; KOOYMAN *et al.,* 1997; SHAW *et al.,* 1998; ISRAF *et al.*,1997; AMARANTE *et al,.* 2005; PETIT *et al.,* 2005) e a utilizar estes níveis como marcadores imunológicos para seleção de animais resistentes (DOUCH *et al.,* 1995; DOUCH *et al.,* 1996; BISSET *et al.,* 2001).

Para a seleção de um rebanho, pode-se optar pelo uso de um (ALBERS *et al.,* 1987; WOOLASTON *et al.,* 1990; SRÉTER *et al.,* 1994; DOUCH *et al.,* 1995; MORRIS *et al.,* 1997) ou mais marcadores, formando um índice ou matriz de seleção (DOUCH *et al.,* 1996; SCHMIDT *et al.* 2000; SOTOMAIOR, 2002; ROCHA *et al.*, 2005). O melhorista deverá escolher a(s) característica(s) que melhor se adapte(m) a seu programa de seleção para um determinado rebanho. A característica ideal para ser utilizada como marcador deve apresentar alta herdabilidade, alta repetibilidade, baixo custo e uma análise automatizada; as amostras (de sangue ou fezes) devem ser de fácil obtenção e passíveis de serem estocadas o maior tempo possível. Dos marcadores estudados até agora, o nível de anticorpos anti-helminto por enzima-imunoensaio parece ser o método que melhor se enquadra neste perfil (DOUCH *et al.,* 1996). No entanto, de todos os programas comerciais de seleção, apenas o neozelandês WORMFEC apresenta aos produtores a possibilidade de coletar amostras de soro para dosagem de IgG específica contra o parasito dominante (BISSET *et al.,*2001). Até o presente momento, não há programas comerciais baseados na mensuração da IgE.

Visando uma metodologia rápida e fácil para identificar clinicamente os animais que necessitam tratamento anti-helmíntico de maneira imediata, a campo, sem a necessidade de coleta de amostras para exames laboratoriais, foi criado o método FAMACHA© (VAN WYK & BATH, 2002). Este método baseia-se na comparação da coloração da mucosa ocular de ovinos com uma escala de cinco tonalidades de cores presente em um cartão. Como a cor da mucosa está relacionada com o valor do

hematócrito dos animais, cada uma das cinco categorias representada no cartão estima o grau de anemia, sendo o grau 1 (vermelho) correspondente a mais que 28% de hematócrito e o grau 5 (pálido) a menos que 12%. Os demais graus correspondem a valores intermediários (BATH *et al.,* 2001).

Portanto, em regiões em que o *Haemonchus contortus* é o parasito a mais importante, o FAMACHA© pode ser utilizado como indicador da resposta dos animais à verminose, uma vez que este helminto é altamente hematófago (BATH *et al.,* 2001). No Paraná, o método foi implementado com sucesso em algumas propriedades de Umuarama (MOLENTO *et al.*, 2004) e da Região Metropolitana de Curitiba (SOTOMAIOR *et al.*, 2003), possibilitando uma sensível redução no número de desverminações necessárias ao longo do ano.

A herdabilidade do método FAMACHA© foi estimada em 0,55 (VAN WYK & BATH, 2002). Portanto, a progênie de animais de escores mais elevados tenderia a se apresentar menos anêmica quando infectada por *Haemonchus contortus.* Esta característica reflete uma maior habilidade dos ovinos resistirem aos efeitos da infecção parasitária. A habilidade do animal manter seu nível produtivo, resistindo aos efeitos da parasitose, é chamada resiliência (ALBERS *et al.*, 1987).

Nem sempre os animais resilientes seriam também considerados resistentes. BISSET *et al.*(1992) relataram a ocorrência de maiores escores de diarréia (DAG score) em cordeiros de linhagens resistentes à infecção natural quando *Trichostrongylus* spp. e *Ostertagia* spp. eram os helmintos preponderantes. Esta diarréia pode ser decorrente do reconhecimento do antígeno parasitário pela IgE ligada aos mastócitos da mucosa intestinal, resultando na liberação de histamina, que estimula a secreção de muco e o peristaltismo (McCLURE e EMMERY, 1994). A hipermotilidade e hipersecreção resultantes podem aumentar a velocidade de passagem do alimento pelo trato digestório do animal, resultando em uma menor absorção dos nutrientes, aumento da conversão alimentar e baixo ganho de peso (DOUCH *et al.,* 1996).

MOLENTO *et al.* (2004) relataram a ocorrência de vários animais de alto OPG que não apresentaram anemia, em propriedades onde o *Haemonchus contortus* era o principal parasito. Estes seriam animais resilientes, porém não resistentes. Tendo em vista que o *Haemonchus contortus* é o principal responsável por perdas produtivas na ovinocultura paranaense, a seleção de animais resistentes ou resilientes a este helminto é uma medida de CIP que pode ser adotada visando a diminuição do uso de anti-helmínticos. Para isto, é necessário testar qual característica teria uma seleção mais eficaz e quais marcadores apresentariam melhores resultados.

Este trabalho tem como objetivo padronizar a técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos das classes IgG e IgE ovinas específicos contra *Haemonchus contortus* e validá-la como ferramenta no estudo da resposta imune dos ovinos aos helmintos gastrintestinais e na seleção de animais resistentes às parasitoses, comparando-a com a seleção para resiliência. Para melhor compreensão, os resultados serão apresentados em quatro capítulos:

- ✓ Capítulo 1: Produção de antígeno somático de *Haemonchus contortus* adultos e seu uso em ensaio imunoenzimático indireto para detecção de imunoglobulinas G e E ovinas; (apresentado conforme as normas para publicação na revista *Arquives of Veterinary Science*)
- ✓ Capítulo 2: Uso de marcadores parasitológicos e imunológicos na seleção de ovelhas resistentes às parasitoses e sua comparação com a seleção de animais resilientes; (apresentado conforme as normas para publicação na revista *Ciência Animal Brasileira*)
- ✓ Capítulo 3: Desenvolvimento da resposta imune aos nematódeos gastrintestinais em cordeiros lanados após o desmame; (apresentado conforme as normas da ABNT para artigos para posterior tradução)
- ✓ Capítulo 4: Uso de marcadores parasitológicos e imunológicos na seleção de cordeiros resistentes às parasitoses e sua comparação com a seleção de animais resilientes (apresentado conforme as normas da ABNT para artigos para posterior tradução).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, R.C. **Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission.** 2. ed. Wallingford, Oxon (UK): CABI Publishing, 2000. 650 p.

ALBERS, G.A.A; GRAY, G.D.; PIPER, L.R.; BARKER, J.S.F.; LE JAMBRE, L.F.; BARGER, I.A. The genetics of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* infection in young Merino sheep. **International Journal for Parasitology**, v. 17, n. 7, p. 1355-1363, 1987.

AMARANTE, A.F.T. Resistência genética a helmintos gastrointestinais.In: Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, V,2004, Pirassununga. **Anais...** Disponível em: http://www.sbmaonline.org.br/anais/v/palestras/palest14.pdf Acesso em: 31 set. 2006.

AMARANTE, A.F.T; BRICARELLO, P.A.; ROCHA, R.A.; GENNARI, S.M. Resistance of Santa Inês, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology,** v. 120, p.91-106, 2004.

AMARANTE, A.F.T; BRICARELLO, P.A.; HUNTLEY, J.F.; MAZZOLIN, L.P.; GOMES, J.C.; Relationship of abomasal histology and parasite-specific immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* in three breeds of sheep. **Veterinary Parasitology.** v.128, p.99-107, 2005.

BATH, G.F.; HANSEN, J.W.; KRECEK, R.C.; VAN WYK, J.A.; VATTA, A.F. **Sustainable approaches for managing haemoncosis in sheep and goats.** FAO: Roma, 2001. 90 p.

BISSET, S.A;VLASSOFF, A; DOUCH, P.G.C.; JONAS, W.E.; WEST, C.J.; GREEN, R.S. Nematode burdens and immunological responses following natural challenge in Romney lambs selectively bred for low or high faecal worm count. **Veterinary Parasitology**, v. 61, p. 249-263. 1996

BISSET, S.A.; MORRIS, C.A.; McEWAN; VLASSOFF, A. Breeding sheep in New Zealand that are less reliant on anthelmintics to maintain health and productivity. **New Zealand Veterinary Journal.** v.49, n.6, p.236-246. 2001.

BITTENCOURT, C.B.A. **Viroses dos Pequenos Ruminantes do Estado do Paraná.** Curitiba, 2005. Monografia apresentada como requisito exigência para a obtenção do título de Especialista em Defesa Sanitária Animal – Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Tuiuti do Paraná.

BUDDLE, B.M.; JOWETT, G.; GREEN, R.S.; DOUCH, P.G.C.; RISDON, P.L. Association of blood eosinophilia with the expression of resistance in Romney lambs to nematodes. **International Journal for Parasitology**, v. 22, n. 7, p. 955-960, 1992.

CABARET, J.; MAGE, C.; BOUILHOL, M. Helminth intensity and diversity in organic meat sheep farms in centre of France. **Veterinary Parasitology,**v. 105, n.1, p.33-47. 2002

CSIRO. **Breeding for worm resistance: a component of sustainable worm control.** CSIRO, 2006. Disponível em: http://www.csiro.au/science/ps1gy.html#1 Acesso em: 18 set. 2006.

CUQUERELLA, M.; GÓMEZ-MUÑHOZ, M.T.; CARRERA, L.; FUENTE, C.; ALUNDA, J.M. Cross antigenicity among ovine trichotrongyloidea. Preliminary report. **Veterinary Parasitology,** v.53, p.243-251, 1994.

DOUCH, P.G.C.; GREEN, R.S.; MORRIS, C.A.; McEWANS, J.C.; WINDON, R.G. Phenotypic markers for selection of nematode–resistant sheep. **International Journal for Parasitology,** v. 26, n.8/9, p. 899-911, 1996.

ECHEVARRIA, F. Resistência anti-helmíntica. In: PADILHA, T. **Controle dos Nematódeos Gastrintestinais em Ruminantes.** Coronel Pacheco: EMBRAPA, 1996a. p. 53-75.

_____. Epidemiologia de nematódeos e controle estratégico em ovinos lanados. In: PADILHA, T. **Controle dos Nematódeos Gastrintestinais em Ruminantes.** Coronel Pacheco: EMBRAPA, 1996b. p. 157-168.

FAO, Salud Animal. **Resistência a los Antiparasitarios: Estado Actual Énfasis en América Latina.** Roma: FAO, 2003. 52p.

GILL, H.S. Genetic control of acquired resistance to haemonchosis in Merino lambs. **Parasite Immunology**, v. 13, p. 617-628, 1991.

GILL, H.S.; HUSBAND, A.J.; WATSON, D.L. Localization of immunoglobulin-containing cells in the abomasum of sheep following infection with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v. 31, p. 179-187, 1992.

IBGE. **Efetivo de rebanhos.** 2005. Disponível em: http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp Acesso em :20 abr. 2007

ISRAF, D.A.; JACKSON, F.; STEVENSON,L.M.; JONES,D.G; JACKSON, E.; HUNTLEY, J.F.; COOP, R.L. Resistence of immunity to *Nematodirus battus* infections in lambs. **Veterinary Parasitology,** v. 71, n. 1, p. 39-52, 1997.

KOOYMAN, F.N.J.; VAN KOOTEN, P.J.S.; HUNTLEY, J.F.; MacKELLAR, A.; CORNELISSEN, A.W.C.A; SCHALLIG, H.D.F.H. Production of a monoclonal antibody specific for ovine immunoglobulin E and its application to monitor serum IgE responses to *Haemonchus contortus* infection. **Parasitology,** v.114, p. 395-406, 1997

McCLURE, S.J.; EMERY, D.L. Cell Mediated Responses Against Gastrointestinal Nematodes Parasites of Ruminants. In: GODDEERIS, B.M.L.; MORRISON, W.I. **Cell-mediated immunity in ruminants.** Boca Raton: CRC Press Inc., 1994 p. 213-228.

MOLENTO, M.B.; TASCA, C.; GALLO, A.; FERREIRA, M.; BONONI, R.; STECCA, E. Famacha guide as an individual clinic parameter for Haemonchus contortus infection in small ruminants. **Ciencia Rural**., Santa Maria, v. 34, n. 4, 2004.

MORAES, F.R.; SARNOSKI Jr; S.; SAULT, J.P.E.; OLIVEIRA; V.P.; SOCCOL, V.T.; CASTRO, E.A. Estudo epidemiológico da verminose ovina na Região de Ponta Grossa - PR. In: EVINCI - Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná, 6.,1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Editora da Universidade Federal do Paraná, 1998. p. 427.

MORRIS, C.A.; VLASSLOFF, A.; BISSET, S.A.; BAKER, R.L.; WEST, C.J.; HURFORD, A.P. Responses of Romney sheep to selection for resistance or susceptibility to nematode infection. **Animal Science,** v.64, p. 319-329, 1997.

NARI, A.; CARDOZO, H. Nematodos Gastrointestinales. In.: **Enfermidades de los lanares – Tomo I.** Montevideo : Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L., 1987. p.1-51.

NARI, A.; EDDI, C. Alternativas para el control de las verminosis en pequeños rumiantes. In: I Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária, Curitiba, PR, 14 a 17 de maio de 2002. **Anais...** Curitiba:2002 p. 86-89.

O'CONNOR, L.J.; WALKDEN-BROWN, S.W.; KAHN, L.P. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. **Veterinary Parasitology,** v.142, n.1-2, p.1-15. 2006.

OLIVEIRA; V.P.; MORAES, F.R.; ZAGO, M.; POLLATI, L.; SOUZA, F.P.; THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E.A. Epidemiologia da verminose em ovinos na Região de Guarapuava - Paraná. In: EVINCI - Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná, 7.,1999, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Editora da Universidade Federal do Paraná, 1999. v.2. p. 494.

PERNTHANER, A.; COLE, S.A.; MORRISON, L.; GREEN, R.; SHAW, R.J.; HEIN, W.R. Cytokine and antibody subclass responses in the intestinal lymph of sheep during repeated experimental infections with nematode parasite *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v.114, p. 135-148. 2006.

PETTIT, J.J.; JACKSON, F.; ROCCHI, M.; HUNTLEY, J.F. The relationship between responsiveness against gastrointestinal nematodes in lambs and the numbers of circulating IgE-bearing cells. **Veterinary Parasitology,** v. 134, p.131-139. 2005.

PFEFFER,A.; DOUCH, P.G.C.; SHAW, R.J.; GATEHOUSE, T.K.; RABEL, B.; GREEN, R.S.; SHIRER, C.L.; JONAS, W.E.; BISSET, S. Sequential cellular and humoral responses in the abomasal mucosa and blood of sheep dosed with *Trichostrongylus axei.* **International Journal for Parasitology,** v. 26, n. 7, p. 765-773, 1996.

RAMOS, C.I. et al. Resistência de parasitos gastrointestinais de ovinos a alguns anti-helmínticos no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência Rural.** 32:473-477, 2002.

ROCHA, R.A.; AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A. Resistance of Santa Ines and Ile de France suckling lambs to gastrointestinal nematode infections. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,** v.14, n.1; p. 17-20, 2005.

ROSALINSKI-MORAES, F. et al. Resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos da região da Associação dos Municípios do Alto Irani (AMAI), Oeste de Santa Catarina. **Ciência Animal Brasileira,** v. 8, n. 3, p. 559-565. 2007

SANTIAGO, M.A.M.; BEVENGA, S.F.; COSTA, U.C. Epidemiologia e controle da helmintose ovina no Município de Itaqui, Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária**, v.11, p. 1-7, 1976.

SCHMIDT, E.M.S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MORAES, F.R. Pesquisa de marcadores parasitológicos e hematológicos de resistência ao parasitismo gastrintestinal em cordeiros. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia UNIPAR**, v. 4, n. 1, p. 55-64, 2001.

SEAB. **Programa de Apoio à estruturação das cadeias produtivas de ovinos e caprinos.** 2006. Disponível em: www.ovinocaprino.pr.gov.br. Acesso em: 19 abr. 2007.

SHAW, R.J.; GATEHOUSE, T.K.; McNEILL, M.M. Serum IgE responses during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology,** v.28, p. 293-302, 1998

SHAW, R.J.; MORRIS, C.A.; GREEN, R.S.; WHEELER, M.; BISSET, S.A.; VLASSOFF, A.; DOUCH, P.G.C. Genetic and phenotypic relationships among *Trichostrongylus colubriformis* – specific immunoglobulin E, anti – *Trichostrongylus colubriformis* antibody, immunoglobulin G_1, faecal egg count and body weight traits in grazing Romney lambs. **Livestock Production Science,** v. 58, p.25-32, 1999

SOTOMAIOR, C. **Estudo de caracteres que possam auxiliar na identificação de ovinos resistentes e susceptíveis às helmintoses gastrintestinais.** In: I Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária, Curitiba, PR, 14 a 17 de maio de 2002. **Anais...** Curitiba:2002 p. 90-94.

SOTOMAIOR, C.; MILCZEWSKI, V.; SCHWARTZ, M. G.; MORAES, F. R. Evaluation of FAMACHA System: accuracy of anaemia estimation and use of the method on commercial sheep flocks. In: International Seminar in Animal Parasitology, V, 2003, Merida. **Proceedings...** 2003. p. 61-66.

SOUZA, F. **Contribuição para o estudo da resistência dos helmintos gastrintestinais de ovinos (*Ovis aires*) aos anti-helmínticos no Estado do Paraná.** Curitiba, Julho de 1997.Universidade Federal do Paraná. Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre–Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. 74 p.

SRÉTER, T.; KASSAI, T.; TAKÁCS, E. The heritability and specificity of responsiveness to infection with *Haemonchus contortus* in sheep. **International Journal for Parasitology**, v. 24, n. 6, p. 871-876, 1994.

STEAR, M.J.; BISHOP, S.C.; DUNCAN, J.L.; McKELLAR, Q.A.; MURRAY, M. The repeatability of faecal egg counts, peripheral eosinophil counts, and plasma pepsinogen concentrations during deliberate infections with *Ostertagia circumcincta*. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 3, p. 375-380, 1995a.

STEAR, M.J.; BISHOP, S.C.; DOLIGALSKA, M; DUNCAN, J.L.; HOLMES, P.H.; IRVINE, J.; McCRIRIE, L.; McKELLAR, Q.A.; SINSKI, E. MURRAY, M. Regulation od egg production, worm burden, worm length and worm fecundity by host immune responses in sheep infected with *Ostertagia circumcinta.* **Parasite Immunology**, v. 17, p. 643-652, 1995b.

SYKES, A.R. The effect of subclinical parasitism in sheep. **The Veterinary Record,** v.102, n. 2, p.32-34, 1978

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOTOMAIOR, C.; SOUZA, F.P.; CASTRO, E.A.; PESSÔA SILVA, M.C.; MILCZEWSKI, V. Occurence of resistance to antihelmintics in sheep in Paraná State, Brazil. **Veterinary Record**, v. 139, p. 421-422, 1996.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F.P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E.A.; MILCZEWSKI, V.; PESSOA, M. C.; MOCELIN, G. Resistance of gastrointestinal nematodes of anthelmintics in sheep (*Ovies aries)*. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** Curitiba, PR,v. 47, p. 41 – 47, 2004.

TIZARD, Ian R. **Imunologia Veterinária – Uma Introdução.** Tradução: Paulo Marcos Agria de Oliveira. 6.ed. São Paulo: Roca, 2002. 532 p. Tradução de: Veterinary Immunology: an Introduction.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. **Parasitologia Veterinária.** Tradução: Ana Maria Nogueira Pinto Quintanilha. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1998. 306 p. Original: Veterinary Parasitology.

VAN WYK, J.A.; BATH, G. The FAMACHA© system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. **Veterinary Research,** v. 33, p. 509-529. 2002.

VANIMISETTI, H.B.; ANDREW, S.L.; ZAJAC, A.M.; NOTTER, D.R. Inheritance of fecal egg count and packed cell volume and their relationship with production traits in sheep infected with *Haemonchus contortus.* **Journal of Animal Science,** v.82, p.1602-1611. 2004.

WALLER, P.J. The development of anthelmintic resistance in ruminant livestock. **Acta Tropica**, v. 56, p. 233-243, 1994.

WALLER,P.; ECHEVARRIA, F.;EDDI, C.; MACIEL, S.; NARI, A.; HENSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: General overview. **Veterinary Parasitology,** v. 62, n.3-4, p. 181-187. 1996.

WOOLASTON, R.R.; BARGER, I.A.; PIPER, L.R. Response to helminth infection of sheep selected for resistance to *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v. 20, n. 8, p. 1015-1018, 1990.

WOOLASTON, R.R.; MANUELLI, P.; EADY, S.J.; BARGER, I.A.; LeJAMBRE, L.F.; BANKS, D.J.D.; WINDON, R.G. The value of circulating eosinophil count as selection criterion for resistance of sheep to Trichostrongyle parasites. **International Journal for Veterinary Parasitology**, v. 26, n. 1, p. 123-126, 1996.

CAPÍTULO 1

PRODUÇÃO DE ANTÍGENO SOMÁTICO DE *Haemonchus contortus* ADULTOS E SEU USO EM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO PARA DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G OVINA

(Production of somatic extract of adult *Haemonchus contortus* and its use in an indirect enzime-linked immunosorbent assay for detection of ovine immunoglobulin G *)*

RESUMO - Um dos fatores limitantes à criação de pequenos ruminantes é a verminose gastrintestinal, sobretudo em regiões de clima ameno, onde o *Haemonchus contortus* é o parasito mais prevalente. Para compreender a resposta imune do ovino a este parasita e identificar os animais mais responsivos, é necessária a adoção de metodologias adequadas para mensurar a resposta imune do hospedeiro. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de produzir um antígeno somático de *H.contortus* e utilizá-lo em técnicas de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) para detecção de IgG ovina. Para a obtenção do antígeno, cerca de 1.000 helmintos adultos (machos e fêmeas) foram lavados, submetidos à maceração, ciclos de congelamento e descongelamento, sonicação e centrifugação. Foram utilizados como soros controle-positivo 20 amostras oriundas de ovelhas adultas submetidas à infecção natural. Como soros controle-negativos, foram utilizadas amostras pré-colostrais de 15 cordeiros, bem como de dois borregos mantidos livres de parasitos. Foram testadas várias diluições de antígeno, soros e um conjugado comercial anti-IgG ovina a fim de obter as concentrações ideais. A concentração ótima de antígeno foi de 5μg.mL^{-1}, e as diluições ótimas de soro e conjugado foram, respectivamente, 1:80 e 1:1000.
Palavras-chave: IgG, *Haemonchus contortus,* ELISA

ABSTRACT – One of the most limiting factors to the small ruminant husbandry is gastrointesinal verminosis, specially in mild whether regions, where *Haemonchus contortus* is the predominant parasite. To understand sheep immune response to this parasite and to identify the more responsive animals, it is necessary to adopt adequate methods that can measure the host's immune response. This work was conducted in order to produce na somatic extract of *H.contortus* and to employ it in an indirect enzime-linked immunosorbent assay (ELISAs) to detect ovine IgG. For obtaining the antigen, environ 1.000 adult worms (both male and female) were washed, macerated, submitted to freezing and thawing cycles, sonicated and centrifugated. Samples from 20 ewes naturally infected were used as positive standards. Negative standards were 15 pre-colostral samples and those from two lambs kept indoors and parasite-free. It was tested several dilutions of antigen, sera and anti-sheep IgG commercial conjugated in order to obtain the optimal condition. The optimal antigen concentration was 5μg.mL^{-1} and the optimal dilutions of sera and conjugated were 1:80 and 1:1000, respectively.

Key-words: IgG, IgE, *Haemonchus contortus,* ELISA

Introdução

Um dos principais entraves econômicos à criação de pequenos ruminantes é a verminose (CABARET *et al.,* 2002; FAO, 2003; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2004). Estima-se que mais de 100 milhões de dólares sejam gastos em anti-helmínticos no Brasil por ano, o que corresponde a 20% do mercado de produtos para sanidade animal (WALLER *et al.,* 1996). Os principais nematódeos gastrintestinais de importância econômica pertencem à Superfamília Trichostrongyloidea, gêneros *Haemonchus; Trichostrongylus; Teladorsagia*; *Ostertagia; Nematodirus* e *Cooperia* (ANDERSON, 2000). De uma forma geral, esses parasitos coexistem em infecções mistas, sendo que a prevalência de um ou mais gêneros depende do clima da região, da estação do ano, da categoria animal e das condições da propriedade (NARI e CARDOZO, 1987; ECHEVARRIA, 1996; MORAES *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 1999). Em regiões de clima ameno e chuvoso, normalmente o *Haemonchus contortus* é o parasito mais prevalente (O'CONNOR *et al.*, 2006). Portanto, torna-se necessário conhecer as formas de interação entre este helminto e seu hospedeiro, de modo a buscar novas alternativas de controle.

A presença de nematódeos gastrintestinais desencadeia uma série de respostas celulares e humorais no hospedeiro, normalmente envolvendo mecanismos Th2- dependentes (PETTIT *et al.* 2005; PERNTHANER *et al.* 2006). Estes mecanismos envolvem o aumento do número de eosinófilos circulantes (PFEFFER *et al.*, 1996; SCHMIDT *et al.* 2001; ROCHA *et al.* 2005) e sua quimiotaxia para a mucosa gastroentérica (STEAR *et al.,* 1995; OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al.,* 2000; AMARANTE *et al.* 2005), bem como a produção de anticorpos das classes IgG (DOUCH *et al.* 1994; PFEFFER *et al.*, 1996; PERNTHANER *et al.* 2006), IgA (AMARANTE *et al.* 2005; PERNTHANER *et al.* 2006) e, principalmente, IgE (SHAW *et al.*, 1998; PETTIT *et al.* 2005; PERNTHANER *et al.,* 2005) . O principal papel da IgE na imunidade contra os helmintos se dá pela sua ligação aos receptores de alta afinidade presentes na membrana dos mastócitos. Quando ocorre o reconhecimento do antígeno parasito-específico pela IgE aderida à membrana, iniciam-se rápidas modificações celulares no mastócito, que levam à exocitose do conteúdo granular. Os grânulos dos mastócitos são ricos em histamina, serotonina, tripsina, proteases neutras, leucotrienos e bradicininas. Estes fatores em conjunto alteram a

permeabilidade capilar, permitindo maior fluxo de macromoléculas para os tecidos (TIZARD, 2002). A histamina tem um papel muito importante no estímulo da secreção de muco pelas células do epitélio intestinal e no aumento do peristaltismo (McCLURE e EMMERY, 1994). O fenômeno descrito é característico de uma reação de hipersensibilidade do tipo I e é responsável pelo fenômeno de expulsão rápida dos helmintos presentes no trato digestório (McCLURE e EMMERY, 1994, TIZARD, 2002; PETIT *et al.,* 2005).

Esta resposta imune pode limitar o estabelecimento da carga parasitária, e está sob controle genético, com valores de herdabilidade entre 0,30 e 0,50 (DOUCH *et al.*,1996; AMARANTE, 2004). Isto possibilitou a criação de programas de seleção de ovinos resistentes às parasitoses, inclusive com a possibilidade de utilizar o nível de IgG anti-helminto como marcador (DOUCH *et al.*,1996; BISSET *et al.,*2001). No entanto, existem algumas evidências de que a reação de hipersensibilidade possa trazer prejuízos ao hospedeiro. Linhagens resistentes de ovinos tendem a apresentar maiores escores de diarréia quando submetidos a infecções por *Trichostrongylus* spp. e *Ostertagia* spp. (BISSET *et al.*,1992). Sendo assim, é importante conhecer melhor os mecanismos de resposta imunológica que determinam a resistência e a susceptibilidade dos ovinos aos helmintos gastrintestinais, a fim de selecionar animais que sejam resistentes à parasitose porém sem prejuízo da produção de carne e lã. Para proporcionar este tipo de estudo, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de produzir um antígeno somático de *Haemonchus contortus* e utilizá-lo na padronização de técnicas de ensaio imunoenzimático indireto para detecção de IgG e IgE ovinas.

Material e Métodos

Obtenção do antígeno: Para a produção do antígeno somático de *Haemonchus contrortus* (H.c.), helmintos adultos, machos e fêmeas, foram obtidos a partir de ovinos infectados naturalmente e abatidos. Os parasitos foram coletados um a um e lavados sucessivas vezes em solução de cloreto de sódio a 0,9%. Todos os helmintos foram identificados individualmente em microscópio estereoscópico, a fim de se certificar da espécie, seu estádio de desenvolvimento e estado de autólise. Indivíduos imaturos ou com a morfologia alterada por autólise foram descartados.

Os helmintos foram congelados em PBS 7,4 até o preparo do antígeno, que foi obtido segundo MINOZZO *et al.* (2004), com algumas adaptações. Foi procedida à maceração mecânica de cerca de 1.000 parasitos em uma solução de EDTA a 1mM. Para promover uma melhor lise cuticular e de estruturas internas dos parasitos, os mesmos foram triturados em homogeneizador de tecidos (Potter S - Biotech Ineternational, 3.01-0699), em ciclos de 150 a 400 rpm, até que não se observasse macroscopicamente grandes fragmentos. O material resultante foi submetido a cinco ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37ºC e a oito séries de 30 segundos no ultra-som (20 kHz, 1mA), com intervalo de 30 segundos.

A fim de proporcionar a solubilização das proteínas de membrana, o antígeno foi deixado sob agitação a 5 ºC por 12 horas. O material foi transferido para tubos cônicos gelados e submetidos à ultra-centrifugação a 9.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadadante foi submetido a nova centrifugação a 10.000 rpm por 45 minutos. O antígeno solúvel (sobrenadante) foi homogeneizado, aliquotado e estocado a –18 ºC. Uma destas alíquotas foi submetida à dosagem de proteína. Durante todo o procedimento para extração de proteínas, o material antigênico foi mantido em gelo picado.

Para dosagem de proteína do antígeno foi utilizado o método de BRADFORD (1976). Os valores de absorbância obtidos em espectrofotômetro, com filtro de 595 nm, foram comparados com uma curva padrão de albumina para o cálculo da concentração protéica do antígeno H.c.

Soros-controle: Para a padronização da técnica de ensaio imunoenzimático e controle da variação entre placas foi necessária a obtenção de controles positivos e negativos para *H. contortus*. Os soros controles positivos foram amostras obtidas de ovelhas adultas, de propriedade do Quartel General do Exército da Quinta Região Militar, Curitiba, no final do verão. Os animais eram criados a pasto, sujeitos à infecção natural e apresentavam exames coproparasitológicos positivos para estrongilídeos e com mais de 60% de larvas de *Haemonchus* identificadas nas coproculturas

Como controles negativos, trabalhou-se com 15 amostras de soros pré-colostrais de cordeiros, colhidas no período de 22 de agosto a 7 de setembro de 2000, no Setor de Ovinocultura da Fazenda Experimental do Canguiri, UFPR, Pinhais. As ovelhas foram acompanhadas em baia-maternidade durante o trabalho de parto, sendo realizadas intervenções obstétricas quando necessário. Somente quando a fêmea e o produto apresentavam-se em plenas condições, o cordeiro foi separado para a coleta de sangue. Apenas cordeiros com peso acima da média esperada para sua raça foram utilizados. O sangue foi colhido da veia jugular externa, após depilação e desinfecção do local de punção. Imediatamente após a coleta, o sangue foi passado para tubo de ensaio estéril, onde permanecia até ser levado para o laboratório para centrifugação e obtenção do soro.

Também foram obtidos soros-controle negativo a partir de dois cordeiros, tratados com anti-helmínticos e mantidos confinados desde o desmame. Estes animais também eram pertencentes ao Setor de Ovinocultura da Estação Experimental do Canguiri. Dois meses após o confinamento, cada um recebeu uma dose de Levamisol (10 $mg.kg^{-1}$; Ripercol 150 F ® - Cyanamid Química do Brasil). Quinze dias após esta dosificação, os animais receberam uma dose de Nitroxinil (13 $mg.kg^{-1}$; Dovenix ®34% - Laboratórios Merial - Uruguai). Três meses após a primeira dosificação, foram colhidas as amostras de soro.

Padronização da Técnica de Ensaio Imunoenzimático para detecção de IgG ovina anti- H. contortus (H.c.). O protocolo a ser padronizado foi adaptado de MINOZZO *et al.*(2004). O antígeno H.c. foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6, até as concentrações de 5; 2,5 e 1,25 $\mu g.mL^{-1}$, que foram testadas na padronização. Este tampão foi escolhido por apresentar melhores condições para adesão do

antígeno H.c. à placa (SCHALLIG *et al.*, 1995). Foram adicionados 100 µL de solução antigênica por poço e a placa foi incubada por 12 horas a 4-8 ºC. O excesso de antígeno foi removido por duas lavagens. O bloqueio dos poços foi realizado com 150 µL de uma solução de 2% de caseína bovina, por uma hora, a 37 ºC. Para avaliar o nível de reações inespecíficas devido a anticorpos presentes no soro, alguns poços sem antígeno foram bloqueados. O excesso de caseína foi removido por duas lavagens.

Um volume de 100 µL de várias diluições de soro teste foi analisado em duplicata. Além dos soros-teste, uma amostra de soro controle positivo e uma de controle negativo foram adicionados a cada placa, a fim de controlar possíveis variações entre placas. Para padronizar a diluição ideal de soro, foram testadas as diluições de 1:40 e 1:80. Os soros foram incubados a 37 ºC por uma hora, e procedidas seis lavagens.

O conjugado utilizado consistia em anticorpos policlonais, obtidos a partir de soro de asininos imunizados com IgG ovina e marcados com a enzima peroxidase (SIGMA A3415) . Após vários testes iniciais, optou-se por testar as diluições de 1:1000 e 1:2500, em um volume total de 100 µL por poço. Então, a placa foi incubada a 37 ºC por uma hora e novas seis lavagens procedidas.

O OPD (orto-fenileno-diamino, SIGMA P6787) foi utilizado como substrato e o peróxido de hidrogênio, como catalizador, tendo o tampão citrato, pH 5,0 como veículo. Após adição de 100µL desta mistura por poço, a placa foi incubada em temperatura ambiente, por 15 minutos, ao abrigo de luz. A reação foi inibida pela adição de 50 µL por poço de uma solução de ácido sulfúrico a 5%. Os valores de absorbância foram obtidos em leitora (BioRad-Model 550) com filtro de 492 nm.

Determinação de reações inespecíficas: O grau de reações inespecíficas ocasionado pelas diferentes diluições de soro também foi analisado nas placas de padronização. Para isto, a técnica foi realizada conforme descrito acima, porém sem sensibilização antígeno H.c.

Ponto de corte. O ponto de corte da reação entre soros reagentes e não reagentes, foi determinado pela média aritmética dos valores de absorbância das amostras de soros controle negativo acrescido de dois desvios-padrão da média.

Padronização da Técnica de Ensaio Imunoenzimático para detecção de IgE ovina anti- Haemonchus contortus *(H.c.)*

Foi utilizada a técnica descrita por SHAW *et al.* (1998), sendo que apenas a concentração de antígeno foi adaptada. Para isto, foram realizadas nove diluições seriadas do antígeno na base dois, a partir da concentração de 20 µg de proteína por mL, e cada uma foi adicionada em duplicata aos poços de uma placa de poliestireno de 96 poços.

O bloqueio foi realizado conforme descrito anteriormente e 100 µL de soro ovino contendo 10 µg de IgE.mL^{-1} foram adicionados por poço. Após seis lavagens, os anticorpos monoclonais (mAbs) anti-IgE ovina YD3 e XB6, produzidos a partir de células de camundongos imunizados (SHAW *et al.,* 1996), foram adicionados na concentração de 2,5 µg.mL^{-1} e incubados por duas horas em temperatura ambiente. A placa foi lavada seis vezes antes da adição do conjugado peroxidase-anti-IgG (cadeia γ) murina (SIGMA A3673), diluído 1/1000, em volume de 100 μl por poço, seguida de incubação a 37 ºC por uma hora. Mais seis lavagens foram realizadas para remoção do conjugado que não se ligou. O substrato utilizado para revelar a presença da peroxidase foi o tetra-metil-benzidino (TMB - SIGMA T8768), que foi deixado agir por 15 minutos. A parada da reação foi realizada pela adição de 50 µL por poço de uma solução de ácido sulfúrico a 2N. A leitura foi realizada com filtro de 450 nm.

Resultados

Quantidade de antígeno para sensibilização da placa no ensaio para detecção de IgG anti- H.c.

A concentração protéica do antígeno H.c. foi estimada em 5 $mg.mL^{-1}$ pelo método de BRADFORD (1976). Quando as concentrações de 5; 2,5 e 1,25 µg de antígeno por mL foram testadas com os soros controles diluídos 1:80 e o conjugado 1:1000, pôde-se observar melhor distinção entre os soros positivos e negativos na concentração de 5µg de antígeno por mL (FIGURA 1). Como as placas foram sensibilizadas com 100 µL da solução antigênica por poço, esta concentração ($5\mu g.mL^{-1}$) corresponde à quantidade de 500 ng de antígeno por poço.

Padronização da diluição do soro

Para a padronização da diluição ótima de soro a ser empregada, duas diluições foram comparadas (1:40 e 1:80). O antígeno foi utilizado na quantidade de 500 ng por poço e o conjugado, diluído1:1000. A diluição de 1:40 resultou valores de absorbância relativamente altos, especialmente para o controle negativo 1, cuja absorbância foi de 0,236 (FIGURA 2). Quando a diluição utilizada foi de 1:80, os valores de absorbância para os controles positivos foram entre 1,063 e 0,485, e o valor do controle negativo 1 foi de 0,151.

Quando as amostras de soro diluídas 1:40 foram incubadas em poços sem antígeno, valores muito altos de absorbância foram obtidos, sobretudo para os controles positivos (TABELA 1). Ao aumentar a diluição para 1:80, os valores de absorbância para reações inespecíficas caíram para níveis menores que 0,050.

Padronização da diluição do conjugado

Ao manter fixa a quantidade de antígeno em 5 $\mu g.mL^{-1}$ e a diluição do soro em 1:80, pôde–se observar redução nos valores de absorbância na diluição de 1:2500, quando comparada à 1:1000. (FIGURA 3). Por isso, a diluição de 1:1000 foi escolhida para a continuidade do trabalho.

Concentração de antígeno para ensaio imunoenzimático de detecção de IgE anti-H.c.

Dentre as concentrações de antígeno testadas, não foi observada diferença importante nos valores de absorbância nas concentrações de 20, 10 e 5 $\mu g.mL^{-1}$ (2, 1 e 0,5 µg por poço) (FIGURA 4). Por motivo de economia de antígeno, optou-se pela concentração de 500 ng por poço.

Ponto de corte

Mantendo-se fixa a concentração protéica do antígeno em 5 $\mu g.mL^{-1}$, a diluição do soro em 1:80 e a diluição do conjugado em 1:1000, a média de valores de absorbância para os soros controles-negativos foi de 0,213 e o desvio padrão de 0,033. Portanto, o valor mínimo de absorbância para que a amostra possa ser considerada reagente ao teste foi de 0,279.

Discussão

A concentração de 5 µg de antígeno somático de *Haemonchus contortus* adultos por mL de tampão carbonato, adotada tanto para o ensaio de detecção de IgG quanto para o de IgE específicas, também foi utilizada por GILL (1991), SCHALLIG *et al.* (1995), GÓMEZ-MUÑHOZ *et al.* (1998) e AMARANTE *et al.* (2005). CUQUERELLA *et al.* (1994) utilizaram a concentração de 5 µg mL^{-1} de antígeno somático de L_3 de *H. contortus.* Porém, quando o antígeno foi obtido a partir de parasitos adultos, a concentração empregada foi a de 10 µg mL^{-1}. Portanto, a concentração de antígeno utilizada neste trabalho está coerente com a utilizada por outros autores.

A diluição do soro em 1:80 proporcionou melhor distinção entre os controles positivos e negativos, bem como a diminuição da ocorrência de respostas inespecíficas. Este é o fator que mais varia na padronização de testes imunoenzimáticos. Para detecção de IgG anti-*H.contortus,* foram encontradas diluições de 1:100 (CUQUERELLA *et al.*, 1994) a 1:1000 (GÓMEZ-MUÑHOZ *et al.,*1998). A diluição ótima dos soros depende de outras condições padronizadas no teste, como a concentração de outros reativos empregados e do tempo de incubação em cada fase do enzima-imunoensaio. Estas variáveis mudam conforme a rotina de cada laboratório, tornando difícil a utilização de uma mesma diluição de soro para todos os ensaios. Outro fator que pode influenciar na diluição de soro escolhida é a concentração de anticorpos presentes na população teste. Desta forma, um conjunto de amostras que apresentem altos títulos de anticorpos específicos tendem a ser analisadas sob maior fator de diluição. Neste trabalho, as amostras teste eram todas provenientes de ovinos com infecção natural. É possível que estes animais tenham apresentado menores títulos de anticorpos que animais submetidos a infecções experimentais com alto nível de desafio. Isto explicaria o

menor fator de diluição de soros empregado neste trabalho se comparado com o de outros autores.

Como o conjugado é o reativo de maior custo em uma prova de imunoensaio, tenta-se utilizar a maior diluição possível do mesmo, desde que isto não diminua significativamente os valores de absorbância dos soros ao ponto de prejudicar a distinção entre controles positivos e negativos. Neste estudo foi utilizado um conjugado comercial, cuja recomendação do fabricante é a titulação do mesmo por meio de diluições sucessivas até 1:10000. A diluição de 1:1000 foi a que mostrou valores mais satisfatórios de absorbância para os soros controles.

Embora a diluição ótima de conjugado dependa de suas características intrínsecas e das condições do ensaio, é comum o uso de conjugados comerciais na diluição de 1:1000 (GILL ,1991; CUQUERELLA *et al.,* 1994; SCHALLIG *et al.*, 1995; GÓMEZ-MUÑOZ *et al.,* 1998; AMARANTE *et al.,* 2005).

Conclusão

Foi possível a produção de antígeno a partir de indivíduos adultos da espécie *Haemonchus contortus* e o seu uso em métodos de ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos ovinos das classes IgG e IgE. Para ambas as técnicas a concentração ótima de antígeno por poço foi de 500ng e, para a detecção de IgG as diluições ótimas de soro e conjugado foram, respectivamente, 1:80 e 1:1000.

Referências

ANDERSON, R.C. **Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission.** 2. ed. Wallingford, Oxon (UK): CABI Publishing, 2000. 650 p.

AMARANTE, A.F.T; BRICARELLO, P.A.; HUNTLEY, J.F.; MAZZOLIN, L.P.; GOMES, J.C.; Relationship of abomasal histology and parasite-specific immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* in three breeds of sheep. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v.128, p.99-107, 2005.

AMARANTE, A.F.T; BRICARELLO, P.A.; ROCHA, R.A.; GENNARI, S.M. Resistance of Santa Inês, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v. 120, p.91-106, 2004.

BISSET, S.A.; VLASSOFF, A.; MORRIS, C.A.; SOUTHEY, B.R.; BAKER, R.L.; PARKER, A.G.H. Heritability of and genetic correlations among faecal egg counts and productivity traits in Rommey sheep. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington,n.35, p. 51-58, 1992.

BISSET, S.A.; MORRIS, C.A.; McEWAN; VLASSOFF, A. Breeding sheep in New Zealand that are less reliant on anthelmintics to maintain health and productivity. **New Zealand Veterinary Journal,** Wellington, v.49, n.6, p.236-246. 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry,** v. 42, p. 248-254, 1976.

CABARET, J.; MAGE, C.; BOUILHOL, M. Helminth intensity and diversity in organic meat sheep farms in centre of France. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v. 105, n.1, p.33-47. 2002.

CUQUERELLA, M.; GÓMEZ-MUÑHOZ, M.T.; CARRERA, L.; FUENTE, C.; ALUNDA, J.M. Cross antigenicity among ovine trichotrongyloidea. Preliminary report. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v.53, p.243-251, 1994.

DOUCH, P.G.C.; GREEN, R.S.; MORRIS, C.A.; McEWANS, J.C.; WINDON, R.G. Phenotypic markers for selection of nematode–resistant sheep. **International Journal for Parasitology,** Oxon, v. 26, n.8/9, p. 899-911, 1996.

DOUCH, P.G.C.; GREEN, R.S.; RISDON, P.L. Antibody responses of sheep to challenge with *Trichostrongylus colubriformis* and the effect of dexamethasone treatment. **International Journal for Parasitolology,** Oxon, v. 24, n. 7, p. 921-928, 1994.

ECHEVARRIA, F. Epidemiologia de nematódeos e controle estratégico em ovinos lanados. In: PADILHA, T. **Controle dos Nematódeos Gastrintestinais em Ruminantes.** Coronel Pacheco: EMBRAPA, 1996. p. 157-168.

FAO, Salud Animal. **Resistência a los Antiparasitarios: Estado Actual Énfasis en América Latina.** Roma: FAO, 2003. 52p.

GILL, H.S. Genetic control of acquired resistance to haemonchosis in Merino lambs. **Parasite Immunology**, v. 13, p. 617-628, 1991.

GOMEZ-MUÑOZ, M.T.; CUQUERELLA, M.; FUENTE, C.; GÓMEZ-IGLESIAS, L.A.; ALUNDA, J.M. Infection-induced protection against *Haemonchus contortus* in Merino and Manchego sheep – ralationship to serum antibody response. **Journal of Veterinary Medicine - Series B,** Berlin, v.45, p. 449-459, 1998.

McCLURE, S.J.; EMERY, D.L. Cell Mediated Responses Against Gastrointestinal Nematodes Parasites of Ruminants. In: GODDEERIS, B.M.L.; MORRISON, W.I. **Cell-mediated immunity in ruminants.** Boca Raton: CRC Press Inc., 1994 p. 213-228.

MINOZZO, J.C.; THOMAZ-SOCCOL, V.; OLORTEGI, C.C; SOARES, V.E.; COSTA, A.J. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for imunodiagnostic of bovine cysticercosis and kinetics of antibodies production against-*Cysticercus bovis*. **Ciencia Rural**., Santa Maria, v. 34, n. 3, 2004.

MORAES, F.R.; SARNOSKI Jr; S.; SAULT, J.P.E.; OLIVEIRA; V.P.; SOCCOL, V.T.; CASTRO, E.A. Estudo epidemiológico da verminose ovina na Região de Ponta Grossa - PR. In: EVINCI - Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná, 6.,1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Editora da Universidade Federal do Paraná, 1998. p. 427.

NARI, A.; CARDOZO, H. Nematodos Gastrointestinales. In.: **Enfermidades de los lanares – Tomo I.** Montevideo : Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L., 1987. p.1-51.

O'CONNOR, L.J.; WALKDEN-BROWN, S.W.; KAHN, L.P. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v.142, n.1-2, p.1-15. 2006.

OLIVEIRA; V.P.; MORAES, F.R.; ZAGO, M.; POLLATI, L.; SOUZA, F.P.; THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E.A. Epidemiologia da verminose em ovinos na Região de Guarapuava - Paraná. In: EVINCI - Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná, 7.,1999, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Editora da Universidade Federal do Paraná, 1999. v.2. p. 494.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; AMARANTE, A.F.T.; SEQUEIRA, J.L. Parasitological characteristics and tissue response in the abomasum of sheep infected with *Haemonchus* spp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** , Belo Horizonte, v. 52, n.5, p.447-452, 2000.

PERNTHANER, A.; SHAW, R.J.; McNEILL, M.M.; MORRISON, L.; HEIN, W.R. Total and nematode-specific IgE response in intestinal lymph of genetically resistant and susceptible sheep during infection with *Trichostrongylus colubriformis.* **Veterinary Immunology and Immunopathology,** Amsterdam, v. 104, p. 69-80. 2005.

PERNTHANER, A.; COLE, S.A.; MORRISON, L.; GREEN, R.; SHAW, R.J.; HEIN, W.R. Cytokine and antibody subclass responses in the intestinal lymph of sheep during repeated experimental infections with nematode parasite *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** Amsterdam, v.114, p. 135-148. 2006.

PETTIT, J.J.; JACKSON, F.; ROCCHI, M.; HUNTLEY, J.F. The relationship between responsiveness against gastrointestinal nematodes in lambs and the numbers of circulating IgE-bearing cells. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v. 134, p.131-139. 2005.

PFEFFER,A.; DOUCH, P.G.C.; SHAW, R.J.; GATEHOUSE, T.K.; RABEL, B.; GREEN, R.S.; SHIRER, C.L.; JONAS, W.E.; BISSET, S. Sequential cellular and humoral responses in the abomasal mucosa and blood of sheep dosed with *Trichostrongylus axei.* **International Journal for Parasitology,** Oxon, v. 26, n. 7, p. 765-773, 1996.

SCHALLIG, H.D.F.H.; HORNOK, S.; CORNELISSEN, J.B.W.J. Comparison of two enzyme immunoassays for the detection of *Haemonchus contortus* infections in sheep. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v.57, p. 329-338, 1995

SCHMIDT, E.M.S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MORAES, F.R. Pesquisa de marcadores parasitológicos e hematológicos de resistência ao parasitismo gastrintestinal em cordeiros. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia UNIPAR**, Umuarama, PR,v. 4, n. 1, p. 55-64, 2001.

SHAW, R.J.; GRIMMETT, D.J.; DONAGHY, M.J.; GATEHOUSE, T.K.; SHIRER, C.L.; DOUCH, P.G.C. Production and characterisation of monoclonal antibodies recognising ovine IgE. **Veterinary immunology and Immunopathology,** Amsterdam, v. 51, n. 3-4, p. 235-251, 1996.

SHAW, R.J.; GATEHOUSE, T.K.; McNEILL, M.M. Serum IgE responses during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology,** Oxon, v.28, p. 293-302, 1998.

STEAR, M.J.; BISHOP, S.C.; DUNCAN, J.L.; McKELLAR, Q.A.; MURRAY, M. The repeatability of faecal egg counts, peripheral eosinophil counts, and plasma pepsinogen concentrations during deliberate infections with *Ostertagia circumcincta*. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 3, p. 375-380, 1995.

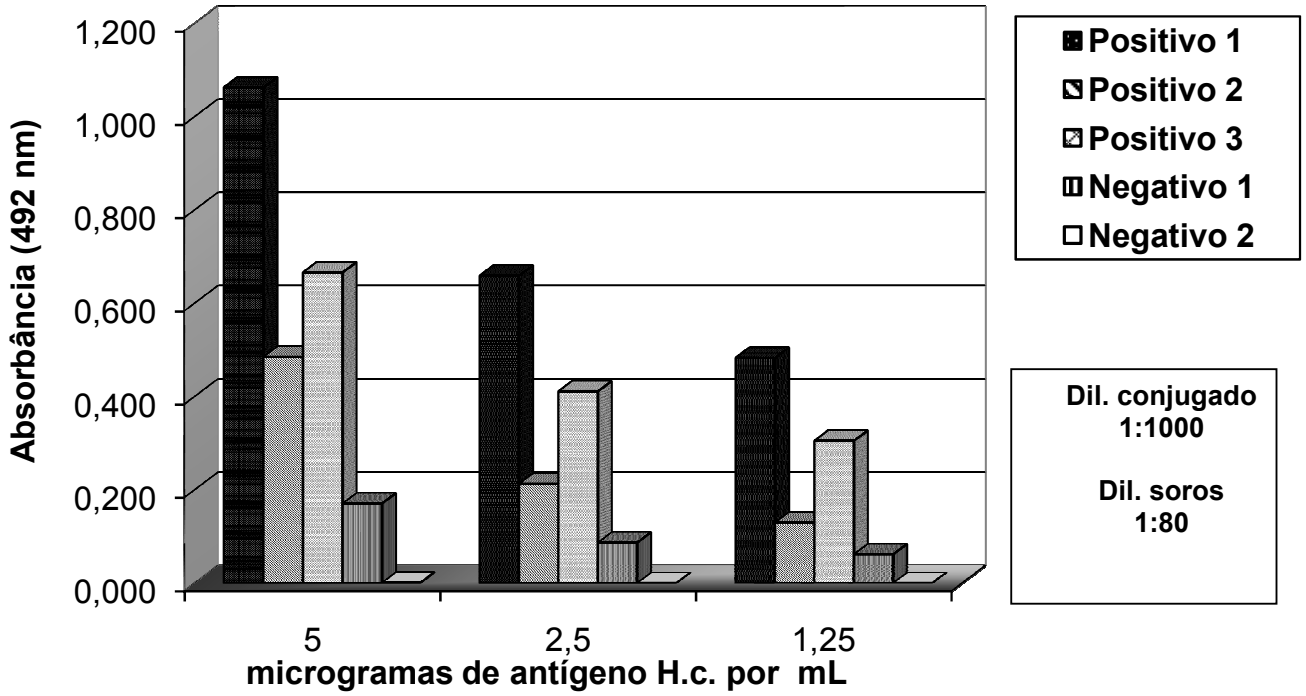
ROCHA, R.A.; AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A. Resistance of Santa Ines and Ile de France suckling lambs to gastrointestinal nematode infections. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,** Rio de Janeiro, v.14, n.1; p. 17-20, 2005.

TIZARD, Ian R. **Imunologia Veterinária – Uma Introdução.** Tradução: Paulo Marcos Agria de Oliveira. 6.ed. São Paulo: Roca, 2002. 532 p. Tradução de: Veterinary Immunology: an Introduction.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F.P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E.A.; MILCZEWSKI, V.; PESSOA, M. C.; MOCELIN, G. Resistance of gastrointestinal nematodes of anthelmintics in sheep (*Ovies aries).* **Brazilian Archives of Biology and Technology.** Curitiba, PR, v. 47, p. 41 – 47, 2004.

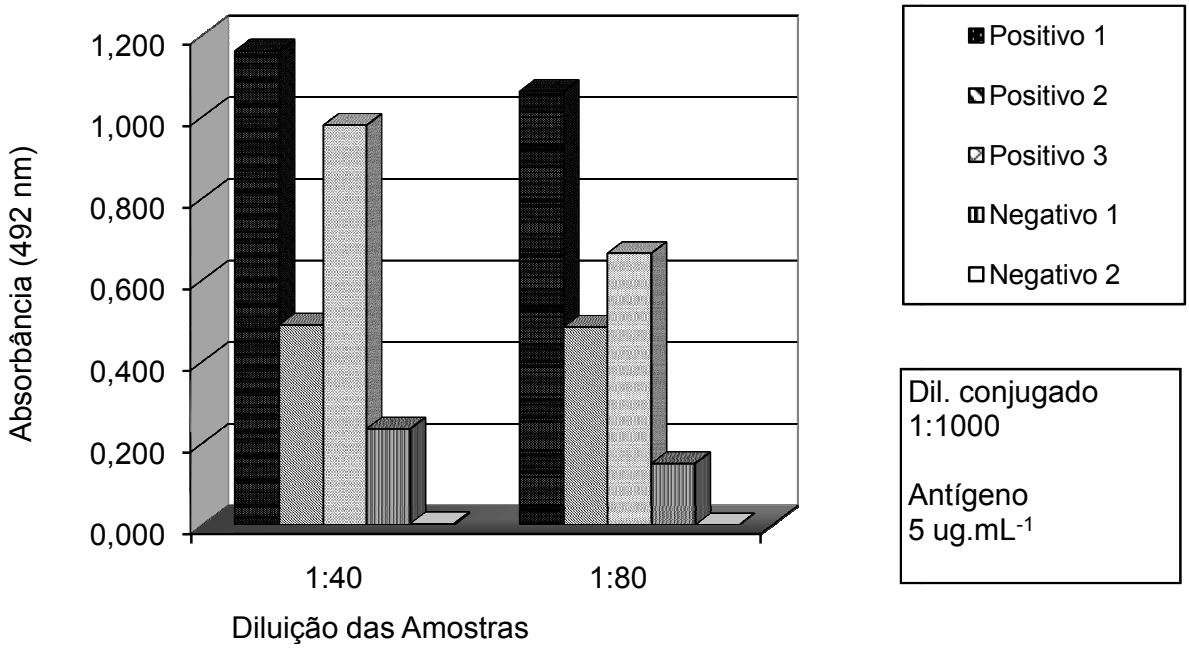
WALLER,P.; ECHEVARRIA, F.;EDDI, C.; MACIEL, S.; NARI, A.; HENSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: General overview. **Veterinary Parasitology,** v. 62, n.3-4, p. 181-187. 1996.

FIGURA 1 - VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS SOROS DE OVINOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA *Haemonchus contortus* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO SOMÁTICO DO PARASITO ADULTO (µg/mL), QUANDO OS SOROS FORAM DILUÍDOS 1:80 E O CONJUGADO ANTI-IgG OVINA1:1000



NOTA: Soros controles positivos 1, 2 e 3 obtidos de ovelhas adultas durante o final do verão; soro controle negativo 1 proveniente de cordeiro tratado e mantido em condições livres de parasitismo por dois meses; soro controle negativo 2 corresponde a uma amostra de soro pré-colostral.

FIGURA 2 - VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS SOROS DE OVINOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA *Haemonchus contortus* (H.c.) EM FUNÇÃO DA DILUIÇÃO DOS SOROS CONTROLES, QUANDO A PLACA FOI SENSIBILIZADA COM SOLUÇÃO ANTÍGENO A 5 $\mu g.mL^{-1}$ E O CONJUGADO ANTI-IgG OVINA DILUÍDO 1:1000



NOTA: Soros controles positivos 1, 2 e 3 obtidos de ovelhas adultas durante o verão; soro controle negativo 1 proveniente de cordeiro tratado e mantido em condições livres de parasitismo por dois meses; soro controle negativo 2 corresponde a uma amostra de soro pré-colostral.

TABELA 1 – VALORES DE ABSORBÂNCIA INESPECÍFICOS E ESPECÍFICOS PARA IgG ANTI-*Haemonchus contortus* (H.c.) QUANDO DUAS DILUIÇÕES DE SORO CONTROLE FORAM ANALISADAS

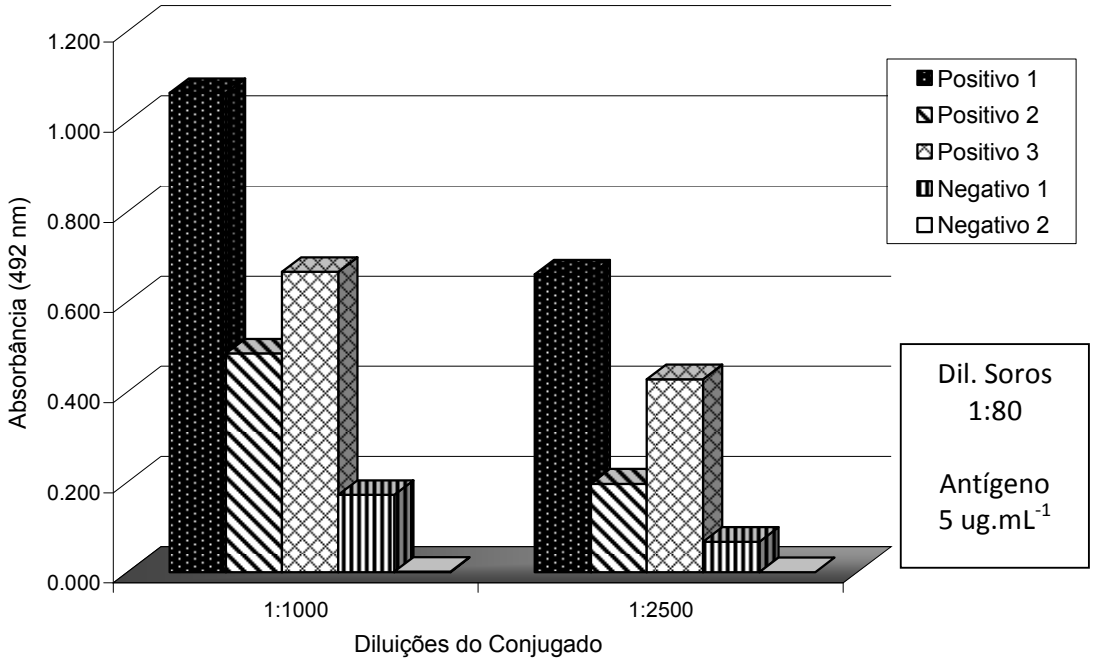
O SORO	RA DE SORO	A PARA IgG ANTI-H.c.	IA PARA REAÇÃO INESPECÍFICA(1)	A CORRIGIDA(2)
	o 1	1,162	0,104	1,058
	o 2	0,491	0,082	0,409
	o 3	0,980	0,078	0,902
	vo 1	0,236	0,047	0,189
	vo 2	0,004	0,000	0,004
	o 1	1,063	0,049	1,014
	o 2	0,485	0,049	0,436
	o 3	0,666	0,046	0,620
	vo 1	0,151	0,027	0,124
	vo 2	0,001	0,000	0,001

NOTA: Soros controles positivos 1, 2 e 3 obtidos de ovelhas adultas durante o verão; soro controle negativo 1 proveniente de cordeiro tratado e mantido em condições livres de parasitismo por dois meses; soro controle negativo 2 corresponde a uma amostra de soro pré-colostral.

(1) Resulta do reconhecimento de anticorpos inespecíficos presentes no soro; obtida quando a placa não foi sensibilizada com antígeno somático de *Haemonchus contortus*

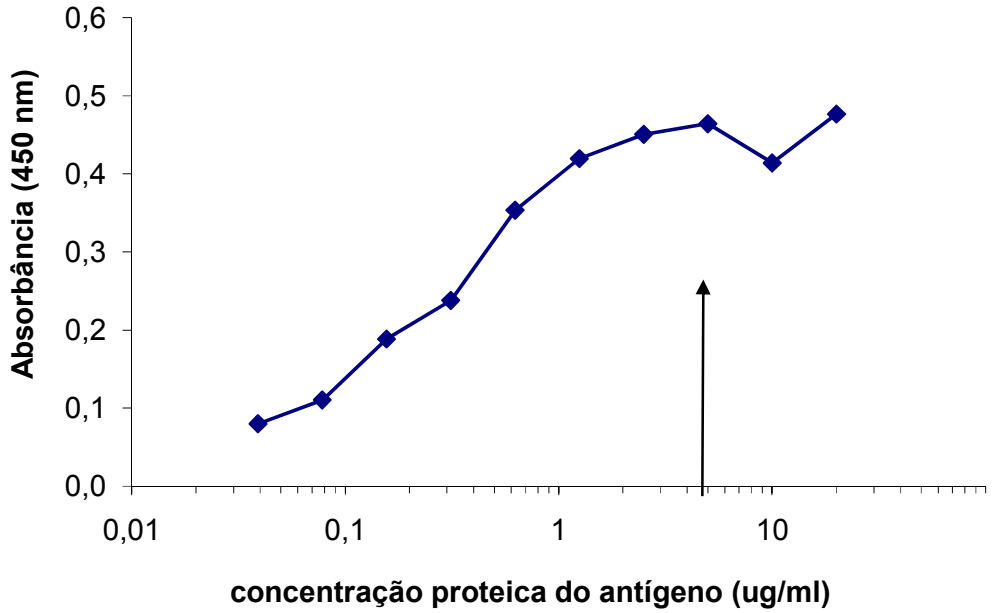
(2) Obtida pela diferença entre os valores de absorbância na presença e ausência de antígeno H.c. Representa a real reatividade do soro ao antígeno específico.

FIGURA 3 - VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS SOROS DE OVINOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA *Haemonchus contortus* EM FUNÇÃO DA DILUIÇÃO DO CONJUGADO ANTI-IgG OVINA, QUANDO A PLACA FOI SENSIBILIZADA COM 5 $\mu g.mL^{-1}$ DE ANTÍGENO E OS SOROS CONTROLES FORAM DILUÍDOS A 1:80



NOTA: Soros controles positivos 1, 2 e 3 obtidos de ovelhas adultas durante o verão; soro controle negativo 1 proveniente de cordeiro tratado e mantido em condições livres de parasitismo por dois meses; soro controle negativo 2 corresponde a uma amostra de soro pré-colostral

FIGURA 4 – VALORES DE ABSORBÂNCIA DE SORO PADRÃO COM 10 µg DE IgE OVINA POR mL QUANDO SUBMETIDOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTÍGENO DE *Haemonchus contortus* EM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO



CAPÍTULO 2

USO DE MARCADORES PARASITOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS NA SELEÇÃO DE OVELHAS RESISTENTES ÀS PARASITOSES GASTRINTESTINAIS

RESUMO

Este trabalho tem por objetivo avaliar a possibilidade de identificar ovelhas resistentes e susceptíveis às parasitoses por meio de um marcador parasitológico (direto), de marcadores imunológicos (indiretos) ou pela associação entre ambos, bem como comparar a eficácia destes métodos com a seleção de animais resilientes. Vinte ovelhas foram acompanhadas por coletas mensais de sangue e fezes no período de novembro de 1998 a maio de 1999. O marcador parasitológico utilizado foi o número de ovos de helmintos por grama de fezes (OPG); os marcadores imunológicos foram o número de eosinófilos sanguíneos, imunoglobulinas G (IgG) e E (IgE) anti-*Haemonchus contortus.* Para indicar resiliência foi utillizado o hematócrito (HT). As ovelhas puderam ser identificadas como resistentes ou susceptíveis pelo OPG. Tanto o número de eosinófilos quanto a IgE específica utilizados concomitantemente com o OPG foram capazes de identificar ovelhas resistentes e susceptíveis. O número de eosinófilos sanguíneos foi o único marcador imunológico capaz de classificar as ovelhas indiretamente nos mesmos grupos obtidos para o OPG. O HT enquadrou as ovelhas susceptíveis no mesmo grupo identificado pelo OPG, indicando que os animais resilientes também seriam mais resistentes quando o *H. contortus* é o helminto mais prevalente.

Palavras-chave: resistência aos parasitos, eosinófilos, IgG, IgE, resiliência

SUMMARY

This work was conducted to verity the possibility to identify adult sheep that are resistant to parasites by using a parasitological marker (direct), immunological markers (indirect) or by the association of both types of markers, as well as to compare the efficacy of these methods to the selection for resilience. Twenty ewes were sampled monthly for blood and faeces, from July of 1998 to June of 1999. Faecal egg counts (FEC) was chosen as parasitological marker. The number of peripheral eosinophils, IgE and IgG anti-*Haemonchus contortus* were used as immunological markers. The packed-cell value (PCV) was used as a resilience indicator. Sheep could be classified as resistant or susceptible by FEC. Both peripheral eosinophils and specific IgE data could be joined to FEC in order to identify resistant or susceptible animals. The number of peripheral eosinophils was the only immunological maker that was able to classify high and low FEC ewes in two different groups. The PCV marker has able to cluster high and low FEC into different groups, showing that the most resistant sheep would be also the more resilient ones when *H. contortus* is the most prevalent worm.

Key words: resistance to nematodes; eosinophils; IgG; IgE; resilience

INTRODUÇÃO

A verminose gastrintestinal é uma das principais causas de perdas produtivas em rebanhos ovinos (CABARET *et al.,* 2002; FAO, 2003; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2004). Seus principais efeitos são observados em cordeiros e em fêmeas adultas no período de lactação (NARI e CARDOZO, 1987; MORAES *et al.*, 1998).

Uma das formas de minimizar os prejuízos com medicamentos e retardar o processo de resistência anti-helmíntica é a identificação de animais que sejam resistentes ou resilientes aos helmintos gastrintestinais (FAO, 2003; AMARANTE, 2006). No entanto, estratégias para este processo devem ser estudadas considerando as particularidades da categoria animal.

As ovelhas adultas são a base de um rebanho, uma vez que elas são responsáveis pela produção dos cordeiros que serão abatidos. Por este motivo, normalmente se considera que a cada ano, apenas uma média de 10 a 20% das fêmeas de um plantel costumam ser descartadas e substituídas (GOMES, 2006). A escolha dos animais a serem descartados normalmente é realizada em função da idade, baixa produtividade, ocorrência de defeitos genéticos e de portadores de doenças infecto-contagiosas (GRANADOS, DIAS e SALES, 2006).

Tendo em vista que a maioria das ovelhas de um plantel se mostra resistente (SOTOMAIOR, 2002) ou resiliente (SOTOMAIOR *et al.,* 2003) aos parasitos gastrintestinais, a identificação das fêmeas susceptíveis por meios eficientes e economicamente viáveis pode ser mais um critério a ser considerado no momento de realizar o descarte seria uma alternativa importante para diminuir o impacto da verminose gastrintestinal nos rebanhos. Este trabalho tem por objetivos avaliar a possibilidade de identificar ovelhas resistentes e susceptíveis às parasitoses por meio de um marcador parasitológico (direto), de marcadores imunológicos (indiretos) ou pela associação entre ambos, bem como de comparar a eficácia destes métodos com a seleção de animais resilientes.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram acompanhadas 20 ovelhas pertencentes ao Quartel General do Exército da Quinta Região Militar, Curitiba, no período entre 10 de novembro de 1998 e 01 de junho de 1999. Todas as fêmeas eram mestiças *Suffolk* de vários graus de sangue, com idade de um a oito anos. Na estação de monta de 1998, todas as ovelhas foram cobertas com um macho *Suffolk*. Os cordeiros, produtos deste cruzamento, nasceram entre 22 de maio e 08 de agosto. O desmame de todos os cordeiros foi realizado conjuntamente, em 06 de outubro de 1998.

No ano de 1999, as ovelhas foram deixadas com um macho *Hampshire Down* a partir do mês de janeiro. Todos os animais permaneceram constantemente nas mesmas pastagens, sujeitos à infecção natural.

Coleta de fezes e sangue

As coletas de fezes foram realizadas a cada 28 dias, no período de novembro de 1998 a maio de 1999. As fezes foram coletadas com sacos plásticos, diretamente do reto de cada animal. Depois de identificadas, as amostras foram acondicionadas em isopor com gelo e levadas ao laboratório, onde foram processados os exames parasitológicos.

As coletas de sangue foram realizadas a partir do desmame, na mesma data das coletas de fezes, sempre por volta das oito horas da manhã. O sangue foi coletado da veia jugular externa, em dois tubos *vacuntainer* (Vacuette® Greiner – Labortechnik), um com capacidade para 8 mL e outro com 4 mL, que continha EDTA como anticoagulante. As amostras foram identificadas, acondicionadas inclinadas em caixas de transporte e levadas ao laboratório. Posteriormente, cada amostra obtida sem anticoagulante foi centrifugada para obtenção do soro. O soro de cada animal foi aliquotado em tubos *eppendorff* identificados e mantidos a –20 ºC até a realização do ensaio-imunoenzimático. As amostras obtidas com EDTA foram identificadas e levadas ao laboratório para a contagem de eosinófilos e determinação do hematócrito.

Métodos parasitológicos

Para estimativa do OPG (número de ovos de helmintos por grama de fezes), foi utilizada a técnica de GORDON e WHITLOCK (1939), sensível para 100 OPG. Para identificar os gêneros de parasitos prevalentes em cada pico de parasitismo, foi realizada a coprocultura. Para isto, um *pool* de amostras obtido a cada coleta foi homogeneizado, umedecido e acrescido de cepilho. Cada *pool* foi incubado a 18-25 ºC por 15 dias. As larvas foram recuperadas do cultivo pelo método de RUGAI *et al.* (1954) e identificadas com a chave proposta por UENO e GONÇALVES (1994).

Contagem de eosinófilos

A contagem dos eosinófilos foi feita pelo método direto (LIMA *et al.*, 1985). Este método consiste na utilização de líquidos de diluição-coloração. Sua composição é baseada nas propriedades específicas de coloração das granulações eosinofílicas e na maior resistência dos eosinófilos à lise, em relação aos demais glóbulos sanguíneos.

O diluente utilizado foi o de Pilot Modificado (MacFARLANE e CECIL, 1951), que cora somente os eosinófilos (por meio da eosina), lisa ou reduz a fragmentos os eritrócitos (por meio do propilenoglicol) e os leucócitos (por meio do carbonato de cálcio). A câmara de contagem utilizada foi a de Fucks-Rosenthal, por comportar maior volume (3,2 mm^3). Após a diluição de 20 µl de cada amostra de sangue em 380 µl de diluente a mistura foi homogeneizada e utilizada para preenchimento da câmara. A leitura foi feita em microscópio óptico, no aumento de 400 vezes. As duas áreas reticuladas da câmara foram contadas. O número de eosinófilos por mm^3 de sangue foi obtido pela multiplicação da média de eosinófilos contados nos dois retículos pelo fator de correção (6,25).

Determinação do nível de anticorpos da classe IgG anti-Haemonchus contortus

O extrato protéico de *Haemonchus contortus* (H.c.) adultos foi escolhido como antígeno para as provas de mensuração dos níveis de anticorpos específicos uma vez que esta espécie de helminto é a mais patogênica e uma das mais prevalentes no Estado do Paraná (MORAES *et al.,* 1998; OLIVEIRA *et al.,* 1999). Apesar dos animais estarem sujeitos à infecção natural multi-específica, o nível de anticorpos anti-*Haemonchus* pode ser um

indicativo da resposta humoral contra a carga parasitária total devido à existência de imunidade cruzada entre os tricostrongilídeos (CUQUERELLA *et al.,* 1994; SCHALLIG *et al.*, 1995; BISSET *et al.,* 1996).

Para determinação dos níveis de IgG específica, foi utilizado o ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. As placas de poliestireno foram sensibilizadas *overnight* a 5ºC com 100 ml de solução de antígeno H.c. (5µg/ml em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9.6), lavadas, e bloqueadas com 150 µL por poço de uma solução de 2% de caseína bovina, por uma hora, a 37ºC. As amostras de soro foram acrescentadas em duplicatas, diluídas 1:80 em tampão de incubação (caseína 2,5 mg/ml; tween20 0,5µl/mL) e incubadas por uma hora a 37ºC. Seis lavagens foram procedidas para remover as proteínas do soro. Cem microlitros de conjugado anti-IgG ovina (SIGMA A3415), diluído 1/1000 em tampão de incubação, foram adicionados a cada poço e incubado a 37ºC por uma hora. Após novas seis lavagens, foram acrescentados 50 µl de substrato OPD - Ortofenilenodiamino (SIGMA P6787) (2 mg em 10,5 ml de tampão fosfato). Dois microlitros de peróxido de hidrogênio foram utilizados para catalisar a reação. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 15 minutos e a reação foi inibida com a adição de 50 µl de ácido sulfúrico a 5% por poço. A leitura foi realizada em leitor de placas com filtro de 492 nm.

Determinação do nível de anticorpos da classe IgE anti-Haemonchus contortus

Para determinação do nível de IgE específica, foi adaptada a técnica descrita por SHAW *et al.* (1998). Antes da realização do ensaio, os soros-teste foram submetidos à precipitação por sulfato de amônio saturado (SAS), a fim de eliminar as moléculas de IgG presentes na amostra. Inicialmente, foi preparada uma solução de SAS em salina, no dobro da concentração final (39%). Esta foi adicionada no mesmo volume da amostra a ser submetida à precipitação. A mistura foi homogeneizada e as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi colhido e armazenado a 5 ºC em novos tubos. Cada amostra resultante da precipitação em SAS foi diluída 1:20 em solução fisiológica com 0,1% Tween 20.

As placas de poliestireno foram sensibilizadas e bloqueadas conforme descrito para o ensaio para detecção de IgG específica. A seguir, 100 µl de cada amostra de soro (precipitada em SAS e diluída1:20) foram adicionadas em duplicata, e incubada *overnight* em temperatura ambiente. Após seis lavagens, os anticorpos monoclonais (mAbs) anti-IgE ovina YD3 e XB6,

produzidos a partir de células de camundongos imunizados (SHAW *et al.,* 1996), foram adicionados na concentração de 2,5 $\mu g.ml^{-1}$ e incubados por duas horas em temperatura ambiente. Novas seis lavagens foram procedidas para remoção dos mAbs que não se aderiram na placa. A diluição do conjugado peroxidase-anti-IgG (cadeia γ) murina (SIGMA A3673), bem como os passos subseqüentes foram idênticos ao descrito para o ensaio para detecção de IgG anti-H.c.

Determinação do hematócrito

Como o *Haemonchus contortus* é um parasito altamente hematófago, foi estimado o grau de anemia dos animais a cada coleta, a fim de ter uma medida de resistência do animal ao efeito da parasitose (resiliência). O hematócrito foi determinado a partir de amostras de sangue coletadas com EDTA pela técnica do microhematócrito (JAIN, 1993).

Controle parasitário

As 20 ovelhas foram desverminados por ocasião do desmame (dia 06 de outubro) com 200 $\mu g\ kg^{-1}$ de Moxidectin (Cydectin® Cyanamid Química do Brasil Ltda.). Esta dosificação teve como objetivo deixar os animais em condições semelhantes de parasitose para o acompanhamento. Durante o acompanhamento, foram procedidas novas dosificações anti-helmínticas sempre que a média de OPG ultrapassasse 1500 (UENO e GONÇALVES, 1994), com o mesmo princípio ativo e dose. A cada tratamento, a eficácia do medicamento foi controlada pelo cálculo do percentual de redução do OPG (SOUZA, 1997).

Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Statistica, versão 5.0,exceto a análise de variância para o cálculo da Repetibilidade, e o teste de Bartlett para determinação da homogeneidade das variâncias, realizado no MSTAT-C, versão 2.10.

Para diminuir o coeficiente de variação das variáveis estudadas, foi empregada a transformação logarítmica dos dados. Para isto, os dados de OPG foram transformados no logaritmo decimal do valor mais uma unidade (log (OPG+1)); o número de eosinófilos no

sangue periférico (EOSINO), IgE e IgG específicas, no logaritmo decimal do valor (log(EOSINO); log(IgE); log(IgG)). Os dados de hematócrito (HT) não necessitaram a transformação logarítmica pois as variâncias se mostraram homogêneas no teste de Bartlett.

O OPG foi considerado marcador parasitológico; as variáveis eosinófilos, IgE e IgG foram consideradas marcadores imunológicos e o HT e grau FAMACHA© foi considerado marcador de resiliência. Para o estudo do comportamento de cada variável no rebanho, os dados foram submetidos à Análise de Variância, considerando um delineamento inteiramente casualizado, onde os animais representavam as repetições e as diferentes coletas os tratamentos. As médias de cada coleta foram comparadas pelo teste de Duncan, $p<0,05$. Este teste de médias foi escolhido por ser ideal para variáveis com coeficiente de variação elevado (SAMPAIO, 1998).

Para as análises de correlações entre os marcadores estudados, optou-se pelo teste não paramétrico de Spearman, aplicado sobre os dados não transformados. Foram consideradas significativas as correlações cujo p foi menor que 0,10.

Para a seleção dos animais, diferentes combinações entre as variáveis foram submetidas à análise de *cluster*. Este é um método capaz de agrupar unidades (animais) com base nos valores de várias medidas simultaneamente (marcadores). Os resultados são expressos em um diagrama em árvore ou dendrograma, com uma escala para que se possa observar os níveis de agrupamento. A escala adotada foi a distância euclidiana, que corresponde à distância geométrica entre as unidades no espaço multidimensional. Os *clusters* formados foram ligados com bases nos vizinhos distantes (*Complete linkage*), no qual a distância entre dois *clusters* é determinada pelos objetos mais extremos de cada um. Como as variáveis utilizadas para o agrupamento apresentavam diferentes unidades, os dados brutos (sem transformação logarítmica) foram "estandarizados" antes de ser submetidos à análise.

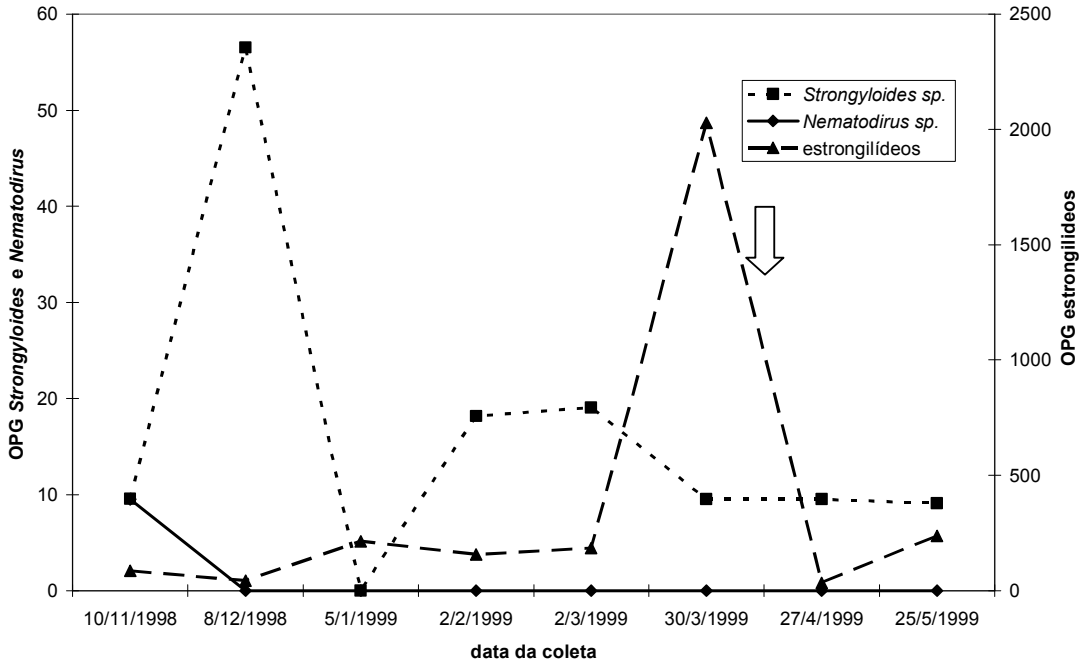
Uma vez obtidos os grupos resistente e susceptível pela análise de *cluster,* as médias de cada grupo para as variáveis analisadas (log(OPG+1); log(EOSINO); log(IgE), log(IgG) e HT) foram comparadas pelo teste t de Student para amostras não pareadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação Parasitológica

Os exames coproparasitológicos revelaram a presença de ovos de helmintos da Ordem Strongylida (ovos estrongiliformes e de *Nematodirus*) e de *Strongyloides* (FIGURA 1). Os primeiros foram predominantes durante todo o período, com um aumento na coleta de 30 de março, quando a média de eliminação foi de 2028,57 ± 3511,97 OPG (FIGURA 1). Por este motivo, o rebanho foi tratado com moxidectin (0,02 mg/kg, via subcutânea), que resultou em uma redução de 99,26% no OPG 14 dias após o tratamento.

FIGURA 1 – MÉDIA MENSAL DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DAS OVELHAS ADULTAS, POR TIPO DE OVO ENCONTRADO, NO PERÍODO DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999, CURITIBA, PARANA



NOTA: A seta indica o tratamento anti-helmíntico de 06 de abril.

Este aumento na eliminação de ovos de helmintos no final do mês de março pode ser explicado pelas condições meteorológicas favoráveis ao desenvolvimento e sobrevivência das larvas infectantes nas pastagens durante todo o verão, possibilitando a infecção dos animais e o aumento do OPG dos ovinos mais sensíveis. A ocorrência dos picos de parasitismo em animais adultos, presenciada neste trabalho, foi semelhante à obtida por MORAES *et al.* (1998) para a região de Ponta Grossa, Paraná.

A predominância de eliminação de ovos de estrongilídeos durante o acompanhamento é explicável pela maior freqüência e patogenicidade dos parasitos desta superfamília em ovinos (SANTIAGO, BEVENGA e COSTA, 1976; NARI e CARDOZO, 1987; RAMOS *et al.,* 2004; BOWMAN *et al.,* 2006). Ovos de *Nematodirus* sp. foram observados apenas nas coletas de julho, outubro e novembro. Em cada uma destas coletas, uma ovelha diferente foi assinalada como positiva para ovos do parasito. É bem possível que este helminto tenha estado presente durante todo período de acompanhamento, mas sua baixa prevalência associada ao seu baixo potencial biótico (UENO e GONÇALVES, 1994) tenha dificultado a detecção dos ovos nos exames coproparasitológicos. RAMOS *et al.* (2004) encontraram *Nematodirus spathiger* em 100% dos ovinos acompanhados durante o mesmo período deste trabalho, na Região do Planalto de Santa Catarina.

Os ovos de *Strongyloides papillosus* foram assinalados durante todo o acompanhamento, com dois ou três animais assinalados positivos na maioria das coletas. O único pico expressivo de eliminação de ovos deste parasito foi no mês de dezembro, com média de 56,52 ± 77,09 OPG no lote e nove animais positivos nos exames coproparasitológicos. Em estudo epidemiológico realizado no mesmo período, este parasito não foi assinalado em ovinos do Planalto Catarinense (RAMOS *et al.* 2004).

As coproculturas indicaram predominância dos gêneros *Haemonchus* sp. com 87,0 e 94,0% das larvas recuperadas em março e maio, respectivamente. Isto pode ter ocorrido porque é durante o outono que os estádios exógenos deste parasito encontram as condições mais adequadas para sua sobrevivência e desenvolvimento, justificando a prevalência do gênero neste período (ECHEVARRIA,1996).

Durante o acompanhamento, também foram assinaladas larvas de *Trichostrongylus* sp.*, Ostertagia* sp., *Nematodirus* sp. e *Cooperia* sp. Apenas 2 e 4% das larvas recuperadas nas coproculturas de março e maio, respectivamente, foram do gênero *Trichostrongylus.* Estes dados são semelhantes aos obtidos por MORAES *et al.* (1998) para a região de Ponta Grossa para o mesmo período do ano. A maior

prevalência de *Ostertagia* no mês de março (11,0%) é coerente com os achados de OLIVEIRA *et al.* (1999). As percentagens de larvas recuperadas de *Nematodirus* sp. e *Cooperia* sp. são coniventes com os dados de NARI e CARDOZO (1987), ECHEVARRIA (1996), MORAES *et al.* (1998) e OLIVEIRA *et al.* (1999), que encontraram baixa prevalência destes gêneros em ovinos. Não foram recuperadas larvas nas coproculturas dos meses de novembro a fevereiro e abril, devido ao baixo OPG dos animais.

Larvas de *Strongyloides papillosus* foram encontradas em todas as coproculturas realizadas, mas não foram incluídas no cálculo percentual porque este parasito é capaz de realizar o ciclo heterogônico no ambiente se reproduzir em vida livre (BOWMAN *et al.* 2006). Nos períodos de baixo parasitismo, nenhuma ou raras larvas de estrongilídeos foram recuperadas.

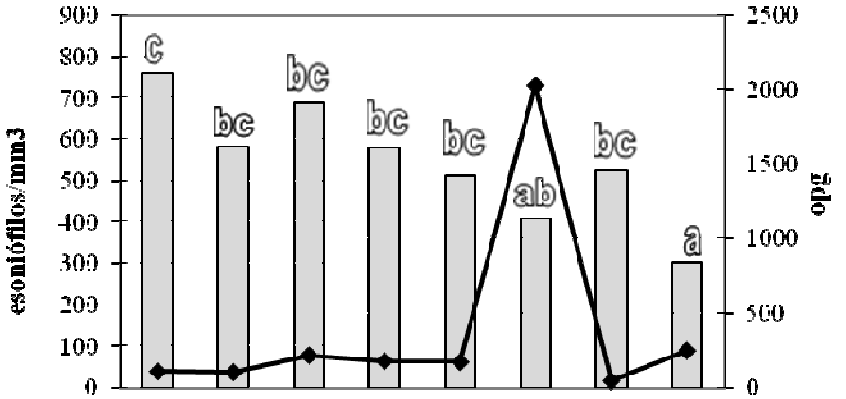
Eosinófilos sanguíneos

O número de eosinófilos periféricos apresentou-se alto no mês de novembro, com média de 762,18 ± 618,49 eosinófilos por mm^3 de sangue (FIGURA 2a). A média de eosinófilos se manteve constante de dezembro a março. Concomitante ao pico de parasitismo de 30 de março, foi observada uma queda no número de eosinófilos circulantes, com média de 410,62 ± 178,82 células por mm^3. Após o tratamento anti-helmíntico, foi observada uma recuperação no nível sanguíneo de eosinófilos, seguida por uma acentuada queda. Esta queda foi registrada na última coleta do acompanhamento e atingiu a média de 302,50 ± 116,78 eosinófilos por mm^3.

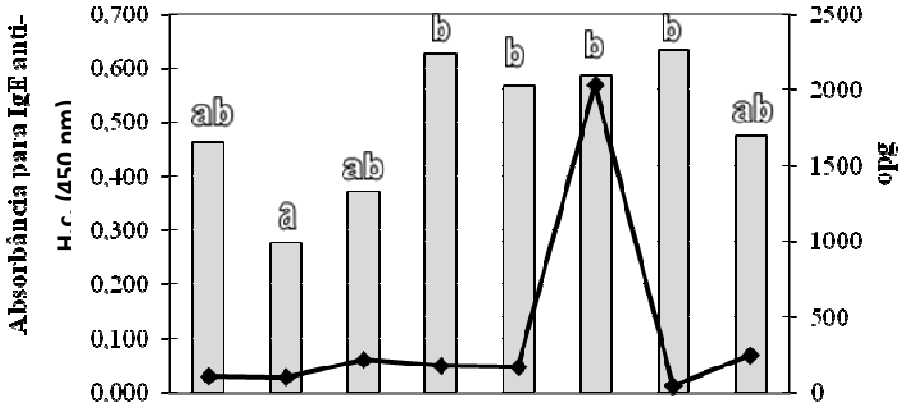
A média dos eosinófilos periféricos no lote de fêmeas acompanhadas revelou uma queda no pico de parasitismo, com recuperação subseqüente. Esta redução pode ter sido compensada devido à migração para a mucosa gastrintestinal, induzida pela liberação de IL-5, em decorrência do estímulo parasitário (TIZARD, 2002). PERNTHANER *et al.* (2006) relataram um aumento significativo dos níveis desta interleucina na linfa intestinal de ovinos de um ano de idade criados a pasto, quando estes foram desafiados com larvas de *Trichostrongylus colubriformis*.

FIGURA 2 – MÉDIA MENSAL DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG -LINHAS), EOSINÓFILOS POR MILÍMETRO CÚBICO DE SANGUE (a), ABSORBÂNCIA PARA IgG (b) E IgE ANTI-*Haemonchus contortus* (c) DAS OVELHAS ADULTAS, NO PERÍODO DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999

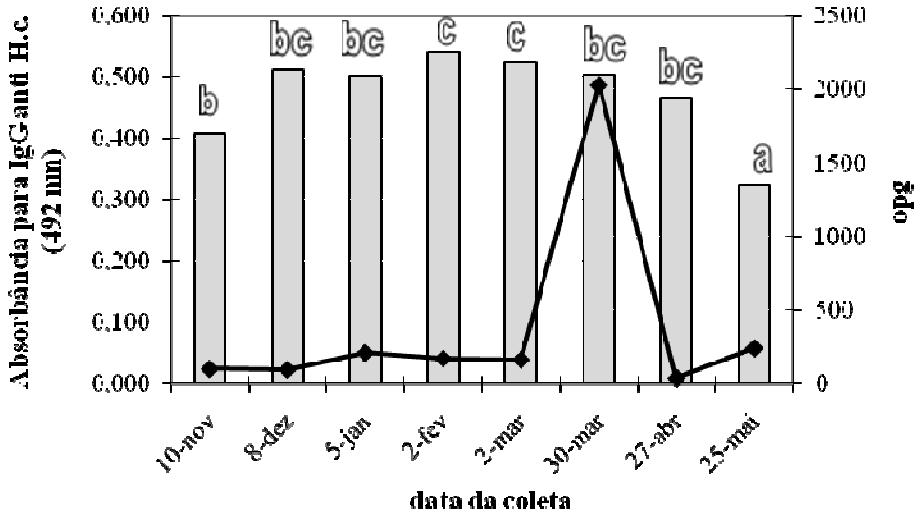
(a)



(b)



(c)



NOTA: As letras indicam diferenças nas médias para o teste de Duncan ($p<0,05$)

Na coleta de 25 de maio, houve nova diminuição no número de eosinófilos. Esta poderia estar associada à imuno-depressão peripuerperal, uma vez que a maioria dos animais acompanhados encontrava-se no último mês de gestação. VALDERRÁBANO *et al.* (2006) também relataram diminuição no número de eosinófilos circulantes em fêmeas ovinas um mês antes do parto.

IgE anti-Haemonchus contortus

A média dos valores de absorbância para IgE específica foi baixa nos meses de novembro (0,462 ± 0,574) e de dezembro (FIGURA 2b). De fevereiro a abril, a média de IgE específica se manteve elevada e constante. Em maio ocorreu nova queda nos valores de IgE anti-H.c., com valor médio de 0,476 ± 0,547.

Ao contrário do observado com os eosinófilos, houve uma tendência do nível de IgE específica se manter elevado durante o pico de parasitismo. Isso era esperado, uma vez que PERNTHANER *et al.* (2005) observaram que o nível de IgE específica no soro era proporcional ao encontrado na linfa intestinal.

PFEFFER *et al.* (2005) não encontraram diferença significativa nos níveis séricos de IgE anti-*Trichostrongylus colubriformis* em ovelhas entre o dia do parto e 30 dias após, mas verificaram níveis colostrais deste anticorpo equivalentes aos séricos. Portanto, os baixos valores de IgE específica observados nas três primeiras coletas podem ser reflexo da transferência passiva destes anticorpos e da imunossupressão lactacional. Se esta hipótese for verdadeira, a IgE específica é a última das variáveis imunológicas a restabelecer seus valores normais após o término da lactação. Este restabelecimento ocorreria somente após longo período de desafio parasitário. É possível que a contaminação do pasto por ovos de helmintos eliminados pelos animais jovens, somada às condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do estádio infectante tenham proporcionado um nível de desafio parasitário necessário para a elevação da IgE sérica.

A diminuição no nível médio de IgE específica no mês de maio foi acompanhada de queda na média de outras variáveis imunológicas (IgG e eosinófilos periféricos). A diminuição nos níveis médios de todas as variáveis imunológicas na coleta do dia 25 de maio pode ser atribuída à imuno-depressão peri-parto, uma vez que a maior parte das fêmeas cursavam o quinto mês gestacional.

IgG anti-Haemonchus contortus

No início do acompanhamento, a média de densidade óptica para IgG específica foi de 0,408 ± 0,092 (FIGURA 2c). Um pequeno aumento nesta média foi observado em dezembro, com os valores se mantendo constantes até o mês de abril. No mês de maio foi observada uma redução acentuada nos valores de absorbância para IgG anti-H.c., atingindo a média de 0,324 ± 0,078.

A baixa média de IgG anti-H.c. observada no início do acompanhamento pode estar relacionada à imuno-depressão inespecífica que ocorre nas fêmeas durante o período lactacional (HOUDIJK *et al.,* 2000). PFEFFER *et al.* (2005) observaram o aumento dos níveis séricos de IgG_1 anti-*Trichostrongylus colubriformis* 30 dias após o parto, mas não houve comparação dos níveis deste anticorpo no período periparto e o término da lactação das ovelhas. Portanto, é possível que o restabelecimento total dos níveis de IgG específica só aconteça após o término do período lactacional. Isso explicaria o aumento na média desta variável a partir da coleta de novembro, um mês após o desmame dos cordeiros. Outra explicação para a baixa absorbância observada na primeira coleta seria os níveis baixos de parasitismo dos animais, resultando em um insuficiente estímulo ao sistema imune.

A manutenção dos níveis de IgG específica durante os meses de verão e outono pode ser resultado da infecção constante dos animais com L_3 na pastagem. A queda destes níveis no mês de maio, tal qual a queda do número de eosinófilos periféricos, pode ser atribuída à imuno-depressão periparto.

Hematócrito

Os valores de hematócrito das ovelhas mantiveram-se constantes durante o acompanhamento individual, elevando-se após o tratamento anti-helmíntico (TABELA 1).

TABELA 1 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS VALORES DE HEMATÓCRITO (HT) DAS OVELHAS, NO PERÍODO DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999 CURITIBA, PARANA

COLETA	DATA	MÉDIA HT(%)[(1)]		DESVIO HT (%)
1	10/11/98	31,50	ab	2,19
2	08/12/98	30,75	ab	1,89
3	05/01/99	32,05	ab	2,35
4	02/02/99	30,60	ab	3,53
5	02/03/99	31,85	ab	2,30
6	30/03/99	30,05	b	4,80
7	27/04/99	32,30	a	2,49
8	25/05/99	32,30	a	2,34

(1) agrupadas pelo teste de Duncan, p <0,05

 coleta referente ao pico de parasitismo

Tendo em vista que as culturas de larvas mostraram a predominância do gênero *Haemonchus* durante todo o período experimental, era esperado que os valores de hematócrito dos animais decaíssem nos períodos de parasitismo mais intenso. Esta relação foi observada por SOTOMAIOR (1997) e SCHMIDT (2001) em ovelhas adultas submetidas à infecção natural por *Haemonchus contortus* e por VANIMISETTI *et al.* (2004), em infecção experimental. No entanto, a diferença na média dos valores hematócrito não foi considerada significativa pelo teste de Duncan ($p<0.05$) durante o pico de parasitismo. Possivelmente isso ocorreu devido à variação de respostas entre os animais (desvio padrão de 4,8%), sendo que seis ovelhas apresentaram valores de hematócrito inferiores a 28% apenas nesta coleta.

Análise de correlação

Quando os dados de OPG, eosinófilos, IgE total, IgE e IgG específicas de todas as coletas foram correlacionados entre si, observou-se que tanto eosinófilos quanto IgE tendem a ser correlacionados negativamente com o OPG (TABELA 2). Todas as demais correlações entre OPG e variáveis imunológicas foram positivas, sendo significativas as $r_{(OPG;\ IgG)} = 0,13$; $r_{(IgE;\ EOSINO)} = 0,13$; e $r_{(IgG,\ IgE)} = 0,15$.

TABELA 2 – CORRELAÇÕES DE SPEARMAN ENTRE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG), EOSINÓFILOS CIRCULANTES (EOSINO), IgG E IgE ANTI-*Haemonchus contortus* E HEMATÓCRITO (HT) DAS OVELHAS, CONSIDERANDO TODAS AS COLETAS ENTRE NOVEMBRO DE 1998 E MAIO DE 1999 (ACIMA DA DIAGONAL) E APENAS A COLETA DE 30 DE MARCO DE 1999, CORRESPONDENTE AO PICO DE PARASITISMO (ABAIXO DA DIAGONAL)

VARIÁVEL	OPG	EOSINO	IgE	IgG	HT
OPG	-	-0,2097 *	-0,0341	0,1310 +	0,1452 +
EOSINO	-0,6418 *	-	0,1331 +	0,0221	-0,0141
IgE	-0,1138	0,2549	-	0,1554 *	-0,0799
IgG	0,0007	0,0316	-0,1865 *	-	0,0381
HT	0,0088	-0,01399	-0,0826	0,0182	-

+ $p<0,10$; * $p<0,05$

Quando os dados totais de cada variável foram correlacionados, verificamos que o número de eosinófilos sanguíneos foi a variável que obteve melhor correlação com o marcador parasitológico. No pico de verminose, uma correlação de –0,64 foi obtida entre eosinófilos periféricos e OPG. Isso indica que o alto grau de parasitismo é diretamente responsável pela migração dos eosinófilos do sangue para a mucosa gastrintestinal. Nível médio de correlação (r = -0,26) entre eosinófilos e OPG também foi detectado por WOOLASTON *et al.* (1996) após desafiar borregos de 13 meses de idade, submetidos a prévias infecções a campo.

A relação observada entre IgG e OPG não seria o esperado para animais adultos, com um padrão de resposta imune estabelecido contra os helmintos gastrintestinais. Uma vez estabelecido um grau de imunidade protetora, seria esperada uma correlação negativa entre estas características. Quanto maior o nível de anticorpos circulantes, menor seria o número de helmintos estabelecidos. Correlações negativas entre IgG específica e OPG de nível médio a alto foram detectadas em vários estudos (DOUCH *et al.,* 1995, 1996; BISSET *et al.,* 1996; SHAW *et al.,* 1999). A correlação positiva entre IgG e OPG obtida neste estudo pode ser reflexo de uma provável seleção natural para resiliência. Embora não haja estudos sobre a resposta imune de animais resilientes, pode ser que os altos níveis de IgG indiquem a capacidade do organismo em reconhecer o agente agressor, mas não em expulsá-lo.

A tendência a correlações negativas entre IgE específica e OPG é esperada para animais adultos, com uma resposta imune estabelecida. Esta relação indica que quanto maior for o nível de IgE sérica, menor é o número de parasitos estabelecidos. A intensificação da correlação entre estas variáveis na coleta logo após o tratamento anti-helmíntico pode indicar uma tendência natural de eliminação da carga parasitária. Se esta

hipótese estivesse correta, seria possível que os animais apresentassem auto-cura caso não tivessem recebido o tratamento anti-helmíntico.

Quando as três variáveis imunológicas foram correlacionadas entre si, o esperado seria correlações altas e positivas, uma vez que tanto eosinófilos, IgG e IgE aumentam em resposta ao estímulo parasitário. Isto foi observado nas relações entre IgE e eosinófilos, bem como IgG e IgE. Quando IgG e eosinófilos foram correlacionados, houve várias correlações negativas entre as coletas. Além disso, a maior parte das correlações obtidas foram fracas, muito longe do nível de significância adotado. PERNTHANER *et al.* (1995) também encontraram mudanças nas tendências das correlações com eosinófilos ao longo do estudo.

Os baixos valores de correlação obtidos entre as variáveis estudadas, bem como a resposta atípica obtida para os valores de IgG, pode ser decorrente da heterogeneidade de resposta imune dos indivíduos. Considerável variação na expressão da imunidade dos ovinos aos helmintos gastrintestinais foi observada em vários estudos (STEAR *et al.*, 1995a; SHAW *et al.*, 1997; GÓMEZ-MUÑHOZ *et al.*,1998). No presente trabalho, a variabilidade pode ter sido evidenciada devido à infecção natural, à baixa amostragem do lote e às diferenças de idade e de raça entre os animais.

A correlação baixa e positiva entre hematócrito e OPG, com ausência de correlação entre estas variáveis no pico de parasitismo não eram esperados, uma vez que os ovinos apresentaram maior prevalência do gênero *Haemonchus* nas coproculturas. VANIMISETTI *et al.* (2004) relataram correlação de –0,39 entre o OPG e o hematócrito de ovelhas adultas; BISSET *et al.* (2001); VAN WYK e BATH (2002) calcularam valores de –0,72. Contudo, ovinos resilientes podem manifestar um alto grau de parasitismo sem alterações clínicas ou perda evidente de performance. MOLENTO *et al.* (2004) relataram que não foram observados sinais de anemia em vários dos animais acompanhados, mesmo com contagens de OPG acima de 1500. Os mesmos autores relatam também ocorrência de baixa correlação entre o OPG e o grau FAMACHA. É possível que a presença de animais resilientes no rebanho analisado tenha sido responsável pelos resultados obtidos.

A não ocorrência de correlações significativas entre o hematócrito e os caracteres imunológicos já era prevista, uma vez que não se conjectura relações entre estas variáveis. A ocorrência de algumas correlações negativas entre o hematócrito de coletas durante e após desafio parasitário e o nível de eosinófilos pode indicar que a migração desta célula para os tecidos pode ter contribuído para a eliminação dos parasitos e/ou a diminuição de sua patogenicidade.

Seleção das ovelhas

a) Classificação das ovelhas em resistentes e susceptíveis à parasitose gastrintestinal com base no marcador parasitológico (OPG)

Para a análise de *cluster*, foram elaboradas três hipóteses de agrupamento baseadas no OPG:

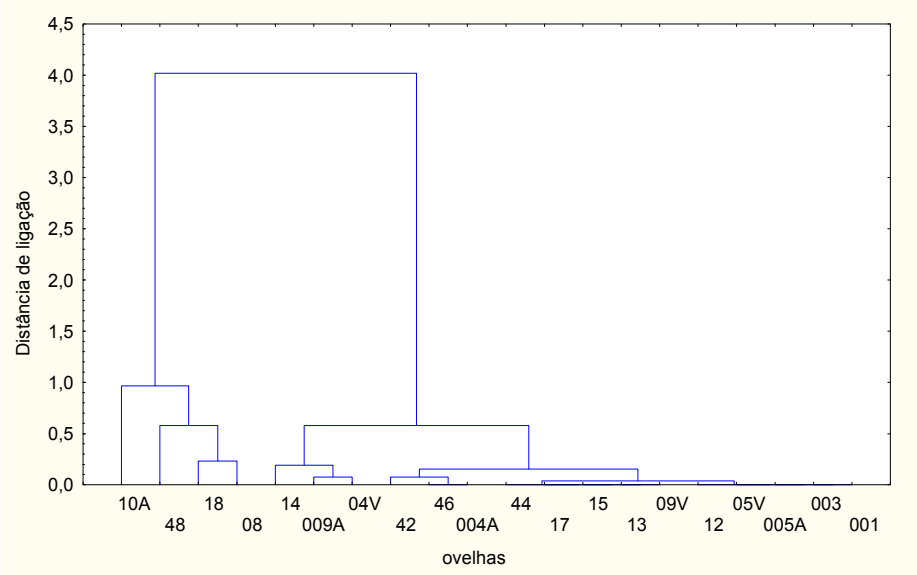
1 – dados de todas as coletas

2 – dados da coleta 6 (pico de parasitismo de outono)

3 – dados das coletas 5 e 6

As três hipóteses resultaram em *cluster*s muito semelhantes, capazes de identificar o mesmo grupo de animais resistentes, composto por 16 ovelhas, e o mesmo grupo de animais susceptíveis ao parasitismo, composto por quatro fêmeas (FIGURA 3).

FIGURA 3 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE CONTAGEM DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DA COLETA DE 30 DE MARÇO DE 1999, CORRESPONDENTE AO PICO DE PARASITISMO DE OUTONO EM OVELHAS



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana. (S) Susceptíveis; (R) Resistentes.

O teste t sobre os grupos resistente (R) e susceptível (S) mostrou que o logaritmo do OPG das coletas 2, 3 e 6 (pico de parasitismo) e do número de eosinófilos sanguíneos das coletas 5 e 6 foi diferente entre os grupos, para $p<0,05$. Não foi observada diferença significativa entre os grupos para os logaritmos de IgE e IgG específica. Para o hematócrito, a média dos grupos resistente e susceptível somente foi considerada diferente na coleta 1 ($p<0,05$).

A análise da distribuição das variáveis por grupo na coleta coincidente com o pico de parasitismo revelou que o grupo dos animais susceptíveis apresentou maior média de OPG e menor média de eosinófilos (TABELA 3). Quando o logaritmo da absorbância para IgE específica foi analisado, foi observada grande variabilidade de respostas dentro de ambos os grupos. Entretanto, foi observada uma tendência do grupo susceptível em apresentar uma média de IgE mais baixa que a do grupo resistente. Os valores de logaritmo da absorbância para IgG específica foram também muito variáveis, sobretudo no grupo dos animais resistentes. O grupo susceptível teve menor discrepância de dados e tendência a uma maior média que o grupo resistente. O grupo susceptível também apresentou menores valores de hematócrito do que o grupo resistente, embora esta diferença não tenha sido considerada significativa pelo teste t ($p=0,0753$).

TABELA 3 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO LOGARITMO DAS CONTAGENS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG), EOSINÓFILOS CIRCULANTES (Eosino), IgG E IgE ANTI- *Haemononchus contortus* E HEMATÓCRITO DAS OVELHAS CLASSIFICADAS COMO RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS PELA ANÁLISE DE CLUSTER REALIZADA COM DADOS DE OPG, NA COLETA DE 30 DE MARÇO DE 1998, REFERENTE AO PICO DE PARASITISMO

VARIÁVEL	GRUPO RESISTENTE (n=16)		GRUPO SUSCEPTIVEL (n=4)		p*
	MÉDIA	DESVIO	MÉDIA	DESVIO	
Log (OPG+1)	3,9581	1,2294	1,6742	0,5013	0,00187
Log (Eosino)	2.6435	0,1536	0,2809	0,0582	0,00024
Log (IgE)	-0,4335	0,5509	-0,7353	0,5589	0,34131
Log (IgG)	-0,3219	0,1209	-0,2639	0,0285	0,36211
Hematócrito (%)	31,0000	0,6021	26,2500	0,9574	0,07531

*Probabilidade de erro do tipo I em teste T independente

b) Classificação das ovelhas em resistentes e susceptíveis à parasitose gastrintestinal com base em mais de um marcador

Para a seleção das ovelhas baseada em mais de um marcador, foram comparadas as seguintes hipóteses:

1- dados de OPG, eosinófilos sanguíneos, IgE e IgG de todas as coletas;
2- dados de OPG, eosinófilos sanguíneos, IgE e IgG da coleta 6 (pico de parasitismo);
3- dados de OPG e eosinófilos da coleta 6;
4- dados de OPG e IgE da coleta 6;
5- dados de OPG e IgG da coleta 6

As hipóteses de 1 a 4 dividiram os animais de formas distintas (ANEXO 4), mas todas foram capazes de separar um mesmo grupo de quatro ovelhas de baixo OPG. Estas foram as mesmas ovelhas identificadas como susceptíveis utilizando o marcador parasitológico. Desta forma, estas hipóteses foram capazes de segregar as ovelhas susceptíveis do grupo resistente.

A última hipótese resultou em dois grupos: o grupo A, que compreendeu os animais de alta IgG, foi subdividido em dois subgrupos. O subgrupo A_1 compreendeu os animais cujos valores de OPG foram elevados (susceptíveis) e o A_2, animais com valores baixos de OPG. O grupo B compreendeu animais de baixa IgG. Como os grupos primários formados (A e B) mantinham animais de baixo OPG, não se pôde obter grupos resistentes e susceptíveis bem formados.

c) Classificação das ovelhas em resistentes e susceptíveis com base em marcadores imunológicos

A fim de observar o comportamento dos marcadores imunológicos como ferramentas de seleção indireta para animais resistentes (de baixo OPG), os valores de eosinófilos, IgE e IgG específica foram submetidos à análise de *cluster*. Para cada variável foram construídos dois *clusters,* um relacionando dados do pico de parasitismo (coleta 6) com a coleta imediatamente anterior (coleta 5), e outro com a coleta imediatamente posterior (coleta 7).

Tanto para IgG quanto para IgE específica, nenhum *cluster* foi capaz de reunir os animais susceptíveis em um mesmo grupo. Nas duas hipóteses formuladas para os eosinófilos, os quatro animais considerados susceptíveis pelo OPG foram incluídos no grupo de menores valores para eosinófilos, assinalado como B_1 (ANEXO 5).

d) Classificação das ovelhas em resilientes e susceptíveis com base no hematócrito

Para a análise de *cluster*, foram elaboradas três hipóteses de agrupamento baseadas no hematócrito:

1 – dados de todas as coletas

2 – dados da coleta 6 (pico de parasitismo de outono)

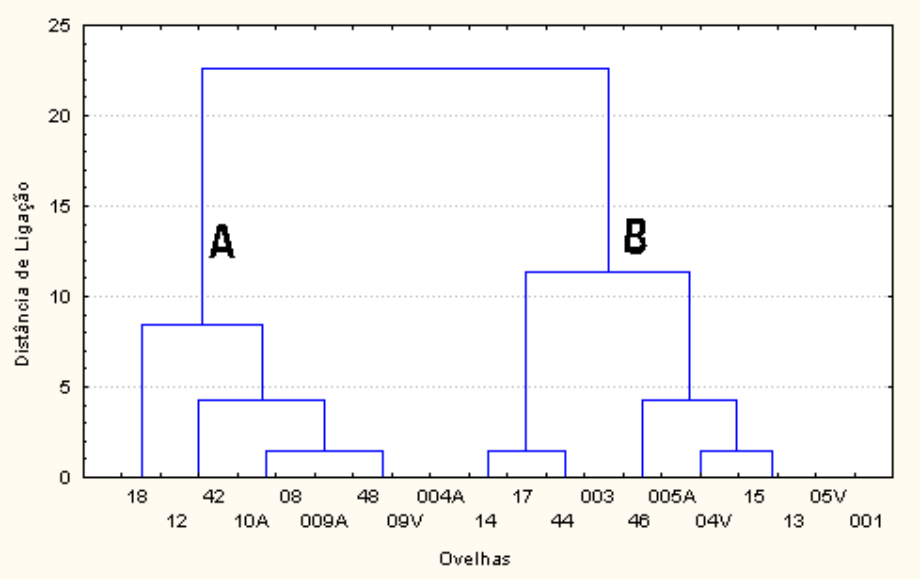
3 – dados das coletas 5 e 6

A primeira hipótese resultou na formação de dois grupos, unidos a 22,4 de distância euclidiana (ANEXO 6). O grupo A reuniu os animais de maior valor de hematócrito (mais resilientes), enquanto o grupo B compreendeu animais com diversos tipos de oscilação no hematócrito durante todo o acompanhamento. Apesar da clara formação de dois subgrupos, B1 e B2, não foi demonstrada diferença significativa na média do hematócrito entre eles para nenhuma das coletas de sangue pelo teste t.

A segunda hipótese permitiu a separação em dois grupos distintos, ao nível de 22,9 de distância euclidiana (FIGURA 4). Destes, o grupo A compreendeu os nove animais de mais baixo hematócrito, dentro dos quais estavam os quatro animais de mais alto OPG (08, 10^A, 18 e 48). Quando a média de OPG, hematócrito e variáveis imunológicas na coleta referente ao pico de parasitismo foram comparadas entre os dois grupos, pôde ser observada

diferença significativa pelo teste t (p=0,05) em todas elas, exceto para o log da IgG e IgE específica (TABELA 4).

FIGURA 4 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE HEMATÓCRITO DAS OVELHAS NA COLETA DE 30 DE MARÇO DE 1999, CORRESPONDENTE AO PICO DE PARASITISMO



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

TABELA 4 – MÉDIAS DOS VALORES DE HEMATÓCRITO E DO LOGARITMO DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES, EOSINÓFILOS CIRCULANTES, IMUNOGLOBULINAS E e G ANTI-*Haemonchus contortus* OBTIDOS NA COLETA DE 30 DE MARÇO DE 1999 PARA AS OVELHAS CLASSIFICADAS COMO SUSCEPTÍVEIS OU resilientes PELA ANÁLISE DE CLUSTER DOS VALORES DE HEMATÓCRITO DESTA MESMA DATA

VARIÁVEL	MÉDIA GRUPO A (SUSCEPTÍVEL)	MÉDIA GRUPO B (RESISTENTE)	VALOR DE T	P
hematócrito	26,000	33,363	5,354	0,0000
Log (OPG+1)	2,869	1,527	2,296	0,0339
Log (eosino)	2,439	2,678	3,185	0,0051
Log (IgE)	-0,475	-0,509	0,135	0,8944
Log (IgG)	-0,293	-0,324	0,609	0,5501

A terceira hipótese resultou em um diagrama muito semelhante ao obtido na segunda, exceto pela inclusão das ovelhas 08 e 009^{A} no grupo dos animais resilientes (ANEXO 6). No entanto, quando as médias dos novos grupos A e B são analisadas pelo teste t, observa-se que apenas o hematócrito e os eosinófilos da coleta referente ao pico de parasitismo foram estatisticamente diferentes (TABELA 5).

TABELA 5 – MÉDIAS DOS VALORES DE HEMATÓCRITO E DO LOGARITMO DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES, EOSINÓFILOS CIRCULANTES, IMUNOGLOBULINAS E e G ANTI-*Haemonchus contortus* OBTIDOS NA COLETA DE 30 DE MARÇO DE 1999 PARA AS OVELHAS CLASSIFICADAS COMO SUSCEPTÍVEIS OU RESILIENTES PELA ANÁLISE DE CLUSTER DOS VALORES DE HEMATÓCRITO DESTA MESMA DATA E DA COLETA ANTERIOR

VARIÁVEL	MÉDIA GRUPO A (SUSCEPTÍVEL)	MÉDIA GRUPO B (RESILIENTE)	VALOR DE t	P
hematócrito	25,429	32,538	4,473	0,0003
Log (OPG+1)	2,686	1,832	1,286	0,2148
Log (eosino)	2,432	2,646	2,553	0,0199
Log (IgE)	-0,578	-0,448	0,493	0,6277
Log (IgG)	-0,307	-0,312	0,086	0,9324

A análise de cluster mostrou-se como um método eficaz de agrupamento dos animais em resistentes e susceptíveis, conforme já havia sido demonstrado por SOTOMAIOR (1997), SCHMIDT (2000) e SOTOMAIOR (2002). Quando o OPG foi utilizado como marcador, 80% do lote acompanhado foi enquadrado no grupo resistente. Isto era esperado, uma vez que a população parasitária tende a apresentar uma distribuição binomial negativa entre hospedeiros, com a predominância de animais com baixa carga parasitária (BISSET *et al.,* 2001; VAN WYK e BATH, 2002; SOTOMAIOR *et al.* 2003).

O uso de mais de um marcador concomitantemente tem o objetivo de enquadrar animais dentro dos grupos resistente e susceptível com maior acurácia. Quando mais de um marcador foi utilizado para a seleção dos animais, observou-se que o grupo susceptível era o mesmo formado em todas as hipóteses analisadas, exceto no agrupamento a partir do OPG e da IgG específica. Assim, tanto o número de eosinófilos circulantes quanto a absorbância para IgE específica poderiam ser utilizados como marcadores juntamente com o OPG. Neste caso, o uso da IgE seria mais vantajoso, uma vez que o teste de enzima-imunoensaio apresenta a leitura automatizada, permite a estocagem das amostras por longos períodos e a análise de um grande número de animais ao mesmo tempo (DOUCH *et al.,* 1995).

O uso isolado de um marcador imunológico para identificação de animais resistentes somente foi possível com o eosinófilo. Isto pode ser explicado pois o número de eosinófilos sanguíneos foi a variável imunológica que teve maior correlação com o OPG (r=-0,21) e o único marcador imunológico que mostrou diferenças significativas na média do grupo resistente e susceptível. A seleção indireta baseada nos eosinófilos seria interessante, uma vez que este marcador apresentou uma repetibilidade bem maior que a do OPG (0,5207±0,1478 e 0,2277±0,1113; respectivamente). Como os valores de eosinófilos permaneceram 46% constantes entre todas as coletas realizadas, a amostragem do lote poderia ser realizada a qualquer momento do período seco das ovelhas, sem necessidade de esperar o pico de verminose. Entretanto, WOOLASTON *et al.* (1996) desaconselha a seleção indireta pelo eosinófilo pelo fato da técnica de contagem ser trabalhosa e pela característica apresentar menor herdabilidade que o OPG.

Os valores de absorbância para IgG anti-H.c. mostraram-se muito variáveis entre os animais acompanhados, sobretudo naqueles classificados como resistentes pelo OPG. Considerável variação na resposta imune dos ovinos aos helmintos gastrintestinais também foi relatada por outros autores (STEAR *et al.*, 1995; SHAW *et al.*, 1997; GÓMEZ-MUÑHOZ *et al.*,1998). A variabilidade do comportamento da IgG anti-H.c. observada neste trabalho impediu seu uso como caráter de identificação de animais resistentes à verminose, uma vez que tanto animais de alto quanto de baixo OPG apresentaram altos níveis séricos de IgG específica.

A dificuldade em identificar indivíduos resistentes indiretamente pelos níveis de IgG anti-H.c. no rebanho estudado não era esperada, tendo em vista a existência de programas de seleção de ovinos resistentes às parasitoses baseados nesta característica. Segundo DOUCH *et al.* (1995), a seleção indireta pela IgG teria 51-67% da eficiência da seleção direta pelo OPG. Contudo, a maior parte das pesquisas relacionadas à seleção indireta de animais para resistência às parasitoses são realizadas com dados de rebanhos previamente selecionados. DOUCH *et al.* (1995) encontraram maiores diferenças no nível de IgG sérica entre grupos de grande distância genética, ou seja, linhas de animais susceptíveis e resistentes selecionadas por várias gerações. É possível que quando se pretende identificar animais resistentes a partir de um rebanho comum, que não tenha sido pré-selecionado, a resposta imune seja mais variável dentro de um mesmo grupo. McEWAN *et al.* (1994 ***apud*** DOUCH *et al.,* 1996) estudaram a progênie dos cinco carneiros com os maiores níveis de IgG anti-*Trichostrongylus colubriformis* de um rebanho não selecionado e dos cinco com menores níveis. A progênie do

grupo de maior resposta imune mostrou maiores níveis de IgG específica sérica, bem como maior ganho de peso. Entretanto, não foi observada divergência entre o OPG das duas linhas. Isso pode indicar uma menor relação entre IgG e OPG em rebanhos que não tenham sido previamente selecionados para resistência.

Quando se tentou identificar os animais resilientes com base no agrupamento dos valores de hematócrito pela análise de *cluster*, foi observado que os valores referentes à coleta do pico de parasitismo forneceram um agrupamento mais acurado. Neste agrupamento, os animais resilientes também mostraram menor média de OPG e maior número de eosinófilos circulantes, o que sugere que estes animais seriam também mais resistentes às parasitoses. BISSET *et al.*(2001); VAN WYK e BATH (2002) observaram que ovinos da raça merino considerados resilientes, também tendem a ser considerados resistentes quando submetidos à infecção natural em regiões da África do Sul onde o *Haemonchus contortus* é o helminto predominante. No entanto, estudos realizados na Nova Zelândia, onde o *Trichostrongylus colubriformis* é o helminto mais prevalente, ovinos *Romney Marsh* de linhagens resistentes manifestaram maior grau de diarréia e perda de peso, sendo considerados menos resilientes. KARLSSON *et al.* (2004) observaram a importância da interação genótipo-ambiente na ocorrência de diarréia em ovinos resistentes, sendo que a correlação entre OPG e fezes aderidas à lã foi considerada baixa.

Apesar do grupo susceptível compreender alguns animais de baixo OPG, a diminuição do hematócrito concomitante a um pico de parasitismo pode pressupor a resposta do hospedeiro às larvas de *Haemonchus.* A queda dos valores hematológicos antes da infecção patente por *H. contortus* após infecção experimental foi relatada por STEAR *et al.* (1995). Como neste trabalho foi utilizada a infecção natural, é possível que alguns animais tenham adquirido maior carga parasitária alguns dias após os outros, manifestando baixo hematócrito apesar de pouco ou nenhum OPG por ocasião da coleta.

O sucesso em agrupar animais resilientes e susceptíveis a partir dos valores de hematócrito da coleta de 30 de março sobre as demais hipóteses elaboradas já era esperado, uma vez que as medidas individuais fora do desafio não se mostraram proporcionais às do pico de parasitismo pela baixa repetibilidade deste marcador. A recomendação de desafiar os animais a campo e administrar anti-helmíntico apenas aos indivíduos mais anêmicos, como forma de identificar os animais resilientes (BATH *et al*., 2001; VAN WYK e BATH, 2002; MOLENTO *et al.,* 2004) também corrobora esta afirmação.

A fim de facilitar a avaliação do grau de anemia dos ovinos a campo, foi criado o método FAMACHA©. Este baseia-se na coloração da conjuntiva ocular do ovino com uma escala de cinco cores presentes em uma cartela padrão, sendo o mais vermelho (grau 1) correspondente a um hematócrito maior ou igual a 28% e o mais pálido (grau 5), correspondente a um valor igual ou menor que 13%. Indica-se tratamento individual pra animais com grau 3 ou inferior (BATH *et al*. 2001). No presente trabalho, se os valores de hematócrito fossem convertidos em grau FAMACHA©, somente dois animais seriam classificados dentro do grau 3, com 22% de hematócrito, durante o pico de parasitismo. Destes, apenas uma ovelha havia sido considerada susceptível pelo OPG. As outras três ovelhas susceptíveis seriam enquadradas dentro dos grupos não anêmicos, não sendo recomendado o uso de anti-helmíntico. Dois destes animais tiveram 28% de hematócrito (grau 1) e uma teve 27% (grau 2). Portanto, segundo BATH *et al.* (2001) estes três animais ainda seriam capazes de suportar o desafio parasitário, não necessitando tratamento, embora tivessem, respectivamente, 8800; 10400 e 7900 OPG.

O fato de nenhuma das ovelhas acompanhadas ter atingido hematócrito inferior a 22% de hematócrito, mesmo quando a média do lote ultrapassou os 2000 OPG, pode ser um indicativo de que os rebanhos paranaenses tenham sofrido uma seleção natural para a resiliência. Não se sabe o limite que um ovino resiliente possa suportar, mas postula-se que por mais resiliente que seja, o animal que não consegue eliminar a sua carga parasitária deve sucumbir à infecção em situações de estresse ou desnutrição (AMARANTE, 2006). Portanto, o declínio nos valores de hematócrito observado em vários animais durante o pico de parasitismo pode ser indicativo desta resposta. Isso explicaria porque foi possível o agrupamento dos animais em resilientes e susceptíveis pela análise de *cluster* dos valores de hematócrito das ovelhas durante o pico de parasitismo. Provavelmente se o tratamento dos animais fosse postergado, os sinais de anemia seriam mais evidentes.

CONCLUSÕES

A identificação de ovelhas resistentes à verminose gastrintestinal pode ser realizada pelo OPG ou, indiretamente, pelo número de eosinófilos periféricos. Para aumentar a acurácia da seleção, tanto o número de eosinófilos circulantes quanto a IgE específica podem ser utilizados concomitantemente com o marcador parasitológico. O hematócrito é capaz de enquadrar as ovelhas susceptíveis no mesmo grupo identificado pelo marcador parasitológico, mas há de se considerar o risco de enquadrar ovelhas de alto OPG em categorias que não necessitam tratamento anti-helmíntico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE, A.F.T. Resistência genética a helmintos gastrointestinais.In: Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, V,2004, Pirassununga. **Anais...** Disponível em: http://www.sbmaonline.org.br/anais/v/palestras/palest14.pdf Acesso em: 31 set. 2006.

BATH, G.F.; HANSEN, J.W.; KRECEK, R.C.; VAN WYK, J.A.; VATTA, A.F. **Sustainable approaches for managing haemoncosis in sheep and goats.** FAO: Roma, 2001. 90 p.

BISSET, S.A;VLASSOFF, A; DOUCH, P.G.C.; JONAS, W.E.; WEST, C.J.; GREEN, R.S. Nematode burdens and immunological responses following natural challenge in Romney lambs selectively bred for low or high faecal worm count. **Veterinary Parasitology**, v. 61, p. 249-263. 1996

BISSET, S.A.; WYK, J.A.; BATH, G.F.; MORRIS, C.A.; STENSON, M.O., MALAN, F.S. Phenotypic and genetic relationships amongst FAMACHA score, faecal egg count and performance data in Merino sheep exposed to *Haemonchus contortus* infection in South Africa. In: International Sheep Veterinary Congress, 2001, Cape Town, South Africa. **Proceedings ...** 1 CD-ROM.

BOWMAN, Dwight D.; LYNN, Randy Carl; EBERHARD, Mark L.; ALCARAZ, Ana. **Parasitologia Veterinária de Georgis.** Tradução: Cid Figueiredo e Taís Bittencourt Figueiredo. Barueri, SP: Editora Manole, 2006. 429 p. Tradução de: Georgis' Parasitology for Veterinarians.

CABARET, J.; MAGE, C.; BOUILHOL, M. Helminth intensity and diversity in organic meat sheep farms in centre of France. **Veterinary Parasitology,**v. 105, n.1, p.33-47. 2002

CUQUERELLA, M.; GÓMEZ-MUÑHOZ, M.T.; CARRERA, L.; FUENTE, C.; ALUNDA, J.M. Cross antigenicity among ovine trichotrongyloidea. Preliminary report. **Veterinary Parasitology,** v.53, p.243-251, 1994.

DOUCH, P.G.C.; GREEN, R.S.; MORRIS, C.A.; BISSET, S.A.; VLASSOFF, A.; BAKER, R.L.; WATSON, T.G.; HURFORD, A.P.; WHEELER, M. Genetic and phenotypic relationships among anti-T*richostrongylus colubriformis* antibody level, faecal egg count and body weight traits in grazing Romney sheep. **Livestock Production Science,** v.41, p. 121-132, 1995.

DOUCH, P.G.C.; GREEN, R.S.; MORRIS, C.A.; McEWANS, J.C.; WINDON, R.G. Phenotypic markers for selection of nematode–resistant sheep. **International Journal for Parasitology,** v. 26, n.8/9, p. 899-911, 1996.

ECHEVARRIA, F. Epidemiologia de nematódeos e controle estratégico em ovinos lanados. In: PADILHA, T. **Controle dos Nematódeos Gastrintestinais em Ruminantes.** Coronel Pacheco: EMBRAPA, 1996. p. 157-168.

FAO, Salud Animal. **Resistência a los Antiparasitarios: Estado Actual Énfasis en América Latina.** Roma: FAO, 2003. 52p.

GOMES, A. **Resposta Técnica.** Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, Sistema Brasileiro de Respostas Técnicas, 2006. Disponível em: http://sbrt.ibict.br/upload/sbrt1885.pdf. Acesso: 21 jan. 2007.

GOMEZ-MUÑOZ, M.T.; CUQUERELLA, M.; FUENTE, C.; GÓMEZ-IGLESIAS, L.A.; ALUNDA, J.M. Infection-induced protection against *Haemonchus contortus* in Merino and Manchego sheep – ralationship to serum antibody response. **Journal of Veterinary Medicine - Series B,** v.45, p. 449-459, 1998.

GORDON, H.McL.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v. 12, p. 50, 1939.

GRANADOS, L.B.C.; DIAS, A.J.B.; SALES, M.P. **Aspectos gerais da reprodução de ovinos e caprinos. Capacitação dos técnicos e produtores do Norte e Noroeste Fluminense em Reprodução de Caprinos e Ovinos.** Campos de Goytacazes: PROEX/UENF, 2006. 54 p.

HOUDIJK, J.G.M.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; HUNTLEY, J.F.; COOP,R.L. Can an increased intake of metabolizable protein affect the periparturient relaxation in immunity against *Telardosagia circumcincta* in sheep. **Veterinary Parasitology,** v.91, p.43-62, 2000.

JAIN, N.C. Comparative hematology of common domestic animals. In: _____. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.19-52, 1993.

KAMBARA, T.; McFARLANE, R.G. Changes in T cell subpopulations of sheep due age and dietary protein intake; association with protective immunity to *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v. 51, p.127-135, 1996.

KARLSSON, L.J.E.; POLLOTT, G.E.; EADY, S.J.; BELL, A.; GREEFF, J.C. Relationship between faecal worm egg counts and scouring in Australian merino sheep. **Animal Production in Australia,** v. 25, p. 100-103, 2004.

LEARMOUNT, J.; TAYLOR, M.A.; SMITH, G.; MORGAN, C. A computer model to simulate control of parasitic gastroenteritis in sheep on UK farms. **Veterinary Parasitology,** v.142, p. 312-329. 2006.

LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J.R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretação.** 6 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985.

Mac FARLANE, J.C.W.; CECIL, G.W. Eosinophil counting: a modification of Pilots method. **British Medical Journal**, v. 2, p. 1187, 1951.

MOLENTO, Marcelo Beltrão; TASCA, Cláudio; GALLO, Alencar; FERREIRA, Márcio; BONONI, Ronaldo; STECCA, Evandro. Famacha guide as an individual clinic parameter for Haemonchus contortus infection in small ruminants. **Ciencia Rural**., Santa Maria, v. 34, n. 4, 2004.

MORAES, F.R.; SARNOSKI Jr; S.; SAULT, J.P.E.; OLIVEIRA; V.P.; SOCCOL, V.T.; CASTRO, E.A. Estudo epidemiológico da verminose ovina na Região de Ponta Grossa - PR. In: EVINCI - Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná, 6.,1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Editora da Universidade Federal do Paraná, 1998. p. 427.

NARI, A.; CARDOZO, H. Nematodos Gastrointestinales. In.: **Enfermidades de los lanares – Tomo I.** Montevideo : Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L., 1987. p.1-51.

O'CONNOR, L.J.; WALKDEN-BROWN, S.W.; KAHN, L.P. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. **Veterinary Parasitology,** v.142, n.1-2, p.1-15. 2006.

OLIVEIRA; V.P.; MORAES, F.R.; ZAGO, M.; POLLATI, L.; SOUZA, F.P.; THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E.A. Epidemiologia da verminose em ovinos na Região de Guarapuava - Paraná. In: EVINCI - Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná, 7.,1999, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Editora da Universidade Federal do Paraná, 1999. v.2. p. 494.

PERNTHANER, A.; STANKIEWICZ, M.; BISSET, S.A.; JONAS, W.E.; CABAJ, W.; PULFORD, H.D. The immune responsiveness of Romney sheep selected for resistance or susceptibility to gastrointestinal nematodes: lymphocyte blastogenic activity, eosinophilia and total white blood cell counts. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 523-529, 1995.

PERNTHANER, A.; SHAW, R.J.; McNEILL, M.M.; MORRISON, L.; HEIN, W.R. Total and nematode-specific IgE responses in intestinal lymph of genetically resistant and susceptible sheep during infection with *Trichostrongylus colubriformis.* **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v.104, p. 69-80. 2005.

PERNTHANER, A.; COLE, S.A.; MORRISON, L.; GREEN, R.; SHAW, R.J.; HEIN, W.R. Cytokine and antibody subclass responses in the intestinal lymph of sheep during repeated experimental infections with nematode parasite *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v.114, p. 135-148. 2006.

PFEFFER,A.; SHAW, R.J.; GREEN, R.S.; PHEGAN, M.D. The transfer of maternal IgE and other Immunoglobulins specific for *Trichostrongylus colubriformis* larval excretory/secretory product to the neonatal lamb. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v. 108, p.315-323, 2005.

RAMOS, C.I.; BELLATO, V.; SOUZA, A.P.; AVILA, V.S.; COUTINHO, G.C.; DALAGNOL, C.A. Epidemiology of sheep gastrintestinal helminthosis in "Planalto Catarinense" Region, Brazil. **Ciencia Rural**., Santa Maria, v. 34, n. 6, 2004.

RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A.P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes – Modificação do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolfo Lutz,** v. 14, p. 5-8, 1954

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal.** 1. ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SANTIAGO, M.A.M.; BEVENGA, S.F.; COSTA, U.C. Epidemiologia e controle da helmintose ovina no Município de Itaqui, Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária**, v.11, p. 1-7, 1976.

SCHALLIG, H.D.F.H.; HORNOK, S.; CORNELISSEN, J.B.W.J. Comparison of two enzyme immunoassays for the detection of *Haemonchus contortus* infections in sheep. **Veterinary Parasitology,** v.57, p. 329-338, 1995

SCHMIDT, E.M.S. **Estudo de marcadores parasitológicos e hematológicos de resistência ao parasitismo gastrintestinal em ovinos.** Curitiba, 2000. Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Abril de 2000. 102 p.

SHAW, R.J.; GRIMMETT, D.J.; DONAGHY, M.J.; GATEHOUSE, T.K.; SHIRER, C.L.; DOUCH, P.G.C. Production and characterisation of monoclonal antibodies recognising ovine IgE. **Veterinary immunology and Immunopathology,** v. 51, n. 3-4, p. 235-251, 1996.

SHAW, R.J.; McNEILL, M.M.; GATEHOUSE, T.K.; DOUCH, P.G.C. Quantification of total sheep IgE concentration using anti-ovine IgE monoclonal antibodies in an enzyme immunoassay. **Veterinary immunology and Immunopathology,** v.57, p.253-265, 1997

SHAW, R.J.; GATEHOUSE, T.K.; McNEILL, M.M. Serum IgE responses during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology,** v.28, p. 293-302, 1998

SHAW, R.J.; MORRIS, C.A.; GREEN, R.S.; WHEELER, M.; BISSET, S.A.; VLASSOFF, A.; DOUCH, P.G.C. Genetic and phenotypic relationships among *Trichostrongylus colubriformis* – specific immunoglobulin E, anti – *Trichostrongylus colubriformis* antibody, immunoglobulin G_1, faecal egg count and body weight traits in grazing Romney lambs. **Livestock Production Science,** v. 58, p.25-32, 1999

SOTOMAIOR, C. **Estudo de caracteres que possam auxiliar na identificação de ovinos resistentes e susceptíveis às helmintoses gastrintestinais.** Curitiba, 1997. Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

SOTOMAIOR, C. **Estudo de caracteres que possam auxiliar na identificação de ovinos resistentes e susceptíveis às helmintoses gastrintestinais.** In: I Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária, Curitiba, PR, 14 a 17 de maio de 2002. **Anais...** Curitiba:2002 p. 90-94.

SOTOMAIOR, C.; MILCZEWSKI, V.; SCHWARTZ, M. G.; MORAES, F. R. Evaluation of FAMACHA System: accuracy of anaemia estimation and use of the method on commercial sheep flocks. In: International Seminar in Animal Parasitology, V, 2003, Merida. **Proceedings...** 2003. p. 61-66.

SOUZA, F. **Contribuição para o estudo da resistência dos helmintos gastrintestinais de ovinos (*Ovis aires*) aos anti-helmínticos no Estado do Paraná.** Curitiba, Julho de 1997.Universidade Federal do Paraná. Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre–Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. 74 p.

STEAR, M.J.; BISHOP, S.C.; DUNCAN, J.L.; McKELLAR, Q.A.; MURRAY, M. The repeatability of faecal egg counts, peripheral eosinophil counts, and plasma pepsinogen concentrations during deliberate infections with *Ostertagia circumcincta*. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 3, p. 375-380, 1995a.

STEAR, M.J.; BISHOP, S.C.; DOLIGALSKA, M; DUNCAN, J.L.; HOLMES, P.H.; IRVINE, J.; McCRIRIE, L.; McKELLAR, Q.A.; SINSKI, E. MURRAY, M. Regulation od egg production, worm burden, worm length and worm fecundity by host immune responses in sheep infected with *Ostertagia circumcinta.* **Parasite Immunology**, v. 17, p. 643-652, 1995b.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F.P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E.A.; MILCZEWSKI, V.; PESSOA, M. C.; MOCELIN, G. Resistance of gastrointestinal nematodes of anthelmintics in sheep (*Ovies aries).* **Brazilian Archives of Biology and Technology**,v. 47, p. 41 – 47, 2004.

TIZARD, Ian R. **Imunologia Veterinária – Uma Introdução.** Tradução: Paulo Marcos Agria de Oliveira. 6.ed. São Paulo: Roca, 2002. 532 p. Tradução de: Veterinary Immunology: an Introduction.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes.** 3.ed. Tóquio: Japan International Cooperation Agency, 1994.166p.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. **Parasitologia Veterinária.** Tradução: Ana Maria Nogueira Pinto Quintanilha. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1990. 306 p. Original: Veterinary Parasitology.

VALDERRÁBANO, J.; GOMEZ-RINCÓN, C; URIARTE, J. Effect of nutricional status and fat reserves on the periparturient immune response to *Haemonchus contortus* infection in sheep. **Veterinary Parasitology,** v. 141, p. 122-131. 2006.

VAN WYK, J.A.; BATH, G. The FAMACHA© system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. **Veterinary Research,** v. 33, p. 509-529. 2002.

VANIMISETTI, H.B.; ANDREW, S.L.; ZAJAC, A.M.; NOTTER, D.R. Inheritance of fecal egg count and packed cell volume and their relationship with production traits in sheep infected with *Haemonchus contortus.* **Journal of Animal Science,** v.82, p.1602-1611. 2004.

WOOLASTON, R.R.; MANUELLI, P.; EADY, S.J.; BARGER, I.A.; LeJAMBRE, L.F.; BANKS, D.J.D.; WINDON, R.G. The value of circulating eosinophil count as selection criterion for resistance of sheep to Trichostrongyle parasites. **International Journal for Veterinary Parasitology**, v. 26, n. 1, p. 123-126, 1996.

CAPÍTULO 3

SURGIMENTO DA RESPOSTA IMUNE AOS PARASITOS GASTRINTESTINAIS EM CORDEIROS LANADOS TIPO CARNE CRIADOS A PASTO DO DESMADE A UM ANO DE IDADE

INTRODUÇÃO

A ovinocultura é uma atividade que tem aumentado sua expressão no cenário econômico do Paraná e outros estados do sul do Brasil. Atualmente, o rebanho paranaense é estimado em 511 mil cabeças de ovinos (IBGE, 2005). Este número caracteriza um aumento no efetivo do rebanho estadual a partir da década de 80, quando houve a importação de 4.050 cabeças das raças *Suffolk* e *Hampshire Down* e fez com que o Estado passasse a ter o melhor plantel de ovinos tipo carne do país (SOUZA, 1997; BITTENCOURT, 2005). Nos anos 90, o Governo do Estado fomentou a introdução de 184 mil ovelhas para rebanho geral, provenientes do Rio Grande do Sul e Uruguai (PARANÀ, 1994, ***apud*** BITTENCOURT, 2005). Além das raças "cara-negras", reprodutores *Texel* e *Ile de France* também foram incorporados ao rebanho paranaense. Após um período de declínio da atividade, foi criado em 2003 o Programa de Apoio à Estruturação das Cadeias Produtivas de Ovinos e Caprinos (PAECPOC), com o objetivo de organizar o mercado e incentivar o associativismo em todo o Paraná (SEAB, 2006). Os reflexos na expansão e organização da ovinocaprinocultura foram evidentes, culminando com a criação de diversas cooperativas no interior do Estado.

O Paraná está situado entre os paralelos de 22º31' e 26º42', implicando na ocorrência do clima tropical ao norte e na predominância do clima subtropical úmido e suas variações no restante do estado (IAPAR, 1994). O sistema de criação de ovinos predominante é o intensivo, com ovelhas adultas criadas em altas lotações de pastagens (SOUZA, 1997) e terminação de cordeiros a pasto ou em confinamento (MACEDO *et al.,* 2000). As características climáticas e de produção tornam a verminose gastrintestinal uma das principais causas de perdas produtivas (THOMAZ-

SOCCOL *et al.*, 2004). Normalmente as infecções são mistas, com o *Haemonchus contortus* sendo o principal e mais patogênico parasito envolvido e o *Trichostrongylus colubriformis* assumindo um papel coadjuvante, sobretudo nos meses de inverno (MORAES *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 1999).

Os principais prejuízos impostos pela parasitose são observados em cordeiros e em ovelhas durante o periparto e lactação (NARI e CARDOZO, 1987; MORAES *et al.*, 1998). A alta susceptibilidade da primeira categoria se deve ao fato de que os animais jovens não terem desenvolvido uma resposta imune protetora aos helmintos gastrintestinais (NARI e CARDOZO, 1987; MORAES *et al.*, 1998). O surgimento desta resposta ocorre em três fases: uma fase susceptível inicial, seguida do desenvolvimento da imunidade adquirida e, finalmente, a fase na qual os mecanismos efetores são totalmente expressos e os animais são capazes de controlar sua carga parasitária (PETTIT *et al.*, 2005). Diversos fatores podem interferir neste processo, tais como: idade dos cordeiros, raça, nível nutricional, intensidade e freqüência do desafio parasitário (McCLURE e EMMERY, 1994; KAMBARA e McFARLANE, 1996) além das espécies de helminto envolvidas (ISRAF *et al.* 1997, WINTER *et al.,* 1997).

Conhecer os fatores decorrentes da interação entre o hospedeiro e os parasitos gastrintestinais, sobretudo aqueles que regulam o surgimento dos mecanismos protetores em animais jovens, é de suma importância para buscar alternativas de minimizar os prejuízos causados pela verminose. Este trabalho tem como objetivo estudar o surgimento dos mecanismos efetores da resposta imune contra os parasitos gastrintestinais em cordeiros tipo carne criados a pasto do desmame a um ano de idade, em sistema de produção intensivo no sul do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

O experimento foi conduzido na Região Metropolitana de Curitiba, localizada a uma longitude de 49°14' Oeste e latitude 25° 25'. Esta localidade apresenta o clima Cfb, segundo a classificação de Koeppen (IAPAR, 1994), sendo que a estação mais quente e chuvosa ocorre de dezembro a março. Foram acompanhados 25 cordeiros de vários graus de sangue *suffolk*, no período entre 06 de outubro de 1998 e 01 de junho de 1999. Os animais nasceram nos meses de junho e julho e foram desmamados em 06 de outubro de 1998, quando iniciou o período experimental. Todos os animais permaneceram a pasto durante todo o experimento, estando sujeitos à infecção natural por nematódeos. Durante a noite, eram recolhidos para um aprisco, onde recebiam suplementação de concentrado. Água e sal mineral eram oferecidos *ad libitum.*

Coleta de fezes e sangue

Antes do desmame, algumas amostras de fezes foram coletadas aleatoriamente em intervalos de 15 dias para monitorar as condições de parasitismo. A partir desta data, amostras de fezes e de sangue total foram coletadas quinzenalmente até o mês de fevereiro, e mensalmente, de março a junho de 1999. As amostras de soro foram coletadas nos mesmos períodos, porém sempre em intervalos mensais.

As fezes foram coletadas com sacos plásticos, diretamente do reto de cada animal. Depois de identificadas, as amostras foram acondicionadas em isopor com gelo e levadas ao laboratório, onde foram processados os exames parasitológicos. O sangue foi coletado da veia jugular externa, em dois tubos *vacuntainer* (Vacuette® Greiner – Labortechnik), um com capacidade para 8 mL e outro com 4 mL, que continha EDTA como anticoagulante. As amostras foram identificadas, acondicionadas inclinadas em caixas de transporte e levadas ao laboratório. Posteriormente, cada amostra obtida sem anticoagulante foi centrifugada para obtenção do soro. O soro de cada animal foi aliquotado em tubos *eppendorff*

identificados e mantidos a –20 ºC até a realização do teste de ensaio-imunoenzimático. As amostras obtidas com EDTA foram identificadas e levadas ao laboratório para a contagem de eosinófilos e determinação do hematócrito.

Métodos parasitológicos

Para estimativa do OPG (número de ovos de helmintos por grama de fezes), foi utilizada a técnica de GORDON e WHITLOCK (1939), sensível para 100 OPG. Para identificar os gêneros de parasitos prevalentes em cada pico de parasitismo, foi realizada a coprocultura. Para isto, um *pool* de amostras obtido a cada coleta foi homogeneizado, umedecido e acrescido de cepilho. Cada *pool* foi incubado a 18-25 ºC por 15 dias. As larvas foram recuperadas do cultivo pelo método de RUGAI *et al.* (1954) e identificadas com a chave proposta por UENO e GONÇALVES (1994).

Contagem de eosinófilos

A contagem dos eosinófilos foi feita pelo método direto (LIMA *et al.*, 1985). Este método consiste na utilização de líquidos de diluição-coloração. Sua composição é baseada nas propriedades específicas de coloração das granulações eosinofílicas e na maior resistência dos eosinófilos à lise, em relação aos demais glóbulos sanguíneos.

O diluente utilizado foi o de Pilot Modificado (MacFARLANE e CECIL, 1951), que cora somente os eosinófilos (por meio da eosina), lisa ou reduz a fragmentos os eritrócitos (por meio do propilenoglicol) e os leucócitos (por meio do carbonato de cálcio). A câmara de contagem utilizada foi a de Fucks-Rosenthal, por comportar maior volume (3,2 mm^3). Após a diluição de 20 µl de cada amostra de sangue em 380 µl de diluente a mistura foi homogeneizada e utilizada para preenchimento da câmara. A leitura foi feita em microscópio óptico, no aumento de 400 vezes. As duas áreas reticuladas da câmara foram contadas. O número de eosinófilos por mm^3 de sangue foi obtido pela multiplicação da média de eosinófilos contados nos dois retículos pelo fator de correção (6,25).

Determinação do nível de anticorpos da classe IgG anti-Haemonchus contortus

Para determinação dos níveis de IgG específica, foi utilizado o ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. As placas de poliestireno foram sensibilizadas *overnight* a 5ºC com 100 ml de solução de antígeno H.c. (5µg/ml de tampão carbonato-bicarbonato, pH 9.6), lavadas, e bloqueadas com 150 µL por poço de uma solução de 2% de caseína bovina, por uma hora, a 37ºC. As amostras de soro foram acrescentadas em duplicatas, diluídas 1:80 em tampão de incubação (caseína 2,5 mg/ml; tween20 0,5µl/mL) e incubadas por uma hora a 37ºC. Seis lavagens foram procedidas para remover as proteínas do soro. Cem microlitros de conjugado anti-IgG ovina (SIGMA A3415), diluídos 1/1000 em tampão de incubação, foram adicionados a cada poço e incubado a 37ºC por uma hora. Após novas seis lavagens, foram acrescentados 50 µl de substrato OPD - Ortofenilenodiamino (SIGMA P6787) (2 mg em 10,5 ml de tampão fosfato). Dois microlitros de peróxido de hidrogênio foram utilizados para catalisar a reação. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 15 minutos e a reação foi parada com a adição de 50 µl de ácido sulfúrico a 5% por poço. A leitura foi realizada em leitor de placas com filtro de 492 nm.

Determinação do nível de anticorpos da classe IgE anti-Haemonchus contortus

Para determinação do nível de IgE específica, foi adaptada a técnica descrita por SHAW *et al.* (1998). Antes da realização do ensaio, os soros-teste foram submetidos à precipitação por sulfato de amônio saturado (SAS), a fim de eliminar as moléculas de IgG presentes na amostra. Inicialmente, foi preparada uma solução de SAS em salina, no dobro da concentração final (36%). Esta foi adicionada no mesmo volume da amostra a ser submetida à precipitação. A mistura foi homogeneizada e as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi colhido e armazenado a 5 ºC em novos tubos. Cada amostra resultante da precipitação em SAS foi diluída 1:4 em solução fisiológica com 0,1% Tween 20.

As placas de poliestireno foram sensibilizadas e bloqueadas conforme descrito para o ensaio para detecção de IgG específica. A seguir, 100 µl de cada amostra de soro (precipitada em SAS e diluída 1:4) foram adicionadas em duplicata, e incubadas *overnight* em temperatura ambiente. Após seis lavagens, os anticorpos monoclonais (mAbs) anti-IgE ovina YD3 e XB6, produzidos a partir de células de camundongos imunizados (SHAW *et al.,* 1996), foram adicionados na concentração de 2,5 $\mu g.ml^{-1}$ e incubados por duas horas em temperatura ambiente. Novas seis lavagens foram procedidas para remoção dos mAbs que não se aderiram ao substrato. O conjugado peroxidase-anti-IgG (cadeia γ) murina (SIGMA A3673), diluído 1/1000 em tampão de incubação, foi adicionado a cada poço e incubado a 37ºC por uma hora.

Mais seis lavagens foram realizadas para remover o conjugado que não se ligou. O substrato utilizado para revelar a presença da enzima peroxidase foi o TMB (tetrametilbenzidino – SIGMA T8768). A placa foi incubada em temperatura ambiente por 15 minutos e a reação foi parada com a adição de 50 µl de ácido sulfúrico a 5% por poço. A leitura foi realizada em leitor de placas com filtro de 450 nm.

Determinação do nível total de anticorpos da classe IgE

Além da determinação da IgE específica anti-*Haemonchus*, também foram medidos os níveis séricos totais de IgE unidades.ml^{-1}(SHAW *et al.,* 1997). Cada unidade representa 0,86 $\mu g.ml^{-1}$ de IgE purificada.

A primeira etapa desta técnica consistiu em sensibilizar a placa de poliestireno com os anticorpos de captura. Para isto, foram colocados 50 µl por poço de uma solução de 2 $\mu g.ml^{-1}$ do mAb anti-IgE ovina YD3 (SHAW *et al.,* 1996) em PBS 7,4. A placa foi incubada por duas horas em temperatura ambiente. Para remoção dos mAbs que não se fixaram à placa, foram realizadas seis lavagens. A seguir foi realizado o bloqueio da placa e incubação por uma hora em temperatura ambiente.

Além das amostras para teste, foram adicionados a cada placa um soro padrão, de 100 unidades de IgE ml^{-1}, em diluições seriais de 1/125; 1/250; 1/500;1/1000 e 1/2000 a fim de se obter uma curva padrão. Todas as amostras foram diluídas

inicialmente a 1/50 para triagem. Quando os valores de absorbância obtidos para esta diluição excediam os limites lineares da curva padrão, a amostra era re-testada em nova diluição, até que se enquadrasse nos limites da curva.

Cada amostra de soro (teste ou padrão) foi adicionada na quantidade de 50 µl por poço e incubada em temperatura ambiente por duas horas, depois a 4 ºC *overnight*. As proteínas que não se ligaram à placa foram removidas por seis lavagens.

A próxima etapa consistiu na adição do anticorpo de detecção. Para tanto, foram adicionados 50 µl de uma solução de 1,2 µg do mAb XB6 biotinilado (SHAW *et al.,* 1996) ml^{-1}. A placa foi incubada em temperatura ambiente por duas horas e, a seguir, foi lavada seis vezes.

O conjugado utilizado foi estreptadivina-peroxidase (PIERCE 21126). Após acrescentar a cada poço 50 µl do conjugado diluído 1/2000, a placa foi incubada em temperatura ambiente por uma hora e meia e lavada seis vezes. A adição do substrato e a parada da reação foi como descrito para o ELISA para IgE específica, exceto que foi deixado o substrato agir por 30 minutos antes da parada da reação.

Com base nos resultados de absorbância obtidos para cada diluição do padrão, foi obtida uma curva para cálculo da concentração de IgE total nas amostras-teste. Se o soro padrão apresenta 100 unidades de IgE ml^{-1}, as diluições de 1/125; 1/250; 1/500; 1/1000 e 1/2000 representam 0,8; 0,4; 0,2; 0,1 e 0,05 unidades ml^{-1}, respectivamente. A curva utilizada foi do tipo Log-Log, obtida por meio da tabulação do Log da absorbância contra o Log de unidades de IgE ml^{-1} correspondentes à cada diluição. Esta é uma curva linear, ou seja, apresenta um formato $y = a + bx$, e é específica para controlar as variações inerentes a cada placa. A substituição de y pela média da absorbância das duplicatas da amostra-teste permitiu o cálculo do Log da quantidade de IgE na diluição utilizada (x). Para se ter acesso às unidades de IgE ml^{-1} de soro elevou-se 10 à potência do x obtido e multiplicou-se pela diluição utilizada.

Determinação do hematócrito

Como o *Haemonchus contortus* é um parasito altamente hematófago, foi determinado o valor do hematócrito dos animais a cada coleta, a fim de ter uma medida de resistência do animal ao efeito da parasitose (resiliência). A técnica utilizada foi a do microhematócrito (JAIN, 1993).

Controle parasitário

Os animais também foram desverminados por ocasião do desmame (dia 06 de outubro) com 200 μg kg^{-1} de Moxidectin (Cydectin® Cyanamid Química do Brasil Ltda.). Esta dosificação teve como objetivo deixar os animais em condições semelhantes de parasitose para o acompanhamento, apesar de estarem com baixo OPG. Durante o acompanhamento, foram procedidas novas dosificações anti-helmínticas sempre que a média de OPG ultrapassasse 1500. A cada tratamento, a eficácia do medicamento foi controlada pelo cálculo do percentual de redução do OPG (SOUZA, 1997).

Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa MSTAT-C, versão 2.10. Para diminuir o coeficiente de variação das variáveis estudadas, foi empregada a transformação logarítmica dos dados. Para isto, os dados de OPG foram transformados no logaritmo decimal do valor mais uma unidade (log (OPG+1)); o número de eosinófilos no sangue periférico (EOSINO), IgE e IgG específicas, no logaritmo decimal do valor (log(EOSINO); log(IgE); log(IgG)). Os dados de hematócrito (HT) não necessitaram a transformação logarítmica pois as variâncias se mostraram homogêneas no teste de Bartlett.

Para o estudo do comportamento de cada variável no rebanho, os dados foram submetidos à Análise de Variância, considerando um delineamento inteiramente

casualizado, onde os animais representavam as repetições e as diferentes coletas os tratamentos. As médias de cada coleta foram comparadas pelo teste de Duncan, $p<0,05$. Este teste de médias foi escolhido por ser ideal para variáveis com coeficiente de variação elevado (SAMPAIO, 1998).

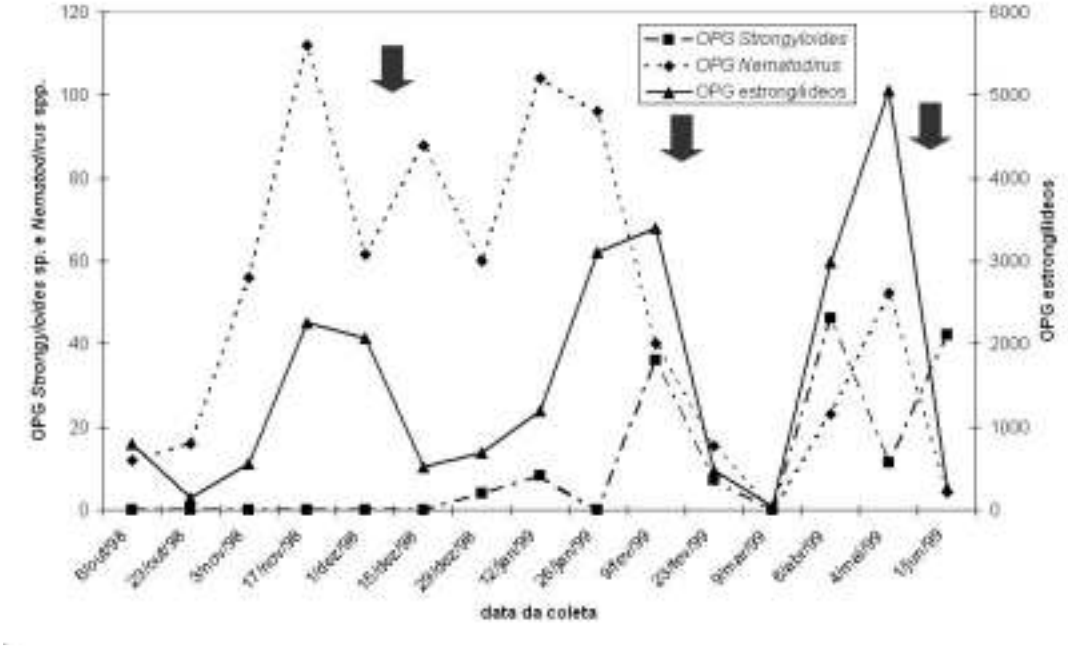
Para as análises de correlações entre os marcadores estudados, optou-se pelo teste não paramétrico de Spearman, aplicado sobre os dados não transformados. Foram consideradas significativas as correlações cujo p foi menor que 0,10.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação parasitológica

Nos exames coprológicos, foi observada a presença de ovos de helmintos da Ordem Strongylida (ovos estrongiliformes e de *Nematodirus*), de *Strongyloides papillosus*, de *Moniezia* e de oocistos de *Eimeria*. Destes, apenas os ovos de nematódeos foram quantificados, sendo que os ovos de estrongilídeos foram predominantes durante todo o acompanhamento (FIGURA 1). A eliminação de ovos de *Nematodirus* permaneceu em níveis baixos até o final de outubro, quando houve um súbito aumento e se manteve alta até o final de janeiro, caindo após o tratamento anti-helmíntico dos animais. O OPG de *Strongyloides papillosus* se manteve residual durante o período de estudo, com pequenos picos precedendo os períodos de alta eliminação de ovos de estrongilídeos (exceto em novembro). Pôde ser observada uma maior eliminação de ovos deste parasito no final de verão e outono.

FIGURA1 – MÉDIA DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG), POR TIPO DE OVO, NOS CORDEIROS ACOMPANHADOS DE JULHO DE 1998 A JUNHO DE 1999, EM CURITIBA, PARANÁ, BRASIL



NOTA: as setas indicam as dosificações anti-helmínticas realizadas durante o período de estudo parasitológico

Ao avaliar a média de OPG de estrongilídeos, foram observados três picos de parasitismo após o desmame dos cordeiros: em 01 de dezembro (2.152,00 ± 3.575,27 OPG); 09 de fevereiro (3462,50 ± 2051,26) e 04 de maio (4648,00 ± 6260,13). Quando os valores de OPG sofreram a transformação logarítmica, as médias destas três coletas foram consideradas significativamente mais altas que as demais pelo teste de Duncan, $p<0,05$. Por este motivo, optou-se por realizar tratamento anti-helmíntico de todos os animais nestas datas, certificando-se de que o princípio ativo escolhido tenha reduzido o OPG (TABELA 1).

TABELA 1 – DATAS DOS TRATAMENTOS ANTI-HELMÍNTICOS NECESSÁRIOS, PRINCÍPIOS ATIVOS UTILIZADOS E PERCENTUAL DE REDUÇÃO DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DOS CORDEIROS, DURANTE O PERÍODO DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO DE 1999, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL

DATA	PRINCÍPIO ATIVO	DOSE (mg. kg^{-1})	MÉDIA DE OPG		PERCENTUAL DE REDUÇÃO DE OPG (R%)
			Pré-tratamento	Pós-tratamento	
08/12	Closantel[2];	10	2130,8	604,0	71,65%
	Oxfendazole[3]	5			
09/02	Moxidectin[1]	0,02	3468,0	188,0	94,0%
11/05	Closantel[2];	10	4633,3	313,0	93,24 %
	Levamisol[4]	7,5			

[1] Cydectin ® Cyanamid Química do Brasil Ltda.; [2]Closantel ®Fatec S.A.; [3]Systamex Suspensão ® Mallinckrodt Veterinária; [4]Ripercol L ® Cyanamid Química do Brasil Ltda.

A predominância de ovos de Strongylida nos exames coproparasitológicos deve-se ao fato destes serem os principais parasitos gastrointestinais de ruminantes (NARI e CARDOZO, 1987; BOWMANN *et al.,* 2006; O'CONNOR *et al,.* 2006; LEARMOUNT *et al.,* 2006). Após o tratamento anti-helmíntico efetuado no desmame, os valores médios de OPG permaneceram baixos até o início de novembro. Neste mês, novo pico de parasitismo ocorreu, paralelamente ao aumento da temperatura ambiente, que gerou um melhor desenvolvimento das larvas na pastagem, aumentando a carga parasitária ingerida por animal (NARI e CARDOZO, 1987; RAMOS *et al.* 2004; O'CONNOR *et al.* 2006). Os valores de OPG caíram após o tratamento, mas voltaram a aumentar gradativamente até a ocorrência de dois novos picos de parasitismo: em fevereiro e março. Estes picos também podem ser atribuídos às condições climáticas e que favorecem o desenvolvimento dos estádios infectantes nas pastagens.

As coproculturas indicaram predominância dos gêneros *Trichostrongylus* e *Haemonchus* (TABELA 2). Os gêneros *Oesophagostomum*, *Cooperia*, *Nematodirus* e *Teladorsagia* também foram observados. *Oesophagostomum* foi encontrado em grande quantidade apenas no mês de junho, representado 87,3% das larvas recuperadas no período. As larvas de *Nematodirus* foram assinaladas no período de dezembro a fevereiro, o que coincidiu com o pico de eliminação de ovos deste parasito. Também

foram encontradas larvas de *Strongyloides papillosus* nos meses de janeiro, março, abril e maio, porém estas não foram quantificadas.

TABELA 2 - PERCENTUAL DE GÊNEROS DE HELMINTOS IDENTIFICADOS NAS COPROCULTURAS REALIZADAS NOS MESES DE NOVEMBRO DE 1998 JUNHO DE 1999, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL

L

GÊNERO/MÊS	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN
Haemonchus sp.	31,0%	53,1%	27,5%	34,0%	87,0%	75,2%	40,0%	1,4%
Trichostrongylus sp.	65,5%	34,4%	71,5%	53,1%	3,0%	13,7%	40,0%	8,5%
Oesophagostomum sp.	-	-	-	-	-	-	-	87,3%
Cooperia sp.	-	-	0,5%	-	-	6,8%	20,0%	2,8%
Teladorsagia sp.	-	-	-	0,9%	10,0%	4,3%	-	-
Nematodirus sp.	3,5%	12,5%	0,5%	12,0%	-	-	-	-

A presença dos gêneros *Trichostrongylus*, *Haemonchus*, *Nematodirus*, *Teladorsagia*, *Cooperia* e *Strongyloides* nas proporções encontradas são semelhantes às encontradas por MORAES *et al.* (1998) na Região de Ponta Grossa-PR. A predominância dos gêneros *Haemonchus* e *Trichostrongylus* no sul do Brasil e Uruguai também foi relatada por outros autores (NARI e CARDOZO, 1987; OLIVEIRA *et al,* 1999; RAMOS *et al.* 2004). A ocorrência de *H. contortus* durante o período mais quente e úmido do ano deve-se ao fato que este é o parasito mais importante em regiões tropicais e subtropicais com característica de verões chuvosos (NARI e CARDOZO, 1987; RAMOS *et al.* 2004; LEARMOUNT *et al.,* 2006). A maior proporção deste gênero, detectada nos meses de março e abril, pode ser um reflexo do aumento da pluviosidade nos meses de janeiro e fevereiro, gerando melhor condição de desenvolvimento para os estádios de vida livre que habitam o bolo fecal e a pastagem. *Haemonchus* é mais sensível à dessecação e ao frio que os gêneros *Trichostrongylus* e *Teladorsagia* (LEARMOUNT *et al.,* 2006; O'CONNOR *et al.,* 2006). Além destes motivos, a baixa proporção de larvas de *Haemonchus* recuperada nos meses de janeiro e junho pode estar relacionada ao tratamento com Closantel no mês anterior.

O alto percentual de *Trichostrongylus* encontrado nas primeiras coproculturas, com diminuição gradual no final do verão e aumento no outono, está de acordo com a afirmação de O'CONNOR *et al.*(2006) de que este gênero também pode ocorrer em regiões com condições para o desenvolvimento do *H. contortus,* mas estendendo sua ocorrência para o período de inverno e primavera.

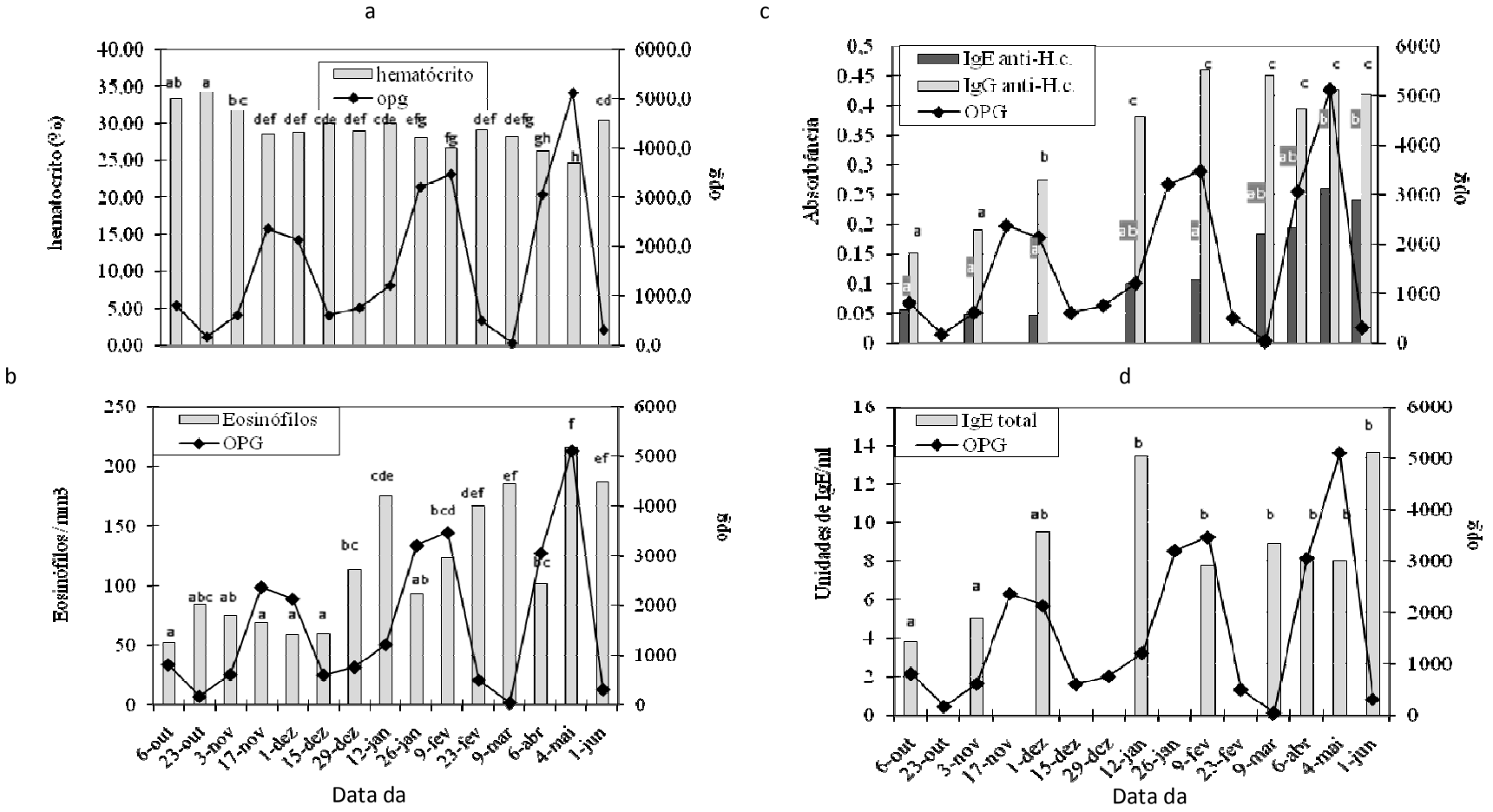
Avaliação hematológica

Os valores de hematócrito se mantiveram pouco alterados até o primeiro aumento da eliminação de OPG, quando foi registrada uma diminuição significativa na média dos valores desta variável (FIGURA 2). Após o tratamento anti-helmíntico, ocorreu discreta recuperação e nova queda simultaneamente ao aumento da eliminação de ovos de helmintos nas fezes dos cordeiros. Esta situação se repetiu após novo tratamento.

Avaliação imunológica

Do desmame até o próximo tratamento anti-helmíntico (coleta 5), a contagem média de eosinófilos se manteve praticamente constante, oscilando entre 52,62 e 85,87 eosinófilos por mm^3 (FIGURA 2b). A partir da sexta coleta (15 de dezembro), a contagem aumentou abruptamente, chegando a 180,37±241,06 eosinófilos/mm^3 28 dias após. Depois, foi observada uma rápida queda, seguida de mais dois picos na contagem de eosinófilos: um no dia 09 de março (coleta 12), com média de 186,87±137,06 eosinófilos/mm^3, e outro no dia 04 de maio (coleta 14), com média de 224,37 ± 181,55 eosinófilos/mm^3. Em geral, alta contagem de eosinófilos ocorreu em períodos de baixo OPG. Quando houve aumento na contagem de OPG, o número de eosinófilos periféricos caiu rapidamente, mas apresentou recuperação na coleta subsequente. O próprio pico ocorrido na 14.ª coleta é exemplo desta recuperação.

FIGURA 2 – MÉDIA DE OVOS DE HELMINTO POR GRAMA DE FEZES (OPG-LINHAS), HEMATÓCRITO (a), EOSINÓFILOS SANGÜÍNEOS(b), NÍVEIS DE IgE E IgG ANTI-*Haemonchus contortus* (c) E IgE TOTAL (d), EM CORDEIROS DO DESMAME A UM ANO DE IDADE, DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO DE 1999, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL



NOTA: as letras indicam o resultado para comparação das médias pelo teste de Duncan ($p<0,05$)

A média de absorbância para pesquisa de IgG específica mostrou um aumento progressivo até a coleta do dia 12/01/99 (coleta 8), quando atingiu um valor de 0,388 ± 0,118 (FIGURA 2c). A partir de então, as médias permaneceram constantes até o fim do acompanhamento do rebanho. A média de absorbância para pesquisa de IgE específica anti-*H.c.* mostrou um aumento progressivo até a estabilização. Contudo, este aumento foi mais lento que o observado para IgG. As três primeiras coletas apresentaram uma média mais baixa de nível de anticorpos, as coletas de 8 a 13, valor intermediário, e as coletas de 14 e 15, valores mais elevados.

A média da IgE total dos cordeiros durante o período acompanhado mostrou uma curva ascendente, de 06/10 a 01/12/98 (coletas 1 a 5) (FIGURA 2d). A partir de então, a média desta variável passou a apresentar valores constantes. O aumento observado durante as primeiras coletas foi mais rápido que o obtido para as outras imunoglobulinas, resultando na estabilização da média de IgE total a partir do segundo pico de eliminação de OPG (coletas 4 e 5).

A avaliação hematológica demonstrou haver decréscimo dos valores de hematócrito dos cordeiros à medida em que havia aumento do OPG, sendo que a correlação entre estas variáveis foi negativa (r=-0,53; p=0,000), com valor intermediário entre o observado por VAN WYK e BATH (2002) e MOLENTO *et al.* (2004). Quando foi considerada a correlação a cada coleta, os valores de r obtidos foram mais elevados durante o segundo (r=-0,82; p=0,000) e o quarto pico de parasitismo (r=–0,62; p=0,001). A relação inversamente proporcional entre hematócrito e OPG também foi relatada por SOTOMAIOR (2002) e SCHMIDT *et al.* (2001), isso ocorre sempre que *Haemonchus contortus* for o parasito predominante (BATH *et al.,* 2001). Portanto, a inexistência de correlação significativa entre o OPG e o hematócrito dos animais no terceiro pico de parasitismo deve-se à predominância do gênero *Trichostrongylus* comprovada pelas coproculturas deste período.

A avaliação imunológica revelou baixos valores de eosinófilos no início do experimento. Apesar disto, a correlação entre estes e o OPG do primeiro pico de parasitismo ($r_{OPG4,\ EOSINO1}$= -0,42; p=0,0441) pode indicar algum papel destas células na

regulação da verminose, ainda que a resposta imune não esteja completa. A correlação $r_{IgG1,\ EOSINO5} = 0,49$ (p=0,0154) ajuda a corroborar a hipótese de que já nesta fase seja possível uma resposta imune Th2, ainda que incipiente.

O primeiro pico na média de eosinófilos, que aconteceu nas coletas 7 e 8 (29/12/98 e 12/01/99, respectivamente), pode indicar o início de uma resposta imune protetora. Os dados para número de eosinófilos neste período foram positivamente correlacionados aos de IgG nas coletas 8 e 10, e negativamente correlacionados ao pico de OPG subseqüente. Outro indício desta hipótese estar correta é a correlação dos valores de eosinófilos com OPG de coletas prévias até a coleta 7. Isso indica que foi necessária a presença de helmintos adultos no trato gastrintestinal para que ocorresse uma resposta eosinofílica. Após a coleta 7 os valores de eosinófilos tenderam a ser correlacionados com OPG de coletas posteriores. Isso indica que, em um segundo momento, o número de eosinófilos circulantes foi capaz de regular o estabelecimento da carga parasitária.

O pico de OPG observado na 9.ª coleta foi acompanhado de uma queda no número de eosinófilos periféricos. É possível que os eosinófilos tenham migrado dos vasos para a mucosa gastrintestinal nesta fase do acompanhamento, a fim de agir sobre os helmintos presentes no trato digestório. A correlação negativa entre o OPG desta coleta e os eosinófilos da coleta anterior ($r_{EOSINO8;\ OPG9} = -0,35$; p =0,0877) corrobora esta hipótese.

Na coleta 10 (09/02/99), o número de eosinófilos periféricos volta a aumentar. Nas coletas 11 e 12, um novo pico de eosinófilos é evidente, mas os valores voltam a cair quando o OPG aumenta na 13.ª coleta. A manutenção das médias altas de OPG por um mês proporcionou novo aumento na média de eosinófilos. Este comportamento da média de eosinófilos em relação à média de OPG do lote também foi observado para os animais adultos (Capítulo 02), o que é indicativo de um padrão de resposta imune definido. Em um primeiro momento, é possível que a IL-5 produzida em resposta à infecção parasitária seja responsável pela quimiotaxia dos eosinófilos para a mucosa gastrintestinal, levando à diminuição do

pool circulante desta célula. Como a IL-5 também estimula a síntese de eosinófilos na medula óssea (ABBAS, 2000; TIZARD, 2002), é compreensível a eosinofilia no segundo tempo de uma infecção. PERNTHANER *et al.* (2006) relataram um aumento significativo na expressão desta interleucina em células linfáticas intestinais após a infecção de ovinos com larvas de *T. colubriformis*, sobretudo em animais resistentes.

De uma forma geral, foram encontrados baixos níveis de todas as três imunoglobulinas estudadas no início do experimento. PFEFER *et al.* (2005) observaram a queda dos níveis de anticorpos colostrais das classes IgG1 e, principalmente, IgE anti-*T. colubriformis,* em cordeiros após um mês de vida. No presente trabalho, a primeira coleta de soro foi realizada no mês de outubro, quando os cordeiros tinham pouco mais de dois meses de idade. Portanto, embora baixos, os níveis de anticorpos encontrados no soro podem ser indícios do início de uma resposta imune ativa, induzida por uma infecção primária pré-desmame.

A média de IgG específica mostrou um aumento progressivo até a coleta do dia 12/01/99 (coleta 8), permanecendo constante a partir de então. A análise de correlações mostrou uma tendência dos níveis de IgG das primeiras coletas a serem correlacionados ao OPG das coletas subsequentes. Isso pode mostrar um esboço de resposta imune, capaz de manter o OPG baixo pelo período de um mês. É possível que esta resposta, mesmo incipiente, tenha sido capaz de retardar o pico de parasitismo das coletas 4 e 5 nos animais mais velhos. Isso explicaria o fato dos valores de OPG serem mais elevados nos cordeiros mais jovens, que tiveram menor oportunidade de se infectar com L_3 de helmintos durante o aleitamento.

A IgG da oitava coleta, a partir da qual a média da variável tende a se estabilizar, mostrou uma correlação de –0,66 ($p = 0,0003$) com o OPG da coleta 9. A IgG sérica de todas as coletas subsequentes também foi correlacionada ao OPG deste pico de parasitismo. A estabilização da média de absorbância para IgG específica bem como suas correlações com o OPG a partir da oitava coleta são indicativos da definição do padrão de resposta imune à verminose. Ainda, a correlação positiva com

o hematócrito durante o quarto pico de parasitismo pode ser indicativa do papel deste isotipo de anticorpo nas respostas dos animais resilientes às parasitoses.

A média de IgE específica anti-*H.c*. mostrou um aumento progressivo, porém mais lento que o da IgG. As primeiras coletas apresentaram um nível mais baixo de anticorpos, as coletas de 8 a 13, valor intermediário, e as de 14 e 15, valores elevados. A IgE das duas primeiras coletas tendeu a ser correlacionada positivamente com o OPG. Essas correlações indicam associação com valores de OPG altos ou em ascensão, e não com coletas após tratamento com anti-helmínticos. É possível que as três primeiras medidas de IgE específica não sejam indicativas de uma resposta imune efetiva. Caso o fosse, seria esperada uma correlação negativa entre essas variáveis. A partir da quinta coleta (01/12/98), a IgE específica passou a ter índices de correlação com o OPG dentro do esperado, variando de –0,63 a –0,39 quando as correlações foram significativas.

A média da IgE total dos cordeiros durante o período acompanhado mostrou uma curva ascendente, de 06/10 a 01/12/98 (coletas 1 a 5). A partir de então, passou a apresentar valores constantes. O aumento observado durante as primeiras coletas foi mais rápido que o obtido para as outras imunoglobulinas, resultando na estabilização da média de IgE total a partir do segundo pico de eliminação de OPG (coletas 4 e 5).

Os valores de IgE total da quinta coleta (01/12/98), primeira coleta após estabilização das médias desta variável, foram correlacionados aos valores de OPG de coletas anteriores. Isso pode ser indicativo da necessidade de estímulo parasitário prévio, estimado pelo OPG das coletas anteriores, para sensibilização do sistema imune e formação de células B de memória. A IgE total da coleta 5 também foi correlacionada negativamente ao OPG da mesma coleta e dos picos subsequentes. Esses resultados indicam uma definição no padrão de resposta de IgE total dos cordeiros ao estímulo parasitário a partir da quinta coleta. PETTIT *et al.* (2005) também detectaram um aumento no número de células sanguíneas ligadas à IgE em cordeiros sujeitos à infecção natural, entre o quinto e o sexto mês de vida, enquanto

esses passavam pelo segundo pico de parasitismo. Esta resposta foi mais evidente em animais com baixo OPG. Portanto, a resposta de IgE total contra os parasitos tende a se estabelecer em cordeiros a partir desta faixa etária.

SHAW *et al.* (1998) observaram picos equivalentes de IgE total após dois desafios subsequentes em cordeiros previamente infectados com *T. colubriformis.* Quando a IgE específica foi mensurada, verificou-se um aumento progressivo dos níveis séricos em cada desafio. Dados semelhantes foram assinalados por KOOYMANN *et al.* (1997) comparando a infecção primária e um desafio com larvas de *H. contortus* por cinco semanas. É possível que os níveis séricos de IgE total tendam a se estabelecer antes que os de IgE específica no decorrer do desenvolvimento da resposta imune. O surgimento de uma resposta de IgE total mesmo após infecções primárias pode ser decorrente do reconhecimento a vários antígenos, nem sempre relacionados à imunidade protetora. KOOYMANN *et al.* (1997) sugerem que o surgimento precoce de altos níveis de IgE total possa ser resultante de um mecanismo de evasão do parasito à resposta imune do hospedeiro.

O estudo comparativo das médias das variáveis imunológicas dos cordeiros mostrou que baixos níveis sanguíneos de cada uma eram detectados inicialmente. Com o passar do tempo, se estabeleceu um comportamento semelhante ao observado nas ovelhas (Capítulo 02). Para os eosinófilos, este comportamento seria a elevação do número de células por mL de sangue com queda no início dos picos de parasitismo. Isto foi observado a partir da sétima e oitava coleta. Para os anticorpos, o comportamento esperado seria a manutenção de níveis séricos praticamente constantes. Isto ocorreu a partir da quinta coleta para IgE total e da oitava coleta para IgG.

Além das diferenças assinaladas na análise das médias do lote, houve um grande número de correlações entre todos os marcadores na sétima e oitava coletas. As correlações entre caracteres imunológicos tenderam a ser positivas a maior parte do acompanhamento, o que indica sua inter-relação por meio da resposta imune Th2.

Estas evidências indicam que o padrão de resposta imune dos cordeiros à verminose se definiu em algum momento entre a sétima e a oitava coleta, quando os animais estavam com média de idade de 193,85±16,5. Segundo NARI e CARDOZO (1987) e McCLURE e EMMERY (1994), o surgimento da resposta imune dos cordeiros contra os helmintos gastrintestinais ocorreria por volta dos seis meses de idade. Além disso, os animais já haviam passado por uma infecção primária (pré-desmame) e uma secundária (pico de parasitismo da primavera), o que possibilitaria a formação de células de memória imunológica. Outra evidência do surgimento da resposta imune dos cordeiros nesta fase do acompanhamento é a redução brusca na eliminação de ovos de *Nematodirus* entre as coletas 9 e 10, antes do tratamento com anti-helmíntico realizado no dia 02 de fevereiro.

Contudo, há alguns eventos que indicam que a resposta imune detectada nos cordeiros por volta da oitava coleta não seja completa. O primeiro deles foi a correlação positiva entre o OPG do segundo pico de parasitismo (coleta 10) e a idade. Partindo-se do pressuposto de uma resposta imune completa a partir dos seis meses e meio de idade, não seria mais esperada uma relação entre idade e OPG. O segundo evento é o fato da IgE específica, o caráter imunológico cujas correlações com o marcador parasitológico foram mais significativas, não apresentar estabilização nos valores séricos até o final do experimento. As correlações entre IgE específica e idade continuaram positivas até o final do acompanhamento, indicando que a resposta imune ainda não era completa. Mesmo o surgimento da resposta imune protetora contra *Nematodirus,* observado a partir da décima coleta, é esperado antes do surgimento da resposta contra os demais helmintos gastrintestinais, conforme descrito por WINTER *et al.*(1997) e ISRAF *et* al., (1997). O quarto e último evento é que a média dos valores individuais para todas as variáveis imunológicas estudadas foi inferior à média dos animais adultos, apesar de um padrão de resposta semelhante entre as categorias ter sido observado após os cordeiros completarem seis meses e meio de idade.

KAMBARA e McFARLANE (1996) observaram um decréscimo no número de linfócitos $CD4^+$ e um aumento no número de células $T19^+$ no sangue periférico e linfa do ducto linfático intestinal de cordeiros de dois a seis meses e meio de idade, ao longo de 12 semanas de desafio com larvas de *T. colubriformis*. Para animais mais velhos, foi observado um aumento de células $CD8^+$, $CD5^+$ e, principalmente, $CD4^+$. Os autores indicam que linfócitos $T19^+$ devam apresentar um papel importante na resposta imune à verminose em cordeiros jovens, da mesma forma que as células $CD4^+$ para animais mais velhos.

Segundo PETTIT *et al.* (2005), o surgimento da resposta imune contra os helmintos gastrintestinais apresenta três fases: uma fase inicial, susceptível; uma fase intermediária, onde inicia a imunidade adquirida e os animais mais responsivos conseguem controlar a infecção em algum grau. A fase final, na qual os animais conseguem controlar sua carga parasitária, só ocorreria nos animais resistentes. Os mesmos autores afirmam que a imunidade adquirida se manifesta mais precocemente em cordeiros resistentes. Sendo assim, é bem possível que os cordeiros já tenham capacidade de regular parcialmente a carga parasitária por meio de sua resposta imune a partir dos seis meses e meio de idade, mas que repetidos desafios sejam necessários para desenvolver um nível de imunidade protetora. Mesmo a maior parte dos animais adultos não é capaz de elaborar uma boa resposta imune contra *H. contortus* (SANTIAGO *et al.*, 1976 ***apud*** ECHEVARRIA, 1996) e dependem de infecções constantes para manutenção da resposta efetiva (SUTHERLAND *et al.,*1999).

CONCLUSÕES

Os cordeiros tipo carne, criados a pasto do desmame a um ano de idade, em sistema de produção intensivo no sul do Brasil, sugerem uma estabilização nos valores das variáveis imunológicas por volta dos seis meses e meio de idade, indicando a definição de um padrão de resposta imune aos helmintos gastrintestinais. De um modo geral o nível de todas as variáveis imunológicas mensuradas ainda é muito baixo no desmame. A primeira variável a mostrar aumento significativo foi a IgE total, seguida do número de eosinófilos periféricos, IgG específica e, por último, a IgE específica.

Todas as variáveis imunológicas foram correlacionadas positivamente entre si. O número de eosinófilos circulantes, IgE total e específica foram correlacionados negativamente com o OPG. A IgG específica foi o única variável imunológica a ser correlacionada positivamente com o OPG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular.** 3.ed. Tradução: Raimundo Gesteira e Lourdes Isaac. Rio de Janeiro: Editora Revinter Ltda., 2000.486 p. Tradução de: Cellular and Molecular Immunology.

BATH, G.F.; HANSEN, J.W.; KRECEK, R.C.; VAN WYK, J.A.; VATTA, A.F. **Sustainable approaches for managing haemoncosis in sheep and goats.** FAO: Roma, 2001. 90 p.

BITTENCOURT, C.B.A. **Viroses dos Pequenos Ruminantes do Estado do Paraná.** Curitiba, 2005. Monografia apresentada como requisito exigência para a obtenção do título de Especialista em Defesa Sanitária Animal – Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Tuiuti do Paraná.

BOWMAN, Dwight D.; LYNN, Randy Carl; EBERHARD, Mark L.; ALCARAZ, Ana. **Parasitologia Veterinária de Georgis.** Tradução: Cid Figueiredo e Taís Bittencourt Figueiredo. Barueri, SP: Editora Manole, 2006. 429 p. Tradução de: Georgis' Parasitology for Veterinarians.

ECHEVARRIA, F. Epidemiologia de nematódeos e controle estratégico em ovinos lanados. In: PADILHA, T. **Controle dos Nematódeos Gastrintestinais em Ruminantes.** Coronel Pacheco: EMBRAPA, 1996. p. 157-168.

GORDON, H.McL.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v. 12, p. 50, 1939.

IAPAR (Instituto Agronômico do Paraná), Cartas Climáticas do Estado do Paraná, 1994, 49p.

IBGE. **Efetivo de rebanhos.** 2005. Disponível em: http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp Acesso em :20 abr. 2007

ISRAF, D.A.; JACKSON, F.; STEVENSON,L.M.; JONES,D.G; JACKSON, E.; HUNTLEY, J.F.; COOP, R.L. Resistence of immunity to *Nematodirus battus* infections in lambs. **Veterinary Parasitology,** v. 71, n. 1, p. 39-52, 1997.

JAIN, N.C. Comparative hematology of common domestic animals. In: _____. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.19-52, 1993.

KAMBARA, T.; McFARLANE, R.G. Changes in T cell subpopulations of sheep due age and dietary protein intake; association with protective immunity to *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v. 51, p.127-135, 1996.

KOOYMAN, F.N.J.; VAN KOOTEN, P.J.S.; HUNTLEY, J.F.; MacKELLAR, A.; CORNELISSEN, A.W.C.A; SCHALLIG, H.D.F.H. Production of a monoclonal antibody specific for ovine immunoglobulin E and its application to monitor serum IgE responses to *Haemonchus contortus* infection. **Parasitology,** v.114, p. 395-406, 1997

LEARMOUNT, J.; TAYLOR, M.A.; SMITH, G.; MORGAN, C. A computer model to simulate control of parasitic gastroenteritis in sheep on UK farms. **Veterinary Parasitology,** v.142, p. 312-329. 2006.

LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J.R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretação.** 6 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985.

Mac FARLANE, J.C.W.; CECIL, G.W. Eosinophil counting: a modification of Pilots method. **British Medical Journal**, v. 2, p. 1187, 1951.

McCLURE, S.J.; EMERY, D.L. Cell Mediated Responses Against Gastrointestinal Nematodes Parasites of Ruminants. In: GODDEERIS, B.M.L.; MORRISON, W.I. **Cell-mediated immunity in ruminants.** Boca Raton: CRC Press Inc., 1994 p. 213-228.

MACEDO, F.A.F. de; SIQUEIRA, E.R.; MARTINS, E. N. Análise econômica da produção de carne de cordeiros sob dois sistemas de terminação: pastagem e confinamento. **Ciência Rural**, v. 30, n. 4, 2000.

MOLENTO, Marcelo Beltrão; TASCA, Cláudio; GALLO, Alencar; FERREIRA, Márcio; BONONI, Ronaldo; STECCA, Evandro. Famacha guide as an individual clinic parameter for Haemonchus contortus infection in small ruminants. **Ciencia Rural**., Santa Maria, v. 34, n. 4, 2004.

MORAES, F.R.; SARNOSKI Jr; S.; SAULT, J.P.E.; OLIVEIRA; V.P.; SOCCOL, V.T.; CASTRO, E.A. Estudo epidemiológico da verminose ovina na Região de Ponta Grossa - PR. In: EVINCI - Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná, 6.,1998.

NARI, A.; CARDOZO, H. Nematodos Gastrointestinales. In.: **Enfermidades de los lanares – Tomo I.** Montevideo : Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L., 1987. p.1-51.

O'CONNOR, L.J.; WALKDEN-BROWN, S.W.; KAHN, L.P. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. **Veterinary Parasitology,** v.142, n.1-2, p.1-15. 2006.

OLIVEIRA; V.P.; MORAES, F.R.; ZAGO, M.; POLLATI, L.; SOUZA, F.P.; THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E.A. Epidemiologia da verminose em ovinos na Região de Guarapuava - Paraná. In: EVINCI - Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná, 7.,1999, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Editora da Universidade Federal do Paraná, 1999. v.2. p. 494.

PERNTHANER, A.; COLE, S.A.; MORRISON, L.; GREEN, R.; SHAW, R.J.; HEIN, W.R. Cytokine and antibody subclass responses in the intestinal lymph of sheep during repeated experimental infections with nematode parasite *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v.114, p. 135-148. 2006.

PETTIT, J.J.; JACKSON, F.; ROCCHI, M.; HUNTLEY, J.F. The relationship between responsiveness against gastrointestinal nematodes in lambs and the numbers of circulating IgE-bearing cells. **Veterinary Parasitology,** v. 134, p.131-139. 2005.

PFEFFER,A.; SHAW, R.J.; GREEN, R.S.; PHEGAN, M.D. The transfer of maternal IgE and other Immunoglobulins specific for *Trichostrongylus colubriformis* larval excretory/secretory product to the neonatal lamb. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v. 108, p.315-323, 2005.

RAMOS, César Itaqui; BELLATO, Valdomiro; SOUZA, Antônio Pereira; AVILA, Volney Silveira de; COUTINHO, Guilherme Caldeira; DALAGNOL, Celso Agostinho. Epidemiology of sheep gastrintestinal helminthosis in "Planalto Catarinense" Region, Brazil. **Ciencia Rural**., Santa Maria, v. 34, n. 6, 2004.

ROCHA, R.A.; AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A. Resistance of Santa Ines and Ile de France suckling lambs to gastrointestinal nematode infections. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,** v.14, n.1; p. 17-20, 2005.

RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A.P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes – Modificação do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolfo Lutz,** v. 14, p. 5-8, 1954

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal.** 1. ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SANTIAGO, M.A.M.; BEVENGA, S.F.; COSTA, U.C. Epidemiologia e controle da helmintose ovina no Município de Itaqui, Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária**, v.11, p. 1-7, 1976.

SCHMIDT, E.M.S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MORAES, F.R. Pesquisa de marcadores parasitológicos e hematológicos de resistência ao parasitismo gastrintestinal em cordeiros. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia UNIPAR**, v. 4, n. 1, p. 55-64, 2001.

SEAB. **Programa de Apoio à estruturação das cadeias produtivas de ovinos e caprinos.** 2006. Disponível em: www.ovinocaprino.pr.gov.br. Acesso em: 19 abr. 2007.

SHAW, R.J.; GRIMMETT, D.J.; DONAGHY, M.J.; GATEHOUSE, T.K.; SHIRER, C.L.; DOUCH, P.G.C. Production and characterisation of monoclonal antibodies recognising ovine IgE. **Veterinary immunology and Immunopathology,** v. 51, n. 3-4, p. 235-251, 1996.

SHAW, R.J.; McNEILL, M.M.; GATEHOUSE, T.K.; DOUCH, P.G.C. Quantification of total sheep IgE concentration using anti-ovine IgE monoclonal antibodies in an enzyme immunoassay. **Veterinary immunology and Immunopathology,** v.57, p.253-265, 1997

SHAW, R.J.; GATEHOUSE, T.K.; McNEILL, M.M. Serum IgE responses during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology,** v.28, p. 293-302, 1998

SOTOMAIOR, C. **Estudo de caracteres que possam auxiliar na identificação de ovinos resistentes e susceptíveis às helmintoses gastrintestinais.** In: I Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária, Curitiba, PR, 14 a 17 de maio de 2002. **Anais...** Curitiba:2002 p. 90-94.

SOUZA, F. **Contribuição para o estudo da resistência dos helmintos gastrintestinais de ovinos (*Ovis aires*) aos anti-helmínticos no Estado do Paraná.** Curitiba, Julho de 1997.Universidade Federal do Paraná. Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre–Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. 74 p.

SUTHERLAND, I.A.; LEATHWICK, D.M.; GREEN, R.; BROWN, A.E.; MILLER, C.M. The effect of continuous drug exposure on the immune response to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. **Veterinary Parasitology,** v. 80, p.261-271, 1999.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F.P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E.A.; MILCZEWSKI, V.; PESSOA, M. C.; MOCELIN, G. Resistance of gastrointestinal nematodes of anthelmintics in sheep (*Ovies aries).* **Brazilian Archives of Biology and Technology.** v. 47, p. 41 – 47, 2004.

TIZARD, Ian R. **Imunologia Veterinária – Uma Introdução.** Tradução: Paulo Marcos Agria de Oliveira. 6.ed. São Paulo: Roca, 2002. 532 p. Tradução de: Veterinary Immunology: an Introduction.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes.** 3.ed. Tóquio: Japan International Cooperation Agency, 1994.166p.

VAN WYK, J.A.; BATH, G. The FAMACHA© system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. **Veterinary Research,** v. 33, p. 509-529. 2002.

WINTER, M.D.; WRIGHT, C.; LEE, D.L. The mast cell and eosinophil response of young lambs to a primary infection with *Nematodirus battus*. **Parasitology,** v. 14, n.2, p.189-193, 1997.

CAPÍTULO 4

USO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS NA SELEÇÃO E NO ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE E DE CORDEIROS RESISTENTES E RESILIENTES ÀS PARASITOSES

INTRODUÇÃO

A produção de cordeiros é essencial para a indústria da carne ovina, pois o abate destes animais resulta no produto de maior valor no mercado. A maciez e textura da carne tendem a variar em função da idade, aumentando até os 5 meses e diminuindo dos 7 aos 9 meses (GULARTE *et al.,* 2000). Por outro lado, os cordeiros são a categoria mais susceptível à verminose gastrintestinal nos primeiros meses de vida (NARI e CARDOZO, 1987; MORAES *et al.*, 1998), o que torna a enfermidade uma das principais causas de perdas produtivas em rebanhos ovinos (CABARET *et al.,* 2002; FAO, 2003; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2004).

A alta susceptibilidade dos cordeiros se deve ao fato de que os animais jovens não terem desenvolvido uma resposta imune protetora aos helmintos gastrintestinais (NARI e CARDOZO, 1987; MORAES *et al.*, 1998). O surgimento desta resposta ocorre em três fases: uma fase susceptível inicial, seguida do desenvolvimento da imunidade adquirida e, finalmente, a fase na qual os mecanismos efetores são totalmente expressos e os animais são capazes de controlar sua carga parasitária. Animais responsivos (resistentes) são capazes de atingir a terceira fase mais precocemente e de controlar parcialmente a carga parasitária durante a fase intermediária (PETTIT *et al.*, 2005).

Como a resposta imune está influenciada geneticamente (GILL, 1991; DOUCH *et al.,*1996), uma das formas de minimizar os prejuízos da verminose gastrintestinal e retardar o processo de resistência aos anti-helmínticos é a identificação de animais que sejam resistentes aos helmintos gastrintestinais (FAO, 2003; AMARANTE, 2006). Alternativamente, pode-se optar por selecionar animais que sejam mais resistentes aos efeitos da infecção parasitária (animais resilientes) (BATH *et al,* 2001; SOTOMAIOR *et al.,* 2003). A seleção dos animais de reposição é o principal ponto a ser levado em

consideração em programas de melhoramento genético, sobretudo quando se trata de borregos. Como os machos consistem em apenas cerca de 3% dos animais do rebanho (GRANADOS *et al.,* 2006), é possível trabalhar com um diferencial de seleção mais elevado na escolha dos futuros reprodutores (PEREIRA, 2005).

A seleção de cordeiros para reposição dos reprodutores do plantel deve ser realizada o mais precocemente possível, antes da idade de abate. Portanto, é necessário conhecer o mecanismo de desenvolvimento da resposta imune de cordeiros mestiços tipo carne contra os helmintos gastrintestinais, quando estes são criados a pasto, sob desafio parasitário constante, a fim de determinar a partir de que idade esta seleção seria possível. Este trabalho tem como objetivos estudar uma metodologia eficaz e precoce de selecionar animais resistentes às parasitoses pelo uso de um marcador parasitológico (direto) ou marcadores imunológicos (indiretos), bem como de comparar estes métodos com a seleção de animais resilientes pelo hematócrito.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Para este estudo, foram utilizados dados oriundos de 25 cordeiros pertencentes ao Quartel General do Exército da Quinta Região Militar, Curitiba, no período entre 06 de outubro de 1998 e 01 de junho de 1999 (CAPÍTULO 3). Todos os cordeiros eram filhos de machos *suffolk* com fêmeas mestiças de vários graus de sangue, e nasceram entre 22 de maio e 08 de agosto. O desmame de todos os cordeiros foi realizado conjuntamente, em 06 de outubro de 1998, quando iniciou o período experimental. Todos os animais permaneceram a pasto durante todo o experimento, estando sujeitos à infecção natural por nematódeos. Durante a noite, eram recolhidos para um aprisco, onde recebiam suplementação de concentrado. Água e sal mineral eram oferecidos *ad libitum.*

A partir do desmame, amostras de fezes e de sangue total foram coletadas quinzenalmente até o mês de fevereiro, e mensalmente, de março a junho de 1999. As amostras de soro foram coletadas nos mesmos períodos, porém sempre em intervalos mensais. No total, foram realizadas 15 coletas de dados.

Marcadores de seleção

O marcador parasitológico utilizado foi o número de ovos de helmintos por grama de fezes (OPG), obtido conforme o método de GORDON E WHITLOCK (1939), sensível para 100 OPG. Os marcadores imunológicos foram o número de eosinófilos circulantes, determinados conforme (LIMA *et al.*, 1985); absorbâncias para IgG anti-*Haemonchus contortus* (CAPÍTULO 1), unidades de IgE total (SHAW *et al.* 1997) e IgE anti-*Haemonchus contortus*, adaptando a técnica descrita por SHAW *et al.*(1998). Todos os procedimentos foram descritos em detalhes no Capítulo 3.

Uma vez que o gênero *Haemonchus* foi predominante nas coproculturas, a mensuração do grau de anemia pelo hematócrito foi utilizada como indicativo de resiliência. Pela maior facilidade e necessidade de menor volume de sangue, optou-se pela técnica do microhematócrito (JAIN, 1993).

Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Statistica, versão 5.0, exceto o teste de Bartlett para determinação da homogeneidade das variâncias, realizado no MSTAT-C, versão 2.10.

Para diminuir o coeficiente de variação das variáveis estudadas, foi empregada a transformação logarítmica dos dados. Os dados de OPG foram transformados no logaritmo decimal do valor mais uma unidade (log (OPG+1)); o número de eosinófilos no sangue periférico (EOSINO), IgE e IgG específicas, no logaritmo decimal do valor (log(EOSINO); log(IgE); log(IgG)). Os dados de hematócrito (HT) não necessitaram a transformação logarítmica pois as variâncias se mostraram homogêneas no teste de Bartlett.

O OPG foi considerado marcador parasitológico; as variáveis eosinófilos, IgE e IgG foram consideradas marcadores imunológicos e o HT foi considerado marcador de resiliência.

Para a seleção dos animais, diferentes combinações entre as variáveis foram submetidas à análise de *cluster*. Este é um método capaz de agrupar unidades (animais) com base nos valores de várias medidas simultaneamente (marcadores). Os resultados são expressos em um diagrama em árvore ou dendrograma, com uma escala para que seja possível observar os níveis de agrupamento. A escala adotada foi a distância euclidiana, que corresponde à distância geométrica entre as unidades no espaço multidimensional. Os *clusters* formados foram ligados com bases nos vizinhos distantes (*Complete linkage*), no qual a distância entre dois *clusters* é determinada pelos objetos mais extremos de cada um. Como as variáveis utilizadas para o agrupamento apresentavam diferentes unidades, os dados brutos (sem transformação logarítmica) foram estandarizados antes de submetidos à análise.

Uma vez obtidos os grupos resistente e susceptível pela análise de *cluster,* as médias de cada grupo para as variáveis analisadas (log(OPG+1); log(EOSINO); log(IgE), log(IgG) e HT foram comparadas pelo teste t de Student para amostras não pareadas.

RESULTADOS

Acompanhamento parasitológico e imunológico

Estes resultados foram descritos previamente (CAPÍTULO 3). Em resumo, os cordeiros manifestaram três picos de parasitismo durante o período acompanhado: em novembro (coletas 4 e 5), fevereiro (coleta 10) e maio (coleta 14). Após tratamento anti-helmíntico, a média do OPG caiu rapidamente, mas mostrou aumento progressivo até a data do próximo tratamento. Durante o primeiro e o terceiro pico de parasitismo, o *Haemonchus* foi o principal gênero identificado nas coproculturas, com 53,1% e 40% das larvas recuperadas, respectivamente. No segundo pico, *Trichostrongylus* foi o principal gênero de estrongilídeo envolvido, com 53,1% das larvas recuperadas, e *Haemonchus* representou 34,0% dos helmintos. Além destas três ocasiões, os cordeiros foram tratados com 200µg kg^{-1} de Moxidectin na data do desmame, quando iniciou o trabalho, a fim de deixar todos os animais em condições semelhantes de parasitismo.

De um modo geral, o nível de todas as variáveis imunológicas mensuradas foi muito baixo no desmame, aumentando progressivamente até por volta dos seis meses e meio de idade. A primeira variável a mostrar aumento significativo foi a IgE total (coleta 5), seguida do número de eosinófilos periféricos (coletas 7 e 8) e IgG específica (coleta 8). A média de IgE anti-*H.c.* demorou mais tempo para se estabilizar do que as demais variáveis imunológicas. Nas primeiras coletas foi observado nível mais baixo de IgE específica, as coletas de 8 a 13, valor intermediário, e as de 14 e 15, valores elevados. Todas as variáveis imunológicas foram correlacionadas positivamente entre si. O número de eosinófilos circulantes, IgE total e específica foram correlacionados negativamente com o OPG. A IgG específica foi o única variável imunológica a ser correlacionada positivamente com o OPG.

Classificação dos cordeiros em resistentes e susceptíveis ao parasitismo com base no marcador parasitológico (ovos de helmintos por grama de fezes)

Para classificação dos cordeiros em resistentes e susceptíveis foram elaboradas três hipóteses de agrupamento:

1- dados de OPG da quinta coleta, relativa ao segundo pico de parasitismo (primeiro pico pós-desmame), quando os cordeiros apresentavam média de cinco meses de idade;
2- dados de OPG da décima coleta, relativa ao terceiro pico de parasitismo, quando os cordeiros apresentavam média de sete meses e meio de idade;
3- dados de OPG da 14.ª coleta, relativa ao quarto pico de parasitismo, quando os cordeiros apresentavam média de idade de dez meses.

O diagrama construído com os dados da primeira hipótese mostrou a formação de dois grupos de animais ao nível da distância euclidiana de 4,33 (ANEXO 7). O grupo A foi subdividido em dois sub-grupos: A1, que compreendeu seis animais com OPG elevado, correspondendo ao grupo susceptível, e A2, com 13 animais de baixo OPG, correspondendo ao grupo resistente (TABELA1). O grupo B reuniu seis animais com OPG muito elevado (altamente susceptível).

A segunda hipótese também foi capaz de diferenciar dois grupos de animais, separando-os ao nível 5,31 de distância euclidiana (ANEXO 7). O grupo resistente reuniu 15 e o susceptível 10 cordeiros (TABELA 1). Para a terceira hipótese, foram nove animais de alto OPG incluídos no grupo susceptível e 14 no resistente. Os animais 01 e 19 foram excluídos pela análise por apresentarem valores muito elevados de OPG: 27.900 e 16.900, respectivamente. Estes animais podem ser considerados altamente susceptíveis, por sua elevada contagem de OPG , diferenciando-os dos outros animais do mesmo rebanho.

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS CORDEIROS EM RESISTENTES (R) OU SUSCEPTÍVEIS (S) DE ACORDO COM A ANÁLISE DE CLUSTER DO OPG DO SEGUNDO (HIPÓTESE 1), TERCEIRO (HIPÓTESE 2) OU QUARTO PICO DE VERMINOSE (HIPÓTESE 3)

CORDEIRO	HIPÓTESE 1	HIPÓTESE 2	HIPÓTESE 3
01	**S**	**S**	**S**
03	**R**	**R**	**R**
04	S	R	R
05	R	S	R
06	R	R	S
10	**R**	**R**	**R**
11	S	R	R
12	**R**	**R**	**R**
13	R	S	S
14	**R**	**R**	**R**
15	S	R	R
16	R	S	S
17	**R**	**R**	**R**
18	S	R	S
19	R	S	S
21	R	S	R
22	**R**	**R**	**R**
24	**S**	**S**	**S**
25	**S**	**S**	**S**
28	**S**	**S**	**S**
34	S	S	R
36	**R**	**R**	**R**
37	S	R	S
38	S	R	S
39	S	R	R

NOTA: as células destacadas indicam os cordeiros que foram selecionados nos mesmos grupos em todas as três hipóteses

O teste t realizado entre os grupos resistente e susceptível nas três hipóteses estudadas revelou diferenças significativas para $p<0,001$ no OPG da coleta sobre a qual foi realizado cada agrupamento (TABELA 2). Entre os grupos formados pela hipótese 1, somente foram detectadas diferenças no OPG de coletas anteriores ao pico de parasitismo utilizado para o agrupamento, bem como uma diferença de baixa significância para o início do terceiro pico (coleta 9). Para os grupos formados pelas hipóteses 2 e 3, foram detectadas diferenças no OPG da coleta 6 (imediatamente após o segundo pico de parasitismo), do terceiro e do quarto pico de verminose.

TABELA 2 – DIFERENÇA ENTRE OS ANIMAIS CLASSIFICADOS COMO RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS COM BASE NO OPG DO SEGUNDO (HIPÓTESE 1), TERCEIRO (HIPÓTESE 2) OU QUARTO PICO DE VERMINOSE (HIPÓTESE 3) PARA AS VARIÁVEIS OPG, NÚMERO DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IGE TOTAL, IGE E IGG ESPECÍFICAS, DE ACORDO COM O TESTE T DE STUDENT

VARIÁVEL	COLETA	H1	H2	H3
OPG	1 (06/10/98)	**	NS	NS
	2 (23/10/98)	NS	*	NS
	3 (03/11/98)	***	NS	NS
	4 (17/11/98) ♣	**	NS	NS
	5 (01/12/98) ♣	***	NS	NS
	6 (15/12/98)	NS	**	*
	7 (29/12/98)	NS	NS	NS
	8 (12/01/99)	NS	NS	NS
	9 (26/01/99) ♣	+	NS	NS
	10 (09/02/99) ♣	NS	***	+
	11 (23/02/99)	NS	*	NS
	12 (09/03/99)	NS	NS	*
	13 (06/04/99) ♣	NS	NS	*
	14 (04/05/99) ♣	NS	+	***
	15 (01/06/99)	NS	NS	NS
HEMATÓ-CRITO	1 (06/10/98)	NS	NS	NS
	2 (23/10/98)	NS	NS	NS
	3 (03/11/98)	+	+	NS
	4 (17/11/98) ♣	*	NS	NS
	5 (01/12/98) ♣	**	NS	NS
	6 (15/12/98)	NS	NS	NS
	7 (29/12/98)	NS	+	NS
	8 (12/01/99)	NS	NS	NS
	9 (26/01/99) ♣	NS	NS	NS
	10 (09/02/99) ♣	NS	NS	NS
	11 (23/02/99)	NS	NS	NS
	12 (09/03/99)	NS	*	NS
	13 (06/04/99) ♣	NS	NS	*
	14 (04/05/99) ♣	NS	**	**
	15 (01/06/99)	NS	NS	NS
EOSINÓ-FILOS	1 (06/10/98)	NS	NS	NS
	2 (23/10/98)	NS	NS	NS
	3 (03/11/98)	NS	+	NS
	4 (17/11/98) ♣	NS	NS	NS
	5 (01/12/98) ♣	NS	*	NS
	6 (15/12/98)	NS	NS	NS
	7 (29/12/98)	NS	NS	NS
EOSINÓ-FILOS (cont.)	8 (12/01/99)	NS	NS	NS
	9 (26/01/99) ♣	+	NS	NS
	10 (09/02/99) ♣	NS	+	NS
	11 (23/02/99)	NS	NS	NS
	12 (09/03/99)	NS	NS	NS
	13 (06/04/99) ♣	NS	NS	*
	14 (04/05/99) ♣	NS	NS	NS
	15 (01/06/99)	NS	NS	+
IGE TOTAL	1 (06/10/98)	NS	NS	NS
	3 (03/11/98)	NS	NS	*
	5 (01/12/98) ♣	**	NS	NS
	8 (12/01/99)	NS	NS	NS
	10 (09/02/99) ♣	+	NS	NS
	12 (09/03/99)	+	NS	NS
	13 (06/04/99) ♣	***	NS	NS
	14 (04/05/99) ♣	*	+	NS
	15 (01/06/99)	*	NS	NS
IGE ESPE-CÍFICA	1 (06/10/98)	NS	NS	NS
	3 (03/11/98)	+	NS	NS
	5 (01/12/98) ♣	***	NS	+
	8 (12/01/99)	**	NS	NS
	10 (09/02/99) ♣	NS	NS	NS
	12 (09/03/99)	*	NS	NS
	13 (06/04/99) ♣	***	NS	NS
	14 (04/05/99) ♣	**	NS	NS
	15 (01/06/99)	*	NS	*
IGG ESPE-ÍFICA	1 (06/10/98)	NS	NS	+
	3 (03/11/98)	NS	NS	NS
	5 (01/12/98) ♣	*	NS	NS
	8 (12/01/99)	NS	+	NS
	10 (09/02/99) ♣	NS	NS	NS
	12 (09/03/99)	NS	NS	NS
	13 (06/04/99) ♣	NS	NS	NS
	14 (04/05/99) ♣	NS	+	NS
	15 (01/06/99)	NS	+	NS

♣ pico de eliminação de OPG; NS – não significativo; +p<0,10; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Foi observada diferença significativa entre a média do hematócrito dos grupos resistente e susceptível formados pelas hipóteses 1 e 3 nas coletas referentes ao dado em que foi realizado o agrupamento. Os cordeiros selecionados como resistentes pela hipótese 2 não mostraram diferença significativa no hematócrito nas coletas 09 e 10, correspondente ao pico em que foram selecionados, mas sim durante o pico de parasitismo subseqüente. Estes também demonstraram maior hematócrito durante as coletas de 03 de novembro e 29 de dezembro, quando o desafio parasitário não era tão intenso.

Para o número de eosinófilos sanguíneos, foi detectada diferença significativa entre cordeiros resistentes e susceptíveis pela hipótese 1 somente para dados da nona coleta, coincidente com o início do terceiro pico de verminose. Os grupos formados pela hipótese 2 mostraram diferença no número de eosinófilos para a terceira coleta, bem como para a quinta (coincidente com o segundo pico de parasitismo) e décima coleta, sobre a qual foi realizado o agrupamento. Para a hipótese 3, os grupos formados mostraram diferença para o número de eosinófilos das coletas 13 e 15, as imediatamente anterior e posterior àquela que foi utilizada para o agrupamento.

Para a IgE total e específica, os grupos formados pela primeira hipótese mostraram diferença significativa para os valores de quase todas as coletas (TABELA 2). Para a segunda hipótese, apenas o valor de IgE total da 14.ª coleta, coincidente com o quarto pico de parasitismo, diferiu estatisticamente. A terceira hipótese mostrou diferenças para IgE total nas coletas 5 (coincidente com o segundo pico de parasitismo) e 15 (posterior ao quarto pico), bem como para a IgE específica da coleta 3.

Os valores de IgG foram diferentes entre os grupos formados para a primeira hipótese apenas na coleta 5, sobre a qual se realizou o agrupamento pelo OPG (TABELA 2). Para a hipótese 2, foram detectadas diferenças nos dados das coletas 8, 14 e 15. Para a hipótese 3, apenas os dados de IgG da primeira coleta foram estatisticamente diferentes.

Ao comparar quais cordeiros foram classificados em cada grupo para as diferentes hipóteses, pode ser observado que nem sempre os mesmos indivíduos foram enquadrados nos mesmos grupos (TABELA 1). Apenas onze animais foram classificados sempre nos mesmos grupos: os cordeiros de brincos 01, 24, 25 e 28 como susceptíveis, e os de brincos 03, 10, 12, 14, 17, 22 e 36 como resistentes.

Quando foi avaliada a diferença entre os sete animais que foram considerados resistentes e os quatro considerados susceptíveis nas três hipóteses elaboradas, foi observado que as médias de OPG dos dois grupos foram estatisticamente diferentes durante os três picos de parasitismo e nas coletas 2, 6 e 7 (TABELA 3). Ao considerar o hematócrito, este apenas diferiu entre os grupos durante o segundo e quarto pico de parasitismo, bem como nas coletas 1 e 3. Para os eosinófilos circulantes, só foram detectadas diferenças nas médias dos grupos para a décima coleta. Para a IgG, as diferenças foram assinaladas na oitava e na décima quinta coleta. As médias de IgE total foram diferentes entre os grupos em todas as coletas, exceto as de 12 de janeiro e de 09 de fevereiro de 1999. Todas as médias de IgE específica após a quinta coleta foram consideradas significativas para $p<0,10$.

TABELA 3 – DIFERENÇA ENTRE OS ANIMAIS CLASSIFICADOS COMO RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS COM BASE NO OPG DOS TRÊS PICOS DE OPG PÓS DESMAME PARA AS VARIÁVEIS OPG, NÚMERO DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IGE TOTAL, IGE E IGG ESPECÍFICAS, DE ACORDO COM O TESTE T DE STUDENT

continua

VARIÁVEL	COLETA	MÉDIA[(1)] GRUPO RESISTENTE	MÉDIA[(1)] GRUPO SUSCEPTÍVEL	
OPG	1 (06/10/98)	1,2874	2,4900	NS
	2 (23/10/98)	0,2863	1,5287	+
	3 (03/11/98)	0,5727	1,6965	NS
	4 (17/11/98) ♣	1,9802	2,5445	NS
	5 (01/12/98) ♣	2,6150	3,5151	***
	6 (15/12/98)	0,6681	2,9348	**
	7 (29/12/98)	4,2971	6,9332	+
	8 (12/01/99)	5,2300	6,7715	NS
	9 (26/01/99) ♣	7,1836	8,3048	+
	10 (09/02/99) ♣	7,2390	8,7720	**
	11 (23/02/99)	2,9785	5,6790	NS
	12 (09/03/99)	1,3186	3,4613	NS
	13 (06/04/99) ♣	7,1184	7,7606	NS
	14 (04/05/99) ♣	5,7235	8,9583	+
	15 (01/06/99)	4,2684	4,1177	NS
HEMATÓCRITO	1 (06/10/98)	34,2857	31,5000	+
	2 (23/10/98)	35,0000	33,7500	NS
	3 (03/11/98)	33,0000	27,5000	*
	4 (17/11/98) ♣	31,1429	24,5000	+
	5 (01/12/98) ♣	32,5714	23,7500	**
	6 (15/12/98)	29,5714	28,2500	NS
	7 (29/12/98)	29,2857	27,7500	NS
	8 (12/01/99)	30,8571	29,5000	NS
	9 (26/01/99) ♣	27,4286	28,5000	NS
	10 (09/02/99) ♣	27,2857	27,7500	NS
	11 (23/02/99)	28,5714	30,5000	NS
	12 (09/03/99)	28,4286	27,2500	NS
	13 (06/04/99) ♣	27,5714	24,2500	NS
	14 (04/05/99) ♣	27,4286	20,2500	**
	15 (01/06/99)	30,8333	30,5000	NS
EOSINÓFILOS	1 (06/10/98)	1,7168	1,6416	NS
	2 (23/10/98)	1,8483	1,9566	NS
	3 (03/11/98)	1,8999	1,8060	NS
	4 (17/11/98) ♣	1,7607	1,7931	NS
	5 (01/12/98) ♣	1,7644	1,6110	NS
	6 (15/12/98)	1,6119	1,6070	NS
	7 (29/12/98)	1,9549	2,0734	NS
	8 (12/01/99)	2,2687	1,9600	NS
	9 (26/01/99) ♣	1,7294	1,7574	NS
	10 (09/02/99) ♣	2,0418	1,8672	+
	11 (23/02/99)	2,1810	2,1580	NS
	12 (09/03/99)	2,2163	2,1758	NS
	13 (06/04/99) ♣	2,0480	1,7886	NS
	14 (04/05/99) ♣	2,2591	2,2992	NS
	15 (01/06/99)	2,3928	1,9425	NS

TABELA 3 – DIFERENÇA ENTRE OS ANIMAIS CLASSIFICADOS COMO RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS COM BASE NO OPG DOS TRÊS PICOS DE OPG PÓS DESMAME PARA AS VARIÁVEIS OPG, NÚMERO DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IGE TOTAL, IGE E IGG ESPECÍFICAS, DE ACORDO COM O TESTE T DE STUDENT

conclusão

VARIÁVEL	COLETA	MÉDIA GRUPO RESISTENTE(1)	MÉDIA GRUPO SUSCEPTÍVEL(1)	
IGE TOTAL	1 (06/10/98)	0,5320	-0,0846	*
	3 (03/11/98)	0,7394	0,3076	*
	5 (01/12/98) ♣	1,0261	0,2900	*
	8 (12/01/99)	0,7429	0,6677	NS
	10 (09/02/99) ♣	0,8820	0,7562	NS
	12 (09/03/99)	0,9227	0,5294	*
	13 (06/04/99) ♣	1,0417	0,5958	*
	14 (04/05/99) ♣	0,9901	0,3333	*
	15 (01/06/99)	1,0241	0,6759	*
IGE ESPECÍFICA	1 (06/10/98)	-1,3188	-1,5669	NS
	3 (03/11/98)	-1,2952	-1,5806	NS
	5 (01/12/98) ♣	-1,2620	-1,9929	**
	8 (12/01/99)	-1,1368	-2,0418	**
	10 (09/02/99) ♣	-1,0944	-1,6419	+
	12 (09/03/99)	-0,9893	-1,7660	*
	13 (06/04/99) ♣	-0,6049	-1,7359	*
	14 (04/05/99) ♣	-0,6243	-1,4953	*
	15 (01/06/99)	-0,5489	-1,5786	*
IGG ESPECÍFICA	1 (06/10/98)	-0,7316	-0,9093	NS
	3 (03/11/98)	-0,7389	-0,8377	NS
	5 (01/12/98) ♣	-0,5536	-0,7032	NS
	8 (12/01/99)	-0,3843	-0,5758	*
	10 (09/02/99) ♣	-0,3246	-0,4379	NS
	12 (09/03/99)	-0,3805	-0,3745	NS
	13 (06/04/99) ♣	-0,4232	-0,4930	NS
	14 (04/05/99) ♣	-0,3993	-0,5052	NS
	15 (01/06/99)	-0,3591	-0,5003	+

(1) Médias calculadas para as variáveis submetidas à transformação logarítmica; exceto para o hematócrito; ♣ pico de eliminação de OPG; NS – não significativo; +p<0,10; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Seleção indireta dos cordeiros em resistentes e susceptíveis ao parasitismo com base na IgE sérica total e na IgE anti-Haemonchus contortus

Considerando-se que a IgE total e a IgE específica foram as variáveis imunológicas cujas médias do grupo susceptível e resistente foram estatisticamente diferentes para um maior número de coletas, as seguintes hipóteses de seleção indireta foram elaboradas para avaliar a utilidade destes marcadores:

A- agrupamento dos animais baseado nos dados de IgE específica das coletas 5 (segundo pico de parasitismo), 8 (anterior ao terceiro pico de parasitismo) e 14 (quarto pico de parasitismo);

B- agrupamento baseado nos dados de IgE específica das coletas 5, 10 e 14 (relativas ao segundo, terceiro e quarto pico de parasitismo, respectivamente);

C- agrupamento baseado nos dados de IgE total das coletas 5 (segundo pico de parasitismo), 8 (anterior ao terceiro pico de parasitismo) e 14 (quarto pico de parasitismo);

D- agrupamento baseado nos dados de IgE total das coletas 5, 10 e 14 (relativas ao segundo, terceiro e quarto pico de parasitismo, respectivamente)

O dendrograma construído com os dados propostos na hipótese A revelou a formação de dois grupos (A e B) ao nível de 1,600 de distância euclidiana (FIGURA 1). O grupo A incluiu quatro cordeiros cujos valores de absorbância foram elevados, correspondendo ao grupo de animais resistentes. O grupo B foi subdividido ao nível de 1,134 em dois subgrupos. O subgrupo B1 compreendeu oito animais de resposta intermediária, enquanto o subgrupo B2, nove animais de baixos valores de densidade óptica, correspondendo ao grupo susceptível. Além dos grupos A e B foi observada a

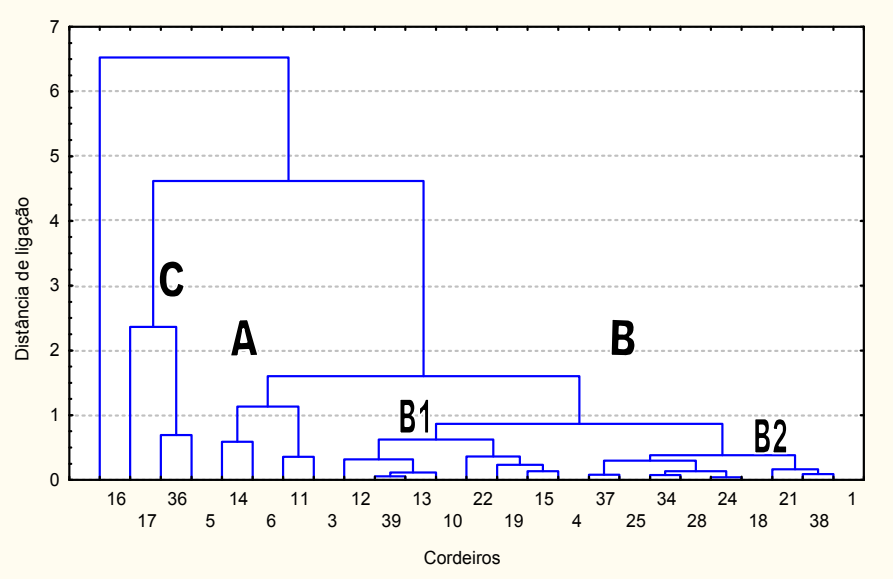
formação de um terceiro grupo (C) ao nível de 4,616 de distância euclidiana. Este grupo compreendeu três animais de valores muito elevados de absorbância para IgE específica. O cordeiro 16 foi excluído da análise por apresentar valor individual de 0,946 na quinta coleta. Este animal e os cordeiros do grupo C também foram considerados resistentes.

Para a hipótese B, os grupos A e B foram formados ao nível de 1,717 de distância e compreenderam os mesmos animais que a hipótese A (FIGURA 2). Contudo, o grupo B foi dividido em três subgrupos, dos quais o subgrupo B3 representou os animais de menores absorbâncias para IgE específica, portanto, susceptíveis. Como para a hipótese A, os animais 05, 16, 17 e 36 foram excluídos dos grupos A e B por apresentarem altos valores de absorbância para IgE específica, sendo incluídos no grupo resistente.

Quando a hipótese C foi submetida à análise de Cluster, foi observada a formação de dois grupos, A e B, ao nível de 5,093 de distância (FIGURA 3). O grupo A compreendeu seis animais cujos valores de IgE total foram elevados. Por isto, este grupo foi considerado resistente. O grupo B foi subdividido em dois, ao nível de 2,715 de distância euclidiana. O subgrupo B1 englobou animais de respostas intermediárias enquanto o B2, animais considerados susceptíveis.

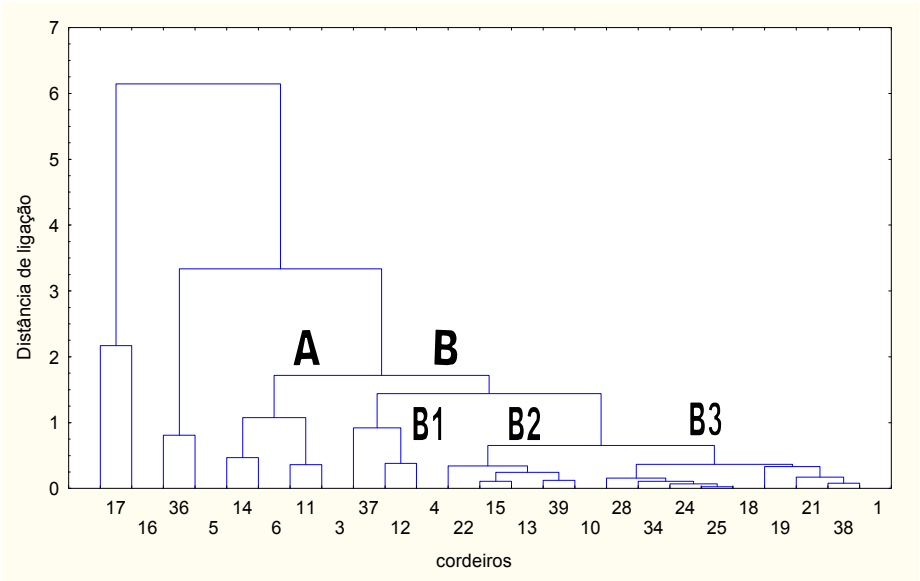
Para a hipótese D, um agrupamento semelhante foi obtido, com a formação do grupo A, com animais de altos valores de IgE total, separado do grupo B ao nível de 6,114 de distância euclidiana (FIGURA 4). O grupo B foi subdividido ao nível de 2,853 no subgrupo B1, com oito animais de resposta intermediária, e B2, com doze animais de baixos níveis de IgE sérica total.

FIGURA 1 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE IgE ANTI-*Haemonchus contortus* DA 5.ª, 8.ª E 14.ª COLETA, REALIZADAS EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998, 12 DE JANEIRO E 04 DE MAIO DE 1999



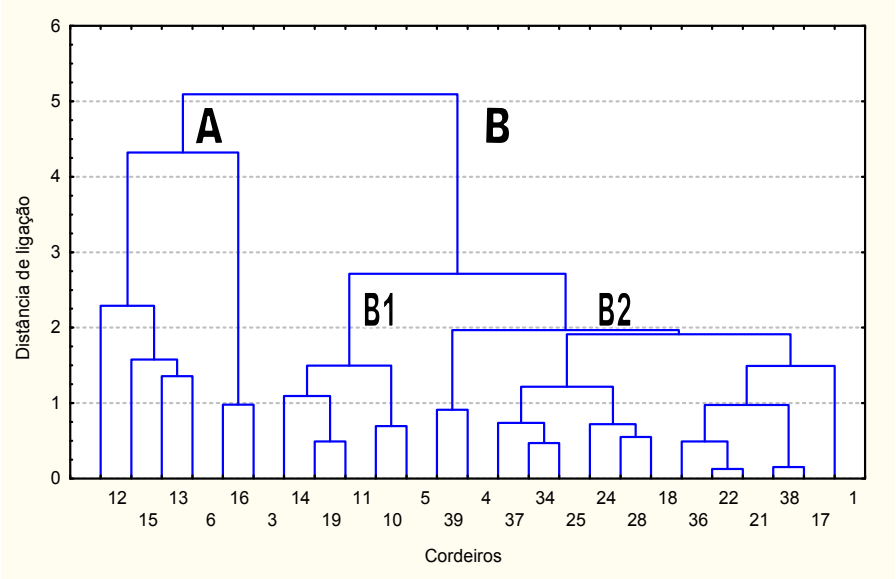
NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

FIGURA 2 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE IgE ANTI-*Haemonchus contortus* DA 5.ª, 10.ª E 14.ª COLETA, REALIZADAS EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998, 09 DE FEVEREIRO E 04 DE MAIO DE 1999



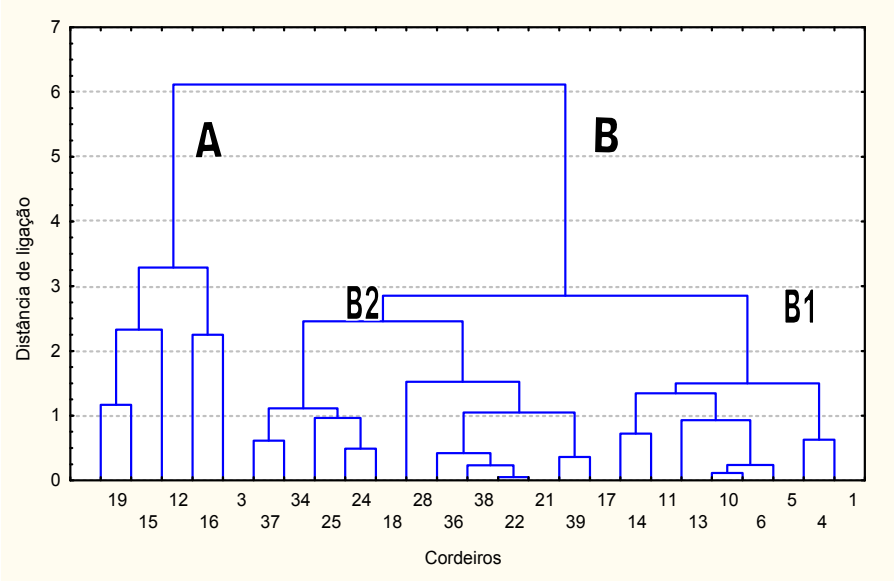
NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

FIGURA 3 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE IgE TOTAL DA 5.ª, 8.ª E 14.ª COLETA, REALIZADAS EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998, 12 DE JANEIRO E 04 DE MAIO DE 1999



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

FIGURA 4 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE IgE TOTAL DA 5.ª, 10.ª E 14.ª COLETA, REALIZADAS EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998, 09 DE FEVEREIRO E 04 DE MAIO DE 1999



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

Ao comparar a média de OPG dos grupos resistente e suscepetível, são observadas diferenças significativas em várias coletas (TABELA 4). Quando o agrupamento foi realizado com base na IgE específica (hipóteses A e B), as diferenças foram mais evidentes, e foram observadas durante períodos de baixo OPG (coletas 1, 3, 6 e 12), bem como no segundo (coleta 5), terceiro (coletas 9 e 10) e quarto (coletas 13 e 14) picos de parasitismo. Quando o agrupamento foi realizado com base na IgE total, foram detectadas diferenças nas médias de OPG apenas fora dos picos de parasitismo.

Exceto para a hipótese B, na qual os grupos resistente e susceptível mostraram diferença significativa no hematócrito das coletas correspondentes ao segundo e ao quarto pico de parasitismo, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos. Também não foram detectadas diferenças na média de eosinófilos circulantes. A única exceção foi a hipótese D, cujos grupos formados mostraram diferenças para as médias de eosinófilos das coletas 9 ($p<0,05$) e 11 ($p<0,10$) (TABELA 4).

Para IgE total, foram detectadas diferenças significativas entre as médias dos grupos nas coletas 5, 14 e 15 para todas as hipóteses de agrupamento. As hipóteses C e D mostraram diferenças entre as médias dos grupos para todas as coletas, exceto para a 13.ª. As médias da quinta e oitava coletas, sobre as quais foi realizado o agrupamento na hipótese C, foram as únicas cujas diferenças foram significativas para $p<0,001$.

Os grupos formados pelas hipóteses A e B, que utilizaram a IgE específica como marcador, mostraram diferenças nas médias desta variável para todas as coletas. Para a hipótese C, diferenças entre as médias dos grupos foram detectadas nas coletas 3 ($p<0,05$), 5 ($p<0,05$), 10 ($p<0,10$) e 15 ($p<0,05$). Para a hipótese D, foi assinalada diferença apenas na coleta 3 ($p<0,05$).

TABELA 4 – DIFERENÇA ENTRE OS ANIMAIS CLASSIFICADOS COMO RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS AOS PARASITOS GASTRINTESTINAIS COM BASE NA IgE ESPECÍFICA DAS COLETAS 5, 8 E 14 (HIPÓTESE A); 5, 10 E 14 (HIPÓTESE B); IgE TOTAL DAS COLETAS 5, 8 E 14 (HIPÓTESE C); 5, 10 E 14 (HIPÓTESE D); PARA AS VARIÁVEIS OPG, NÚMERO DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IgE TOTAL, IgE E IgG ESPECÍFICAS, DE ACORDO COM O TESTE T DE STUDENT

VARIÁVEL	COLETA	HA	HB	HC	HD
OPG	1 (06/10/98)	NS	+	**	*
	2 (23/10/98)	NS	NS	NS	NS
	3 (03/11/98)	+	+	NS	NS
	4 (17/11/98)	NS	NS	NS	NS
	5 (01/12/98)	*	+	NS	NS
	6 (15/12/98)	*	**	NS	NS
	7 (29/12/98)	NS	NS	*	NS
	8 (12/01/99)	NS	NS	NS	NS
	9 (26/01/99)	+	+	NS	NS
	10 (09/02/99)	+	**	NS	NS
	11 (23/02/99)	NS	NS	NS	NS
	12 (09/03/99)	*	*	*	NS
	13 (06/04/99)	NS	NS	NS	NS
	14 (04/05/99)	+	+	NS	NS
	15 (01/06/99)	NS	NS	NS	NS
HEMATÓ-	1 (06/10/98)	NS	NS	NS	NS
CRITO	2 (23/10/98)	NS	NS	NS	NS
	3 (03/11/98)	NS	NS	NS	NS
	4 (17/11/98)	NS	NS	NS	NS
	5 (01/12/98)	NS	*	NS	NS
	6 (15/12/98)	NS	NS	NS	NS
	7 (29/12/98)	NS	NS	NS	+
	8 (12/01/99)	NS	NS	NS	NS
	9 (26/01/99)	NS	NS	NS	NS
	10 (09/02/99)	NS	NS	NS	NS
	11 (23/02/99)	NS	NS	NS	NS
	12 (09/03/99)	NS	NS	NS	NS
	13 (06/04/99)	NS	NS	NS	NS
	14 (04/05/99)	NS	**	NS	NS
	15 (01/06/99)	NS	NS	NS	NS
EOSINÓ-	1 (06/10/98)	NS	NS	NS	NS
FILOS	2 (23/10/98)	NS	NS	NS	NS
	3 (03/11/98)	NS	NS	NS	NS
	4 (17/11/98)	NS	NS	NS	NS
	5 (01/12/98)	NS	NS	NS	NS
	6 (15/12/98)	NS	NS	NS	NS
	7 (29/12/98)	NS	NS	NS	NS

VARIÁVEL	COLETA	HA	HB	HC	HD
EOSINÓ-	8 (12/01/99)	NS	NS	NS	NS
FILOS	9 (26/01/99)	NS	NS	NS	*
(cont.)	10 (09/02/99)	NS	NS	NS	NS
	11 (23/02/99)	NS	NS	NS	+
	12 (09/03/99)	NS	NS	NS	NS
	13 (06/04/99)	NS	NS	NS	NS
	14 (04/05/99)	NS	NS	NS	NS
	15 (01/06/99)	NS	NS	NS	NS
IgE	1 (06/10/98)	*	+	**	**
TOTAL	3 (03/11/98)	+	NS	+	*
	5 (01/12/98)	**	**	***	*
	8 (12/01/99)	NS	NS	***	+
	10 (09/02/99)	+	NS	*	*
	12 (09/03/99)	NS	NS	+	+
	13 (06/04/99)	*	+	NS	NS
	14 (04/05/99)	*	*	*	*
	15 (01/06/99)	**	*	**	**
IgE	1 (06/10/98)	+	+	NS	NS
ESPECÍFICA	3 (03/11/98)	*	*	*	*
	5 (01/12/98)	***	***	*	NS
	8 (12/01/99)	**	**	NS	NS
	10 (09/02/99)	*	**	+	NS
	12 (09/03/99)	**	***	NS	NS
	13 (06/04/99)	***	***	NS	NS
	14 (04/05/99)	***	***	NS	NS
	15 (01/06/99)	***	***	*	NS
IgG	1 (06/10/98)	NS	NS	NS	NS
ESPECÍFICA	3 (03/11/98)	NS	NS	*	+
	5 (01/12/98)	**	**	**	NS
	8 (12/01/99)	+	+	*	NS
	10 (09/02/99)	NS	NS	*	NS
	12 (09/03/99)	NS	NS	*	NS
	13 (06/04/99)	NS	+	*	NS
	14 (04/05/99)	+	*	+	NS
	15 (01/06/99)	*	**	**	NS

NS – não significativo; +p<0,10; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; as coletas 04 e 05 corresponderam ao segundo pico de parasitismo, 9 e 10 ao terceiro, 13 e 14 ao quarto pico.

Seleção dos cordeiros em resilientes e susceptíveis ao parasitismo com base no hematócrito

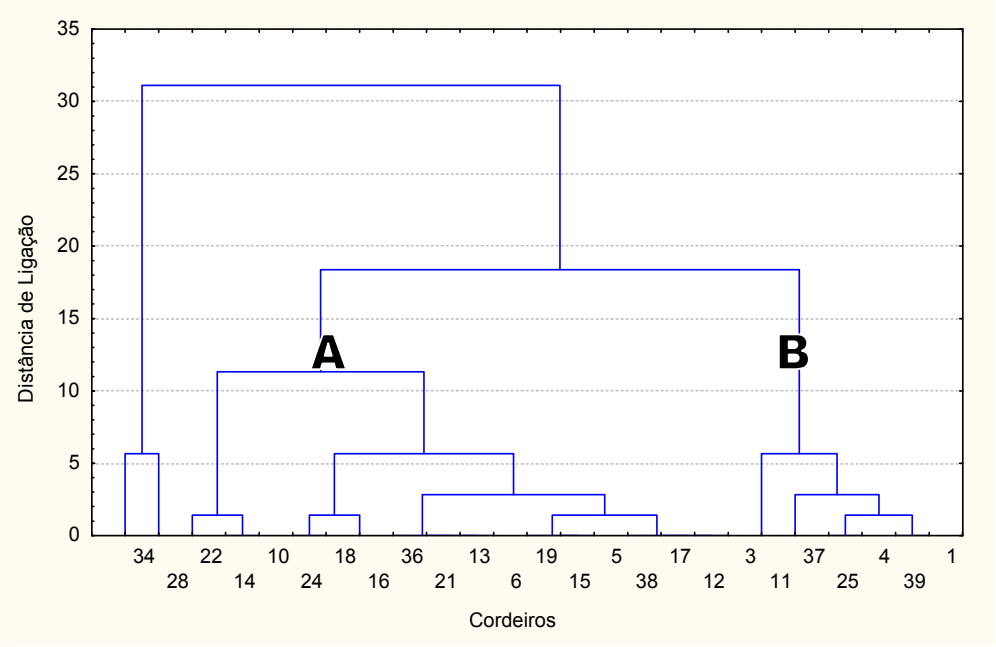
A fim de verificar quais cordeiros se comportaram como resilientes e quais se comportaram como susceptíveis aos efeitos da parasitose gastrointestinal, o hematócrito foi utilizado como marcador. Foram elaboradas cinco hipóteses de agrupamento:

- ✓ Hipótese I: hematócrito do segundo pico de parasitismo (coleta 5);
- ✓ Hipótese II: hematócrito do terceiro pico de parasitismo (coleta 10);
- ✓ Hipótese III: hematócrito do quarto pico de parasitismo (coleta 14);
- ✓ Hipótese IV: hematócrito do segundo, terceiro e quarto picos de parasitismo;
- ✓ Hipótese V: hematócrito do segundo e quarto picos de parasitismo.

A primeira hipótese (FIGURA 5) excluiu os animais 34 e 28 por terem apresentado valor de hematócrito muito mais baixo que os demais (18 e 14%, respectivamente). Os outros animais foram subdivididos em dois grupos: A, com valores de hematócrito maiores que 28% (resilientes) e B, com valores de 23 a 28%.

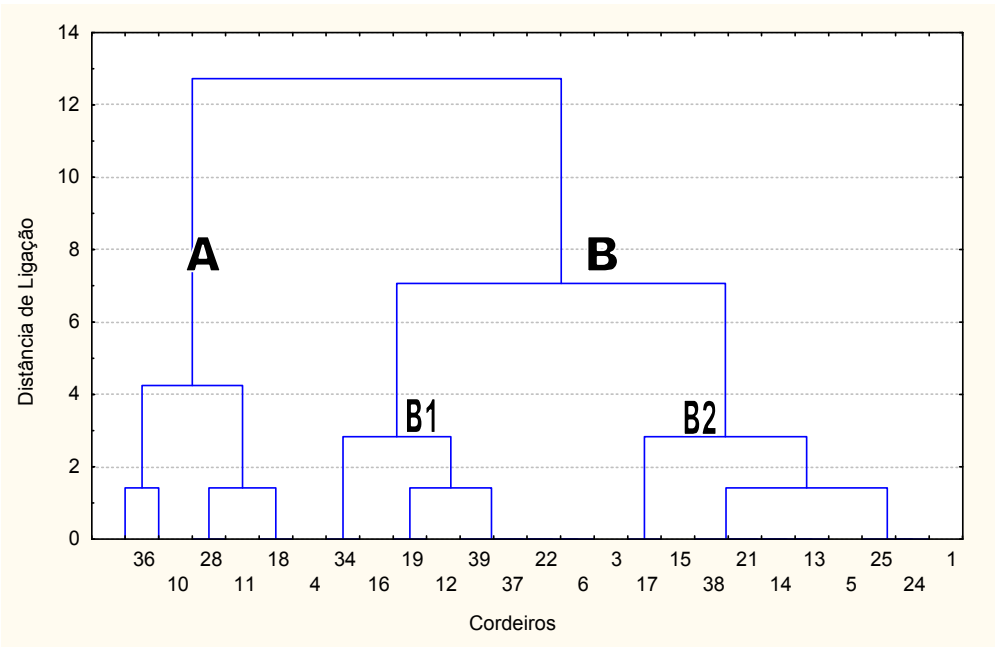
A segunda hipótese (FIGURA 6) revelou dois grupos separados ao nível de 12,8 de distância euclidiana. O primeiro (A) seria considerado resiliente, por ser composto de seis animais com hematócrito entre 29 e 32. Os demais animais formaram dois subgrupos: um (B1) cujos valores de hematócrito variaram entre 23 e 25 (susceptível) e outro (B2) cujos valores foram de 26 a 28.

FIGURA 5 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE HEMATÓCRITO DA 5.ª, COLETA, REALIZADA EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998



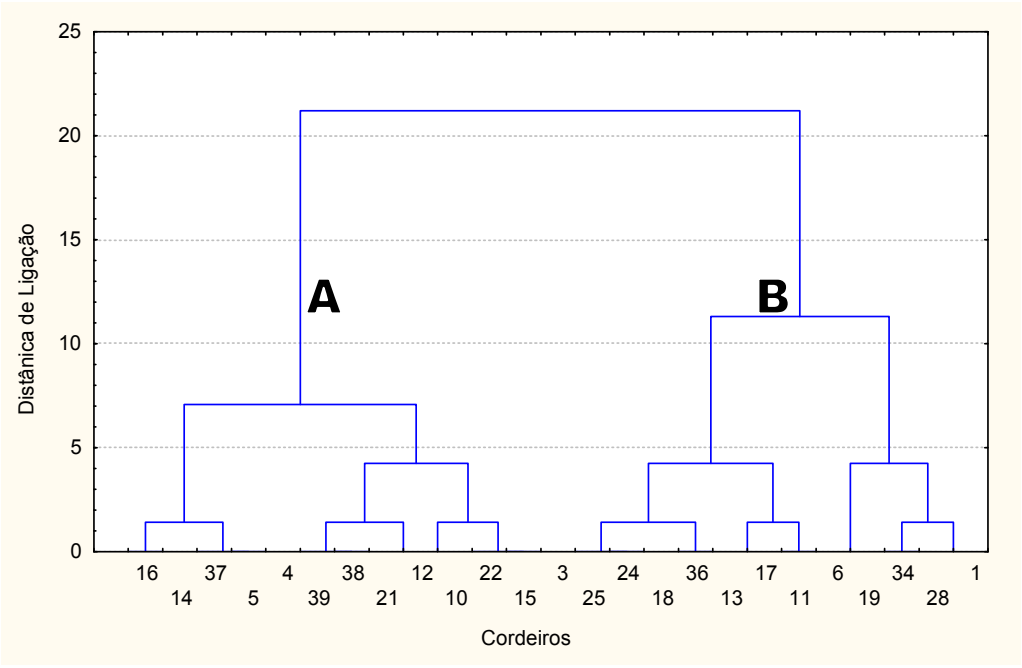
NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

FIGURA 6 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE HEMATÓCRITO DA 10.ª, COLETA, REALIZADA EM 09 DE FEVEREIRO DE 1999



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

FIGURA 7 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE HEMATÓCRITO DA 14.ª, COLETA, REALIZADA EM 04 DE MARÇO DE 1999

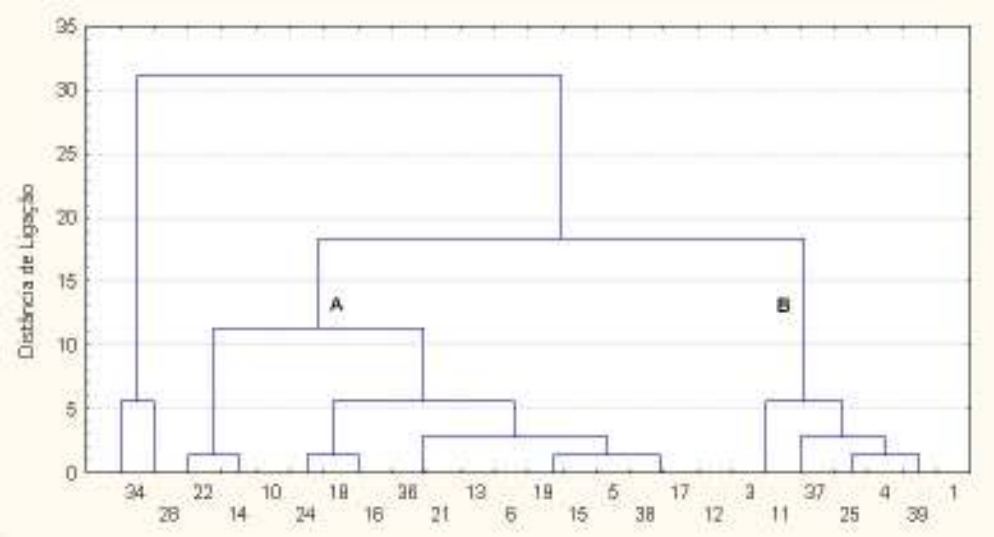


NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

A hipótese 3 (FIGURA 7) dividiu os animais em dois grupos distintos. O primeiro (A), considerado resiliente, compreendeu apenas animais cujos valores de hematócrito foram maiores que 23%. O grupo B, considerado susceptível, foi formado por cordeiros com 23% ou menos de hematócrito.

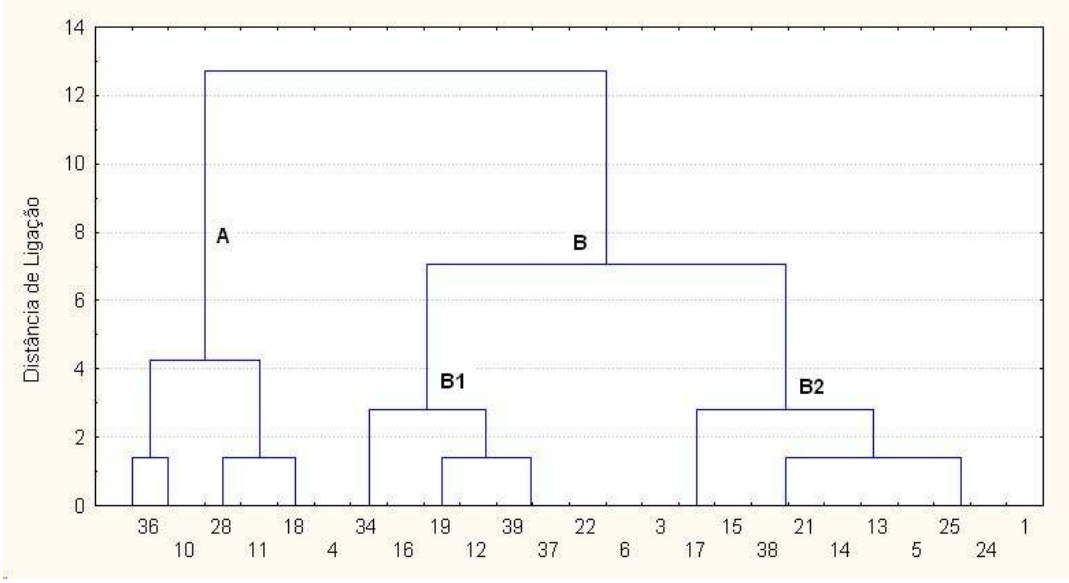
Quando dados dos três picos de verminose foram submetidos à análise de cluster (FIGURA 8), apenas os cordeiros 34 e 28 foram agrupados pelo baixo hematócrito. Todos os demais foram reunidos de acordo com diversos níveis de respostas intermediárias, não sendo possível detectar nenhum subgrupo resiliente. Quando os dados da décima coleta foram excluídos da análise, os mesmos dois animais de baixo hematócrito formaram um grupo aparte (FIGURA 9). Os demais puderam ser divididos em dois subgrupos: A1, que tiveram valores de hematócrito maiors que 23% durante a maior parte do acompanhamento e A2, com valores de hematócrito de 23% ou inferior.

FIGURA 8 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE HEMATÓCRITO DA 5.ª, 10.ª E 14.ª COLETA, REALIZADAS EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998, 09 DE FEVEREIRO E 04 DE MAIO DE 1999



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

FIGURA 9 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE HEMATÓCRITO DA 5.ª, E 14.ª COLETA, REALIZADAS EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998 E 04 DE MAIO DE 1999



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

A diferença de hematócrito entre os grupos resiliente e susceptível mostrou-se significativamente diferente pelo teste t no pico de parasitismo sobre o qual foi realizado o agrupamento e nos demais picos, exceto o segunto (TABELA 5), quanto o gênero *Trichostrongylus* foi o heminto predominante nas coproculturas.

Quanto ao OPG, animais considerados resilientes e susceptíveis pela hipótese I e V mostraram diferenças significativas nesta variável nas coletas sobre as quais foi realizado o agrupamento. Nenhuma hipótese de seleção de animais resilientes foi capaz de segregar animais com diferença significativa no OPG da 14.ª coleta (TABELA 5). Na data desta, quatro cordeiros considerados resilientes em todas as hipóteses mostraram altos valores de OPG: 14 (4100 OPG); 16 (4700 OPG); 37 (9300 OPG) e 38 (4200 OPG).

Ao considerar a resposta imune dos cordeiros de alto hematócrito, foi observado que cordeiros considerados resilientes pela hipótese II apresentaram maior nível de eosinófilos circulantes que os susceptíveis no primeiro e terceiro picos de parasitismo (TABELA 5). No entanto, os grupos segregados por esta mesma hipótese não demonstraram diferença significativa nos níveis séricos de nenhuma das imunoglobulinas pesquisadas. Para as demais hipóteses, houveram diferenças significativas nos níveis de IgE total em várias coletas, inclusive nas referentes ao segundo e quarto picos de parasitismo. Para IgE específica, apenas a hipótese I resultou em diferenças significativas no segundo e quarto picos de verminose ($p<0,05$). A hipótese baseada na segregação dos resilientes em função do grau FAMACHA© do último pico mostrou diferenças na IgE anti-*H.c.*dos dois grupos no segundo e terceiro picos de verminose ($p<0,10$). Para IgG específica, a hipótese I demonstrou maior nível sérico no grupo resiliente apenas na coleta 8; para as hipóteses III e V, o grupo susceptível mostrou menores níveis em várias coletas após a 8.ª, inclusive durante os picos de parasitismo.

TABELA 5 – DIFERENÇA ENTRE OS ANIMAIS CLASSIFICADOS COMO resilientes E SUSCEPTÍVEIS AOS PARASITOS GASTRINTESTINAIS COM BASE NO HEMATÓCRITO DAS COLETAS 5 (HIPÓTESE I); 10 (HIPÓTESE II); 14 (HIPÓTESE III); 5 E 14 (HIPÓTESE V); E GRAU FAMACHA© ESTIMADO CONFORME O HEMATÓCRITO DA COLETA 14 (HIPÓTESE "F")PARA AS VARIÁVEIS OPG, NÚMERO DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IgE TOTAL, IgE E IgG ESPECÍFICAS, DE ACORDO COM O TESTE T DE STUDENT

VARIAVEL	COLETA	HIPÓTESES			
		I	II	III	V
OPG	1 (06/10/98)	*	NS	NS	NS
	2 (23/10/98)	NS	NS	NS	NS
	3 (03/11/98)	*	NS	NS	NS
	4 (17/11/98)	NS	NS	NS	NS
	5 (01/12/98)	***	NS	+	NS
	6 (15/12/98)	NS	NS	NS	*
	7 (29/12/98)	NS	NS	NS	*
	8 (12/01/99)	NS	NS	NS	NS
	9 (26/01/99)	NS	NS	NS	*
	10 (09/02/99)	NS	NS	**	*
	11 (23/02/99)	NS	NS	NS	NS
	12 (09/03/99)	NS	NS	NS	+
	13 (06/04/99)	NS	NS	NS	NS
	14 (04/05/99)	NS	NS	NS	+
	15 (01/06/99)	NS	NS	NS	*
HEMATÓCRITO	1 (06/10/98)	+	NS	NS	NS
	2 (23/10/98)	NS	NS	NS	+
	3 (03/11/98)	***	NS	*	NS
	4 (17/11/98)	***	NS	+	NS
	5 (01/12/98)	***	NS	**	*
	6 (15/12/98)	+	NS	+	*
	7 (29/12/98)	NS	NS	NS	NS
	8 (12/01/99)	NS	NS	NS	NS
	9 (26/01/99)	NS	NS	NS	NS
	10 (09/02/99)	NS	***	NS	NS
	11 (23/02/99)	NS	*	NS	NS
	12 (09/03/99)	NS	+	NS	NS
	13 (06/04/99)	NS	NS	+	NS
	14 (04/05/99)	+	NS	***	***
	15 (01/06/99)	NS	NS	NS	NS
EOSINÓFILOS	1 (06/10/98)	NS	NS	NS	NS
	2 (23/10/98)	NS	NS	NS	NS
	3 (03/11/98)	NS	NS	NS	NS
	4 (17/11/98)	NS	NS	NS	NS
	5 (01/12/98)	NS	*	NS	NS
	6 (15/12/98)	NS	NS	NS	NS
	7 (29/12/98)	NS	NS	NS	NS
	8 (12/01/99)	NS	NS	*	NS
	9 (26/01/99)	NS	NS	NS	NS
	10 (09/02/99)	NS	NS	NS	NS
	11 (23/02/99)	NS	NS	NS	NS
	12 (09/03/99)	NS	NS	NS	NS
	13 (06/04/99)	NS	NS	NS	NS
	14 (04/05/99)	NS	*	NS	NS
	15 (01/06/99)	NS	NS	NS	NS
IgE TOTAL	1 (06/10/98)	NS	NS	NS	NS
	3 (03/11/98)	NS	NS	NS	**
	5 (01/12/98)	+	NS	*	*
	8 (12/01/99)	NS	NS	+	NS
	10 (09/02/99)	+	NS	NS	NS
	12 (09/03/99)	NS	NS	+	NS
	13 (06/04/99)	**	NS	NS	NS
	14 (04/05/99)	**	NS	*	+
	15 (01/06/99)	+	NS	NS	*
IgE ESPECÍFICA	1 (06/10/98)	NS	NS	NS	NS
	3 (03/11/98)	+	NS	NS	NS
	5 (01/12/98)	*	NS	NS	NS
	8 (12/01/99)	NS	NS	NS	NS
	10 (09/02/99)	NS	NS	NS	NS
	12 (09/03/99)	NS	NS	NS	NS
	13 (06/04/99)	*	NS	NS	NS
	14 (04/05/99)	*	NS	NS	NS
	15 (01/06/99)	NS	NS	NS	NS
IgG ESPECÍFICA	1 (06/10/98)	NS	NS	NS	NS
	3 (03/11/98)	NS	NS	NS	*
	5 (01/12/98)	NS	NS	NS	NS
	8 (12/01/99)	*	NS	**	**
	10 (09/02/99)	NS	NS	*	*
	12 (09/03/99)	NS	NS	+	*
	13 (06/04/99)	NS	NS	*	*
	14 (04/05/99)	NS	NS	*	*
	15 (01/06/99)	NS	NS	+	*

NS – não significativo; +p<0,10; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; a coleta 05 correspondeu ao segundo pico de parasitismo, 10 ao terceiro, 13 e 14 ao quarto pico.

DISCUSSÃO

A análise de cluster se mostrou eficaz para definir o ponto de corte entre os animais de alto e de baixo OPG, separando grupos cuja diferença estatística foi significativa nos dados sobre os quais foram realizados os agrupamentos em todas as hipóteses testadas, conforme o relatado por SOTOMAIOR (2002) e SCHMIDT *et al.* (2001). Contudo, vários animais se comportaram ora como resistentes, ora como susceptíveis conforme o pico de parasitismo sobre o qual foi realizada a hipótese de seleção. PETTIT *et al.* (2005) também foram incapazes de selecionar os mesmos animais como resistentes e susceptíveis ao acompanhar dois picos de infecção natural por nematódeos em cordeiros desmamados. Isto pode ser reflexo da incapacidade de alguns cordeiros em expressar um padrão de resposta imune definido aos parasitos gastrintestinais até o final do acompanhamento.

MORRIS *et al.* (1997) descreveram uma prova de reprodutores na qual a média de OPG da progênie de cada carneiro é analisada nos três primeiros picos de verminose após o desmame. Neste esquema, diferenças entre o OPG de cordeiros de linhas resistentes e susceptíveis já são significativas mesmo na primeira amostragem, e ficam ainda mais evidentes ao longo do acompanhamento (DOUCH *et al.*, 1995). Por analogia, seria esperado que pelo menos um pequeno grupo de cordeiros de um rebanho "comum", que não tenha sofrido prévia seleção para resistência, apresentasse uma definição quanto à resistência ou susceptibilidade à verminose gastrintestinal após três picos de infecção natural pós-desmame.

Neste trabalho, dos 25 animais estudados, quatro foram classificados como susceptíveis e sete como resistentes em todas as hipóteses. Considerando-se que cada grupo era formado somente por estes animais, foi observado que a média de OPG do grupo resistente foi estatisticamente menor para todos os picos de parasitismo. Estes dados indicam a possibilidade de identificar alguns cordeiros resistentes e susceptíveis a partir de um rebanho "comum", com base nos dados de OPG dos três primeiros picos

de verminose após o desmame. Assim, a metodologia proposta seria viável para a identificação de borregos resistentes para seleção e teste de progênie.

A igualdade estatística entre os dados de eosinófilos de cordeiros resistentes e susceptíveis assinalada neste trabalho foi de encontro ao observado para as ovelhas adultas (CAPÍTULO 2). Para elas, o eosinófilo foi o marcador imunológico que traduziu mais fielmente as mudanças no OPG. Esta diferença no comportamento de animais adultos e jovens também foi observada por SOTOMAIOR (1997) e pode ser decorrente da incapacidade dos cordeiros em manifestar uma resposta imune completa à verminose.

Os trabalhos de DOUCH *et al.* (1995; 1996) mostraram divergência nos níveis de IgG específica entre ovinos Romney Marsh de linhagens resistentes e susceptíveis à parasitose gastrintestinal, quando submetidos à infecção natural com predominância de *Trichostrongylus* spp. No entanto, os resultados aqui obtidos não mostraram diferenças significativas entre os grupos para a IgG anti-*Haemonchus*. É possível que este isotipo de anticorpo esteja menos relacionado ao processo de resistência à infecção parasitária quando o *Hamonchus contortus* é o helminto mais freqüente ou quando se trata de animais de uma raça sabidamente mais sensível à verminose, como a Suffolk (MORAES *et al.,* 2001; AMARANTE *et al,* 2004; AMARANTE, 2006). Isso pode ser possível pois nem mesmo para as ovelhas adultas, com uma resposta definida contra a parasitose, foi observada diferença nos níveis de IgG específica entre os grupos (CAPÍTULO 2).

Para IgE total e específica, as diferenças entre os cordeiros resistentes e susceptíveis foram significativas para sete das nove coletas realizadas. Isto está de acordo com os resultados de SHAW *et al.* (1999), para dados de linhas resistentes e susceptíveis separadas ao longo de várias gerações. PERNTHANER *et al.*(2005) também encontraram maior concentração de IgE total na linfa intestinal de animais resistentes após desafio parasitário do que em animais susceptíveis.

Como as médias destas variáveis tenderam a apresentar diferenças entre os grupos durante a maior parte do acompanhamento, foi analisada a possibilidade de se

selecionar animais resistentes e susceptíveis indiretamente pela IgE total ou específica. As hipóteses de seleção indireta baseadas na IgE total não revelaram grupos com médias de OPG contrastantes durante os picos de parasitismo. Como a IgE total é uma medida de respostas específicas e inespecíficas ao parasito (KOOYMANN, 1997), era esperado que sua relação com a resistência aos helmintos gastrintestinais fosse menos estreita que a da IgE específica.

Ambas as hipóteses elaboradas para a identificação de animais resistentes e susceptíveis por meio da mensuração da IgE específica mostraram diferenças significativas para o OPG de ambos os grupos nos três picos de parasitismo acompanhados. Isso indica que a seleção indireta de animais resistentes e susceptíveis com base na IgE anti-*Haemonchus* seria viável, conforme proposto por SHAW *et al.*(1999).

Apesar de ainda não ter sido testada na prática, a seleção indireta pela IgE específica teria algumas vantagens sobre a seleção pelo OPG. A primeira seria os valores de repetibilidade mais elevados que os do OPG, diminuindo a necessidade de múltiplas amostragens dos animais para seleção. Além disso, SHAW *et al.* (1999) relatam maior herdabilidade para IgE anti-*T.colubriformis* (0,36-0,52) que para o OPG (0,27-0,36). As outras vantagens são decorrentes da utilização do teste de enzima-imunoensaio para a obtenção dos valores individuais de densidades ópticas, tais como: leitura automatizada, estocagem das amostras por longos períodos e análise de um grande número de animais ao mesmo tempo (DOUCH *et al.,* 1995).

Quando os cordeiros foram classificados em resistentes e susceptíveis pelo OPG, foi observado que o grupo de baixo OPG apresentou maiores valores de hematócrito nas coletas cujo OPG foi utilizado para realizar o agrupamento, à exceção da hipótese relacionada ao terceiro pico de parasitismo. Estes dados se assemelham aos obtidos por outros autores, que relatam ocorrência de maiores valores de hematócrito em animais resistentes à hemoncose ou à verminose gastrintestinal quando o *Haemonchus contortus* é o parasito mais comum (SCHMIDT *et al.,* 2001; SOTOMAIOR 2002; BATH *et al.* 2001). Desta forma, os animais resistentes também

poderiam ser considerados resilientes, pois seriam mais capazes de suportar os efeitos do parasitismo (RIFKIN e DOBSON, 1979).

Os altos valores de hematócrito apresentados pelos animais durante o terceiro pico de parasitose e a baixa correlação entre o hematócrito e o OPG (r=-0,16; p=0,4466) comprometeram a associação entre resistência e resiliência. A maior prevalência de *Trichostrongylus* neste período pode ter tornado o grau de anemia uma medida pouco eficaz de mensurar os efeitos da verminose nos indivíduos, pois este parasito não realiza hematofagia (BATH *et al.* 2001; BOWMANN *et al.* 2006).

Uma vez que os cordeiros mais resistentes tenderam a se mostrar resilientes nos períodos em que o *Haemonchus* foi o parasito mais importante, foram formuladas hipóteses de agrupamentos dos cordeiros conforme o seu valor de hematócrito para verificar se a recíproca seria verdadeira. Ao comparar o OPG dos cordeiros resilientes e susceptíveis, todas as hipóteses incluíram três ou quatro animais de altos valores de OPG dentro do grupo resiliente. Isto est à de acordo com os achados de MOLENTO *et al.* (2004), que não encontraram sinais de anemia em alguns ovinos que apresentavam mais de 1500 OPG.

A manutenção de animais com este perfil no rebanho, bem como sua seleção para reprodução é bastante controversa. Ovinos com alto OPG, mas que não se apresentam anêmicos, magros ou com diarréia não necessitam tratamento anti-helmíntico. Portanto, estes animais continuam eliminando ovos oriundos de parasitos que não sofreram pressão de seleção para resistência anti-helmíntica, contribuindo para manutenção da freqüência dos alelos que determinam a susceptibilidade às drogas na população parasitária (FAO, 2003). No entanto, animais resilientes em algum momento devem sucumbir à infecção parasitária, uma vez que não conseguem eliminar os helmintos de seu trato gastrintestinal (AMARANTE, 2006).

Ao observar que cordeiros de linhagens resistentes apresentavam maiores escores de diarréia (menor resiliência), BISSET *et al.*(1992) associaram este fenômeno à maior resposta inflamatória no intestino destes animais quando submetidos a infecções nas quais *Trichostrongylus* spp. e *Ostertagia* spp. eram os helmintos preponderantes. A IgE media a liberação de mediadores presentes nos grânulos dos mastócitos que alteram a permeabilidade capilar, permitindo maior fluxo de

macromoléculas para os tecidos (TIZARD, 2002). A histamina tem um papel muito importante no estímulo da secreção de muco pelas células do epitélio intestinal e no aumento do peristaltismo (McCLURE e EMMERY, 1994), o que pode resultar no aparecimento da diarréia.

No presente trabalho, animais resilientes apresentaram maiores níveis séricos de IgE total em várias coletas, mas raramente o número de eosinófilos circulantes e a IgE anti-*Haemonchus* mostraram diferenças do grupo susceptível. Possivelmente os ovinos resilientes ativem diferentes mecanismos de resposta imune que os resistentes, com ativação policlonal de células B e produção inespecífica de anticorpos. A superprodução de IgE não específica seria benéfica ao parasito por saturar os receptores de alta afinidade dos mastócitos (FcεRI), e os receptores FcεRII dos eosinófilos, e por inibir a proliferação de células T ao ocupar os receptores $FcεRII_b$ das células B (PRITCHARD *et al.,* 1993 ***apud*** KOOYMANN, 1997). GASBARRE (1997) sugere que um dos mecanismos de imunosupressão em infecções por *Ostertagia ostertagi* em bovinos seria a ativação policlonal de células B.

Ao contrário do observado em relação aos animais resistentes, os resilientes demonstraram maiores níveis de IgG que os susceptíveis na maior parte das coletas realizadas. Normalmente este isotipo de imunoglobulina é produzido contra enzimas, produtos de secreção e excreção, ou cutícula de cada estádio de desenvolvimento. Uma vez que reconheça algum destes antígenos, promove a ativação do complemento pela via clássica e a neutralização das enzimas proteolíticas, bloqueio dos poros oral, anal e excretor do parasito, na ovoposição e na formação de estruturas anatômicas (WAKELIN, 1996; TIZARD, 2002). Desta forma, o animal poderia continuar parasitado, mas limitar a ação das enzimas digestivas histolíticas e a reprodução do parasito.

Embora tenham sido observadas diferenças de resposta imune entre animais resistentes e resilientes neste trabalho, seria importante conduzir estudos mais detalhados para compreender os complexos mecanismos envolvidos na relação entre o hospedeiro ovino e os parasitos gastrintestinais.

CONCLUSÕES

Os cordeiros demonstraram alta variabilidade de respostas às parasitoses. A identificação dos cordeiros resistentes foi possível somente com os dados de OPG dos três picos de parasitose pós-desmame. Foi possível identificar indiretamente cordeiros de alto e baixo OPG pelos dados de IgE específica, medidos durante os três picos de parasitismo. Tanto para a seleção direta pelo OPG quanto pela seleção indireta pela IgE específica, foram necessários dados de três picos de verminose pós-desmame. Portanto, para ambos os marcadores, os cordeiros somente puderam ser selecionados a partir dos 10 meses de idade.

A seleção de cordeiros resilientes foi possível com os dados de hematócrito dos picos de parasitismo em que o *Haemonchus* foi o principal parasito envolvido. Alguns animais de alto OPG foram inseridos neste grupo.

Cordeiros resistentes tenderam a apresentar maiores valores de hematócrito, eosinófilos circulantes, IgE total, IgE e IgG específicas que os susceptíveis, mas somente para IgE total e específica as diferenças foram significativas durante a maior parte do acompanhamento. Cordeiros resilientes apresentaram maiores níveis séricos de IgE total e de IgG anti- *Haemonchus* quando comparados aos animais susceptíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE, A.F.T. Resistência genética a helmintos gastrointestinais.In: Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, V,2004, Pirassununga. **Anais...** Disponível em: http://www.sbmaonline.org.br/anais/v/palestras/palest14.pdf Acesso em: 31 set. 2006.

AMARANTE, A.F.T; BRICARELLO, P.A.; ROCHA, R.A.; GENNARI, S.M. Resistance of Santa Inês, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology,** v. 120, p.91-106, 2004.

BATH, G.F.; HANSEN, J.W.; KRECEK, R.C.; VAN WYK, J.A.; VATTA, A.F. **Sustainable approaches for managing haemoncosis in sheep and goats.** FAO: Roma, 2001. 90 p.

BISSET, S.A.; VLASSOFF, A.; MORRIS, C.A.; SOUTHEY, B.R.; BAKER, R.L.; PARKER, A.G.H. Heritability of and genetic correlations among faecal egg counts and productivity traits in Rommey sheep. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, n.35, p. 51-58, 1992.

BOWMAN, Dwight D.; LYNN, Randy Carl; EBERHARD, Mark L.; ALCARAZ, Ana. **Parasitologia Veterinária de Georgis.** Tradução: Cid Figueiredo e Taís Bittencourt Figueiredo. Barueri, SP: Editora Manole, 2006. 429 p. Tradução de: Georgis' Parasitology for Veterinarians.

CABARET, J.; MAGE, C.; BOUILHOL, M. Helminth intensity and diversity in organic meat sheep farms in centre of France. **Veterinary Parasitology,**v. 105, n.1, p.33-47. 2002

DOUCH, P.G.C.; GREEN, R.S.; MORRIS, C.A.; BISSET, S.A.; VLASSOFF, A.; BAKER, R.L.; WATSON, T.G.; HURFORD, A.P.; WHEELER, M. Genetic and phenotypic relationships among anti-T*richostrongylus colubriformis* antibody level, faecal egg count and body weight traits in grazing Romney sheep. **Livestock Production Science,** v.41, p. 121-132, 1995.

DOUCH, P.G.C.; GREEN, R.S.; MORRIS, C.A.; McEWANS, J.C.; WINDON, R.G. Phenotypic markers for selection of nematode–resistant sheep. **International Journal for Parasitology,** v. 26, n.8/9, p. 899-911, 1996.

FAO, Salud Animal. **Resistência a los Antiparasitarios: Estado Actual Énfasis en América Latina.** Roma: FAO, 2003. 52p.

GASBARRE, L.C. Effects of gastrointestinal nematode infection on the ruminant immune system. **Veterinary Parasitology,** v. 75, p. 327-343, 1997

GORDON, H.McL.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v. 12, p. 50, 1939.

GRANADOS, L.B.C.; DIAS, A.J.B.; SALES, M.P. **Aspectos gerais da reprodução de ovinos e caprinos. Capacitação dos técnicos e produtores do Norte e Noroeste Fluminense em Reprodução de Caprinos e Ovinos.** Campos de Goytacazes: PROEX/UENF, 2006. 54 p.

GULARTE, M. A.; TREPTOW, R.O.;POUEY, J.F.; OSORIO, J.C. Meat lamb tenderness influenced by age and sex in Corriedale lineage. **Ciencia Rural**, v. 30, n. 3, 2000. p.485-488.

JAIN, N.C. Comparative hematology of common domestic animals. In: _____. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.19-52, 1993.

KOOYMAN, F.N.J.; VAN KOOTEN, P.J.S.; HUNTLEY, J.F.; MacKELLAR, A.; CORNELISSEN, A.W.C.A; SCHALLIG, H.D.F.H. Production of a monoclonal antibody specific for ovine immunoglobulin E and its application to monitor serum IgE responses to *Haemonchus contortus* infection. **Parasitology,** v.114, p. 395-406, 1997.

LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J.R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretação.** 6 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985.

Mac FARLANE, J.C.W.; CECIL, G.W. Eosinophil counting: a modification of Pilots method. **British Medical Journal**, v. 2, p. 1187, 1951.

McCLURE, S.J.; EMERY, D.L. Cell Mediated Responses Against Gastrointestinal Nematodes Parasites of Ruminants. In: GODDEERIS, B.M.L.; MORRISON, W.I. **Cell-mediated immunity in ruminants.** Boca Raton: CRC Press Inc., 1994 p. 213-228.
MOLENTO, Marcelo Beltrão; TASCA, Cláudio; GALLO, Alencar; FERREIRA, Márcio; BONONI, Ronaldo; STECCA, Evandro. Famacha guide as an individual clinic parameter for Haemonchus contortus infection in small ruminants. **Ciencia Rural**., Santa Maria, v. 34, n. 4, 2004.

MORAES, F.R.; SARNOSKI Jr; S.; SAULT, J.P.E.; OLIVEIRA; V.P.; SOCCOL, V.T.; CASTRO, E.A. Estudo epidemiológico da verminose ovina na Região de Ponta Grossa - PR. In: EVINCI - Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná, 6.,1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Editora da Universidade Federal do Paraná, 1998. p. 427.

MORAES, F.R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; ROSSI JÚNIOR, P.; WOLFF, F.M.; CASTILHO, G.G. Susceptibilidade de ovinos das raças Suffolk e Santa Inês à infecção natural por tricostrongilídeos. **Arquives of Veterinary Science,** v.6, n.2, p.63-69, 2001.

MORRIS, C.A.; VLASSLOFF, A.; BISSET, S.A.; BAKER, R.L.; WEST, C.J.; HURFORD, A.P. Responses of Romney sheep to selection for resistance or susceptibility to nematode infection. **Animal Science,** v.64, p. 319-329, 1997.

NARI, A.; CARDOZO, H. Nematodos Gastrointestinales. In.: **Enfermidades de los lanares – Tomo I.** Montevideo : Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L., 1987. p.1-51.

OLIVEIRA; V.P.; MORAES, F.R.; ZAGO, M.; POLLATI, L.; SOUZA, F.P.; THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E.A. Epidemiologia da verminose em ovinos na Região de Guarapuava - Paraná. In: EVINCI - Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná, 7.,1999, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Editora da Universidade Federal do Paraná, 1999. v.2. p. 494.

PEREIRA, Jonas Carlos Campos. **Melhoramento genético aplicado à produção animal.** 4. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2005. 609 p.

PERNTHANER, A.; SHAW, R.J.; McNEILL, M.M.; MORRISON, L.; HEIN, W.R. Total and nematode-specific IgE response in intestinal lymph of genetically resistant and susceptible sheep during infection with *Trichostrongylus colubriformis.* **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v. 104, p. 69-80. 2005.

PETTIT, J.J.; JACKSON, F.; ROCCHI, M.; HUNTLEY, J.F. The relationship between responsiveness against gastrointestinal nematodes in lambs and the numbers of circulating IgE-bearing cells. **Veterinary Parasitology,** v. 134, p.131-139. 2005.

RIFFKIN, G.G.; DOBSON, C. Predicting resistance of sheep to *Haemonchus contortus* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 5, p. 365-378, 1979.

SCHMIDT, E.M.S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MORAES, F.R. Pesquisa de marcadores parasitológicos e hematológicos de resistência ao parasitismo gastrintestinal em cordeiros. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia UNIPAR**, v. 4, n. 1, p. 55-64, 2001.

SHAW, R.J.; GRIMMETT, D.J.; DONAGHY, M.J.; GATEHOUSE, T.K.; SHIRER, C.L.; DOUCH, P.G.C. Production and characterisation of monoclonal antibodies recognising ovine IgE. **Veterinary immunology and Immunopathology,** v. 51, n. 3-4, p. 235-251, 1996.

SHAW, R.J.; McNEILL, M.M.; GATEHOUSE, T.K.; DOUCH, P.G.C. Quantification of total sheep IgE concentration using anti-ovine IgE monoclonal antibodies in an enzyme immunoassay. **Veterinary immunology and Immunopathology,** v.57, p.253-265, 1997

SHAW, R.J.; GATEHOUSE, T.K.; McNEILL, M.M. Serum IgE responses during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology,** v.28, p. 293-302, 1998

SHAW, R.J.; MORRIS, C.A.; GREEN, R.S.; WHEELER, M.; BISSET, S.A.; VLASSOFF, A.; DOUCH, P.G.C. Genetic and phenotypic relationships among *Trichostrongylus colubriformis* – specific immunoglobulin E, anti – *Trichostrongylus colubriformis* antibody, immunoglobulin G_1, faecal egg count and body weight traits in grazing Romney lambs. **Livestock Production Science,** v. 58, p.25-32, 1999

SOTOMAIOR, C. **Estudo de caracteres que possam auxiliar na identificação de ovinos resistentes e susceptíveis às helmintoses gastrintestinais.** Curitiba, 1997. Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

SOTOMAIOR, C. **Estudo de caracteres que possam auxiliar na identificação de ovinos resistentes e susceptíveis às helmintoses gastrintestinais.** In: I Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária, Curitiba, PR, 14 a 17 de maio de 2002. **Anais...** Curitiba:2002 p. 90-94.

SOTOMAIOR, C.; MILCZEWSKI, V.; SCHWARTZ, M. G.; MORAES, F. R. Evaluation of FAMACHA System: accuracy of anaemia estimation and use of the method on commercial sheep flocks. In: International Seminar in Animal Parasitology, V, 2003, Merida. **Proceedings...** 2003. p. 61-66.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F.P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E.A.; MILCZEWSKI, V.; PESSOA, M. C.; MOCELIN, G. Resistance of gastrointestinal nematodes of

anthelmintics in sheep (*Ovies aries)*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 41 – 47, 2004.

TIZARD, Ian R. **Imunologia Veterinária – Uma Introdução.** Tradução: Paulo Marcos Agria de Oliveira. 6.ed. São Paulo: Roca, 2002. 532 p. Tradução de: Veterinary Immunology: an Introduction.

VAN WYK, J.A.; BATH, G. The FAMACHA© system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. **Veterinary Research,** v. 33, p. 509-529. 2002.

WAKELIN, D. **Immunity to Parasites – How parasitic infections are controlled.** 2nd Edition. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 204p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de antígeno somático de *Haemonchus contortus* e seu uso na padronização dos métodos de ensaio imunoenzimático indireto para detecção de IgG e IgE anti-*Haemonchus contortus* tornou estas técnicas ferramentas importantes no estudo da resposta imune que decorre da interação entre hospedeiro e parasito, bem como um produto interessante para ser utilizado em programas de seleção de ovinos resistentes às parasitoses. As considerações foram realizadas em dois diferentes grupos de animais: ovelhas adultas, fora do período crítico de verminose (entre o desmame e o final de gestação), e cordeiros do desmame a um ano de idade.

Quando o principal objetivo da ovinocultura é a obtenção de cordeiros para abate, as matrizes são de suma importância para a criação, pois é de seu correto manejo e adequada sanidade que resultarão os produtos para a indústria. No entanto, apenas 20% ou menos das fêmeas de um rebanho são descartadas anualmente (GOMES, 2006). Isto limita o ganho genético de qualquer característica a ser melhorada nas primeiras gerações após a seleção. Por este motivo, poderia ser trabalhada a opção de identificar as ovelhas susceptíveis e descartá-las juntamente com aquelas que apresentem histórico de infertilidade e outras enfermidades crônicas. Neste trabalho foi observado que as ovelhas susceptiveis são a minoria do rebanho. No entanto, são estes indivíduos que tendem a manifestar enfermidade clínica e demandam maiores custos para controle da verminose. Portanto, a correta identificação e descarte das fêmeas susceptíveis deve resultar em economia para o produtor, diminuição de tratamentos anti-helmínticos e, com isso, a pressão de seleção de parasitos resistentes.

Para identificar as ovelhas susceptíveis, poderia ser utilizado o marcador parasitológico (OPG) sozinho, ou acrescido dos valores de IgE específica, a fim de aumentar a segurança na escolha dos animais. Embora o número de eosinófilos no sangue periférico também pudesse ser utilizado, a metodologia de contagem e a necessidade de leitura na mesma data da coleta de material dificultariam seu

emprego a campo. Embora a avaliação clínica dos animais para atribuição do grau FAMACHA© não tenha sido realizada neste trabalho, os valores de hematócrito indicaram que o descarte dos animais anêmicos poderia ser uma alternativa. No entanto, há de se considerar o risco de enquadrar ovelhas de alto OPG em categorias que não necessitam tratamento anti-helmíntico bem como se certificar que o *Haemonchus* é o principal estrongilídeo presente no rebanho no momento de se realizar as avaliações.

A compreensão dos mecanismos envolvidos na interação entre os cordeiros e os parasitos gastrintestinais é de suma importância, uma vez que esta é uma das categorias mais sensíveis à verminose e a responsável pelo produto de maior valor no mercado de carnes ovinas. Além disso, a seleção dos animais de reposição é o principal ponto a ser levado em consideração em programas de melhoramento genético, sobretudo quando se trata de borregos. Como os machos consistem em apenas cerca de 3% dos animais do rebanho (GRANADOS *et al.,* 2006), é possível trabalhar com um alto diferencial de seleção na escolha dos futuros reprodutores (PEREIRA, 2005).

Um limitante à seleção precoce dos futuros reprodutores é o tempo que estes levam para manifestar os mecanismos efetores da resposta imune após desafio parasitário. Neste trabalho, os cordeiros foram mantidos a pasto, sob desafio parasitário constante, e começaram a esboçar um padrão de resposta imune por volta dos seis meses e meio de idade. Foi possível identificar os cordeiros resistentes e susceptíveis diretamente pelo OPG, ou indiretamente pela IgE específica. Contudo, para ambos os marcadores, os cordeiros somente puderam ser selecionados a partir dos 10 meses de idade. O ELISA para IgE teria a vantagem de ter uma leitura automatizada, maior repetibilidade, menor hora técnica em laboratório para análise de muitas amostras em conjunto e a possibilidade de armazenamento das amostras de soro indefinidamente se estocadas a -20^{o}C.

Neste trabalho, foram testadas metodologias de identificação de animais fenotipicamente resistentes (seleção fenotípica ou massal). Como a resistência à

verminose é uma característica de média herdabilidade, o teste de progênie seria um método mais seguro de selecionar os futuros reprodutores, pois mede apenas a porção da variação genética transmitida aos descendentes (PEREIRA, 2005). Uma vez que há a intenção de se criar no Paraná centros de Melhoramento Genético de Ovinos e Caprinos (SEAB, 2006), seria interessante o investimento em fazendas modelo onde pudessem ser realizadas provas de desempenho para os futuros reprodutores. Enquanto isso não se torna realidade, a metodologia testada neste trabalho poderia ser utilizada para seleção fenotípica de reprodutores nas cabanhas paranaenses, de forma a agregar valor aos animais comercializados para reprodução. Para realizar três medidas de IgE, o custo de materiais do kit seria aproximadamente de R$ 20,00 por animal, além das despesas com coleta e transporte do material.

Este trabalho também trouxe alguns subsídios para melhor compreender os mecanismos envolvidos no surgimento da resposta imune aos helmintos gastrintestinais em cordeiros. De um modo geral, o nível de todas as variáveis imunológicas mensuradas foram muito baixos no desmame e apresentam aumento expressivo por volta dos seis meses e meio de idade. A IgE específica foi a última variável a mostrar aumentos expressivos e a que mostrou maior correlação com a carga parasitária e maior expressão em cordeiros resistentes. Cordeiros resilientes, ao contrario, apresentaram maiores níveis séricos de IgE total e de IgG anti-*Haemonchus* quando comparados aos animais susceptíveis. Esta diferença de resposta imune entre animais resistentes e resilientes deve ser estudada com mais cuidado. A descoberta dos fatores no reconhecimento antigênico ou na regulação da resposta imune que sejam responsáveis por esta diferença pode ser a chave para o desenvolvimento de vacinas ou drogas imunomoduladoras que possam minimizar os prejuízos da verminose sobre os rebanhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GOMES, A. **Resposta Técnica.** Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, Sistema Brasileiro de Respostas Técnicas, 2006. Disponível em: http://sbrt.ibict.br/upload/sbrt1885.pdf. Acesso: 21 jan. 2007.

GRANADOS, L.B.C.; DIAS, A.J.B.; SALES, M.P. **Aspectos gerais da reprodução de ovinos e caprinos. Capacitação dos técnicos e produtores do Norte e Noroeste Fluminense em Reprodução de Caprinos e Ovinos.** Campos de Goytacazes: PROEX/UENF, 2006. 54 p.

PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal.** 4. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2005. 609 p.

SEAB. **Programa de Apoio à estruturação das cadeias produtivas de ovinos e caprinos.** 2006. Disponível em: www.ovinocaprino.pr.gov.br. Acesso em: 19 abr. 2007.

ANEXOS

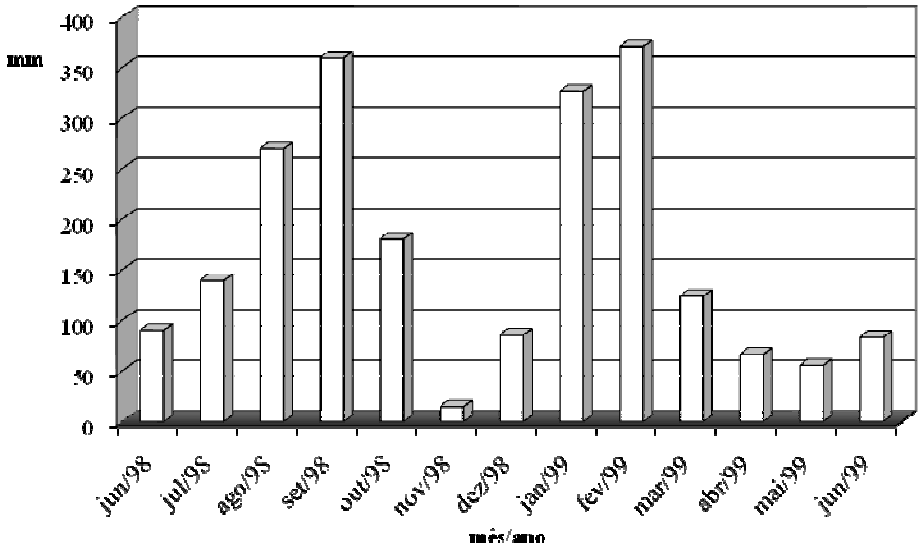
ANEXO 1 – VALORES DE REFERÊNCIA NA ESPÉCIE OVINA

VALORES	MÉDIA	VARIAÇÃO
Série vermelha		
Eritrócitos (x 10^6/µl)	12,0	9-15
Hemoglobina (g/dl)	11,5	9-15
Hematócrito (%)	35	27-45
Série Branca		
Leucócitos/µl	8.000	4.000-12.000
Neutrófilos/µl (bastonetes)	raros	-
Neutrófilos/µl (segmentados)	2.400 (30%)	700-6.000 (10-50%)
Linfócitos/µl	5.000 (62%)	2.000-9.000 (40-75%)
Monócitos/µl	200 (2,5%)	0-750 (0-6%)
Eosinófilos/µl	400 (5%)	0-1.000 (0-10%)
Basófilos/µl	50 (0,5%)	0-300 (0-3%)

FONTE: JAIN (1993)

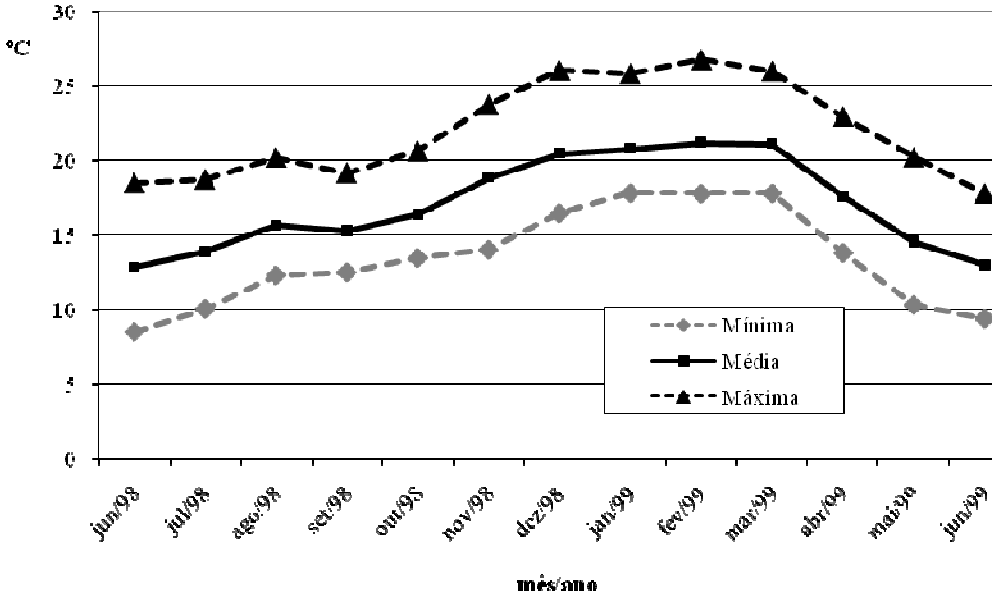
ANEXO 2 – PLUVIOSIDADE E TEMPERATURA NA CIDADE DE CURITIBA, DE JUNHO DE 1998 A JUHO DE 1999

FIGURA 1 – TOTAL MENSAL DE CHUVAS (mm) NA CIDADE DE CURITIBA, NO PERÍODO DE JUNHO DE 1998 A JUNHO DE 1999.



FONTE: SIMEPAR, 2001

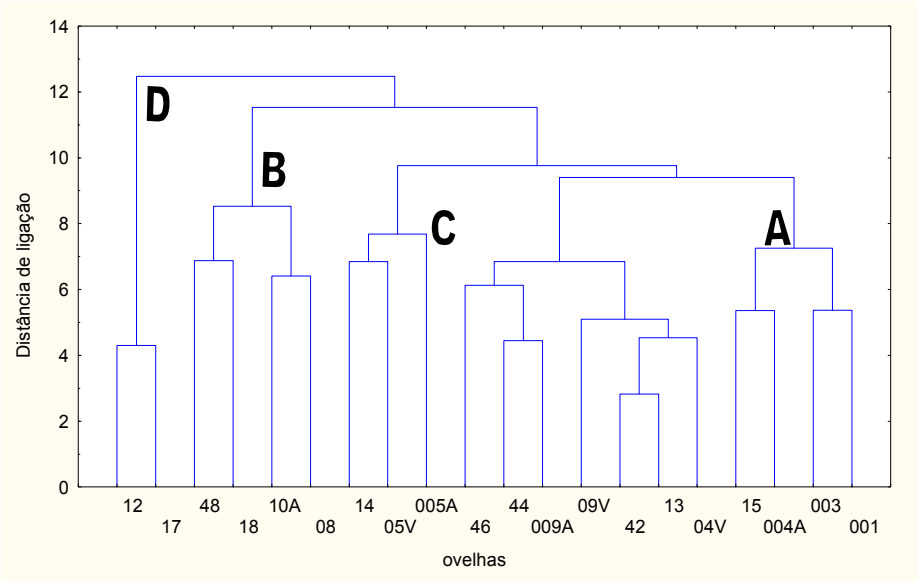
FIGURA 2 – MÉDIAS DAS TEMPERATURAS MÁXIMAS, MÉDIAS E MÍNIMAS POR MÊS NA CIDADE DE CURITIBA, NO PERÍODO DE JUNHO DE 1998 A JUNHO DE 1999.



FONTE: SIMEPAR, 2001

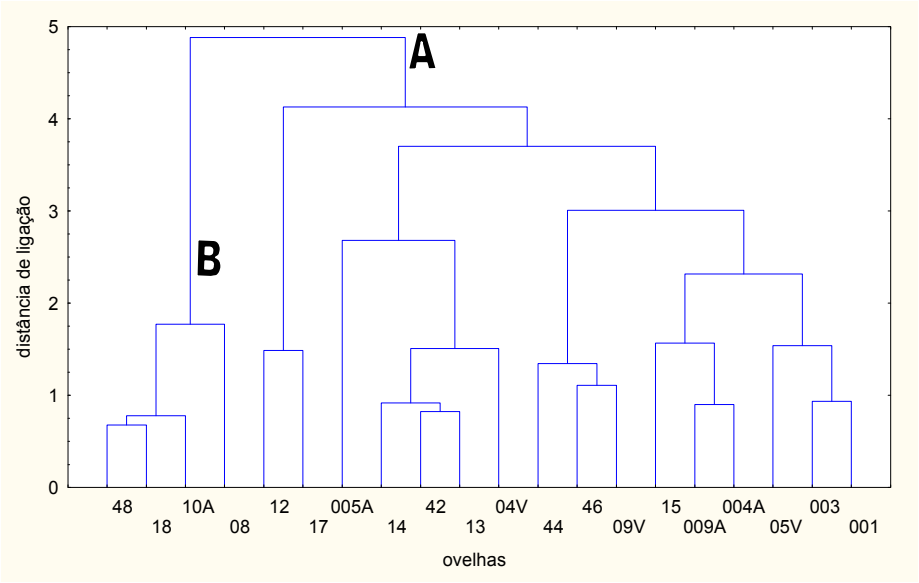
ANEXO 3 – HIPÓTESES DE SELEÇÃO DE OVELHAS RESISTENETES OU SUSCEPTÍVEIS À VERMINOSE GASTRINTESTINAL COM BASE EM MAIS DE UM MARCADOR

FIGURA 1 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE CONTAGENS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES, EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IgE E IgG ANTI – *Haemonchus contortus* OBTIDOS DE TODAS AS COLETAS DAS OVELHAS, REALIZADAS DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999



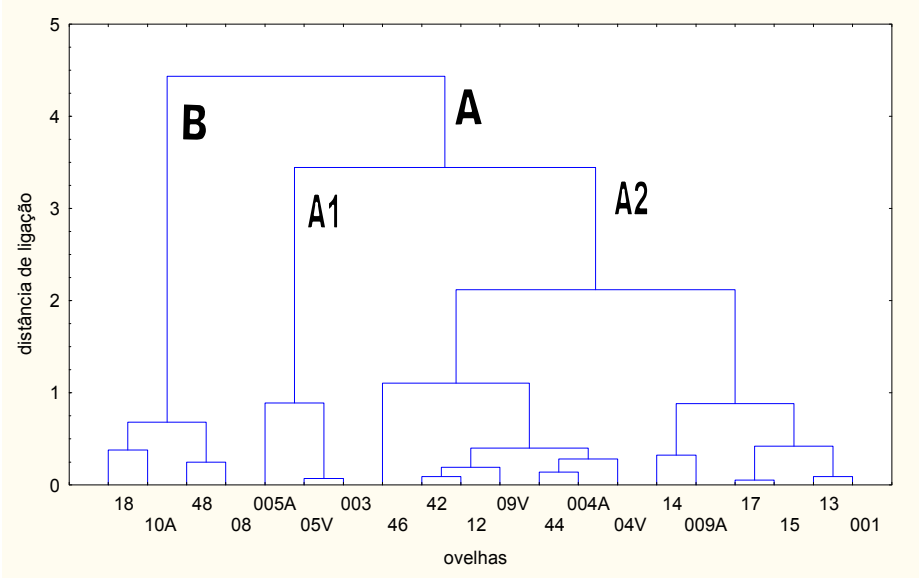
NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

FIGURA 2 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES, EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IgE E IgG ANTI – *Haemonchus contortus* OBTIDAS DA SEXTA COLETA DAS OVELHAS, REALIZADA EM 30 DE MARÇO 1999



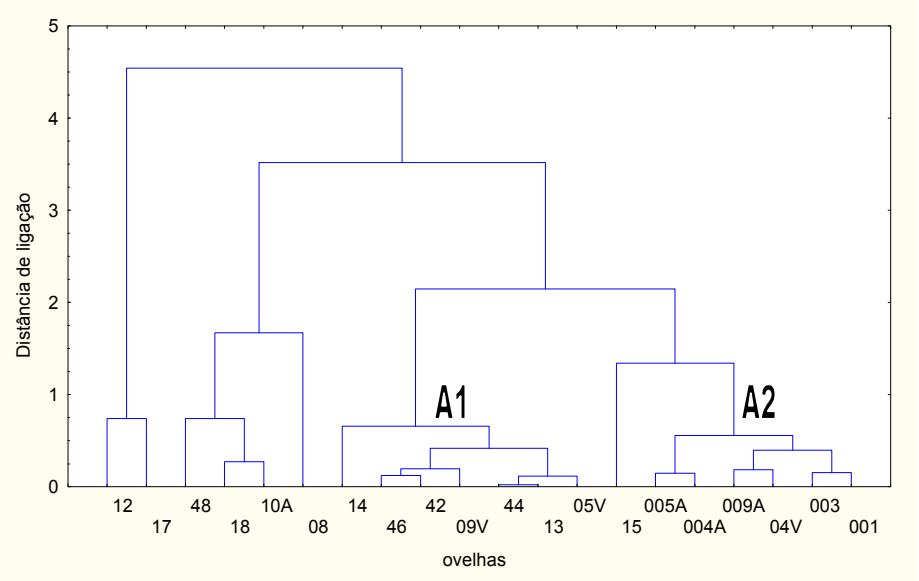
NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

FIGURA 3 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE CONTAGEM DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES E EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS OBTIDOS NA SEXTA COLETA DAS OVELHAS, REALIZADA EM 30 DE MARÇO 1999



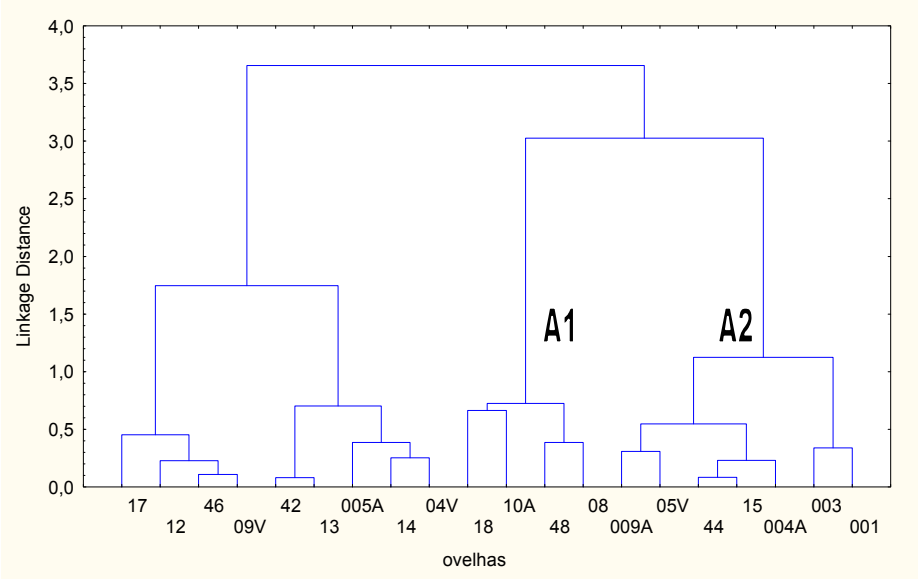
NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

FIGURA 4 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE CONTAGEM DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES E IgE ANTI – *Haemonchus contortus* OBTIDOS NA SEXTA COLETA DAS OVELHAS, REALIZADA EM 30 DE MARÇO 1999



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

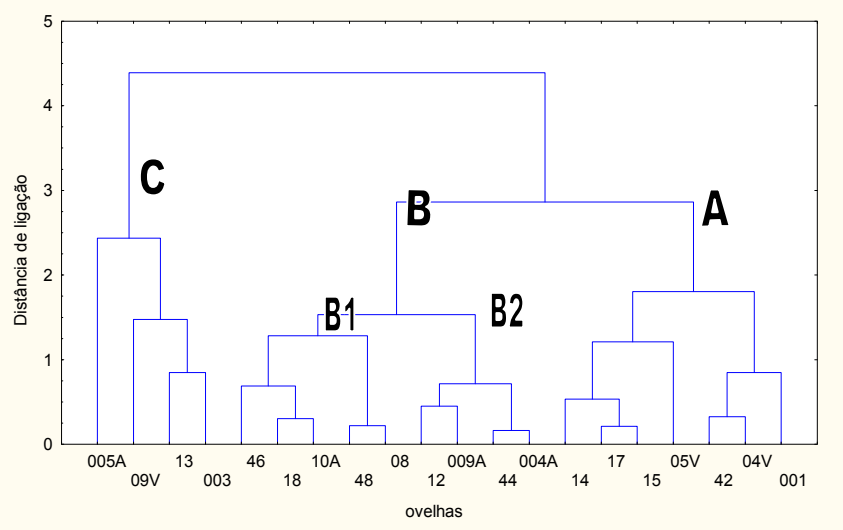
FIGURA 5 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE CONTAGENS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES E IgG ANTI – *Haemonchus contortus* OBTIDAS NA SEXTA COLETA DAS OVELHAS, REALIZADA EM 30 DE MARÇO 1999



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

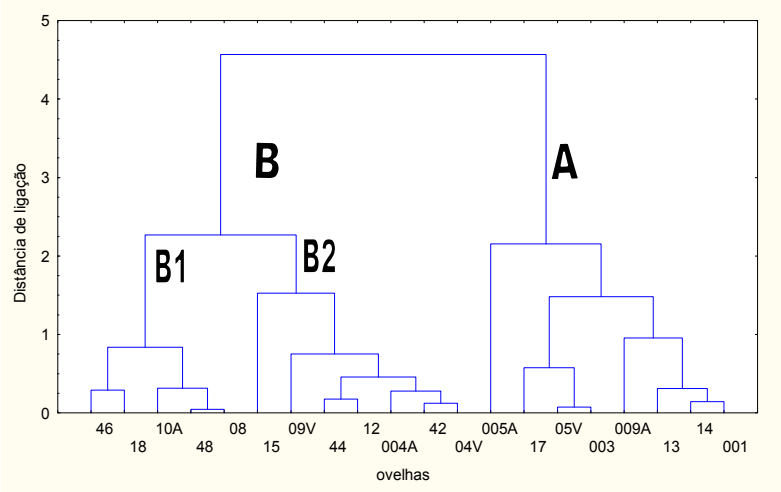
ANEXO 4 – HIPÓTESES DE SELEÇÃO DE INDIRETA DE OVELHAS RESISTENETES OU SUSCEPTÍVEIS À VERMINOSE GASTRINTESTINAL

FIGURA 1 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE CONTAGENS DE EOSINÓFILOS POR MM^3 DE SANGUE OBTIDAS NA SEXTA E SÉTIMA COLETA DAS OVELHAS, REALIZADAS EM 30 DE MARÇO E 27 DE ABRIL DE 1999, RESPECTIVAMENTE



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

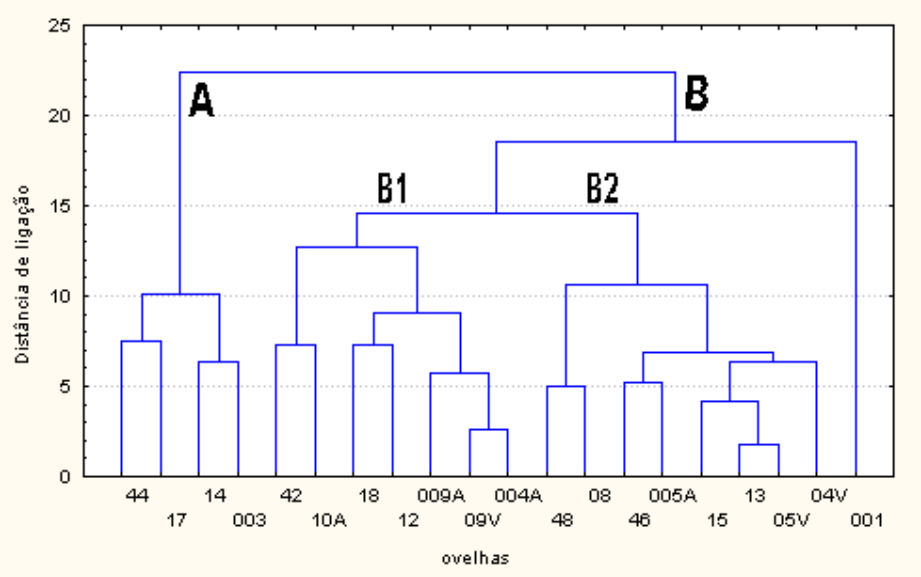
FIGURA 2 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE CONTAGENS DE EOSINÓFILOS POR MM^3 DE SANGUE OBTIDOS NA QUINTA E SEXTA COLETA DAS OVELHAS, REALIZADAS EM 02 E EM 30 DE MARÇO DE 1999, RESPECTIVAMENTE



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

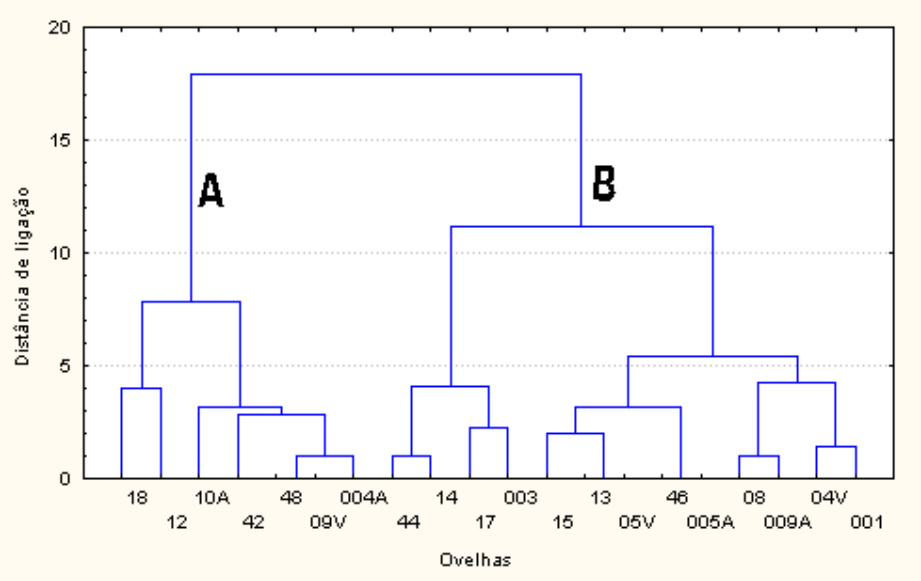
ANEXO 5 – HIPÓTESES DE SELEÇÃO DE OVELHAS RESILIENTES OU SUSCEPTÍVEIS À VERMINOSE GASTRINTESTINAL

FIGURA 1 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE HEMATÓCRITO OBTIDOS DE TODAS AS COLETAS DE SANGUE DAS OVELHAS, REALIZADAS DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

FIGURA 2 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE HEMATÓCRITO DAS OVELHAS NA COLETAS DE 30 DE MARÇO E 27 DE ABRIL DE 1999



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

ANEXO 6 – HIPÓTESES DE SELEÇÃO DE CORDEIROS RESISTENETES OU SUSCEPTÍVEIS À VERMINOSE GASTRINTESTINAL, BASEADAS NO MARCADOR PARASITOLÓGICO

FIGURA 1 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES DA QUINTA COLETA DOS CORDEIROS, REALIZADA EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998

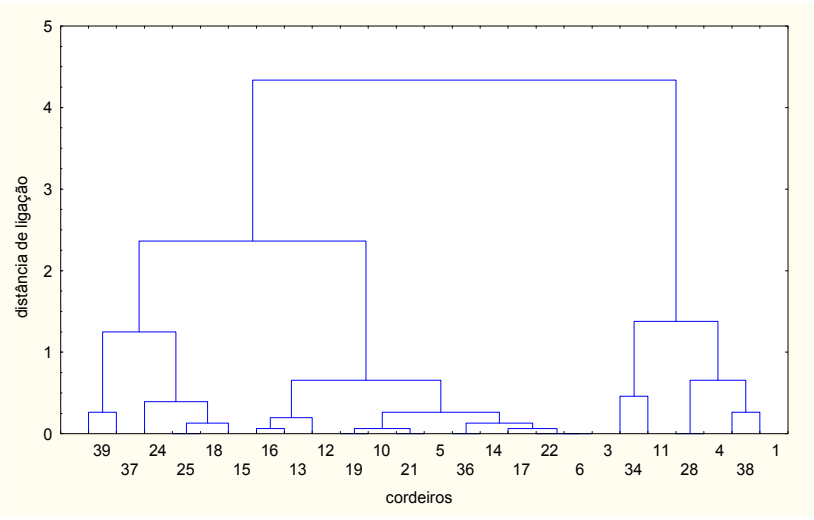
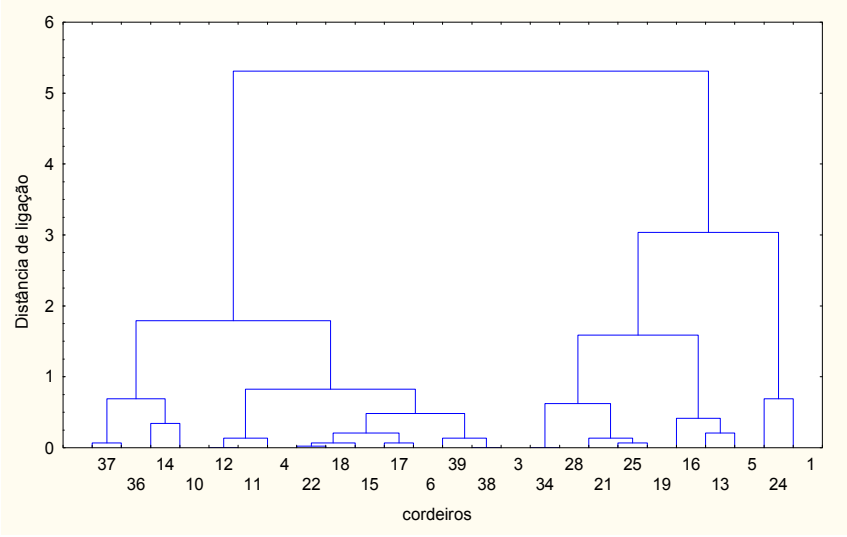
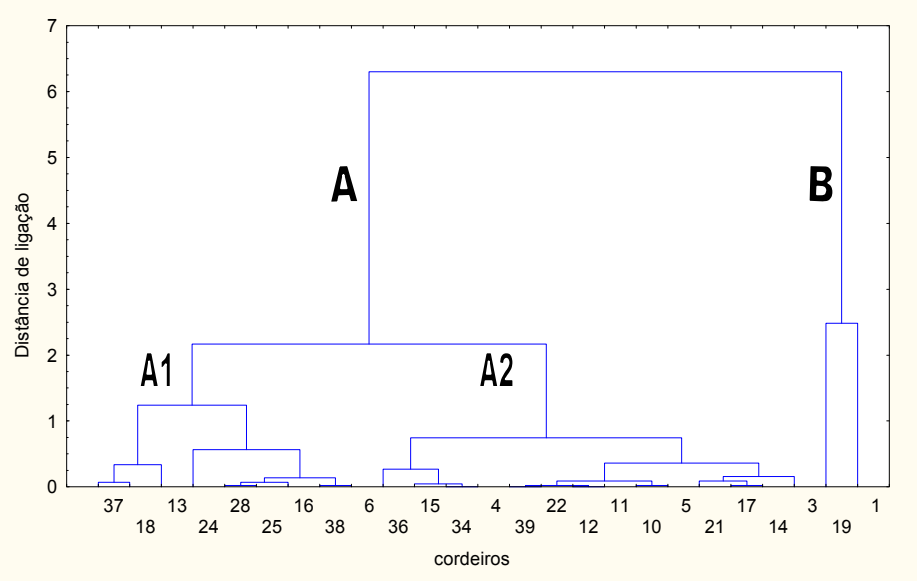


FIGURA 2 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES DA DÉCIMA COLETA DOS CORDEIROS, REALIZADA EM 09 DE FEVEREIRO DE 1999



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

FIGURA 3 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES DA 14.ª COLETA DOS CORDEIROS, REALIZADA EM 04 DE MAIO DE 1999



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana