

CRISTINA SANTOS SOTOMAIOR

**ESTUDO DE CARACTERES QUE POSSAM AUXILIAR NA  
IDENTIFICAÇÃO DE OVINOS RESISTENTES E  
SUSCEPTÍVEIS AOS HELMINTOS GASTRINTESTINAIS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de concentração: Patologia Veterinária. Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanete Thomaz Soccol

CURITIBA

1997

A COMISSÃO EXAMINADORA, ABAIXO ASSINADA,

APROVA A TESE

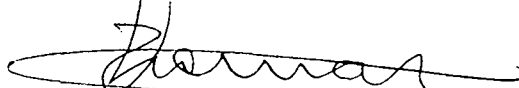
**ESTUDO DE CARACTERES QUE POSSAM AUXILIAR  
NA IDENTIFICAÇÃO DE OVINOS RESISTENTES E  
SUSCEPTÍVEIS AOS HELMINTOS  
GASTRINTESTINAIS**

ELABORADA PELA

Médica Veterinária

**CRISTINA SANTOS SOTOMAIOR**

COMISSÃO EXAMINADORA:



**PROFa. DRa. VANETE THOMAZ SOCCOL - UFPR  
PRESIDENTE/ORIENTADORA**



**PROF. DR. FLÁVIO ECHEVARRIA - EMBRAPA/RS  
MEMBRO EFETIVO**



**PROF. DR. ENNIO LUZ - UFPR  
MEMBRO EFETIVO**

CURITIBA

1997

Aos meus pais, NEWTON e RUTH, à minha  
irmã VANESSA e à minha amiga VIVIANE,  
que, incondicionalmente, sempre me  
compreenderam e apoiaram, dedico este  
trabalho, com carinho.

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanete Thomaz Soccol, pela orientação e exemplo de dedicação, competência e amor à pesquisa.

À direção do Passeio Público, órgão da Prefeitura Municipal de Curitiba e, em especial, à Médica Veterinária Ana Silvia Fischer, pela cessão dos animais utilizados neste experimento.

Aos pastores das ovelhas dos Parques Náutico e Barigüi, pela inestimável ajuda no manejo com os animais.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV), nas pessoas da Prof. Clotilde de Lourdes Branco Germiniani e do Prof. Metry Bacila, pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional, científico e cultural.

Às funcionárias do CPGCV, Deleuse Cherobim e Tânia Mara Schrank, pela atenção e serviços prestados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida.

Ao pessoal do Laboratório de Estatística, Lara Hoffmann Xavier, Eduardo Bolicenha Simm, Edson Vidal e Paulo Cezar Galvão Pinto, pelas análises estatísticas.

À Prof. Rosângela Dittrich e à tecnóloga Nara, do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário, pelo uso do laboratório e pelos auxílios técnicos.

Às Médicas Veterinárias da SEAB (Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Paraná) Maria do Carmo Pessoa Silva e Maria Auxiliadora da Fonseca Lopes, pelo auxílio na análise dos dados.

À CAPRIPAR (Associação dos Caprinocultores do Paraná) e AVEPER (Associação dos Médicos Veterinários de Pequenos Ruminantes do Paraná) pelo empréstimo do microscópio, que tornou possível a realização de parte dos experimentos.

A todos do Laboratório de Parasitologia Veterinária, técnicos, alunos e professores, pelo incentivo e ajuda. Em especial, à Prof. Edilene Alcântara de Castro, pela correção e sugestões para a redação desta tese.

À Prof. Eni Bompeixe, pela leitura crítica desta tese.

Aos meus pais, pelo apoio, carinho e compreensão.

À minha irmã Vanessa Sotomaior, por ser sempre um alento às minhas aflições, uma luz nos momentos de indecisão e, sobretudo, um exemplo de cientista, amiga e irmã.

À amiga Viviane Milczewski, pela ajuda e companheirismo em todos os momentos, e, principalmente, pela amizade. E por ser a única, além de mim mesma, que poderia contar toda a história desta tese.

Aos amigos da Pós-Graduação e, em especial, ao amigo Samuel Pereira Brito, que deixou, entre nós, a alegria de viver e a confiança de que tudo sempre é possível.

Aos amigos e colegas Felipe Pohl de Souza, Ivan de Barros Filho e Elza Maria Galvão Ciffoni, pelo apoio, companheirismo, e por acreditaram no futuro da Medicina de Pequenos Ruminantes.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xii
<b>RESUMO</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	08
2.1 OBJETIVO GERAL.....	08
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	08
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	09
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	10
4.1 ANIMAIS.....	10
4.2 METODOLOGIA DAS COLHEITAS DE FEZES E SANGUE.....	11
4.2.1 Primeira etapa: experimentos realizados com as ovelhas.....	11
4.2.1.1 Colheita de fezes das ovelhas.....	11
4.2.1.2 Colheita de sangue das ovelhas.....	12

4.2.2 Segunda etapa: experimentos realizados com os cordeiros.....	13
4.2.2.1 Colheita de fezes dos cordeiros.....	13
4.2.2.2 Colheita de sangue dos cordeiros.....	13
4.3 EXAMES PARASITOLÓGICOS.....	13
4.3.1 Exame de fezes.....	13
4.3.2 Cultura de larvas.....	14
4.4 DETERMINAÇÃO DO TIPO DE HEMOGLOBINA.....	14
4.4.1 Preparação da solução tampão.....	15
4.4.2 Preparação das amostras de sangue.....	16
4.4.3 Preparação do gel.....	16
4.4.4 Depósito das amostras de hemoglobina.....	17
4.4.5 Migração eletroforética.....	17
4.4.6 Coloração.....	18
4.5 DETERMINAÇÃO DOS VALORES HEMATOLÓGICOS.....	18
4.5.1 Hematócrito.....	19
4.5.2 Concentração de hemoglobina.....	19
4.6 CONTAGEM DE EOSINÓFILOS.....	21
4.7 METODOLOGIA PARA IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS AOS PARASITAS GASTRINTESTINAIS.....	22
4.7.1 Seleção baseada na contagem de ovos por grama de fezes (OPG).....	22
4.7.1.1 Hipóteses baseadas no OPG para a identificação e seleção das ovelhas..	23
4.7.1.2 Hipóteses baseadas no OPG para a identificação e seleção dos cordeiros	24
4.7.2 Análise de Cluster e de K-médias.....	24
4.7.2.1 Hipóteses baseadas na análise de Cluster e de K-médias para a identificação e seleção das ovelhas.....	25
4.7.2.2 Hipóteses baseadas na análise de Cluster e de K-médias para a identificação e seleção dos cordeiros .....	26
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
5.1 EXAMES PARASITOLÓGICOS.....	28
5.1.1 Ovelhas.....	28
5.1.2 Cordeiros.....	35
5.1.3 Resultados obtidos para as ovelhas nas 05 hipóteses propostas no item 4.7.1.1.....	43
5.1.4 Resultados obtidos para os cordeiros nas 05 hipóteses propostas no item 4.7.1.2.....	49
5.2 TIPO DE HEMOGLOBINA.....	58
5.3 HEMATÓCRITO.....	60
5.3.1 Ovelhas.....	60
5.3.2 Cordeiros.....	64
5.4 CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA.....	65
5.4.1 Ovelhas.....	65
5.4.2 Cordeiros.....	68
5.5 CONTAGEM DE EOSINÓFILOS.....	69
5.5.1 Ovelhas.....	69
5.5.2 Cordeiros.....	70
5.6. ANÁLISES DE CLUSTER E DE K-MÉDIAS.....	79
5.6.1 Ovelhas.....	79
5.6.2 Cordeiros.....	87
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	98
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	100

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Frequência das diferentes contagens de ovos de <i>estrongilídeos</i> das ovelhas, considerando todos os exames realizados.....	29
Tabela 02 - Frequência das diferentes contagens de ovos de <i>Nematodirus sp</i> das ovelhas, considerando todos os exames realizados.....	30
Tabela 03 - Frequência das diferentes contagens de ovos de <i>Strongyloides papillosus</i> das ovelhas, considerando todos os exames realizados.....	30
Tabela 04 - Frequência da presença ou ausência de ovos de <i>Moniezia sp</i> das ovelhas, considerando todos os exames realizados.....	31
Tabela 05 - Frequência da presença ou ausência de oocistos <i>Eimeria sp</i> das ovelhas, considerando todos os exames realizados.....	31
Tabela 06 - Média de OPG das 64 ovelhas em cada colheita de fezes realizada...	32
Tabela 07 - Média do OPG dos 77 cordeiros, segundo nº da colheita.....	36
Tabela 08 - Frequência das diferentes contagens de ovos de <i>estrongilídeos</i> dos cordeiros, considerando as três primeiras colheitas.....	37
Tabela 09 - Frequência das diferentes contagens de ovos de <i>Nematodirus sp</i> dos cordeiros, considerando as três primeiras colheitas.....	37
Tabela 10 - Frequência das diferentes contagens de ovos de <i>Strongyloides papillosus</i> dos cordeiros, considerando as três primeiras colheitas.....	38

Tabela 11 - Frequência da presença ou ausência de ovos de <i>Moniezia sp</i> dos cordeiros, considerando as três primeiras colheitas.....	38
Tabela 12 - Frequência da presença ou ausência de oocistos <i>Eimeria sp</i> dos cordeiros, considerando as três primeiras colheitas.....	39
Tabela 13 - Ovelhas que apresentaram o fenômeno de cura espontânea.....	40
Tabela 14 - Cordeiros que apresentaram o fenômeno de cura espontânea.....	40
Tabela 15 - Comparação entre a percentagem de ovelhas consideradas resistentes e susceptíveis pelas hipóteses 01, 02, 03, 04 e 05.....	44
Tabela 16 - Ovelhas consideradas resistentes, de acordo com as diferentes hipóteses propostas.....	46
Tabela 17 - Ovelhas consideradas susceptíveis, de acordo com as diferentes hipóteses propostas.....	47
Tabela 18 - Média do OPG das ovelhas classificadas como resistentes (R) ou susceptíveis (S), nas últimas 04 colheitas de fezes, e segundo as diferentes hipóteses de classificação.....	48
Tabela 19 - Média do OPG dos cordeiros classificados como resistentes (R) ou susceptíveis (S), em cada colheita de fezes, e segundo as diferentes hipóteses de classificação.....	50
Tabela 20 - Comparação entre a percentagem de cordeiros considerados resistentes e susceptíveis pelas hipóteses 01, 02, 03, 04 e 05.....	50
Tabela 21 - Cordeiros considerados resistentes, de acordo com as diferentes hipóteses propostas.....	53

Tabela 22 - Cordeiros considerados susceptíveis, de acordo com as diferentes hipóteses propostas.....	54
Tabela 23 - Frequência dos tipos de hemoglobina das ovelhas e cordeiros.....	58
Tabela 24 - Percentagem de ovelhas e cordeiros AB e AA em relação ao nº de animais considerados resistentes ou susceptíveis em cada hipótese.....	59
Tabela 25 - Média do hematócrito (dado em %) das 64 ovelhas, segundo nº da colheita.....	61
Tabela 26 - Média do hematócrito (em %) das ovelhas classificadas como resistentes (R) ou susceptíveis (S), em cada colheita de sangue, e segundo as diferentes hipóteses de classificação.....	63
Tabela 27 - Média do hematócrito (dado em %) dos 77 cordeiros, segundo nº da colheita.....	64
Tabela 28 - Média do hematócrito (em %) dos cordeiros classificados como resistentes (R) ou susceptíveis (S), em cada colheita de sangue, e segundo as diferentes hipóteses de classificação.....	65
Tabela 29 - Média da concentração de Hb (dada em g/dl) das 64 ovelhas, segundo nº da colheita.....	66
Tabela 30 - Média da concentração de hemoglobina (g/dl) das ovelhas classificadas como resistentes (R) ou susceptíveis (S), em cada colheita de sangue, e segundo as diferentes hipóteses de classificação.....	67

Tabela 31 - Média da concentração de Hb (dada em g/dl) dos 77 cordeiros, segundo nº da colheita.....	68
Tabela 32 - Média da concentração de hemoglobina (g/dl) dos cordeiros classificados como resistentes (R) ou susceptíveis (S), em cada colheita de sangue, e segundo as diferentes hipóteses de classificação.....	69
Tabela 33 - Média da contagem de eosinófilos (em eosinófilos/mm <sup>3</sup> ) das 64 ovelhas, segundo nº da colheita.....	70
Tabela 34 - Média da contagem de eosinófilos (em eosinófilos/mm <sup>3</sup> ) dos 77 cordeiros, segundo nº da colheita.....	71
Tabela 35 - Média do número de eosinófilos (/mm <sup>3</sup> ) das ovelhas classificadas como resistentes (R) ou susceptíveis (S), em cada colheita de sangue, e segundo as diferentes hipóteses de classificação.....	75
Tabela 36 - Média do número de eosinófilos (/mm <sup>3</sup> ) dos cordeiros classificados como resistentes (R) ou susceptíveis (S), em cada colheita de sangue, e segundo as diferentes hipóteses de classificação.....	76

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01 - Média de OPG das 64 ovelhas durante as 16 semanas do experimento, analisando-a em relação aos dados meteorológicos de precipitação pluviométrica (em mm<sup>3</sup>/dia) e temperatura (em graus Celcius). Os dados de precipitação pluviométrica e temperatura, de cada ponto, referem-se à média dos dias anteriores desde o último ponto. Dados meteorológicos fornecidos pelo SIMEPAR..... 33
- Figura 02 - Média de OPG das ovelhas, em relação ao parto, sendo -6 a -1 as semanas pré-parto, 0 a semana do parto e 1 a 16 as semana pós-parto..... 34
- Figura 03 - Média de OPG das 64 ovelhas nas últimas cinco semanas do experimento..... 42
- Figura 04 - Histograma da média dos valores de hematócrito das 4 colheitas de cada ovelha. Os valores foram arredondados para permitir melhor visualização dos dados..... 62
- Figura 05 - Curva da contagem de eosinófilos e dos valores de OPG de uma ovelha classificada no grupo 01, onde existe uma correlação inversa entre número de eosinófilos e OPG..... 72

Figura 06 - Curva da contagem de eosinófilos e dos valores de OPG de uma ovelha classificada no grupo 02, onde se observa uma diminuição do número de eosinófilos e um aumento de OPG..... 72

Figura 07 - Curva da contagem de eosinófilos e dos valores de OPG de uma ovelha classificada no grupo 03, onde ocorre aumento concomitante do número de eosinófilos e OPG..... 73

Figura 08 - Curva da contagem de eosinófilos e dos valores de OPG de uma ovelha classificada no grupo 04, onde existe uma correlação direta entre número de eosinófilos e OPG..... 74

Figura 09 - Dendograma construído segundo método hierárquico ascendente, utilizando a distância euclidiana a linhas completas. Foram utilizados os dados da média de OPG de todas as colheitas de fezes e das médias dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos de todas as colheitas de sangue das ovelhas..... 81

Figura 10 - Dendograma construído segundo método hierárquico ascendente, utilizando a distância euclidiana a linhas completas. Foram utilizados os dados da média de OPG das últimas cinco colheitas de fezes e das médias dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos da 3ª e 4ª colheitas de sangue das ovelhas..... 83

Figura 11 - Dendograma construído segundo método hierárquico ascendente, utilizando a distância euclidiana a linhas completas. Foram utilizados os dados de OPG da 16ª colheita de fezes e dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos da 4ª colheita de sangue das ovelhas..... 86

Figura 12 - Dendograma construído segundo método hierárquico ascendente, utilizando a distância euclidiana a linhas completas. Foram utilizados os dados da média de OPG de todas as colheitas de fezes e das médias dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos de todas as colheitas de sangue dos cordeiros..... 88

Figura 13 - Dendograma construído segundo método hierárquico ascendente, utilizando a distância euclidiana a linhas completas. Foram utilizados os dados da média de OPG das três primeiras colheitas de fezes e das médias dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos das três primeiras colheitas de sangue dos cordeiros..... 91

Figura 14 - Dendograma construído segundo método hierárquico ascendente, utilizando a distância euclidiana a linhas completas. Foram utilizados os dados do valor de OPG da 3ª colheita de fezes e dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos da 3ª colheita de sangue dos cordeiros..... 94

## RESUMO

Com o objetivo de identificar os animais resistentes e susceptíveis aos helmintos gastrintestinais, foi estudado um rebanho ovino, na região de Curitiba, formado por 64 ovelhas e 77 cordeiros. As ovelhas foram avaliadas durante 4 meses, da fase de parto até o final da lactação. Os cordeiros foram avaliados também durante 4 meses, com o início do experimento um mês após o desmame. Tanto para ovelhas como para cordeiros, foram analisados os dados de OPG (ovos por grama de fezes), número de eosinófilos sangüíneos, hematócrito, concentração de hemoglobina e tipo de hemoglobina. A primeira metodologia, empregada para a identificação e seleção dos animais, foi baseada somente nos valores de OPG. Para tanto, foram formuladas várias hipóteses, onde eram usados diferentes critérios quanto ao número de avaliações de OPG e quanto ao nível de corte. Para as ovelhas, selecionou-se, em média, 20% do rebanho como resistente e 18% como susceptível. A média de OPG das ovelhas resistentes e susceptíveis, na última avaliação, foi de 386,59 OPG e 7891,90 OPG, respectivamente. Houve diferença significativa entre os dois grupos quanto aos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e número de eosinófilos. Quanto aos cordeiros, 19,5% dos animais foram considerados resistentes, com média de OPG, na terceira avaliação, de 390,84 OPG; e 18%, susceptíveis, com média de 8528,76 OPG. Também houve diferença significativa entre os grupos dos cordeiros resistentes e susceptíveis, quanto aos valores de hematócrito e concentração de hemoglobina. Quanto ao número de eosinófilos, também houve diferença, porém não significativa estatisticamente. No presente experimento, não foi possível estabelecer relação entre o tipo de hemoglobina e resistência aos parasitas. Outra metodologia empregada para a seleção dos animais resistentes e susceptíveis, foram as análises de Cluster e K-médias. Para estas análises classificatórias, foram utilizados todos os caracteres estudados (OPG, eosinófilos, hematócrito e concentração de hemoglobina). Estas análises confirmaram os resultados obtidos pelo método anterior e indicam que o nível de corte de OPG utilizado poderia ser maior. Portanto, a inclusão de análises como a de Cluster, na seleção dos animais, permitiria o estabelecimento de níveis de corte mais apropriados para o grau de infecção e, conseqüentemente, níveis de contaminação de pastagens, do Paraná. A grande contribuição da identificação de animais resistentes e susceptíveis para a ovinocultura paranaense seria no sentido de possibilitar a eliminação dos animais altamente susceptíveis, por serem estes os grandes responsáveis pelos altos índices de contaminação das pastagens.

## ABSTRACT

In order to identify sheep that are resistant or susceptible to gastrointestinal nematodes, one flock of 64 ewes and 77 lambs was monitored, in Paraná State, Brazil. The ewes were studied during 4 months, covering the lactation period while the lambs started to be analyzed one month after weaning, also for 4 months. The parameters examined were: faecal egg counts (epg), blood eosinophils counts, packed cell volume (PCV), haemoglobin concentration and haemoglobin type. Two methods were used to identify the resistant and susceptible animals. The first one was based only on the faecal egg counts. Different hypothesis were formulated, using different numbers of observations and different levels of cut-off. An average of 20% of the ewes were considered resistant, whereas 18% were considered susceptible. The mean epg of resistant and susceptible ewes, in the last faecal egg count, was 386,59 epg and 7891,90 epg, respectively. When the results of eosinophils, PCV and haemoglobin concentration of the two groups (resistant and susceptible) were compared, there was a significant difference between them. In the group of lambs, 19,5% were considered resistant, with a mean epg of 390,84 epg; and 18%, were considered susceptible, having a mean of 8528,76 epg. Again there was a significant difference between resistant and susceptible lambs when PCV and haemoglobin concentration were considered. The eosinophils also showed a difference, but it was not statistically significant. Under these experimental conditions, it was not possible to establish any kind of relationship between haemoglobin type and resistance to helminths. The second method used to select resistant and susceptible sheep was based on the cluster analysis. For this kind of analysis all traits studied were considered (epg, eosinophils, PCV, haemoglobin concentration). The results obtained with this method confirmed the other one. In some cases, this analysis considered more animals in each group, indicating that the cut-off used in the other method could be greater. So, this kind of methodology could help to establish the cut off that would be more adapted to the high levels of infection of the animals in this region. The most important contribution of identifying the resistant and susceptible animals for the sheep production in the Paraná State, would probably be the possibility of culling or housing the highly susceptible sheep, because they are the great responsible for the high level of pasture contamination.

## 1 INTRODUÇÃO

Os parasitas gastrintestinais são uma das principais causas de perdas na produtividade dos ovinos. Em países onde a ovinocultura tem papel essencial na economia, estas perdas podem ser muito importantes, justificando o interesse e a relevância de estudos e pesquisas nesta área (BECK, MOIR e MEPPEM, 1985; ALBERS *et al.*, 1987; DAWKINS *et al.*, 1988; BEKELE, KASALI e REGE, 1992).

O Estado do Paraná possui um rebanho de ovinos de aproximadamente 630.500 cabeças (SEAB, 1997). Destas, 136.600 são provenientes de importações do Rio Grande do Sul e 50.400 do Uruguai, realizadas pelo Governo Estadual, de 1988 a 1994, num total de 187.000 matrizes. Isto proporcionou um aumento abrupto no plantel paranaense, elevando a importância econômica e social desta criação. Todavia, em virtude da incipiente tecnologia nesta área no Paraná, os índices de produtividade da ovinocultura, em geral, estão abaixo do esperado.

Sem dúvida, um dos grandes motivos desses baixos índices são as parasitoses gastrintestinais. Quando associadas à subnutrição, erros de manejo e ineficiência dos anti-helmínticos, estas parasitoses podem se converter em fatores limitantes da produção ovina. Ainda que não se tenha dados oficiais sobre a porcentagem de perdas, na ovinocultura paranaense, estima-se que estas sejam altas, por algumas características peculiares da criação neste Estado. Normalmente, os ovinos são criados em áreas pequenas e com superlotação, fazendo com que o alto índice de larvas nas pastagens seja uma fonte de contaminação constante. Os ovinocultores, tentando controlar esta situação, passaram a utilizar esquemas de

desverminação múltipla (30 em 30 dias) ou supressiva (15 em 15 dias). O resultado destes esquemas foi a resistência dos parasitas aos diferentes princípios ativos. A rapidez do desenvolvimento da resistência a todos os princípios, no Estado do Paraná, é alarmante (SOCCOL *et al.*, 1996).

O problema de resistência dos nematóides aos anti-helmínticos é também uma preocupação mundial (WALLER, 1994). Percebendo uma iminente falência do sistema de controle de verminose, baseado exclusivamente em anti-helmínticos, pesquisadores do mundo todo têm buscado outras alternativas (ALBERS *et al.*, 1987; DAWKINS *et al.*, 1988; GILL, 1991; BUDDLE *et al.*, 1992; PERNTHANER *et al.*, 1995). Dentre elas, destaca-se a busca de animais geneticamente mais resistentes aos parasitas gastrintestinais. Pesquisas na área de animais geneticamente superiores têm sido feitas para diferentes doenças. Observou-se que estes animais, além de serem mais resistentes, servem também como barreira sanitária, não permitindo a proliferação de doenças. No caso das parasitoses, estes animais diminuiriam, consideravelmente, a contaminação dos pastos. As doenças de controle simples foram as primeiras a contar com a identificação de sua base genética, como é o caso da Doença de Bent-limb ou Bowie leg, controlada por um gene autossômico recessivo (MILLOT, 1986). Nos casos em que há participação de vários genes e uma influência ambiental, torna-se mais complexo o reconhecimento e determinação da base genética.

Em ovinos, a susceptibilidade às verminoses gastrintestinais tem sido estudada há muito tempo. GREGORY, MILLER e STEWART (1940) apresentaram evidências que, diferentes raças de ovinos, teriam níveis diferentes de susceptibilidade à infecções por *Ostertagia circumcincta*. Estes autores observaram,

também, grande variabilidade entre indivíduos de uma mesma raça. Isto os levou a sugerir que a resistência e susceptibilidade encontradas, poderiam ser dependentes da constituição genética dos animais, apesar da influência dos fatores ambientais. Desta forma, cogitaram a aplicação de programas genéticos para o desenvolvimento de linhagens resistentes dentro de cada raça.

Inicialmente, WHITLOCK e MADSEN (1958), analisando os animais descendentes de um carneiro ("Violet") altamente resistente à verminose, sugeriram que essa resistência poderia ser determinada por uma dominância simples, cujos alelos, em condição de homozigose, definiriam a susceptibilidade. Os estudos, na área de seleção de animais mais resistentes à verminose, intensificaram-se desde que foi confirmada a base genética da resistência aos parasitas gastrintestinais (ALBERS *et al.*, 1987, GILL, 1991). Neste sentido, pesquisas têm sido realizadas com o intuito de identificar parâmetros do hospedeiro que reflitam sua habilidade em resistir ao desafio dos nematóides, servindo como "marcadores genéticos" e permitindo um melhor entendimento do mecanismo de desenvolvimento da resistência (BUDDLE *et al.*, 1992).

ALBERS *et al.* (1987) consideram como resistência aos parasitas gastrintestinais, a habilidade dos ovinos em impedir o estabelecimento e/ou subsequente desenvolvimento da infecção parasitária. Para isso, a quantificação da carga parasitária seria a forma mais direta de se avaliar a resposta do hospedeiro frente à infecção (KASSAI *et al.*, 1990). Porém, como esta quantificação implica em morte do animal, outros parâmetros têm sido estudados como alternativa para a identificação, e posterior seleção, dos animais mais resistentes aos parasitas gastrintestinais. De qualquer forma, a utilidade de determinado método para a

identificação da resistência depende da sua relação com a carga parasitária (STEAR *et al.*, 1995). Muitos "marcadores genéticos" foram e continuam sendo avaliados, sempre com o objetivo de se conseguir identificar estes animais de uma forma simples, barata e eficiente.

Um dos primeiros parâmetros estudados e associados à resistência foi o tipo de hemoglobina. Podem ser identificados três tipos de hemoglobina nos ovinos: AA, AB e BB, determinados geneticamente por dois alelos (HARRIS e WARREN, 1955; EVANS *et al.*, 1956; HUISMAN, VLIET e SEBENS, 1958). Muitos trabalhos demonstram a associação do tipo de hemoglobina à maior resistência aos parasitas (EVANS, BLUNT e SOUTHCOTT, 1963; JILEK e BRADLEY, 1969; ALLONBY e URQUHART, 1976; ALTAIF e DARGIE, 1978 a, b; PRESTON e ALLONBY, 1979; CHIMINAZZO *et al.*, 1996). Estes autores sugerem que, dentro de uma mesma raça, ovinos com genótipo AA são mais resistentes à infecção por helmintos que aqueles de genótipo AB ou BB. Estes animais apresentariam menor contagem de ovos de helmintos nas fezes, menor número e tamanho de parasitas adultos, assim como, maiores valores de hematócrito e concentração de hemoglobina.

Outros parâmetros foram usados para separar os grupos de ovinos em resistentes ou susceptíveis. Alguns trabalhos basearam-se na média da concentração de hemoglobina (JILEK e BRADLEY, 1969). Outros, no entanto, fundamentaram-se no declínio dos valores de hematócrito, após infecção experimental com larvas de *Haemonchus contortus* (WOOLASTON, BARGER e PIPER, 1990). ALBERS *et al.* (1987) sugerem que a seleção, baseada no hematócrito, poderia ser uma alternativa para a identificação dos animais mais resistentes, devido à alta correlação genética entre a contagem de ovos nas fezes e

o valor do hematócrito. Este mesmo autor, em 1990, relata que o hematócrito foi a melhor forma de prever os efeitos do *H. contortus* na produtividade de cordeiros (ALBERS *et al.*, 1990).

Outra alternativa, na seleção de animais resistentes, seria a identificação de animais imunologicamente mais competentes. A resposta imunológica do hospedeiro está sob controle genético e, como consequência, a constituição genética de um indivíduo tem uma grande influência na resistência/susceptibilidade a vários agentes infecciosos (WAKELIN, 1978; DAWKINS *et al.*, 1988). DINEEN, GREGG e LASCELLES (1978) trabalharam com vacinação com larvas irradiadas de *Trichostrongylus colubriformis* e encontraram uma distribuição bimodal da contagem de parasitas, após um desafio dos animais vacinados, o que permitiu classificá-los em respondedores (“**responders**”) ou não respondedores (“**non-responders**”).

GILL (1991) sugere que a resistência genética dos ovinos ao *H. contortus* resulta da expressão de uma resposta imunológica adquirida. Os anticorpos e os mediadores celulares teriam um papel importante na determinação genética da resistência dos ovinos à haemoncose. Esta hipótese pode ser confirmada pelo desaparecimento das diferenças na resistência ao *H. contortus*, em animais tratados com imunossuppressores (PRESSON, GRAY e BURGESS, 1988; BUDDLE *et al.*, 1992).

Outro possível marcador estudado, dentro da resposta imunológica, é o eosinófilo. Como a eosinofilia está sob controle genético, muitos trabalhos têm sido realizados tentando correlacioná-la com a maior ou menor resistência aos parasitas (DAWKINS, WINDON e EAGLESON, 1989; BUDDLE *et al.*, 1992).

Os eosinófilos são importantes componentes celulares da resposta inflamatória contra os helmintos (ROTHWELL e DINEEN, 1972). Porém, seu papel contra estes parasitas ainda está indefinido (BUDDLE *et al.*, 1992). Na raça Merino, a eosinofilia sangüínea foi citada como indicadora da habilidade de cordeiros em responder à vacinação contra *T. colubriformis* e sua infecção (DAWKINS, WINDON e EAGLESON, 1989).

Atualmente, tem-se como consenso que a contagem de ovos nas fezes, em animais jovens, pode ser utilizada, com sucesso, como critério de seleção para resistência aos nematóides em ovinos (WHITLOCK, 1992). Vários trabalhos têm demonstrado que há variações no número de ovos de parasitas nas fezes dos ovinos (WINDON, DINEEN e KELLY, 1980; ALBERS *et al.*, 1987).

Diferentes esquemas de seleção, baseados na contagem de ovos nas fezes, são propostos (ALBERS *et al.*, 1987; KASSAI *et al.*, 1990; WOOLASTON, BARGER e PIPER, 1990; SRÉTER, KASSAI e TAKÁCS, 1994). Os trabalhos apresentam diferenças na metodologia, em relação a quando efetuar as avaliações, ou que nível de corte ("cut-off") de OPG deve ser utilizado, para selecionar os animais. KASSAI (1990) sugere que, devido a diferenças de fatores como raça, sexo do hospedeiro, cepa do parasita, nutrição, as características de animais resistentes ou susceptíveis devem ser identificadas para cada rebanho ou sistema de criação.

Atualmente, já se conseguiu fazer seleção de muitas linhagens, de diferentes raças, obtendo animais altamente resistentes ou susceptíveis aos diversos gêneros de parasitas gastrintestinais. Há linhagens descritas na Austrália (WOOLASTON, BARGER e PIPER, 1990), Nova Zelândia (BISSET *et al.*, 1992) e Hungria (KASSAI *et al.*, 1990).

Em países onde a pesquisa nesta área está mais avançada, já existem programas de seleção dos animais a nível comercial. É o caso da Nova Zelândia (McEWAN, 1994) e Austrália (EADY, 1997).

A seleção para a resistência ao *H. contortus*, segundo ALBERS *et al.* (1987), não teria efeitos desfavoráveis na capacidade de produção dos ovinos. E é de consenso que esta seleção traz muitas vantagens. Entre elas, diminui a necessidade de desverminações periódicas e ajuda a controlar o problema da resistência aos anti-helmínticos (ALBERS *et al.*, 1987; WOOLASTON, BARGER e PIPER, 1990; WOOLASTON 1992). E, apesar de não se ter um único gene responsável pela resistência, ganhos genéticos relativamente rápidos podem ser conseguidos com programas baseados na seleção de animais mais resistentes (WOOLASTON, BARGER e PIPER, 1990; SRÉTER, KASSAI e TAKÁCS, 1994).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa identificar, em um rebanho ovino, animais resistentes e susceptíveis aos helmintos gastrintestinais, utilizando diferentes caracteres para esta identificação.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar quais são os animais resistentes e susceptíveis aos helmintos gastrintestinais num rebanho ovino.
2. Verificar se há diferença quanto ao tipo de hemoglobina entre os animais considerados resistentes e susceptíveis.
3. Verificar se há diferença quanto aos valores de hematócrito entre os animais considerados resistentes e susceptíveis.
4. Verificar se há diferença quanto aos valores de concentração de hemoglobina entre os animais considerados resistentes e susceptíveis.
5. Verificar se há diferença quanto ao número de eosinófilos sanguíneos entre os animais considerados resistentes e susceptíveis.
6. Comparar diferentes metodologias para a identificação dos animais resistentes e susceptíveis.

### 3 JUSTIFICATIVA

A falência dos sistemas de controle de verminose baseados exclusivamente em anti-helmínticos é uma preocupação mundial, devido ao problema da resistência dos parasitas aos diferentes princípios ativos.

No Paraná, a tendência é o agravamento desta situação, porque a alta lotação, característica da ovinocultura paranaense, proporciona uma elevada contaminação de pastagens e, conseqüentemente, aumenta a necessidade de desverminações.

Faz-se necessário, portanto, buscar alternativas. E, desta forma, auxiliar o desenvolvimento da ovinocultura, permitindo um incremento da produtividade é tornando esta criação viável e rentável. A seleção de animais geneticamente resistentes aos helmintos gastrintestinais poderia ser uma dessas alternativas. Várias metodologias já foram desenvolvidas, principalmente em países ovelheiros, no sentido de identificar esses animais e, posteriormente, selecioná-los.

Porém, a utilização destas metodologias implica em se estabelecer níveis de separação, estipulando limites entre os animais considerados resistentes e os considerados susceptíveis. Estes limites, quando baseados em valores de OPG, vão depender diretamente do grau de infecção dos animais e, por conseqüência, dos índices de contaminações das pastagens. Assim sendo, não se pode simplesmente utilizar critérios preestabelecidos, sem se saber se estes valores são compatíveis com o grau de infecção dos ovinos criados no Estado do Paraná.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Os ovinos utilizados nos experimentos, descritos a seguir, pertenciam à Prefeitura Municipal de Curitiba e estavam alocados nos parques Barigüi e Náutico, nesse município. Ao todo, foram utilizadas 64 ovelhas (27 no Parque Barigüi e 37 no Parque Náutico) e 77 cordeiros, filhos dessas ovelhas (34 no Parque Barigüi e 43 no Parque Náutico). As ovelhas eram mestiças Suffolk e tinham de 2 a 6 anos.

De 17 de março a 25 de maio de 1995, as ovelhas estiveram em estação de monta. Nos primeiros 15 dias, as ovelhas foram inseminadas com sêmen de vários carneiros, provenientes de diferentes propriedades, todos da raça Suffolk. No restante do período da estação de monta, as ovelhas foram cobertas por um carneiro mestiço Suffolk. Os partos ocorrem de 10 de agosto a 28 de setembro de 1995. Em 11 de dezembro de 1995, os cordeiros foram desmamados, desverminados e transferidos de parque (os que haviam nascido no Parque Barigüi foram para o Parque Náutico e vice-versa).

Apesar de estarem divididos em dois parques, a alimentação e o manejo foram os mesmos para todos os animais. As ovelhas e os cordeiros ficavam, das 7 às 12 horas e das 13 às 17 horas, soltos nos parques, tendo à disposição um pasto formado de capim nativo. A lotação média era de 10 animais/ha. À tarde, quando eram recolhidos ao aprisco, recebiam uma pequena quantidade de concentrado (aproximadamente 100 g/cabeça).

## 4.2 METODOLOGIA DAS COLHEITAS DE FEZES E SANGUE

Os experimentos foram realizados em duas etapas:

- \* primeira, com as ovelhas, no período de agosto a dezembro de 1995;
- \* segunda, com os cordeiros, no período de janeiro a abril de 1996.

### 4.2.1 Primeira etapa: experimentos realizados com as ovelhas

Esta fase, que foi de 10 de agosto a 7 de dezembro de 1995, compreendeu o período dos nascimentos dos cordeiros até o desmame. Nesta etapa, trabalhou-se somente com as ovelhas em fase de lactação.

Todos os animais foram previamente desverminados, em 10 de julho de 1995, com 0,2 µg/kg de moxidectin\*. A razão desta escolha foi este anti-helmíntico ter apresentado 100% de redução de ovos por grama de fezes em teste previamente realizado. O objetivo desta desverminação foi iniciar o experimento com todas os animais nas mesmas condições de infecção parasitária. Estas ovelhas não foram desverminadas até o final do experimento. Somente no encerramento desta etapa, é que foi feita uma nova desverminação, usando o mesmo anti-helmíntico.

#### 4.2.1.1 Colheita de fezes das ovelhas

Durante toda esta etapa do experimento, semanalmente, eram colhidas fezes de todas as ovelhas. As colheitas eram feitas individualmente, com sacos plásticos,

\* Cydectin® - Cyanamid Química do Brasil LTDA.

diretamente da ampola retal. Após identificadas, as amostras eram acondicionadas em isopor e levadas ao laboratório, onde eram processados os exames parasitológicos (item 4.3). As colheitas de fezes eram realizadas no mesmo dia em ambos os parques. Um total de 16 colheitas foram realizadas. A primeira colheita de fezes foi feita na semana de início dos partos.

#### 4.2.1.2 Colheita de sangue das ovelhas

A cada mês, era feita uma colheita de sangue. O sangue era colhido da veia jugular externa, em tubos de vacutainer, com capacidade para 5 ml e contendo EDTA como anticoagulante. As amostras, após a colheita, eram homogeneizadas, identificadas, colocadas em isopor e levadas ao laboratório para a realização dos seguintes exames:

- a) determinação do hematócrito (item 4.5.1),
- b) determinação da concentração de hemoglobina (item 4.5.2),
- c) contagem de eosinófilos (item 4.6),
- d) determinação do tipo de hemoglobina (item 4.4).

As colheitas de sangue eram feitas primeiro nas ovelhas de um dos parques e, depois, nas do outro. Durante o experimento, um total de 4 colheitas foram realizadas, sempre respeitando o prazo de 30 dias entre cada uma. As colheitas de sangue coincidiram com as colheitas 4, 8, 12 e 16 de fezes.

#### 4.2.2 Segunda etapa: experimentos realizados com os cordeiros

Esta etapa iniciou em 17 de janeiro, quando os cordeiros tinham entre 4 a 5 meses, e se estendeu até 13 de abril de 1996. Antes do início dos experimentos, os cordeiros foram desmamados (11 de dezembro de 1995) e receberam uma dose de vermífugo (0,2 µg/kg de moxidectin).

##### 4.2.2.1 Colheita de fezes dos cordeiros

As colheitas de fezes foram feitas com intervalos de um mês, sendo realizadas 4 colheitas no total. A metodologia foi a mesma empregada para as ovelhas (item 4.2.1.1). As colheitas de fezes coincidiam com as colheitas de sangue, sendo feitas primeiro em um dos parques e, depois, no outro, sempre respeitando o prazo de 30 dias entre cada colheita.

##### 4.2.2.2 Colheita de sangue dos cordeiros

As colheitas de sangue foram feitas com intervalos de um mês, sendo realizadas 4 colheitas. A metodologia foi a mesma empregada para as ovelhas (item 4.2.1.2).

### 4.3 EXAMES PARASITOLÓGICOS

#### 4.3.1 Exame de fezes

O número de ovos por grama de fezes (OPG) foi determinado segundo o método de GORDON e WHITLOCK (1939), sensível para 50 OPG. Este é um

método quantitativo e tem como princípio a flutuação de ovos leves de helmintos em solução saturada de cloreto de sódio, usando câmara de McMaster.

#### TÉCNICA

1. Dois gramas de fezes eram pesados.
2. Adicionava-se 28 ml de solução salina saturada.
3. Após a homogeneização, o líquido era passado através de uma peneira.
4. A câmara se McMaster era preenchida e aguardava-se 2 minutos para permitir a flutuação dos ovos.
5. A leitura era realizada em microscópio ótico, com aumento de 100 vezes.
6. A soma dos dois retículos da câmara era multiplicado por 50, obtendo-se assim o resultado em ovos por grama de fezes (OPG).

#### 4.3.2 Cultura de larvas

A cultura e identificação de larvas foi realizada segundo o método de ROBERTS e O'SULLIVAN (1950). Os exames foram realizados a partir de um pool de amostras de fezes. Para as ovelhas, a amostragem foi obtida na última colheita, e para os cordeiros, na terceira colheita.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DO TIPO DE HEMOGLOBINA

A determinação do tipo de hemoglobina foi realizada por meio de eletroforese em gel espesso de amido (VLIET e HUISMAN, 1964). Esta técnica está baseada no

fato de que numerosas moléculas biológicas possuem uma carga elétrica. Quando num campo elétrico, elas migram no sentido oposto de sua polaridade. A mobilidade depende, sobretudo, de grupamentos ionizáveis presentes na superfície da partícula. Por conseqüência, a escolha de um meio apropriado permitirá a separação das moléculas. A eletroforese em suporte sólido (gel espesso de amido) é o método de escolha, porque ela permite a nítida separação dos tipos de hemoglobina existentes, em função de suas cargas elétricas e tamisação através da malha do gel.

## TÉCNICA

A realização técnica compreende seis etapas, descritas a seguir:

### 4.4.1 Preparação da solução tampão

O tampão utilizado foi o Tris-EDTA-Borato, pH 8,6 (HUHENS, 1968).

Preparou-se uma solução estoque como segue:

Tris (tris hidroximetil-aminometano)	109,00 g
EDTA dissódico	5,84 g
Ácido bórico	30,90 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

A solução estoque foi diluída em água destilada na proporção de 1:7 para as cubas, e na proporção de 1:20 para a preparação do gel.

#### 4.4.2 Preparação das amostras de sangue

1. O sangue foi colhido como descrito no item 4.2.1.2, em tubos contendo EDTA como anticoagulante.

2. As amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm, por 5 minutos. O plasma foi desprezado, acrescentando a mesma quantidade em solução salina a 0,85 %. Este procedimento era repetido, por mais duas vezes, ou até o sobrenadante ficar completamente límpido.

3. Após a última centrifugação, provocou-se a hemólise pelo acréscimo de água destilada e agitação vigorosa.

4. Em seguida, foi acrescentado  $\frac{1}{2}$  volume de clorofórmio e centrifugava-se novamente, para separação do estroma.

5. Foi realizada, então, uma diluição da amostra de 1:4, a fim de que não houvesse a formação de bandas muito espessas. Esta diluição podia ser variável, dependendo da concentração de hemoglobina presente na amostra.

#### 4.4.3 Preparação do gel

Para a confecção do gel de amido, utilizou-se a técnica desenvolvida por CARVALHO e AZEVEDO (1976), modificada por PETZL e PRIMO-PARMO (1979), que trabalha com gel de amido comercial\*.

1. A solução estoque era diluída em água na proporção de 1:20 e acrescentava-se amido na concentração de 10 %.

\* Maizena ® - Refinações de Milho Brasil LTDA.

2. Após a homogeneização, a amostra era levada ao forno de microondas, onde o gel era cozido, em potência máxima, por cerca de 12 minutos. Eram feitas várias interrupções para agitar, impedindo o cozimento desigual e a formação de grumos.

3. Ainda fervendo, o gel era despejado sobre uma placa de acrílico (21 cm x 21 cm x 1 cm). O gel, então, era coberto com uma folha de acetato e era colocado um vidro por cima.

4. A placa com o gel permanecia em temperatura ambiente até o resfriamento. Em seguida era levada à geladeira, por 1 a 2 horas.

#### 4.4.4 Depósito das amostras de hemoglobina

As amostras, embebidas em papel Wattman nº 3 de 1 cm<sup>2</sup>, eram introduzidas no gel, com o auxílio de uma pinça de ponta fina. Os orifícios, no gel, eram previamente feitos com o auxílio de um pente de 12 fendas verticais espaçadas de 5 mm. Um padrão de hemoglobina A e outro de hemoglobina B sempre eram utilizados em cada gel, como controle.

#### 4.4.5 Migração eletroforética

Uma vez colocadas as amostras, a placa contendo o gel era acoplada ao sistema horizontal de eletroforese. A ponte entre as cubas e a placa era feita com o auxílio de um tecido esponjoso\*. Esta conexão permitia estabelecer um campo elétrico uniforme, em toda a longitude do suporte. Um gerador de corrente contínua

\* Perfex® - Johnson & Johnson Indústria e Comércio LTDA.

era ligado ao sistema, para permitir a migração dos extratos. A migração ocorre do pólo negativo para o positivo. A fonte era ligada a 120 V, durante 12 horas. Todo o sistema (cubas e gel) ficava dentro de um refrigerador para evitar a desnaturação da proteína. Após o término da migração, os quadriculados de papel Wattman eram retirados. O mesmo era feito com gel. Este era cortado longitudinalmente ao meio, sobre o qual era feita a coloração.

#### 4.4.6. Coloração

O corante era preparado com a seguinte solução (HIGASHI e LUBS, 1966):

Benzidina	200 mg
Nitroprussiato de sódio	200 mg
Ácido acético a 1%	100 ml

Esta mistura era despejada sobre a parte interna do gel. Em seguida, eram adicionados 3 ml de água oxigenada. A leitura era feita após alguns minutos, quando as bandas azuladas tornavam-se mais evidentes.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DOS VALORES HEMATOLÓGICOS

Para a determinação do hematócrito e da concentração de hemoglobina, utilizou-se de métodos de rotina, segundo JAIN (1986).

#### 4.5.1 Hematócrito

O hematócrito, ou volume globular, determina, em percentagem, a concentração de eritrócitos em dado volume de sangue não coagulado.

O método utilizado foi o do microhematócrito.

##### TÉCNICA:

1. Após a homogeneização das amostras, os tubos capilares eram preenchidos com sangue até  $\frac{3}{4}$  do seu volume. Uma das extremidades era vedada e os tubos eram colocados em microcentrífuga.

2. As amostras eram centrifugadas por 15 minutos.

3. A leitura era realizada, por comparação, utilizando-se um cartão de leitura para microhematócrito.

#### 4.5.2 Concentração de hemoglobina

A dosagem da hemoglobina circulante, medida em g/dl, foi avaliada pelo método da cianometemoglobina, utilizando-se um kit comercial\*. Este consiste de um reagente de cor (reagente de Drabkin) e de um padrão de hemoglobina, utilizado para calcular a curva de calibração. Este método tem por princípio a oxidação do átomo do ferro (ferro II), da molécula de hemoglobina, pelo ferricianeto de potássio em pH fracamente alcalino, formando a meta-hemoglobina. Após a reação com o cianeto de potássio, a hemoglobina é convertida em cianometahemoglobina. A coloração avermelhada é proporcional à concentração de hemoglobina, presente na amostra, lida em 500 a 540 nm (ou em filtro verde).

\* Bioclin - Quibasa - Química Básica LTDA.

**TÉCNICA:**

1. O reagente de cor era preparado e o fator de calibração da solução era calculado através da fórmula abaixo, sendo que a absorbância do padrão é a média de três avaliações:

$$\text{Fator de calibração} = \frac{\text{Concentração do padrão}}{\text{Média da absorbância do padrão}}$$

2. Em um tubo de ensaio já contendo 5 ml da solução reagente de cor, adicionava-se 0,02 ml da amostra de sangue. Em seguida, a mistura era homogeneizada.

3. A solução era deixada em repouso por 5 minutos para o processamento da reação.

4. A leitura era feita em um Colorímetro Fotoelétrico Metronic Modelo M2, no filtro verde (que equivale a 540 nm), acertando o zero com o reagente de cor.

5. Os dados, obtidos em porcentagem de transmitância (T), eram convertidos para o valor de absorbância (A) por meio de uma tabela de conversão T - A.

6. O cálculo da concentração de hemoglobina da amostra, dada em g/dl, era feito da seguinte forma:

$$\text{Concentração da amostra (g/dl)} = \text{Absorbância do teste} \times \text{Fator de calibração}$$

#### 4.6 CONTAGEM DE EOSINÓFILOS

A contagem dos eosinófilos foi feita pelo método direto, segundo LIMA *et al.* (1985). A contagem direta na câmara foi o método de escolha, por ter como vantagem ser mais exato e menos trabalhoso. A câmara de contagem utilizada foi a de Fuchs-Rosenthal, por comportar maior volume (3,2 mm<sup>3</sup>).

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 sangüíneos.

O diluidor usado foi o de Pilot Modificado (MacFARLANE e CECIL, 1951), que cora somente os eosinófilos (por meio da eosina), lisando ou reduzindo a fragmentos os glóbulos vermelhos (por meio do propilenoglicol) e os demais glóbulos brancos (por meio de carbonato de cálcio). Após colocado na câmara, espera-se de 15 a 30 minutos. Este tempo é necessário para que os eosinófilos fiquem corados, depositem-se e para que ocorra a lise dos demais elementos figurados do sangue. A fórmula deste diluidor é:

Eosina a 1 %	10,0 ml
Propilenoglicol	50,0 ml
Carbonato de sódio a 10 %	1,0 ml
Água destilada	40,0 ml

#### TÉCNICA:

1. Após colhido o sangue, conforme descrito no item 4.2.1.2, era feita homogeneização da amostra, agitando-se levemente o tubo de colheita.

2. Em um tubo de ensaio, após pipetado 0,38 ml do diluidor, acrescentava-se 0,02 ml da amostra de sangue (diluição de 1:20). Agitava-se, por cerca de 2 a 3 minutos, sempre suavemente para evitar a destruição dos eosinófilos.

3. Em seguida, preenchia-se a câmara, que permanecia em repouso por 30 minutos. Durante este período, a câmara de Fuchs-Rosenthal era mantida em câmara úmida.

4. A leitura era feita em microscópio óptico com um aumento de 400 vezes. As duas áreas reticuladas da câmara eram contadas. O cálculo do número de eosinófilos, por milímetro cúbico de sangue, foi feito utilizando-se a fórmula abaixo:

$$\text{Número de eosinófilos (/mm}^3\text{)} = \frac{\text{média dos dois retículos} \times 20}{3,2}$$

#### 4.7 METODOLOGIA PARA IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS AOS PARASITAS GASTRINTESTINAIS

##### 4.7.1 Seleção baseada na contagem de ovos por grama de fezes (OPG)

Ao serem analisados os valores individuais de OPG dos animais, observa-se grande variedade de resposta à verminose. Estas diferenças permitem dividir os animais em grupos, de acordo com a sua maior ou menor capacidade de responder à verminose, em:

- animais resistentes (“**high responder**”),
- animais susceptíveis (“**low responder**”),
- animais com resposta intermediária.

No presente experimento, trabalhou-se com infecção natural, avaliando a resposta dos animais, ao longo do tempo. Temos, portanto, diferentes fases de contaminação. Em virtude das características próprias deste experimento, elaboraram-se diversas hipóteses para a seleção dos animais. As hipóteses foram construídas levando-se em consideração os seguintes critérios: número de colheitas de fezes utilizadas e valor de OPG no nível de corte (“**cut off**”) realizado.

#### 4.7.1.1 Hipóteses baseadas no OPG para a identificação e seleção das ovelhas

- HIPÓTESE 01 - Média aritmética de OPG de todas as colheitas, sendo o corte feito a nível de 300 OPG para animais resistentes e 1000 OPG para os susceptíveis.
- HIPÓTESE 02 - Média aritmética de OPG das últimas cinco colheitas, sendo o corte feito a nível de 700 OPG (resistentes) e 3000 OPG (susceptíveis).
- HIPÓTESE 03 - Média geométrica do log de todas as colheitas, sendo o corte feito a nível da média +/- um desvio padrão, respectivamente para susceptíveis e resistentes.
- HIPÓTESE 04 - Média geométrica do log das últimas cinco colheitas, sendo o corte feito a nível da média +/- um desvio padrão, respectivamente para susceptíveis e resistentes.

- HIPÓTESE 05 - Máximo valor de OPG encontrado na última colheita, sendo o corte em 1000 OPG (resistentes) e 6000 OPG (susceptíveis).

#### 4.7.1.2 Hipóteses baseadas no OPG para a identificação e seleção dos cordeiros

- HIPÓTESE 01 - Média aritmética de OPG de todas as colheitas, sendo o corte feito a nível de 300 OPG (resistentes) e 2000 OPG (susceptíveis).
- HIPÓTESE 02 - Média aritmética de OPG das três primeiras colheitas, sendo o corte feito a nível de 500 OPG (resistentes) e 2500 OPG (susceptíveis).
- HIPÓTESE 03 - Média geométrica do log de todas as colheitas, sendo o corte feito a nível da média +/- um desvio padrão, respectivamente para susceptíveis e resistentes.
- HIPÓTESE 04 - Média geométrica do log das três primeiras colheitas, sendo o corte feito a nível da média +/- um desvio padrão, respectivamente para susceptíveis e resistentes.
- HIPÓTESE 05 - Máximo valor de OPG encontrado na terceira colheita, sendo o corte realizado em 1000 OPG (resistentes) e 6000 OPG (susceptíveis).

#### 4.7.2 Análise de Cluster e de K-médias

STEAR *et al.* (1995) sugerem que a utilização de mais de uma variável, concomitantemente, poderia fornecer uma identificação mais efetiva dos animais resistentes e susceptíveis. Neste sentido, buscou-se uma metodologia capaz de permitir a análise dos diferentes parâmetros em conjunto. Assim, utilizou-se a

análise de Cluster e de K-médias, calculadas com dados de OPG, eosinófilos, hematócrito e concentração de hemoglobina.

Na análise de Cluster, as unidades, representadas pelas ovelhas, e os caracteres (OPG, hematócrito, concentração de hemoglobina e número de eosinófilos) foram submetidos a um processo de análise de agrupamento. O agrupamento foi feito com base na similaridade ou na distância. Os resultados são dispostos graficamente em um diagrama em árvore, ou dendograma, que possui uma escala para se observar os níveis de agrupamento. São utilizadas ligações completas e a distância euclidiana.

A análise das K-médias é um método aglomerativo não hierárquico, utilizado quando se deseja formar k grupos de observações. Consiste em, primeiramente, definir o número de grupos iniciais. Cada grupo recebe o item cuja média (centróide) esteja mais próxima. Em geral, usa-se a distância euclidiana.

Estes dois tipos de análises foram realizados tanto para as ovelhas como para os cordeiros. Como o objetivo é comparar estes métodos de seleção com a proposta pelo método anterior (somente OPG), procurou-se usar os mesmos critérios para a realização das análises.

4.7.2.1 Hipóteses baseadas na análise de Cluster e das K-médias para a identificação e seleção das ovelhas

- HIPÓTESE 01 - Utilização da média de OPG de todas as colheitas de fezes e das médias dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos de todas as colheitas de sangue.

- HIPÓTESE 02 - Utilização da média de OPG das últimas cinco colheitas de fezes e das médias dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos da 3ª e 4ª colheitas de sangue.
- HIPÓTESE 03 - Utilização do valor de OPG da 16ª colheita de fezes e dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos da 4ª colheita de sangue.

#### 4.7.2.2 Hipóteses baseadas na análise de Cluster e das K-médias para a identificação e seleção dos cordeiros

- HIPÓTESE 01 - Utilização da média de OPG de todas as colheitas de fezes e das médias dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos de todas as colheitas de sangue.
- HIPÓTESE 02 - Utilização da média de OPG das três primeiras colheitas de fezes e das médias dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos das três primeiras colheitas de sangue.
- HIPÓTESE 03 - Utilização do valor de OPG da 3ª colheita de fezes e dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos da 3ª colheita de sangue.

## 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a verificação da possibilidade de se utilizar os dados relativos aos dois parques como se fossem somente um, primeiramente foi feito um estudo descritivo dos dados, tanto para as ovelhas como para os cordeiros. Este estudo revelou que não há dados discrepantes. Porém, como os dados não seguem uma distribuição normal, a análise utilizada para a comparação dos dois parques foi o teste não-paramétrico de U de Mann-Whitney.

A comparação das médias de OPG, eosinófilos, hematócrito e hemoglobina, nas diferentes colheitas, foi feita através do teste não-paramétrico de Friedman. Quando este teste revela que existe diferença na média da característica estudada, utiliza-se então um teste de comparação múltipla para se descobrir onde se encontra a diferença. Para este fim, foi utilizado o teste de diferenças mínimas significativas, específico para o desdobramento do teste de Friedman, sendo também um teste não-paramétrico. A escolha destes testes não-paramétricos se deve ao fato de que os dados não apresentam distribuição normal.

Para a comparação das médias de OPG, eosinófilo, hematócrito e concentração de hemoglobina dos grupos de animais considerados resistentes ou susceptíveis pelas diferentes hipóteses, baseadas na contagem de ovos nas fezes, utilizou-se o teste não paramétrico de U de Mann-Whitney.

Para a seleção dos animais em resistentes e susceptíveis, considerando todos os parâmetros avaliados, foram utilizadas as análises de Cluster e das K-médias.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como foram estudados dois rebanhos, em parques distintos, fez-se necessário utilizar um teste estatístico para avaliar a possibilidade de trabalhar os dados obtidos em conjunto. Para isso empregou-se o teste de U de Mann-Whitney (item 4.8), que indicou que os dados dos animais dos dois parques são homogêneos, sendo possível analisá-los como um rebanho único. Por esta razão, os resultados serão analisados em conjunto.

Serão apresentados, em primeiro lugar, os resultados referentes às ovelhas e, em seguida, aos cordeiros. Após a análise dos dados um a um, será apresentado um capítulo sobre a seleção dos animais, dividindo-os em grupos de animais resistentes, intermediários e susceptíveis à verminose. Enfim, serão avaliadas as relações entre as diferentes análises efetuadas.

### 5.1 EXAMES PARASITOLÓGICOS DE FEZES

#### 5.1.1 Ovelhas

Nos exames de fezes realizados, foram observados ovos de tipo estrogiliformes, *Nematodirus sp*, *Strongyloides papillosus*, *Moniezia sp* e oocistos de *Eimeria sp*. Para todas as análises posteriores, será apenas considerado o valor de OPG (ovos por grama de fezes) de estrogilídeos.

Ao analisar todos os exames realizados ao longo das 16 semanas, observa-se que o número de ovos de *estrongilídeos* nas fezes das ovelhas variou de 0 a 12.950 OPG. Os valores mais freqüentes ficaram entre 0 e 500 OPG. Todavia, 2,8% dos exames realizados apresentaram OPG superior a 5.000 (Tabela 01).

Tabela 01 - Freqüência das diferentes contagens de ovos de *estrongilídeos* das ovelhas, considerando todos os exames realizados.

<i>OPG Estrongilídeos</i>	<i>Freqüência</i>	<i>Percentagem</i>	<i>Freqüência Acumulada</i>
0	336	37,1%	37,1%
50 - 500	345	38,2%	75,3%
550 - 1000	61	6,7%	82,0%
1050 - 2000	73	8,1%	90,1%
2050 - 3000	27	3,0%	94,1%
3050 - 5000	37	4,1%	97,2%
5050 - 7000	11	1,2%	98,4%
7050 - 10000	11	1,2%	99,6%
10050 - 12950	4	0,4%	100,0%
Total	905	100,0%	

Os ovos de *Nematodirus* sp foram encontrados em 6,7% das amostras, não ultrapassando o valor máximo de 300 OPG (Tabela 02). Para as análises posteriores, a contagem de ovos deste parasita foi incluída na contagem total dos ovos de *estrongilídeos*.

Tabela 02 - Frequência das diferentes contagens de ovos de *Nematodirus sp* das ovelhas, considerando todos os exames realizados.

<i>OPG Nematodirus</i>	<i>Frequência</i>	<i>Porcentagem</i>	<i>Frequência Acumulada</i>
0	844	93,3%	93,3%
50	36	4,0%	97,2%
100	9	1,0%	98,2%
150	7	0,8%	99,0%
200	5	0,6%	99,6%
250	2	0,2%	99,8%
300	2	0,2%	100,0%
Total	905	100,0%	

Com relação ao *Strongyloides papillosus*, somente 3% das amostras foram positivas, não ultrapassando 100 OPG. Esta porcentagem, bastante baixa, é condizente com a categoria, uma vez que se tratam de animais adultos (Tabela 03).

Tabela 03 - Frequência das diferentes contagens de ovos de *Strongyloides papillosus* das ovelhas, considerando todos os exames realizados.

<i>OPG Strongyloides</i>	<i>Frequência</i>	<i>Porcentagem</i>	<i>Frequência Acumulada</i>
0	878	97,0%	97,0%
50	25	2,8%	99,8%
100	2	0,2%	100,0%
Total	905	100,0%	

Para os cestóides (*Moniezia sp*) foi apenas considerado presença (+) ou ausência (-) de ovos, uma vez que o número de ovos pode não ter correlação com o grau de infecção (Tabela 04).

Tabela 04 - Frequência da presença ou ausência de ovos de *Moniezia sp* das ovelhas, considerando todos os exames realizados.

<i>Moniezia</i>	Frequência	Porcentagem	Frequência Acumulada
+	128	14,1%	14,1%
-	777	85,9%	100,0%
Total	905	100,0%	

Para os oocistos de *Eimeria sp* também foram assinalados presença (+) ou ausência (-). A porcentagem de amostras positivas é baixa, não representando problemas para esta categoria (Tabela 05). Entretanto, as ovelhas positivas vão servir de fonte de contaminação para os cordeiros, categoria muito mais susceptível.

Tabela 05 - Frequência da presença ou ausência de oocistos *Eimeria sp* das ovelhas, considerando todos os exames realizados.

<i>Eimeria</i>	Frequência	Porcentagem	Frequência Acumulada
+	243	26,9%	26,9%
-	662	73,1%	100,0%
Total	905	100,0%	

Quando se analisa o nível de infecção dos estrongilídeos, ao longo do tempo, observa-se que a média de OPG das 64 ovelhas, em cada colheita de fezes realizada, mantém-se baixa durante as 11 primeiras semanas após o início do experimento. Neste período, a média de OPG não passou de 550, o que pode ser considerado baixo, visto que, nesta data, todas as ovelhas já haviam parido e

estavam em lactação. Um aumento significativo de OPG ( $p < 0,05$ ) ocorreu da 11ª para a 12ª colheita. Portanto, as cinco últimas semanas do experimento são as que tiveram as maiores médias de OPG (Tabela 06).

Tabela 06 - Média de OPG das 64 ovelhas em cada colheita de fezes realizada.

Colheita nº	Data	Média do OPG
1	10/08/95	0,00
2	25/08/95	4,17
3	01/09/95	3,57
4	08/09/95	22,32
5	15/09/95	42,05
6	22/09/95	83,05
7	29/09/95	110,48
8	05/10/95	147,54
9	12/10/95	166,41
10	19/10/95	174,17
11	26/10/95	192,06
12	05/11/95	554,84
13	16/11/95	1496,83
14	23/11/95	2440,16
15	30/11/95	2814,84
16	07/12/95	3208,89
	<b>Média</b>	<b>716,34</b>

As médias semanais de OPG foram correlacionadas com os dados meteorológicos, levando em conta os valores de precipitação pluviométrica e temperatura. Com relação à temperatura, não se observou nenhuma variação que justificasse o aumento de OPG nas cinco últimas colheitas. Já, a precipitação

pluviométrica mostrou-se elevada nos meses de setembro (2ª quinzena) e outubro. Este período de maior precipitação pluviométrica aconteceu cerca de 35 dias antes do aumento de OPG, indicando um provável favorecimento do desenvolvimento larvário neste período, que teria possibilitado a contaminação dos animais (Figura 01).

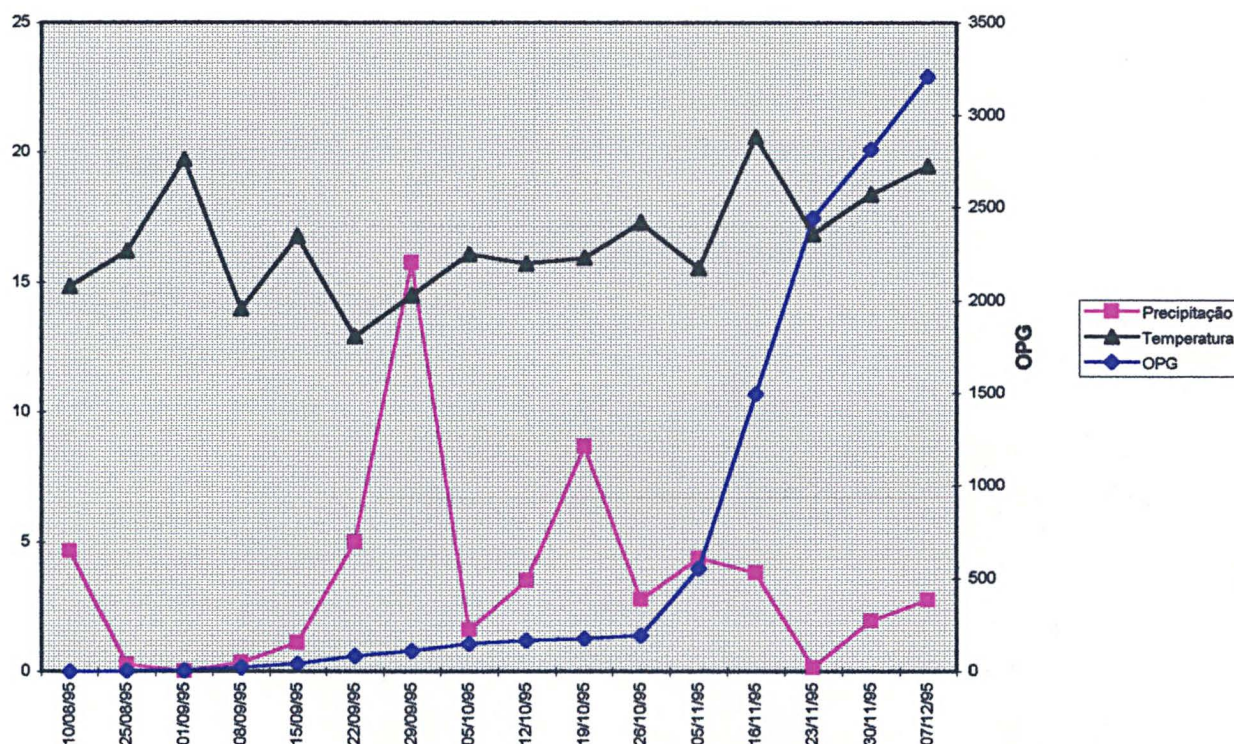


Figura 01 - Média de OPG das 64 ovelhas durante as 16 semanas do experimento, analisando-a em relação aos dados meteorológicos de precipitação pluviométrica (em mm<sup>3</sup>/dia) e temperatura (em graus Celcius). Os dados de precipitação pluviométrica e temperatura, de cada ponto, referem-se à média dos dias anteriores desde o último ponto. Dados meteorológicos fornecidos pelo SIMEPAR.

Analisando a média de OPG das ovelhas em relação às semanas pós-parto, nota-se um aumento linear (Figura 02). O período de partos, relativamente prolongado (10 de agosto a 28 de setembro), não permitiu identificar um aumento significativo de OPG entre a 6ª e 8ª semana, conforme referem a maioria dos autores (CROFTON, 1954; NARI, 1977; THOMAS e ALI 1983; VASCONCELOS *et al.*, 1984). O que se nota, entretanto, é o aumento linear, seguindo a mesma proporção em relação ao tempo, após aplicação do anti-helmíntico. KERBOEUF (1978) assinala que o fenômeno de aumento de OPG pode ser influenciado por muitos fatores, como: pós-parto, lactação, "spring rise", todos eles contribuindo, simultaneamente, para a contaminação ambiental. No presente trabalho, a fase experimental relativa às ovelhas, teve a duração de 4 meses. Ao longo deste período, houve a influência de todos esses fatores, o que explicaria o aumento progressivo da média de OPG das ovelhas.

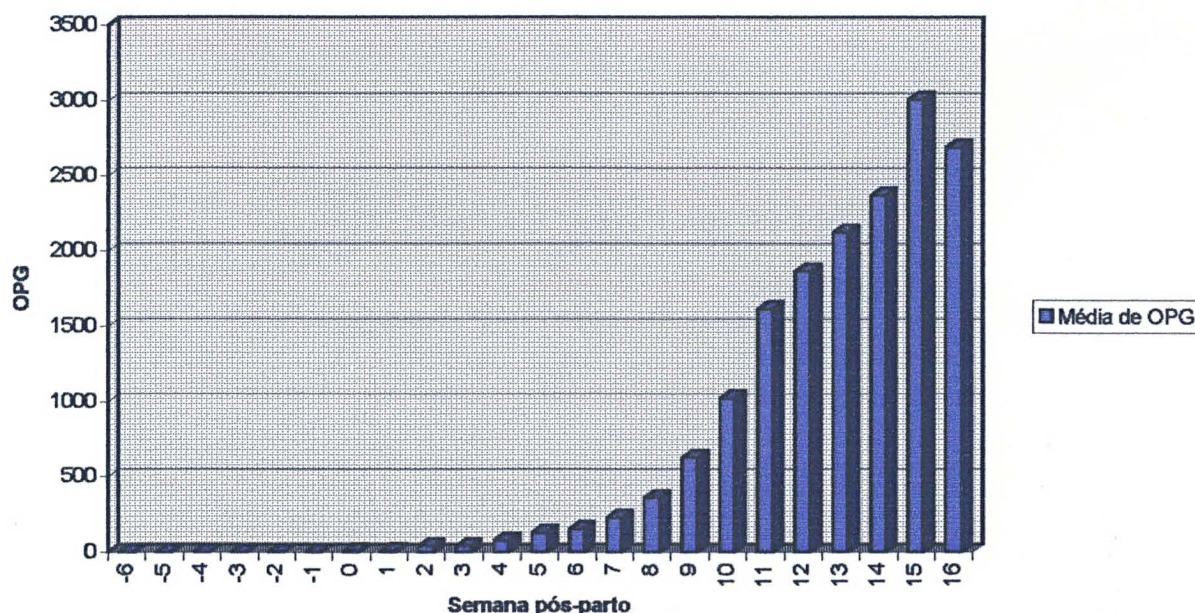


Figura 02 - Média de OPG das ovelhas, em relação ao parto, sendo -6 a -1 as semanas pré-parto, 0 a semana do parto e 1 a 16 as semanas pós-parto.

As ovelhas foram desverminadas em julho (um mês antes do início do experimento) e ficaram até dezembro sem serem desverminadas (6 meses). Nos últimos exames (colheitas 14 a 16), já era possível encontrar animais com OPG superior a 7000, o que é indesejável, por contaminarem as pastagens e pelas perdas produtivas dos animais. Uma aplicação de anti-helmíntico na 12ª semana (início de novembro), teria evitado o aumento exacerbado da média de OPG e os animais teriam ficado 4 meses sem desverminações. Isso demonstra que o esquema mensal de aplicação de vermífugos, altamente difundido na ovinocultura paranaense, é desnecessário para animais adultos.

#### 5.1.2 Cordeiros

Os exames mensais de fezes realizados para a categoria dos cordeiros revelou a presença dos mesmos parasitas encontrados para as ovelhas: ovos de tipo estrongiliformes, *Nematodirus sp*, *Strongyloides papillosus*, *Moniezia sp* e oocistos de *Eimeria sp*. Os cordeiros, no pós-desmame, são reconhecidamente a categoria mais susceptível à verminose, tanto para os estrongilídeos, quanto para *Strongyloides*, *Moniezia* e *Eimeria*. Os resultados mostram que, para todos os gêneros de parasitas encontrados, houve maior frequência de amostras positivas para os cordeiros do que para as ovelhas. Da mesma forma que para as ovelhas, os únicos valores considerados para as análises, foi o OPG de estrongilídeos

A análise do resultado da contagem de ovos de estrongilídeos, mostra também um aumento progressivo de OPG. A causa deste aumento rápido deve-se, primeiramente, à alta contaminação das pastagens e, em segundo lugar, à susceptibilidade dos cordeiros. A cada mês houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ )

da média de OPG, chegando à 3ª colheita (março) com a média de 3894,16 OPG e com alguns cordeiros apresentando contagem próxima a 20000 OPG (Tabela 07). Para evitar perdas de animais, foi necessário fazer nova desverminação logo após a 3ª colheita. Num rebanho comercial, seria necessário uma antecipação da desverminação após a segunda colheita (fevereiro). Isto teria significado 3 meses de intervalo entre as aplicações de vermífugo. Estes dados reforçam que o esquema múltiplo de desverminação, praticado pelos ovinocultores e técnicos, não é necessário, nem mesmo para as categorias mais susceptíveis.

Portanto, os resultados relativos à quarta colheita, são valores após 30 dias da segunda desverminação. Devido à influência do anti-helmíntico, os resultados da 4ª colheita não são considerados para a análise de diferença estatística das médias de OPG, hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos.

Tabela 07 - Média do OPG dos 77 cordeiros, segundo nº da colheita.

Colheita nº	Data	Média	Valor mínimo	Valor máximo
01	17/01/96	100,00 <sup>a</sup>	0,00	1350,00
02	14/02/96	1325,97 <sup>b</sup>	0,00	7500,00
03	11/03/96	3894,16 <sup>c</sup>	0,00	19250,00
04	10/04/96	290,91	0,00	10950,00

Obs.: Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$ )

O OPG dos cordeiros, sem considerar a quarta colheita, variou de 0 a 19250. Observa-se uma percentagem maior de valores acima de 5000 OPG, quando comparada às ovelhas (11,9% contra 2,8%), indicando maior susceptibilidade desta categoria às parasitoses (Tabela 08). A cultura de larvas, por sua vez, apresentou o

seguinte resultado: 83,2% eram larvas de *Haemonchus*, 13,0% larvas de *Cooperia*, 1,5% larvas de *Nematodirus* e 1,3% larvas de *Oesophagostomum*.

Tabela 08 - Frequência das diferentes contagens de ovos de estrongilídeos dos cordeiros, considerando as três primeiras colheitas.

<i>OPG Estrongilídeos</i>	<i>Frequência</i>	<i>Porcentagem</i>	<i>Frequência Acumulada</i>
0	60	26,3%	26,3%
50 - 500	52	22,8%	49,1%
550 - 1000	26	11,4%	60,5%
1050 - 2000	27	11,8%	72,3%
2050 - 3000	12	5,3%	77,6%
3050 - 5000	24	10,5%	88,1%
5050 - 7000	14	6,1%	94,2%
7050 - 10000	9	4,0%	98,2%
10050 - 19250	4	1,8%	100,0%
Total	228	100,0%	

Como a frequência dos ovos de *Nematodirus sp* foi novamente baixa (13,2%), não ultrapassando o valor de 150 OPG, estes ovos foram incluídos na contagem total de estrongilídeos, não sendo realizada análise especial para este gênero (Tabela 09).

Tabela 09 - Frequência das diferentes contagens de ovos de *Nematodirus sp* dos cordeiros, considerando as três primeiras colheitas.

<i>OPG Nematodirus</i>	<i>Frequência</i>	<i>Porcentagem</i>	<i>Frequência Acumulada</i>
0	198	86,8%	86,8%
50	23	10,1%	96,9%
100	6	2,7%	99,6%
150	1	0,4	100,0%
Total	228	100,0%	

Ao avaliar as frequências dos ovos de *Strongyloides papillosus*, nota-se que mais de 40% das amostras são positivas. A maioria destas amostras positivas (89,47%) não ultrapassou o valor de 1000 OPG (Tabela 10).

Tabela 10 - Frequência das diferentes contagens de ovos de *Strongyloides papillosus* dos cordeiros, considerando as três primeiras colheitas.

<i>OPG Strongyloides</i>	<i>Frequência</i>	<i>Porcentagem</i>	<i>Frequência Acumulada</i>
0	133	58,4%	58,4%
50 - 100	49	21,5%	79,9%
150 - 500	28	12,3%	92,2%
550 - 1000	8	3,5%	95,7%
1050 - 2000	7	3,1%	98,8%
2200	1	0,4%	99,2%
3750	1	0,4%	99,6%
7150	1	0,4%	100,0%
Total	228	100,0%	

As amostras positivas para *Moniezia sp* foram mais frequentes nos cordeiros que nas ovelhas. Porém, 70,6% são negativas (Tabela 11).

Tabela 11 - Frequência da presença ou ausência de ovos de *Moniezia sp* dos cordeiros, considerando as três primeiras colheitas.

<i>Moniezia</i>	<i>Frequência</i>	<i>Porcentagem</i>	<i>Frequência Acumulada</i>
+	67	29,4%	29,4%
-	161	70,6%	100,0%
Total	228	100,0%	

Uma das diferenças marcantes entre as ovelhas e os cordeiros é a presença de oocistos de *Eimeria* nas fezes. As amostras positivas dos cordeiros chegaram a 95,6%, mostrando a alta susceptibilidade da categoria a este protozoário (Tabela 12).

Tabela 12 - Frequência da presença ou ausência de oocistos *Eimeria* sp dos cordeiros, considerando as três primeiras colheitas.

<i>Eimeria</i>	Frequência	Porcentagem	Frequência Acumulada
+	218	95,6%	95,6%
-	10	4,4%	100,0%
Total	228	100,0%	

No presente trabalho foi observado, tanto para ovelhas como cordeiros, o fenômeno de cura espontânea (“**self-cure**”). Este, foi descrito pela primeira vez por STOLL (1929) e consiste na eliminação espontânea de parasitas adultos, verificado pela redução abrupta da contagem de OPG. Para nossas condições, foi utilizado o critério de redução de 80% do OPG para se considerar a ocorrência do fenômeno de cura espontânea (PRESTON e ALLONBY, 1979 b).

Das 64 ovelhas, 09 (14,06%) apresentaram uma redução de OPG superior ao critério utilizado, com o percentual de redução variando de 89 a 100% (Tabela 13).

Tabela 13 - Ovelhas que apresentaram o fenômeno de cura espontânea.

Nº da ovelha	OPG	% de Redução
461BC	4800 - 500	89,58%
282AM	750 - 50	93,33%
068VM	1150 - 50	95,65%
527AM	1450 - 50	96,55%
281AM	4150 - 50	98,79%
558AM	4300 - 50	98,84%
251AM	400 - 0	100%
162BC	700 - 0	100%
389AM	850 - 0	100%

Obs.: Estas quedas de OPG foram registradas nas últimas cinco colheita de fezes.

Quanto aos cordeiros, observou-se uma percentagem semelhante às ovelhas, com 10,39% dos animais manifestando o fenômeno de cura espontânea. As taxas de redução variaram de 88 a 100% (Tabela 14).

Tabela 14 - Cordeiros que apresentaram o fenômeno de cura espontânea.

Nº do cordeiro	OPG	% de Redução
242AZ	900 - 100	88,89%
228AZ	600 - 50	91,67%
250AZ	650 - 0	92,31%
133AM	1350 - 100	92,59%
297AZ	4650 - 50	98,92%
273AZ	300 - 0	100%
153AM	650 - 0	100%
210AZ	3200 - 0	100%

Obs.: Estas quedas de OPG foram registradas da 2ª para a 3ª colheita de fezes.

Segundo GORDON (1948), a ocorrência do fenômeno de cura espontânea é invariavelmente observado logo após um período de chuvas. STEWART (1950 a, b; 1953), também demonstrou que um desafio com larvas de *H. contortus* normalmente produzia uma queda na contagem de ovos nas fezes e eliminação de uma infecção prévia por parasitas adultos. Portanto, propõe que o mecanismo da cura espontânea estaria na dependência de uma reação de hipersensibilidade imediata na mucosa abomasal, desencadeada pelo estímulo de novas larvas adquiridas. O efeito das chuvas contribuiria apenas para aumentar o número de larvas infectantes. Já, ALLONBY e URQUHART (1973) demonstram que o mecanismo de cura espontânea não está, necessariamente, dependente da aquisição de novas larvas. Mudanças climáticas e de pastoreio são suficientes para induzir a expulsão dos parasitas adultos. O presente experimento não tem por objetivo estudar os mecanismos da cura espontânea. Somente constatou sua ocorrência. O mais importante é o indicativo de que este fenômeno não é repetitivo, ou seja, não conferiria resistência à reinfecção. Portanto, não seria um parâmetro a ser levado em consideração para a seleção de animais em resistentes ou em susceptíveis (GORDON, 1948; ALLONBY e URQUHART, 1973).

Ao serem analisados os valores individuais de OPG dos animais estudados neste experimento, confirma-se a grande variabilidade de resposta, encontrada também por outros autores (WINDON, DINEEN e KELLY, 1980; ALBERS *et al.*, 1987). Há ovelhas e cordeiros que, em todos os exames de fezes realizados, não ultrapassaram o valor máximo de 100 OPG. Outros, entretanto, chegaram a níveis próximos de 20000 OPG. A Figura 03, com a média das cinco últimas colheitas de todas as ovelhas estudadas, ilustra bem esta diferença de resposta à verminose.

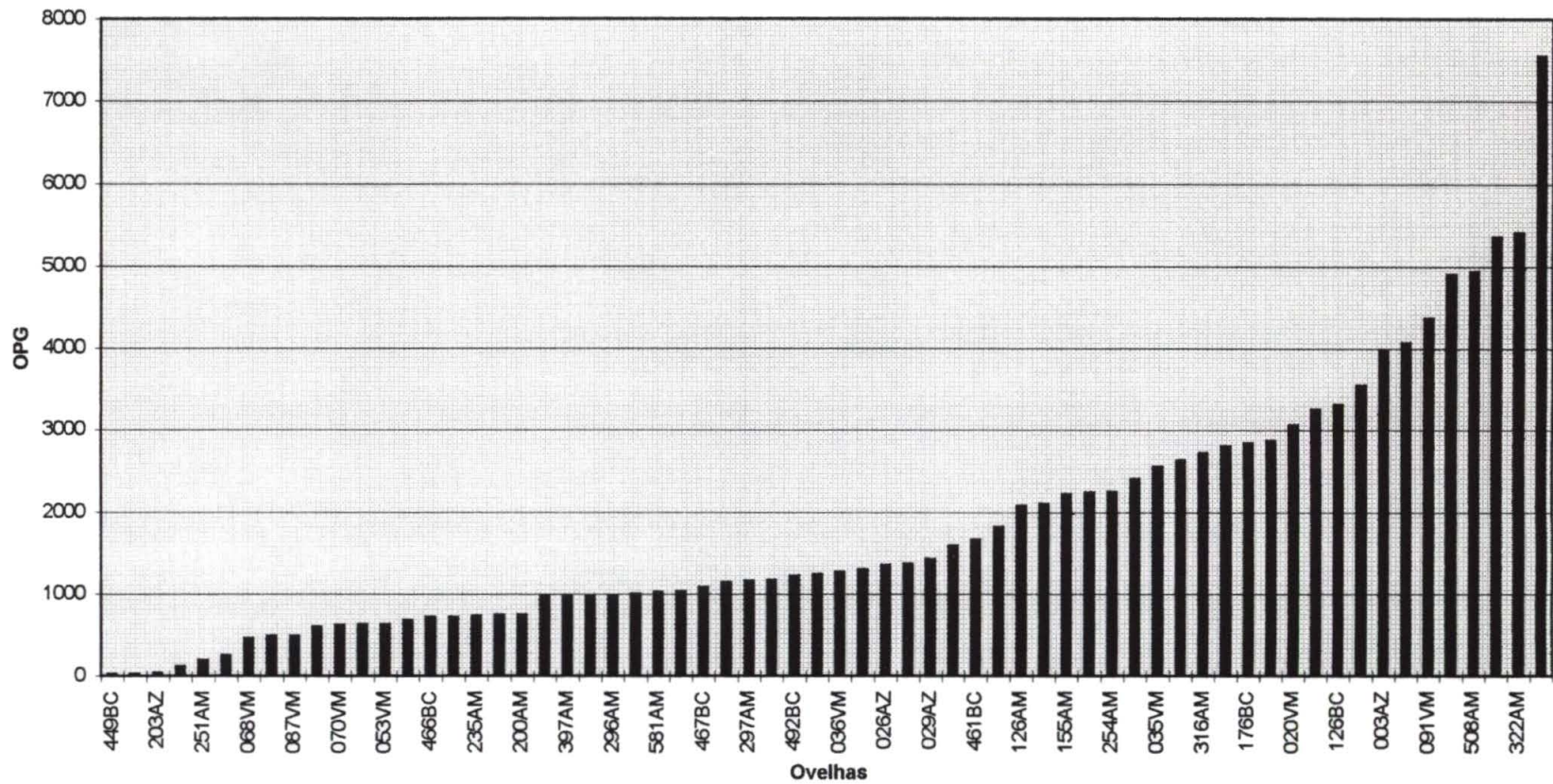


Figura 03 - Média de OPG de cada uma das 64 ovelhas nas últimas cinco semanas do experimento.

Estes resultados são indicativos de que a contagem de OPG (item 4.7.1) poderia ser utilizada para a divisão dos animais em grupos de resistentes e susceptíveis. As várias hipóteses foram, então, formuladas com o objetivo de estudar e avaliar os critérios de seleção, procurando definir o nível de corte, o número e a melhor época para realizar as avaliações.

### 5.1.3 Resultados obtidos para as ovelhas nas cinco hipóteses propostas no item

#### 4.7.1.1:

**Hipótese 01** - Foram utilizadas todas as colheitas de fezes e o corte foi feito a nível de 300 OPG, para as resistentes, e 1000 OPG, para as susceptíveis. Das 64 ovelhas estudadas, 16 ovelhas foram consideradas como resistentes (25,00%) e 14 (21,88%) como susceptíveis.

**Hipótese 02** - Somente as 05 últimas colheitas foram consideradas e o corte foi feito em 700 OPG para as resistentes e 3000 OPG para as susceptíveis. Dentre os animais avaliados, foram consideradas como resistentes 14 ovelhas (21,88%), e 12 (18,75%) foram os animais classificados como susceptíveis.

As hipóteses 03 e 04 trabalharam com os dados transformados em logaritmos, utilizando como critério de corte, o OPG equivalente à média mais um desvio padrão, para os animais susceptíveis e à média menos um desvio padrão, para as ovelhas resistentes.

**Hipótese 03** - Utilizou dados obtidos de todas as colheitas. Foram selecionadas 9 ovelhas (14,06%) como sendo resistentes e 10 (15,63%), como susceptíveis.

**Hipótese 04** - Os dados considerados para esta hipótese foram aqueles obtidos nas cinco últimas colheitas. Nesta condição, 08 ovelhas foram consideradas resistentes (12,05%) e 09 susceptíveis (14,06%).

**Hipótese 05** - Utilizou como critério apenas os dados da última colheita. Foram consideradas como resistentes os animais que apresentaram OPG inferior a 1000, sendo 18 ovelhas (28,13%) classificadas neste grupo. Já o grupo das ovelhas susceptíveis, que apresentaram OPG acima de 6000, inclui 13 ovelhas, representando 20,31% do rebanho.

Se comparadas as percentagens de animais classificados como resistentes e susceptíveis, em cada uma das hipóteses, nota-se que as hipóteses 03 e 04 possuem taxas menores que as demais (Tabela 15).

Tabela 15 - Comparação entre a percentagem de ovelhas consideradas resistentes e susceptíveis pelas hipóteses 01, 02, 03, 04 e 05.

	Resistentes		Susceptíveis	
	Nº de ovelhas	%	Nº de ovelhas	%
Hipótese 01	16	25,00	14	21,88
Hipótese 02	14	21,88	12	18,75
Hipótese 03	9	14,06	10	15,63
Hipótese 04	8	12,50	9	14,06
Hipótese 05	18	28,13	13	20,31

Se existem algumas diferenças no número de animais classificados em cada hipótese, há também diferenças quanto às ovelhas selecionadas como resistentes ou como susceptíveis. Há aquelas que estão incluídas em todas as hipóteses. Outras, entretanto, aparecem somente em algumas. No caso das consideradas susceptíveis, das 18 ovelhas classificadas, 33% estão em todas as hipóteses. Já nas ovelhas consideradas resistentes, apenas 16% estão presentes em todas as hipóteses. Isso mostra uma maior variação na classificação dos animais considerados resistentes (Tabelas 16 e 17).

Ao comparar as hipóteses 1 e 2 (que diferem por considerar os valores de OPG de todas as colheitas ou somente das cinco últimas), verifica-se que estas diferem em poucos animais. A hipótese 02 tem duas ovelhas a menos no grupo das consideradas susceptíveis. Em relação ao grupo das resistentes, na hipótese 02, três ovelhas não estão aí incluídas (466BC, 529AM e 200AM). Todavia, o animal 022AZ passa a constar no grupo das resistentes.

As hipóteses 03 e 04 trabalham com a média geométrica do OPG, sendo o corte, um critério matemático. Observa-se que os animais classificados como resistentes e susceptíveis são os mesmos das hipóteses 1 e 2. Apenas que, como foram menos ovelhas classificadas, algumas ficaram de fora das hipóteses 3 e 4. Somente uma ressalva poderia ser feita. No grupo das susceptíveis, uma ovelha da hipótese 3 não foi classificada nesta categoria por nenhuma outra hipótese.

A hipótese 05, quando comparada com as demais, é a que apresenta as maiores diferenças. No caso do grupo dos animais considerados resistentes, a hipótese 05 é a única que inclui todas as ovelhas que apresentaram cura espontânea. Foram classificadas 06 ovelhas como resistentes e que não estão

incluídas em nenhuma outra hipótese. No que diz respeito ao grupo das susceptíveis, também há três ovelhas que somente são classificadas neste grupo pela hipótese 05.

Tabela 16 - Ovelhas consideradas resistentes,  
de acordo com as diferentes hipóteses propostas.

Nº ovelha	Hipótese 01	Hipótese 02	Hipótese 03	Hipótese 04	Hipótese 05
449BC	X	X	X	X	X
203AZ	X	X	X	X	X
058VM	X	X	X	X	X
251AM	X	X	X	X	X
282AM	X	X		X	X
162BC	X	X		X	X
068VM	X	X		X	X
087VM	X	X			X
389AM	X	X		X	X
466BC	X		X		X
529AM	X		X		
053VM	X	X	X		
070VM	X	X	X		
128BC	X	X			
200AM	X				
283AM	X	X			
481BC			X		X
467AM					X
022AZ		X			X
476BC					X
527AM					X
558AM					X
461BC					X
281AZ					X
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>14</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>18</b>
<b>%</b>	<b>25,00</b>	<b>21,88</b>	<b>14,06</b>	<b>15,50</b>	<b>28,13</b>

Tabela 17 - Ovelhas consideradas susceptíveis, de acordo com as diferentes hipóteses propostas.

Nº ovelha	Hipótese 01	Hipótese 02	Hipótese 03	Hipótese 04	Hipótese 05
020VM	X	X	X		
133AM	X	X	X	X	X
288AM	X	X			
330AM	X	X	X		X
126BC	X	X	X	X	X
533AM	X	X	X	X	X
091VM	X	X	X	X	X
508AM	X	X	X	X	X
322AM	X	X		X	X
152BC	X	X		X	X
003AZ	X	X	X	X	X
123AZ	X	X		X	X
032VM	X		X		
577AM	X				
254AM					X
176BC					X
126AM					X
394AM			X		
Total	14	12	10	9	13
%	21,88	18,75	15,63	14,06	20,31

Quando se separam as ovelhas em resistentes e susceptíveis e faz-se a comparação de todas as hipóteses, é possível verificar a diferença significativa ( $p < 0,01$ ) da média de OPG entre esses grupos. Para exemplificar esta diferença, foram utilizados os dados de OPG obtidos nas últimas 4 colheitas de fezes (Tabela 18).

Tabela 18 - Média do OPG das ovelhas classificadas como resistentes (R) ou susceptíveis (S), nas últimas 04 colheitas de fezes, e segundo as diferentes hipóteses de classificação.

	Colheita 13		Colheita 14		Colheita 15		Colheita 16	
	R	S	R	S	R	S	R	S
Hipótese 01	381,25 *	2385,71 *	478,57 *	4667,86 *	573,33 *	5903,57 *	587,50 *	7711,54 *
Hipótese 02	439,29 *	2483,33 *	479,17 *	4750,00 *	419,23 *	6358,33 *	435,71 *	8259,09 *
Hipótese 03	277,78 *	1810,00 *	607,14 *	3920,00 *	833,33 *	4505,00 *	577,78 *	6672,22 *
Hipótese 04	393,75 *	2538,89 *	300,00 *	5266,67 *	85,71 *	6794,44 *	62,50 *	8825,00 *
Hipótese 05	917,65 *	2011,54 *	1009,38 *	4404,17 *	1058,82 *	5438,46 *	269,44 *	8441,67 *

\* Diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre o grupo resistente (R) e susceptível (S).

Nota-se que as médias das ovelhas resistentes têm a tendência de permanecerem constantes nas quatro colheitas. Em alguns casos, chegam a diminuir. Apenas na hipótese 05, por incluir os animais da cura espontânea, observam-se valores médios de OPG um pouco mais altos, próximos a 1000 OPG. Na 16ª colheita, entretanto, a média cai para 270 OPG.

Por outro lado, as ovelhas consideradas susceptíveis tem um aumento da média de OPG de colheita para colheita, em todas as hipóteses formuladas. Conclui-se, portanto, que são estes animais os grandes responsáveis pelo aumento progressivo da média de OPG do rebanho, principalmente nas últimas semanas.

5.1.4 Resultados obtidos para os cordeiros nas cinco hipóteses propostas no item 4.7.1.2:

**Hipótese 01** - Foram consideradas todas as colheitas e corte ao nível de 300 OPG para os animais resistentes e 2000 OPG para os susceptíveis. Desta forma, 15 cordeiros (19,48%) foram considerados resistentes e 17 (22,08%), susceptíveis.

**Hipótese 02** - Considera-se somente as três primeiras colheitas e o corte feito ao nível de 500 OPG para as resistentes e 2500 OPG para os susceptíveis. Inclui 15 cordeiros como resistentes e 16 animais no grupo dos susceptíveis(20,78%).

**Hipótese 03 e 04** - Utilizam os mesmos critérios que os propostos para as ovelhas. Apresentaram, respectivamente, 12 e 13 cordeiros resistentes e 09 e 10 susceptíveis.

**Hipótese 05** - Considera-se apenas o OPG da terceira colheita e o corte em 1000 OPG para os animais resistentes e 6000 OPG para os susceptíveis. Nesta condição, 20 cordeiros foram classificados como resistentes (25,97%) e 17 (22,08%) como susceptíveis.

As médias de OPG dos cordeiros resistentes e susceptíveis, apresentam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,01$ ) na segunda e terceira colheita, em todas as hipóteses formuladas (Tabela 19).

Tabela 19 - Média do OPG dos cordeiros classificados como resistentes (R) ou susceptíveis (S), em cada colheita de fezes, e segundo as diferentes hipóteses de classificação.

	Colheita 01		Colheita 02		Colheita 03		Colheita 04	
	R	S	R	S	R	S	R	S
Hipótese 01	13,33	167,86	380,00 *	2711,76 *	213,33 *	8797,06 *	16,67 **	1158,82 **
Hipótese 02	13,33	167,86	380,00 *	2881,25 *	213,33 *	9109,38 *	16,67 **	546,88 **
Hipótese 03	4,17 *	388,89 *	291,67 *	3977,78 *	295,83 *	8744,44 *	16,67 **	894,44 **
Hipótese 04	4,17 *	415,00 *	196,15 *	3380,00 *	969,23 *	6840,00 *	873,08	500,00
Hipótese 05	130,00	138,24	1035,00 **	2405,88 **	262,50 *	9152,94 *	12,50	420,59

\* Diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre o grupo resistente (R) e susceptível (S).

\*\* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo resistente (R) e susceptível (S).

Novamente, observa-se que a média dos cordeiros considerados resistentes permanece baixa em todas as colheitas, independente da hipótese. Ressalva deve ser feita à hipótese 05 que, na segunda colheita, tem uma média de OPG de 1035 para os animais resistentes. Mesmo assim, há diferença significativa entre o grupo dos resistentes e o dos susceptíveis, nesta hipótese.

Ao comparar as cinco hipóteses, em relação ao número de animais classificados em cada grupo, observa-se que todas possuem características similares e os resultados são próximos (Tabela 20).

Tabela 20 - Comparação entre a percentagem de cordeiros considerados resistentes e susceptíveis pelas hipóteses 01, 02, 03, 04 e 05.

	Resistentes		Susceptíveis	
	Nº de cordeiros	%	Nº de cordeiros	%
Hipótese 01	15	19,48	17	22,08
Hipótese 02	15	19,48	16	20,78
Hipótese 03	12	15,58	09	11,69
Hipótese 04	13	16,88	10	12,99
Hipótese 05	20	25,97	17	22,08

Assim como nas ovelhas, há algumas diferenças nos cordeiros classificados como resistentes e susceptíveis. As hipóteses 1 e 2 (que diferem por usar todas as colheitas ou somente as três primeiras) possuem os mesmos cordeiros no grupo dos animais resistentes e susceptíveis. A exceção é a inclusão de um animal na hipótese 1, no grupo dos susceptíveis. Este animal (261AZ) apresenta um OPG de 10950 na 4ª colheita, mesmo após a desverminação da colheita anterior. Por este motivo, está incluído no grupo dos susceptíveis da hipótese 1 e não no da hipótese 2.

Comparando-se as hipóteses 3 e 4, observa-se que estas não diferem muito. A hipótese 04 apresenta um animal a mais, em cada um dos grupos considerados. Ao compará-las com as demais hipóteses, contudo, observa-se uma variação em relação aos animais classificados nos dois grupos, principalmente em relação aos cordeiros susceptíveis. A inclusão de hipóteses (3 e 4) que utilizaram a média geométrica de dados, transformados em logaritmos, visou a normalização destes dados. Caso não fossem transformados, a média do rebanho, em qualquer das hipóteses, ficaria muito alta (devido aos altos valores de OPG de alguns animais), alterando o cálculo do desvio padrão e, conseqüentemente, do nível do corte. Todavia, os animais que, por apresentarem apenas um único valor alto de OPG (por exemplo, 0, 50 e 10.000 OPG), não figuraram entre os cordeiros classificados como susceptíveis, ainda que tenham atingido tal OPG. Animais como estes, além de terem uma péssima resposta à verminose, são os maiores contribuidores para a contaminação das pastagens. Há, também, o caso do animal 261AZ, já citado anteriormente, que não é classificado como susceptível na hipótese 3. Porém, ele

chega a figurar no grupo dos resistentes da hipótese 4 (porque esta não considera a 4ª colheita).

No presente trabalho, as hipóteses 3 e 4 formuladas para os cordeiros, por apresentarem estas diferenças, não seriam consideradas como uma boa escolha para a seleção dos animais em resistentes e susceptíveis. Talvez, uma segunda avaliação, após a desverminação, pudesse confirmar ou infirmar tais hipóteses.

Quando se compara a hipótese 05, que utiliza somente um valor de OPG (da 3ª colheita), com as hipóteses que trabalham com as médias (1 e 2), há algumas diferenças. Na hipótese 05, o grupo de resistentes têm 5 animais a mais. Destes, três são cordeiros que manifestaram o fenômeno de cura espontânea e, portanto, tinham os valores de OPG bastante baixos na data avaliada. Esta é a única hipótese, que inclui como resistentes todos os cordeiros que tiveram cura espontânea, semelhante ao que ocorre com as ovelhas. Em relação aos animais considerados susceptíveis, apesar da semelhança quanto à percentagem, há diferenças em relação aos animais classificados. A hipótese 05 não inclui cinco animais que estão nas duas primeiras hipóteses (entre eles o animal 261AZ), e acrescenta outros cinco. Isto ocorre porque há animais que já apresentavam OPG mais alto na 2ª colheita (o que eleva a média). Porém, estes animais não ultrapassaram níveis superiores a 6000 OPG. Outros, por sua vez, tinham OPG muito baixo na 2ª colheita (o que diminui a média). Porém, atingem valores acima de 6000 OPG na terceira colheita.

Ao contrário do que ocorre com as ovelhas, as maiores variações quanto à classificação dos cordeiros estão no grupo dos animais susceptíveis. No grupo dos resistentes, 41,67% dos cordeiros estão classificados em todas as hipóteses. Já, no

grupo dos susceptíveis, somente 18,52% dos cordeiros participam de todas as hipóteses (Tabelas 21 e 22).

Tabela 21 - Cordeiros considerados resistentes,  
de acordo com as diferentes hipóteses propostas.

Nº cordeiro	Hipótese 01	Hipótese 02	Hipótese 03	Hipótese 04	Hipótese 05
224AZ	X	X	X	X	X
264AZ	X	X	X	X	X
134AM	X	X	X	X	X
245AZ	X	X	X	X	X
273AZ	X	X	X	X	X
277AZ	X	X	X	X	X
228AZ	X	X	X	X	X
236AZ	X	X	X	X	X
153AM	X	X	X	X	X
250AZ	X	X	X	X	X
242AZ	X	X	X		X
136AM	X	X			X
220AZ	X	X			X
217AZ	X	X			X
219AZ	X	X			X
133AM					X
210AZ					X
297AZ					X
160AM					X
268AZ					X
258AZ				X	
261AZ				X	
272AZ				X	
233AZ			X		
Total	15	15	12	13	20
%	19,48	19,48	15,58	16,88	25,97

Tabela 22 - Cordeiros considerados susceptíveis,  
de acordo com as diferentes hipóteses propostas.

Nº cordeiro	Hipótese 01	Hipótese 02	Hipótese 03	Hipótese 04	Hipótese 05
271AZ	X	X	X	X	X
247AZ	X	X	X	X	X
152AM	X	X	X	X	X
131AM	X	X	X	X	X
169AM	X	X	X	X	X
253AZ	X	X			
221AZ	X	X			X
254AZ	X	X			X
240AZ	X	X	X		
238AZ	X	X			
230AZ	X	X			
163AM	X	X			X
244AZ	X	X			X
157AM	X	X			X
269AZ	X	X			X
278AZ	X	X	X		X
261AZ	X				
225AZ			X	X	
227AZ			X	X	
216AZ				X	
213AZ				X	
296AZ				X	
270AZ					X
298AZ					X
248AZ					X
274AZ					X
234AZ					X
Total	17	16	9	10	17
%	22,08	20,78	11,69	12,99	22,08

As hipóteses propostas para a seleção dos animais (ovelhas e cordeiros) em resistentes e susceptíveis aos parasitas gastrintestinais foram baseadas somente na contagem de ovos nas fezes. Optou-se por trabalhar com este método, porque existe uma correlação entre o número de parasitas e a contagem de ovos de helmintos nas fezes (ROBERTS e SWAN, 1981). A quantificação do número de parasitas seria a forma mais direta de se medir a resposta do hospedeiro à infecção. Porém, esta quantificação implica na morte do animal (KASSAI *et al.*, 1990).

O valor de OPG no qual é feita a divisão das categorias, resistente e susceptível, é empírico e varia de acordo com a espécie do helminto (SRÉTER, KASSAI e TAKÁCS, 1994). Na literatura, vários níveis de corte podem ser encontrados. RIFFKIN e DOBSON (1979), descreveram média de 899 OPG  $\pm$  237 e 13801 OPG  $\pm$  2875 para cordeiros resistentes e susceptíveis, respectivamente, após infecção primária com 12000 larvas de *H. contortus*. KASSAI *et al.* (1990), utilizando infecção experimental dupla com 7000 larvas de *H. contortus*, definiu os valores limites de 200 OPG para resistentes e 2000 OPG para susceptíveis. SRÉTER, KASSAI e TAKÁCS (1994) utilizaram diferentes níveis de corte, segundo a espécie de helminto. Para o *H. contortus*, com infecção dupla com 7000 larvas, consideraram resistentes os cordeiros que não ultrapassassem o valor máximo de 1000 OPG. Os susceptíveis, por sua vez, seriam aqueles que tivessem mais que 3000 OPG. Para o *T. colubriformis*, com infecção dupla com 15000 larvas, os cortes se deram ao nível de 400 OPG e 900 OPG, respectivamente.

Neste trabalho foi utilizada infecção natural. Desta forma, não há controle do número de larvas ingeridas pelos animais. Parte-se do princípio, entretanto, que todos tiveram as mesmas oportunidades de contaminação. O resultado da cultura

de larvas demonstrou que *H. contortus* era predominante (83% das larvas da cultura), porém, considerou-se como sendo infecção mista. Por isso, diferentes critérios foram utilizados para definir o corte, após a análise dos resultados de OPG. Foram considerados valores baixos de verminose OPG abaixo de 1000, quando feita uma única avaliação. Por sua vez, quando utilizada média geométrica de OPG, com os números transformados em logaritmo (log), o corte foi feito no valor de OPG correspondente à média - um desvio padrão, para resistentes e média + um desvio padrão, para susceptíveis.

Quanto à época de avaliação dos dados de OPG, para a separação dos grupos, há discussão, na literatura. A grande maioria dos trabalhos utilizam infecções experimentais, para a seleção dos animais. KASSAI *et al.* (1990) encontraram que a melhor forma de separação dos animais seria avaliar o OPG aproximadamente 50 dias após a segunda infecção. ALBERS *et al.* (1987), em trabalho realizado com infecção experimental primária e secundária, sugerem que a avaliação da contagem de ovos nas fezes deve ser feita após 4 a 6 semanas da segunda infecção. Outros autores demonstram que a seleção baseada no OPG máximo, após um desafio com larvas de *H. contortus*, é efetiva em identificar os animais resistentes e susceptíveis (WOOLASTON, BARGER e PIPER, 1990).

No presente trabalho, realizado com infecção natural, várias análises foram feitas durante o transcurso do experimento, objetivando estudar a melhor época para proceder a avaliação, e quantas avaliações seriam necessárias. Para as ovelhas foram realizados 16 exames de fezes e, para os cordeiros, 4 exames. As hipóteses propostas utilizam diferentes critérios quanto ao número de colheitas: todas, somente algumas ou uma única.

A comparação entre as hipóteses que utilizaram os valores de OPG de todas as colheitas ou de somente algumas, revela que, tanto para as ovelhas como para os cordeiros, não se observam variações significativas.

Uma confirmação de que estes dois critérios não diferem é a análise das médias dos valores de eosinófilos, hematócrito e concentração de hemoglobina, dos grupos considerados resistentes e susceptíveis pelos dois critérios. Estas médias apresentaram diferenças significativas nas mesmas colheitas, em ambos os critérios (itens 5.3, 5.4 e 5.5).

Portanto, as hipóteses que trabalharam com somente algumas colheitas, podem ser consideradas mais apropriadas, por necessitarem de menor número de análises.

Quando o critério utilizado foi uma única colheita, preferiu-se trabalhar com as de maior valor de OPG, 16<sup>a</sup> para as ovelhas e 3<sup>a</sup> para os cordeiros. No caso dos cordeiros, esta seria a única colheita que, quando analisada isoladamente, permitiria a separação dos animais em resistentes e susceptíveis. Isto significa que, para este trabalho, a melhor época para a avaliação, no caso dos cordeiros, seria quatro meses após o desmame. No caso das ovelhas, as avaliações a partir da 12<sup>a</sup> colheita de OPG já poderiam ser utilizadas.

Quando se comparam as hipóteses que utilizaram várias colheitas, com as que trabalharam com uma única, há diferenças. As hipóteses que consideram um único valor de OPG, incluem todos os animais que apresentaram cura espontânea. Uma vez que este fenômeno não seria repetitivo, ou seja, não conferiria resistência a infecções posteriores, estes animais, antes da queda do OPG, podem contribuir com a contaminação ambiental.

## 5.2 TIPO DE HEMOGLOBINA

A determinação do tipo de hemoglobina mostrou que, das 64 ovelhas, apenas uma apresentou o genótipo AA, seis apresentaram o AB e 57, o genótipo BB. A frequência do alelo A aumenta nos cordeiros, onde há três animais AA, 18 com genótipo AB e 56 com o BB. Isto significa uma frequência alélica de 0,11 e 0,89 para os alelos A e B, respectivamente, neste rebanho estudado (Tabela 23).

Tabela 23 - Frequência dos tipos de hemoglobina das ovelhas e cordeiros.

	AA		AB		BB		TOTAL	Frequência alélica A	Frequência alélica B
	n	%	n	%	n	%	n		
Ovelhas	01	1,56	06	9,38	57	89,06	64	0,06	0,94
Cordeiros	03	3,90	18	23,39	56	72,73	77	0,16	0,84
Total	04	2,84	24	17,02	113	80,14	141	0,11	0,89

n = número de animais

FAN, MOREIRA e FISCHER (1981) estudaram a frequência do tipo de hemoglobina em ovinos criados no município de Santa Maria, RS. O resultado obtido por esses autores é próximo ao encontrado no presente trabalho: 4,7% de ovinos tipo AA; 29,7% de animais com o genótipo AB; e a maior percentagem (65,6%), apresentou a hemoglobina BB. A raça Crioula Lanada, criada no sul do país, também foi avaliada para o tipo de hemoglobina. A frequência do alelo A foi de 0,33, superior à frequência encontrada neste trabalho (HENKES *et al.*, 1993). Na

literatura internacional, há grande variação na frequência dos alelos A e B, sendo possível distinguir raças com predominância de um ou de outro tipo (EVANS, HARRIS e WARREN, 1957; HUISMAN, VLIET e SEBENS, 1958). Para a raça Suffolk, há registro nos EUA de rebanhos com frequência de 0,85 e 1,00 para o alelo B (WANG, FOOTE e BUNCH, 1991).

No presente experimento, a baixa percentagem de animais com genótipo AA não permitiu que fossem feitas correlações entre o tipo de hemoglobina e outros parâmetros indicadores de parasitismo. Todavia, considerando qualquer uma das hipóteses para a seleção das ovelhas e cordeiros, encontram-se animais AA, AB e BB nos dois grupos (animais resistentes e susceptíveis). A resposta dos animais frente às parasitoses parece ser independente do tipo de hemoglobina (Tabela 24).

Tabela 24 - Percentagem de ovelhas e cordeiros AB e AA em relação ao nº de animais considerados resistentes ou susceptíveis em cada hipótese.

Hipótese	% AB resistente		% AB susceptível		% AA resistente		% AA susceptível	
	Ovelhas	Cordeiros	Ovelhas	Cordeiros	Ovelhas	Cordeiros	Ovelhas	Cordeiros
01	12,50	26,67	14,28	23,53	6,25	-	-	11,76
02	7,14	26,67	16,67	25,00	-	-	-	12,50
03	-	33,33	20,00	22,22	11,11	-	-	11,11
04	12,50	30,77	11,11	20,00	-	-	-	10,00
05	5,56	20,00	15,38	23,53	-	-	-	5,88

Vários trabalhos encontram relação entre o genótipo AA e uma maior resistência (EVANS, BLUNT e SOUTHCOTT, 1963; JILEK e BRADLEY, 1969; ALLONBY e URQUHART, 1976; ALTAIF e DARGIE, 1978 a, b; PRESTON e ALLONBY, 1979; CHIMINAZZO *et al.*, 1996). Alguns destes trabalhos mostram que

a maior resistência dos animais portadores do genótipo AA seria em virtude da maior afinidade deste tipo de hemoglobina ao oxigênio (HUISMAN, VLIET e SEBENS, 1958; EVANS, BLUNT e SOUTHCOTT, 1963). Outros autores sugerem que, devido à habilidade da hemoglobina A produzir um tipo especial de hemoglobina (hemoglobina tipo C), durante a fase de anemia, os animais portadores deste tipo de hemoglobina seriam mais resistentes aos efeitos das parasitoses (BLUNT e EVANS, 1963; VLIET e HUISMAN, 1964; BEALE *et al.*, 1966). Outros trabalhos, por sua vez, defendem a teoria de que as diferenças encontradas quanto à resistência estariam mais ligadas à habilidade dos animais em desenvolverem uma boa resposta imunológica, e que o tipo de hemoglobina atuaria somente como um marcador para esta habilidade (ALTAIF e DARGIE, 1978, a; CUPERLOVIC *et al.*, 1978; PRESTON e ALLONBY, 1979).

Outros autores, no entanto, não encontraram relação entre tipo de hemoglobina e resistência à verminose (RADHAKRISHNAN, BRADLEY e LOGGINS, 1972; YAZWINSKI *et al.*, 1980; WINDON, DINEEN e KELLY, 1980; KASSAI *et al.*, 1990).

### 5.3. HEMATÓCRITO

#### 5.3.1 Ovelhas

Foram analisados os valores médios do hematócrito (Ht) das quatro colheitas de sangue. Há uma diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre a média da 4ª colheita e as anteriores, indicando que a queda no Ht é reflexo direto do aumento

do parasitismo, demonstrado pelo aumento do OPG, que ocorreu a partir da 12ª colheita de fezes (Tabela 25).

Tabela 25 - Média do hematócrito (dado em %) das 64 ovelhas, segundo nº da colheita.

Colheita nº	Data	Média	Valor mínimo	Valor máximo
01	08/09/95	33,39 <sup>a</sup>	26,00	40,00
02	05/10/95	33,10 <sup>a</sup>	27,00	43,00
03	05/11/95	31,85 <sup>a</sup>	23,00	39,00
04	07/12/95	26,98 <sup>b</sup>	19,00	37,00

Obs.: Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$ )

Os valores de hematócrito, considerados normais para ovinos, variam de 27% a 45%, com média de 35% (JAIN, 1993). Já na terceira colheita, observa-se ovelhas com valores abaixo do normal (valor mínimo = 23%), indicando que alguns animais, antes que outros, começam a manifestar os efeitos da infecção parasitária. Nota-se que a média da quarta colheita está no limite inferior dos valores considerados normais.

Estas variações, nos valores do hematócrito, podem ser melhor distinguidas quando se analisa a média do hematócrito das quatro colheitas de sangue de cada ovelha. Nota-se que 75% encontram-se dentro do intervalo média  $\pm 1$  desvio padrão, 93,31%, no intervalo média  $\pm 2$  desvios padrão e 98,44% estão situadas entre a média  $\pm 3$  desvios padrão (Figura 04).

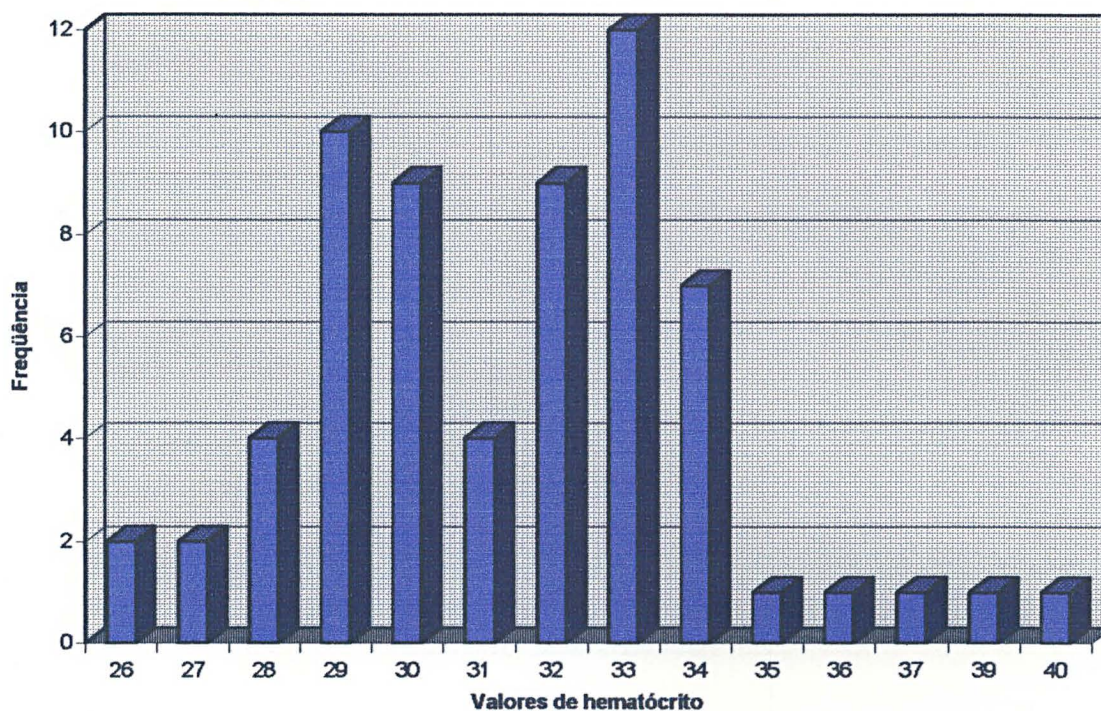


Figura 04 - Histograma da média dos valores de hematócrito das 4 colheitas de cada ovelha. Os valores foram arredondados para permitir melhor visualização dos dados.

Ao relacionar o hematócrito com o OPG, analisando a média dos valores de hematócrito das ovelhas consideradas resistentes e susceptíveis, observam-se os mesmos resultados nas diferentes hipóteses. Todas mostraram uma diferença significativa, na 4ª colheita, entre a média dos dois grupos (Tabela 26).

Tabela 26 - Média do hematócrito (em %) das ovelhas classificadas como resistentes (R) ou susceptíveis (S), em cada colheita de sangue, e segundo as diferentes hipóteses de classificação.

	Colheita 01		Colheita 02		Colheita 03		Colheita 04	
	R	S	R	S	R	S	R	S
Hipótese 01	33,14	32,77	33,69	32,07	32,54	31,00	29,46 **	24,00 **
Hipótese 02	32,64	32,27	32,93	31,33	31,92	30,43	29,38 **	23,36 **
Hipótese 03	34,00	33,75	34,11	32,00	33,43	30,33	29,63 *	25,11 *
Hipótese 04	32,50	32,63	33,13	31,22	32,83	31,00	30,14 **	22,88 **
Hipótese 05	32,87	33,17	32,50	32,00	31,73	30,00	28,29 **	23,82 **

\* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo resistente (R) e susceptível (S).

\*\* Diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre o grupo resistente (R) e susceptível (S).

Observa-se que, no grupo das ovelhas consideradas resistentes, a média do hematócrito na quarta colheita está dentro do considerado normal para a espécie. No entanto, os valores das ovelhas susceptíveis, está bem abaixo. Esta diferença significativa dos valores de hematócrito, entre os grupos das ovelhas resistentes e susceptíveis, reflete uma relação inversa entre estes valores e a contagem de OPG, utilizada para a classificação dos animais. Ou seja, as ovelhas com menor OPG, possuem os maiores valores de Ht e vice-versa. Porém, esta diferença só pode ser observada na última colheita, quando o nível de infecção parasitária estava máximo. Este resultado reafirmaria que a 16<sup>a</sup> colheita seria a mais indicada para a seleção das ovelhas.

### 5.3.2 Cordeiros

Os cordeiros apresentaram queda nos valores de hematócrito nas três primeiras colheitas, recuperando os valores na 4ª colheita, após a desverminação. A análise estatística, contudo, mostra que somente a queda da 1ª para a 2ª colheita é significativa (Tabela 27).

Tabela 27 - Média do hematócrito (dado em %) dos 77 cordeiros, segundo nº da colheita.

Colheita nº	Data	Média	Valor mínimo	Valor máximo
01	17/01/96	34,80 <sup>a</sup>	27,00	42,00
02	14/02/96	30,17 <sup>b</sup>	20,00	36,00
03	11/03/96	27,37 <sup>b</sup>	14,00	37,00
04	10/04/96	30,05	10,00	36,00

Obs.: Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$ )

Os resultados dos cordeiros demonstram que, já na segunda colheita, há animais com valores de hematócrito abaixo do normal (27% a 45%). A média da terceira colheita, que coincide com a de maior valor de OPG, está próxima ao limite inferior do considerado normal.

Após a separação dos cordeiros em resistentes e susceptíveis, através da contagem de OPG, foi feita uma comparação com o hematócrito. Observa-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na 2ª colheita, entre os dois grupos, nas quatro primeiras hipóteses. Já, na 3ª colheita, somente a hipótese 04 não apresenta diferença significativa (Tabela 28).

Tabela 28 - Média do hematócrito (em %) dos cordeiros classificados como resistentes (R) ou susceptíveis (S), em cada colheita de sangue, e segundo as diferentes hipóteses de classificação.

	Colheita 01		Colheita 02		Colheita 03		Colheita 04	
	R	S	R	S	R	S	R	S
Hipótese 01	36,25	33,63	33,14 **	28,30 **	31,13 **	23,00 **	31,00	26,70
Hipótese 02	36,25	33,63	33,14 **	28,30 **	31,13 **	23,00 **	31,00	27,78
Hipótese 03	36,11 *	32,17 *	33,00 *	26,60 *	31,57 **	23,67 **	30,56	26,88
Hipótese 04	36,11 **	32,75 **	33,00 *	27,33 *	29,63	26,00	29,40	30,14
Hipótese 05	35,19	33,78	31,36	28,44	31,38 **	23,92 **	30,88	28,73

\* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo resistente (R) e susceptível (S).

\*\* Diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre o grupo resistente (R) e susceptível (S).

Como para as ovelhas, foi encontrada uma relação inversa entre os valores de OPG e hematócrito. E, novamente, apenas os cordeiros considerados susceptíveis, apresentaram valores de hematócrito abaixo do normal.

ALBERS *et al.* (1987) demonstram que há correlação entre a contagem de ovos nas fezes e os valores de hematócrito, servindo o hematócrito como uma alternativa de seleção. Porém KASSAI *et al.* (1990), não encontraram relação que pudesse sugerir que o hematócrito seria um parâmetro útil na seleção de animais resistentes e susceptíveis.

## 5.4. CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA

### 5.4.1 Ovelhas

A análise dos resultados das quatro colheitas, em relação à concentração de hemoglobina circulante, demonstra que houve um declínio a cada colheita. Todavia,

foi entre a 2ª e 3ª colheita que houve uma diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) (Tabela 29).

Tabela 29 - Média da concentração de Hb (dada em g/dl) das 64 ovelhas, segundo nº da colheita.

Colheita nº	Data	Média	Valor mínimo	Valor máximo
01	08/09/95	11,99 <sup>a</sup>	8,87	14,76
02	05/10/95	10,80 <sup>a</sup>	8,76	16,25
03	05/11/95	8,45 <sup>b</sup>	6,12	10,89
04	07/12/95	7,07 <sup>b</sup>	4,50	10,26

Obs.: Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$ )

Comparando o resultado das médias da concentração de hemoglobina e do hematócrito das ovelhas, observa-se o mesmo comportamento, com uma diminuição nos seus valores, mês a mês. No entanto, a queda dos valores de concentração de hemoglobina, com diferença estatística significativa, ocorreu um mês antes que a do hematócrito. Os valores considerados normais para a concentração de hemoglobina circulante dos ovinos é de 9 a 15 g/dl, sendo a média de 11,5 g/dl (JAIN, 1993). Observa-se que a média de concentração de hemoglobina das ovelhas já estava abaixo do normal na terceira colheita, confirmando a queda mais rápida da concentração da hemoglobina em relação ao hematócrito. SCHALM, JAIN e CARROL (1975) citam observações de diminuição da concentração de hemoglobina durante e logo depois da estação de nascimentos.

Ao relacionar a concentração de hemoglobina com os valores de OPG, analisou-se as médias das ovelhas consideradas resistentes e susceptíveis.

Observa-se diferença estatística significativa entre os dois grupos analisados somente na 4ª colheita, independente da hipótese (Tabela 30).

Tabela 30 - Média da concentração de hemoglobina (g/dl) das ovelhas classificadas como resistentes (R) ou susceptíveis (S), em cada colheita de sangue, e segundo as diferentes hipóteses de classificação.

	Colheita 01		Colheita 02		Colheita 03		Colheita 04	
	R	S	R	S	R	S	R	S
Hipótese 01	11,96	11,96	11,05	10,51	8,66	8,19	7,56 **	5,97 **
Hipótese 02	11,81	12,01	10,67	10,47	8,53	8,14	7,65 **	5,84 **
Hipótese 03	12,84	12,26	11,40	10,61	9,00	8,04	7,74 **	6,21 **
Hipótese 04	11,70	11,87	10,75	10,32	8,70	8,15	7,96 **	5,63 **
Hipótese 05	11,84	12,11	10,63	10,50	8,60	8,50	7,49 **	6,09 **

\* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo resistente (R) e susceptível (S).

\*\* Diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre o grupo resistente (R) e susceptível (S).

Da mesma forma que para o hematócrito, a diferença significativa dos valores de concentração de hemoglobina entre os grupos das ovelhas resistentes e susceptíveis, reflete uma relação inversa entre estes valores e a contagem de OPG. Esta diferença também só pode ser observada na última colheita, quando o nível de infecção parasitária estava máximo. Todavia, a queda mais pronunciada da concentração de hemoglobina, fez com que alguns animais resistentes apresentassem valores abaixo do considerado normal.

### 5.4.2 Cordeiros

A média da concentração de hemoglobina circulante dos 77 cordeiros, nas quatro semanas, mostra queda a cada colheita e uma recuperação na 4ª colheita. No caso dos cordeiros, a queda com significância estatística ( $p < 0,05$ ) ocorreu da 2ª para a 3ª colheita, um mês após o hematócrito (Tabela 31).

Tabela 31 - Média da concentração de Hb (dada em g/dl) dos 77 cordeiros, segundo nº da colheita.

Colheita nº	Data	Média	Valor mínimo	Valor máximo
01	17/01/96	11,33 <sup>a</sup>	7,32	15,19
02	14/02/96	10,86 <sup>a</sup>	6,36	13,90
03	11/03/96	9,58 <sup>b</sup>	4,43	13,05
04	10/04/96	10,02	3,17	12,50

Obs.: Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$ )

Se forem relacionados os dados da concentração de hemoglobina com o OPG, por meio da comparação das médias dos cordeiros resistentes e susceptíveis, observa-se diferença estatística significativa na 3ª colheita, para todas as hipóteses propostas. No entanto, na 2ª colheita, somente as hipóteses 03 e 04 mostraram diferença estatística significativa (Tabela 32).

Tabela 32 - Média da concentração de hemoglobina (g/dl) dos cordeiros classificados como resistentes (R) ou susceptíveis (S), em cada colheita de sangue, e segundo as diferentes hipóteses de classificação.

	Colheita 01		Colheita 02		Colheita 03		Colheita 04	
	R	S	R	S	R	S	R	S
Hipótese 01	11,63 *	10,69 *	11,69	10,29	10,76 **	8,21 **	10,18 *	9,09 *
Hipótese 02	11,63 *	10,62 *	11,69	10,29	10,76 **	8,24 **	10,18	9,38
Hipótese 03	11,75 **	10,52 **	12,05 **	8,96 **	11,03 *	8,87 *	10,34 *	8,69 *
Hipótese 04	11,67 **	10,72 **	11,88 *	9,54 *	10,40 **	9,46 **	9,81	9,57
Hipótese 05	11,33	10,94	11,08	10,12	10,61 **	8,70 **	10,04	9,82

\* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo resistente (R) e susceptível (S).

\*\* Diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre o grupo resistente (R) e susceptível (S).

Novamente, há uma relação inversa entre a concentração de hemoglobina e os valores de OPG. O conteúdo normal de hemoglobina no eritrócito, em base de volume, é de aproximadamente 33,3%. Desta forma, torna-se possível prever o valor de concentração de hemoglobina, de uma amostra de sangue, dividindo o valor do hematócrito por três (SCHALM, JAIN e CARROL, 1975). Portanto, as considerações feitas para o hematócrito poderiam servir para a concentração de hemoglobina.

## 5.5 CONTAGEM DE EOSINÓFILOS

### 5.5.1 Ovelhas

A média do número de eosinófilos foi feita para todas as ovelhas, em cada uma das quatro colheitas. A análise estatística revela um aumento significativo da 2ª

para a 3ª colheita, que coincide com o aumento da eliminação de ovos de *estrongilídeos* nas fezes dos animais (Tabela 33).

Tabela 33 - Média da contagem de eosinófilos (em eosinófilos/mm<sup>3</sup>) das 64 ovelhas, segundo nº da colheita.

Colheita nº	Data	Média	Valor mínimo	Valor máximo
01	08/09/95	201,75 <sup>a</sup>	9,38	2759,38
02	05/10/95	180,70 <sup>a</sup>	9,38	1156,25
03	05/11/95	214,06 <sup>b</sup>	56,25	768,75
04	07/12/95	287,84 <sup>b</sup>	40,63	1234,38

Obs.: Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$ )

Ao analisar os valores individuais da contagem de eosinófilos das ovelhas, observa-se que somente um animal (467BC) apresentou valores acima do considerado normal por JAIN (1993), que é de 0 a 1000 eosinófilos/ $\mu$ l, sendo a média de 400 eosinófilos/ $\mu$ l.

### 5.5.2 Cordeiros

Os cordeiros apresentaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da média do número de eosinófilos da 1ª para a 2ª colheita. Houve, também, um aumento da média da 2ª para a 3ª avaliação, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 34).

Tabela 34 - Média da contagem de eosinófilos (em eosinófilos/mm<sup>3</sup>) dos 77 cordeiros, segundo nº da colheita.

Colheita nº	Data	Média	Valor mínimo	Valor máximo
01	17/01/96	140,54 <sup>a</sup>	9,38	909,38
02	14/02/96	193,51 <sup>b</sup>	18,75	1103,13
03	11/03/96	248,09 <sup>b</sup>	18,75	1037,50
04	10/04/96	182,27	18,75	737,50

Obs.: Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$ )

A quarta contagem de eosinófilos dos cordeiros não foi avaliada estatisticamente, devido à influência do anti-helmíntico. Mas, o que se observa é uma queda da média nesta colheita, o que vem de encontro aos dados obtidos por outros autores, que observaram um pequeno aumento dos valores de eosinófilos, logo após à desverminação, com queda acentuada nas semanas seguintes (STEAR *et al.*, 1995).

Ao analisar os valores individuais, de ovelhas e cordeiros, observa-se que há uma variação na contagem. Esta difere de animal para animal, sendo que, enquanto alguns tiveram um aumento na contagem dos eosinófilos, outros apresentaram uma diminuição. Quando se analisa esta variação do número de eosinófilos em conjunto com os dados de OPG, pode-se dividir os animais em quatro grupos (serão consideradas somente a 3ª e 4ª contagens de eosinófilos, no caso das ovelhas, e a 2ª e 3ª, no caso dos cordeiros, porque correspondem às de maior variação de OPG):

**Grupo 1** - Há um aumento do número de eosinófilos e uma diminuição do OPG. Neste grupo podem ser classificadas 17 ovelhas (26,56%) e 10 cordeiros (12,99%) (Figura 05).

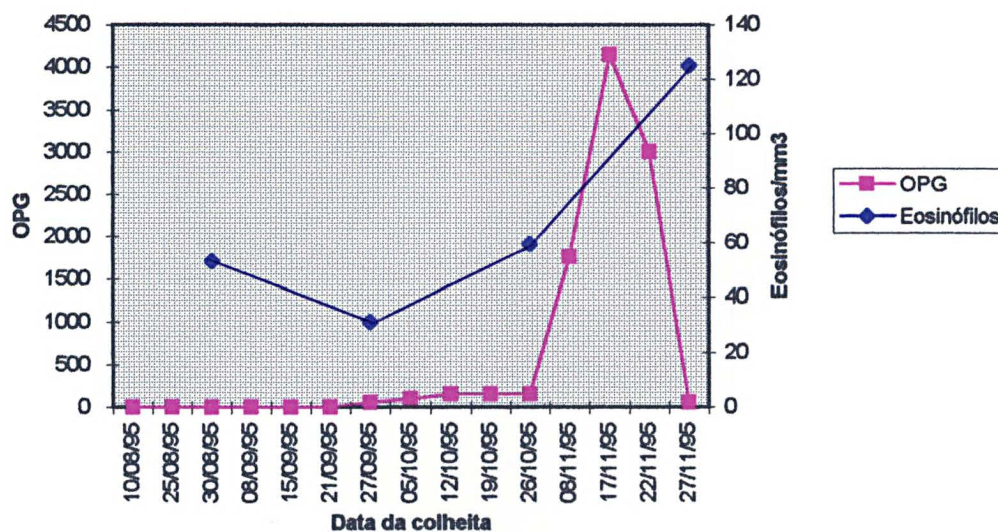


Figura 05 - Curva da contagem de eosinófilos e dos valores de OPG de uma ovelha classificada no grupo 01, onde há uma relação inversa entre número de eosinófilos e OPG.

**Grupo 2** - Há uma diminuição do número de eosinófilos e um aumento do OPG. Neste grupo poderiam ser incluídas 16 ovelhas (25%) e 23 cordeiros (29,87%) (Figura 06).

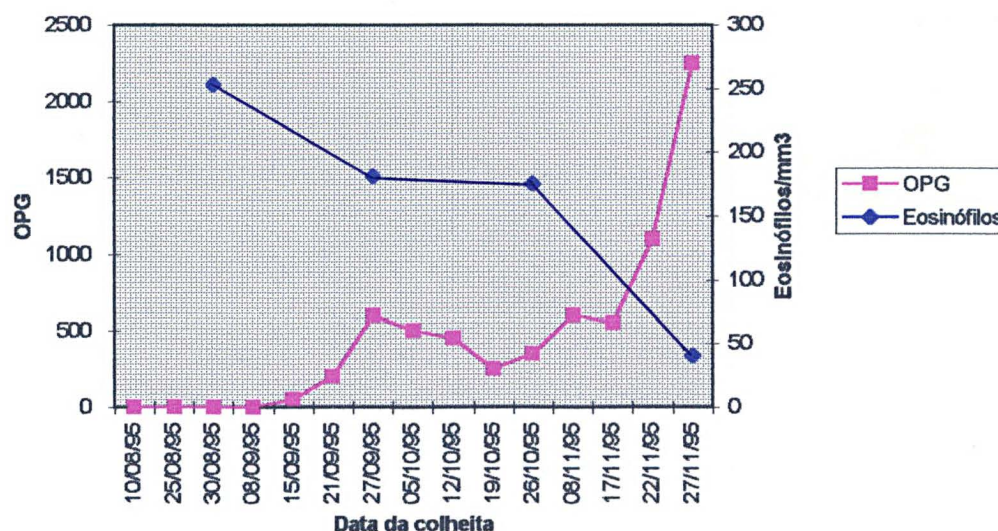


Figura 06 - Curva da contagem de eosinófilos e dos valores de OPG de uma ovelha classificada no grupo 02, onde se observa uma diminuição do número de eosinófilos e um aumento de OPG.

**Grupo 3** - Há um aumento do número de eosinófilos e simultaneamente ocorre um aumento do OPG. Neste grupo podem ser classificadas 23 ovelhas (35,94%) e 37 cordeiros (48,05%) (Figura 07).

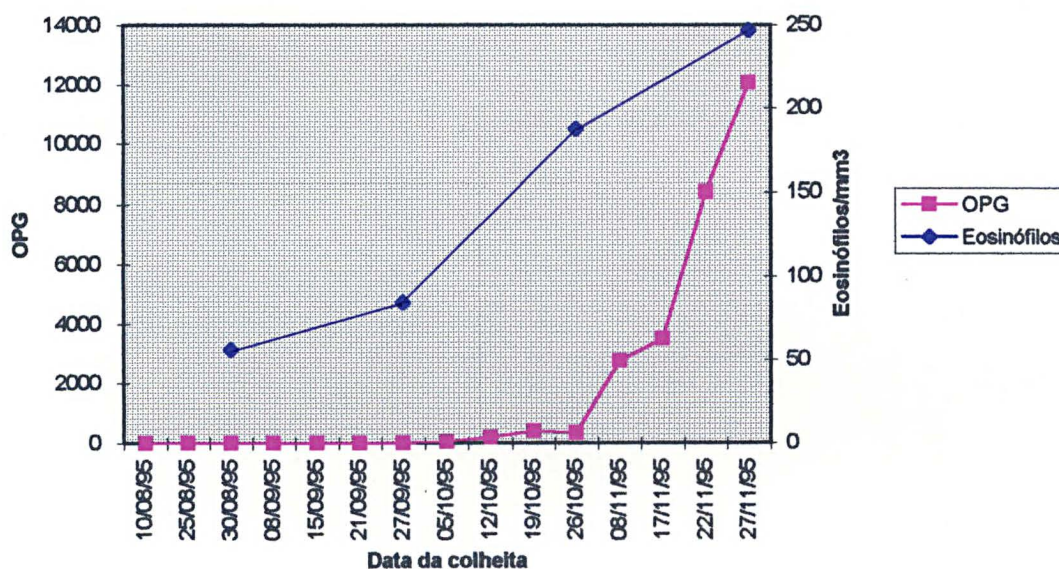


Figura 07 - Curva da contagem de eosinófilos e dos valores de OPG de uma ovelha classificada no grupo 03, onde ocorre aumento concomitante do número de eosinófilos e OPG.

**Grupo 4** - Há uma diminuição do número de eosinófilos e uma diminuição do OPG. Neste grupo poderiam ser incluídas 8 ovelhas (12,5%) e 7 cordeiros (9,09%) (Figura 08).

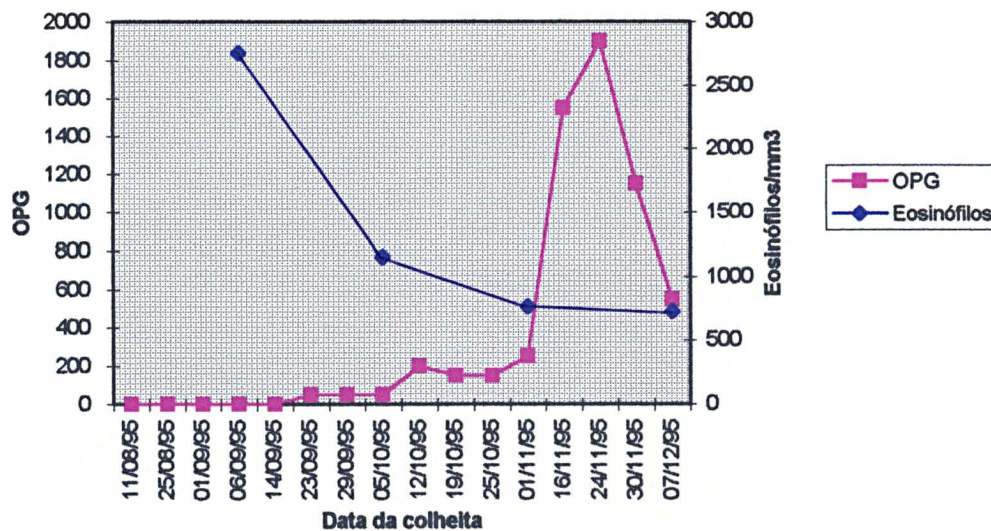


Figura 08 - Curva da contagem de eosinófilos e dos valores de OPG de uma ovelha classificada no grupo 04, onde existe uma relação direta entre número de eosinófilos e OPG.

A variação na contagem do número dos eosinófilos durante a infecção é importante, por indicar como o animal está reagindo imunologicamente frente às parasitoses. O esperado é uma relação inversa entre eosinófilos e OPG (BUDDLE *et al.*, 1992), ou seja, um aumento do número de eosinófilos e uma queda do OPG e vice-versa (grupos 1 e 2). No caso das ovelhas, estes dois grupos somam 51,56%. Quanto aos cordeiros, os grupos 1 e 2 representam 42,86%.

Por outro lado, a percentagem de animais que tem um aumento de eosinófilos e um aumento concomitante de OPG é maior nos cordeiros que nas ovelhas (48,05% contra 35,94%), indicando um sistema imunológico menos eficiente dos cordeiros.

Ao relacionar os valores de eosinófilos com os de OPG, observa-se que as médias do número de eosinófilos das ovelhas, classificadas como resistentes e

susceptíveis, mostram variações entre as hipóteses. As hipóteses 01 e 02, apresentam diferenças significativas entre as médias dos dois grupos, nas colheitas 1, 2 e 3. A hipótese 03, no entanto, não mostra diferença em nenhuma das colheitas. As hipóteses 04 e 05 apresentaram, também, diferença significativa na 2ª, 3ª e 4ª colheitas (Tabela 35).

Tabela 35 - Média do número de eosinófilos (/mm<sup>3</sup>) das ovelhas classificadas como resistentes (R) ou susceptíveis (S), em cada colheita de sangue, e segundo as diferentes hipóteses de classificação.

	Colheita 01		Colheita 02		Colheita 03		Colheita 04	
	R	S	R	S	R	S	R	S
Hipótese 01	175,00 **	81,73 **	205,27 *	109,15 *	247,85 **	155,80 **	311,72	196,43
Hipótese 02	163,28 *	84,09 *	206,92 **	91,93 **	254,91 **	164,84 **	298,66	212,24
Hipótese 03	148,44	97,66	211,11	110,00	243,06	162,19	366,32	210,31
Hipótese 04	125,45	59,77	211,33 *	92,01 *	280,08 *	172,57 *	367,19 *	195,49 *
Hipótese 05	302,15	130,73	259,55 *	167,55 *	289,76 **	166,11 **	396,53 *	202,64 *

\* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo resistente (R) e susceptível (S).

\*\* Diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre o grupo resistente (R) e susceptível (S).

Os resultados apresentados acima mostram que, em todas as colheitas, a média de eosinófilos de grupo das ovelhas consideradas resistentes (com baixo OPG) é superior aos das consideradas susceptíveis (com alto OPG).

BUDDLE *et al.* (1992) observaram uma significativa correlação negativa entre eosinofilia sangüínea e OPG, que foi relacionada ao "status" de resistência dos ovinos aos parasitas. Portanto, segundo esses autores, a eosinofilia estaria mais associada com a expressão de resistência aos nematóides do que como indicador da presença de infecção, servindo para avaliar a resposta imunológica.

DAWKINS, WINDON e EAGLESON (1989) não encontraram evidências para sugerir que altas contagens de eosinófilos seriam um “marcador” para resistência ao *T. colubriformis* antes da infecção, pois as correlações pré-vacinação foram baixas e não significativas. Porém, as comparações das correlações entre os diferentes períodos pós-infecção indicam que os coeficientes são negativos e aumentam muito com a indução dos mecanismos imunológicos que causam a rejeição do parasita. Isto pode ser observado nas hipóteses 04 e 05, que tiveram diferenças significativas na média de eosinófilos somente após a segunda avaliação.

Quanto ao número de eosinófilos dos cordeiros, em nenhuma das hipóteses formuladas, são observadas diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de animais classificados como resistentes ou susceptíveis (Tabela 36).

Tabela 36 - Média do número de eosinófilos (/mm<sup>3</sup>) dos cordeiros classificados como resistentes (R) ou susceptíveis (S), em cada colheita de sangue, e segundo as diferentes hipóteses de classificação.

	Colheita 01		Colheita 02		Colheita 03		Colheita 04	
	R	S	R	S	R	S	R	S
Hipótese 01	223,96	142,28	254,38	140,44	339,79	149,27	168,33	133,82
Hipótese 02	223,96	147,85	254,38	142,58	339,79	153,32	168,33	141,02
Hipótese 03	261,46	165,28	281,77	212,15	259,64	219,10	154,69	167,01
Hipótese 04	225,96	171,56	265,87	191,56	259,62	280,94	152,89	216,25
Hipótese 05	190,16	120,96	222,03	201,29	338,44	194,85	194,53	179,23

Ao comparar os valores de contagem de eosinófilos entre os animais identificados como resistentes ou susceptíveis, novamente nota-se diferença entre

as ovelhas e os cordeiros. Enquanto nas ovelhas há diferenças significativas entre os dois grupos (Tabela 35), no caso dos cordeiros, em nenhuma das hipóteses ou colheitas consideradas, há diferenças estatisticamente significativas (Tabela 36). Porém, observa-se, no caso da hipótese 01, 02 e 05, formuladas para os cordeiros, uma média maior do número de eosinófilos no grupo dos resistentes.

Os cordeiros, neste experimento, tinham entre 4 e 5 meses no início das avaliações (janeiro), chegando aos 6 a 7 meses na época da terceira colheita. SRÉTER, KASSAI e TAKÁCS (1994) sugerem que a resistência genética dos parasitas gastrintestinais resulta, parcialmente, da expressão de uma resposta imunológica adquirida. Os cordeiros estariam prontos para um teste de resposta em torno dos 6 meses, quando já teriam sua capacidade de montar uma resposta imunológica completa. É possível que, no início deste experimento, os cordeiros ainda não tivessem uma total capacidade de resposta imunológica, principalmente aqueles que nasceram no final da estação de nascimento. As diferenças de resposta dos eosinófilos dos cordeiros, tanto no número, quanto na variação da contagem, comparadas às das ovelhas, confirmariam esta hipótese.

Outro fator que poderia explicar a variação do número dos eosinófilos nos cordeiros é a metodologia empregada. Neste experimento, os animais foram desverminados no desmame, utilizando como critério o resultado do exame de fezes de alguns animais que apresentavam OPG acima de 1000. Como se trabalhou com infecção natural, e os cordeiros estavam com 3 a 4 meses na época do desmame, era indicativo que todos os animais tivessem tido contato prévio com os helmintos gastrintestinais. Principalmente porque, na época (dezembro), havia uma alta contaminação de pastagem.

Os autores utilizam infecção experimental dupla (ALBERS *et al.*, 1987; KASSAI *et al.*, 1990; SRÉTER, KASSAI e TAKÁCS, 1994), ou infecção experimental única, mas com animais previamente expostos à infecção natural (WOOLASTON, BARGER e PIPER, 1990). Há necessidade da dupla infecção porque, ao contrário do que se espera, durante a primeira infecção, os cordeiros resistentes podem apresentar uma contagem de ovos nas fezes maior e, somente após a segunda infecção, é que apresentam valores de OPG significativamente inferiores (GILL, 1991). SRÉTER, KASSAI e TAKÁCS (1994) encontraram valores maiores e menores de OPG já na primeira infecção, para os cordeiros susceptíveis e resistentes, respectivamente. Porém, os valores de correlação entre a primeira e segunda infecções são relativamente baixos, levando-os a confirmar a hipótese de GILL (1991), que a segunda infecção proporciona uma base mais confiável para a separação dos cordeiros.

Seria necessário uma segunda colheita após a desverminação, quando os animais estariam com 8 a 9 meses de idade e, com segurança, em infecção secundária, para confirmar ou infirmar esta hipótese.

## 5.6 ANÁLISES DE CLUSTER E K-MÉDIAS

### 5.6.1 OVELHAS

Baseadas nas análises propostas no item 4.7.2.1, são os seguintes os resultados encontrados para as ovelhas:

**HIPÓTESE 01** - Para a construção do dendograma e análise de k-médias, foram utilizadas a média de OPG de todas as colheitas de fezes e as médias dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos de todas as colheitas de sangue.

#### a)Análise de Cluster

Esta análise separa o rebanho em três grupos (A, B e C - Figura 09):

Grupo A: são classificadas 18 ovelhas neste grupo, o que representa 28,13% do rebanho. Este grupo possui duas subdivisões, formada por um pequeno grupo de 05 animais (subgrupo A<sub>1</sub>) e por outro grupo de 13 ovelhas (subgrupo A<sub>2</sub>). Este grupo mostra-se homogêneo.

Grupo B: este segundo grupo é formado por 26 animais (40,63%). No interior deste grupo, encontram-se três outros subgrupos, todos eles ligando-se ao nível de 500.

Grupo C: são classificados 18 animais (28,13%). Este grupo também constitui-se de dois subgrupos: C<sub>1</sub> com 14 ovelhas e C<sub>2</sub> com 05 ovelhas.

A ovelha 467BC, que foi a única a apresentar a média dos valores de eosinófilos acima do clinicamente normal, ficou excluída de todos os grupos.

## b) Análise das K-médias

Este método, com a formação de cinco grupos, apresenta semelhanças com o método anterior. Um dos grupos formados tem os mesmos animais do subgrupo  $A_1$ , com a diferença de um único animal a mais. No caso do grupo C, da análise de Cluster, entretanto, o grupo equivalente formado por este método é menor, com apenas 11 ovelhas.

Ao comparar estas análises com a hipótese equivalente do método baseado somente na contagem de ovos nas fezes (hipótese 01), notam-se várias concordâncias. O grupo A possui os mesmos animais que o grupo das ovelhas consideradas resistentes, acrescido de duas ovelhas. Estas duas ovelhas, 527AM e 481BC, possuem médias de OPG de 310 e 326,67, muito próximas do nível de corte feito para a hipótese 01 (300 OPG). Observa-se, ainda, que o subgrupo  $A_1$  representaria as ovelhas altamente resistentes, cujas médias de OPG de todos os exames realizados não ultrapassam o valor de 100 OPG. O grupo C, por sua vez, representaria as ovelhas classificadas como susceptíveis. Porém há 05 ovelhas a mais. Essas ovelhas seriam todas classificadas como susceptíveis na hipótese 01, se o corte feito fosse a nível de 893,33 OPG. Da mesma forma que para as ovelhas resistentes, pode-se distinguir um grupo de animais considerados altamente susceptíveis, representado pelo subgrupo  $C_2$ . A média de OPG das 05 ovelhas deste subgrupo é de 2022 OPG. O grupo B representaria os animais de resposta intermediária.

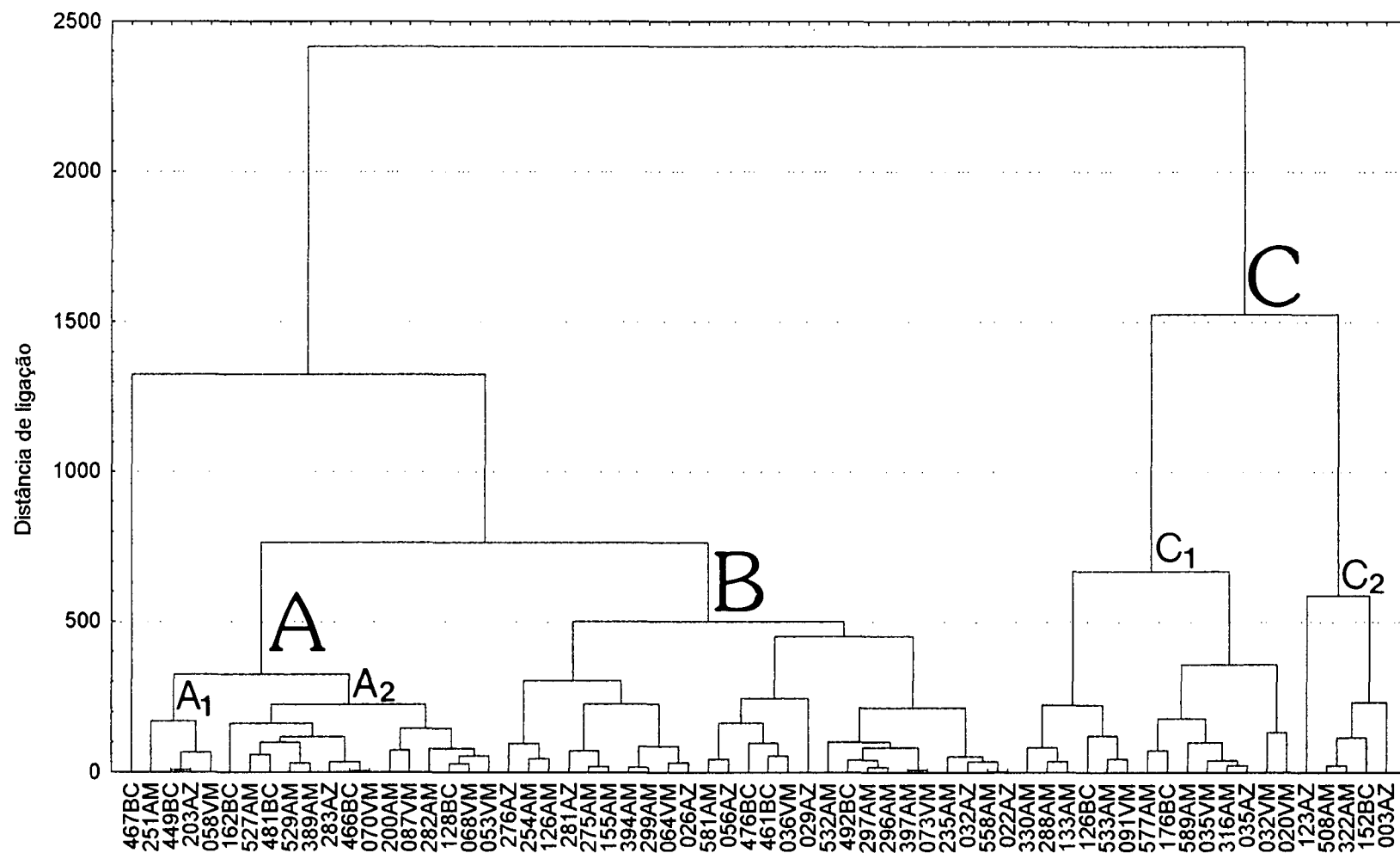


Figura 09 - Dendrograma construído segundo método hierárquico ascendente, utilizando a distância euclidiana a linhas completas. Foram utilizados os dados da média de OPG de todas as colheitas de fezes e as médias dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos de todas as colheitas de sangue das ovelhas.

**HIPÓTESE 02** - Para a construção do dendograma e para a análise das k-médias, foram utilizadas a média de OPG das últimas cinco colheitas de fezes e as médias dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos da 3ª e 4ª colheitas de sangue.

#### a)Análise de Cluster

Esta análise divide os animais em três grandes grupos (A, B e C - Figura 10):

Grupo A: é formado por 38 ovelhas, que estão subdivididas em dois subgrupos. O subgrupo A<sub>1</sub> inclui 18 animais (28,13%). O subgrupo A<sub>2</sub>, tão homogêneo quanto o anterior, é constituído por 20 ovelhas, o que representa 31,25% do rebanho.

Grupo B: este grupo, formado por 15 ovelhas (23,44%), também se divide, formando subgrupos relativamente heterogêneos, que se ligam em 1500.

Grupo C: está constituído por 11 animais (17,19%), sendo que um desses animais está isolado neste grupo, que é bastante heterogêneo.

#### b)Análise das K-médias

Este método forma dois grupos que reúnem as mesmas 11 ovelhas do grupo C da análise de Cluster. Outro grupo formado é constituído pelas mesmas ovelhas que o subgrupo A<sub>2</sub>, com uma ovelha a menos. Os outros dois grupos formados contêm as ovelhas representadas pelo subgrupo A<sub>1</sub> e grupo B.

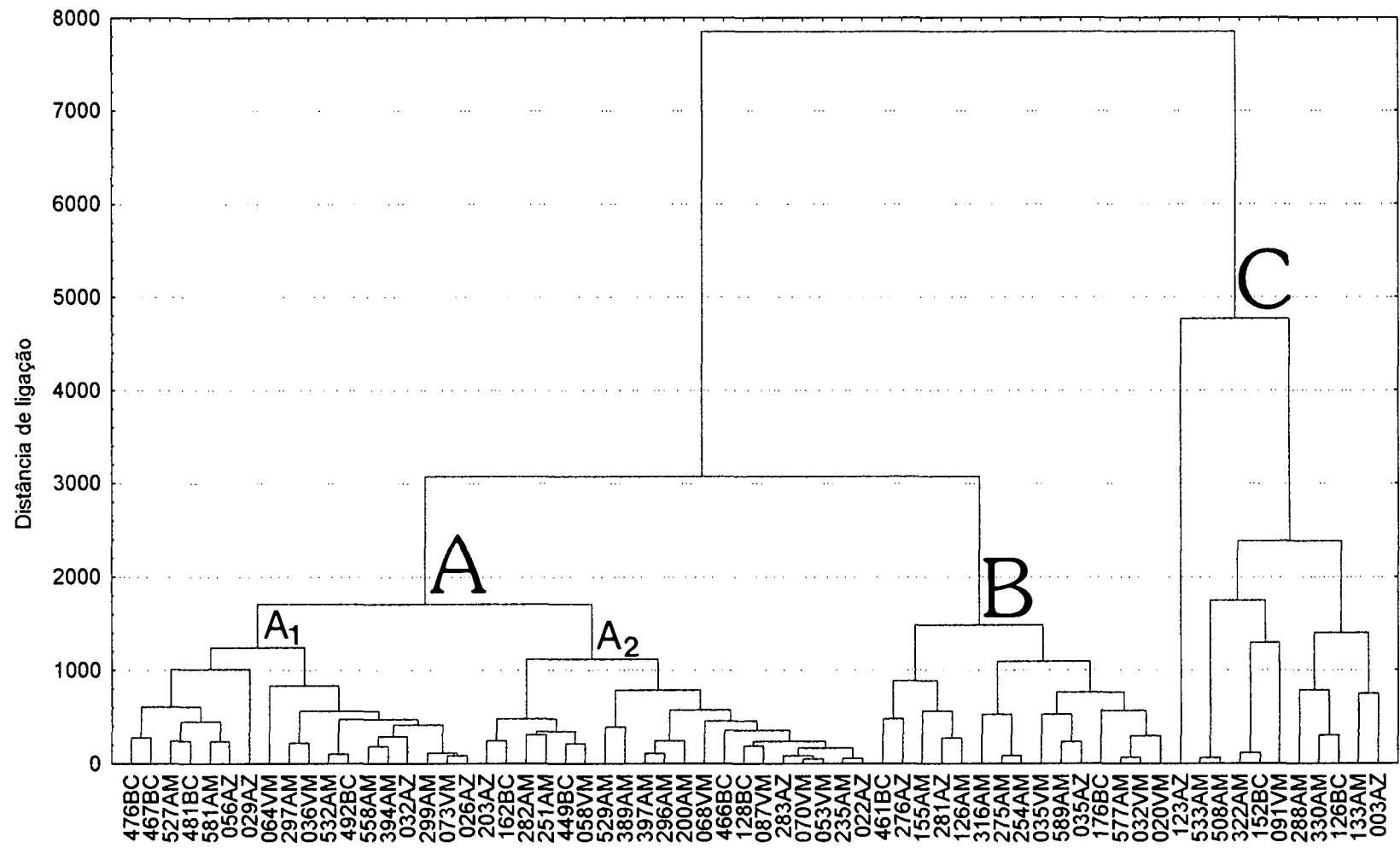


Figura 10 - Dendrograma construído segundo método hierárquico ascendente, utilizando a distância euclidiana a linhas completas.

Foram utilizados os dados da média de OPG das últimas cinco colheitas de fezes e as médias dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos da 3ª e 4ª colheitas de sangue das ovelhas.

Ao comparar com a hipótese correspondente, baseada no OPG (hipótese 2), observa-se que o subgrupo  $A_2$  representaria as ovelhas resistentes, porém com seis animais a mais. Dessas seis ovelhas, 4 tem a média entre 720 e 750 OPG, próximas ao nível de corte da hipótese 02 (700 OPG). Já as outras duas, tem média de 970 e 980 OPG. Quanto às ovelhas consideradas susceptíveis, elas estariam representadas pelo grupo C, com uma ovelha a menos na análise de Cluster. Esta ovelha a menos, foi a última a ser classificada como susceptível pela hipótese de OPG.

**HIPÓTESE 03** - Para a análise das k-médias e construção do dendograma, foram utilizados o valor de OPG da 16ª colheita de fezes e os valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos da 4ª colheita de sangue.

#### a)Análise de Cluster

Esta análise divide as ovelhas em dois grandes grupos. Estes, por sua vez, sofrem nova dicotomia, permitindo visualizar 4 grupos distintos (A, B, C e D - Figura 11):

Grupo A: é formado por apenas 6 ovelhas (9,38%)

Grupo B: é um grupo grande, formado por 35 ovelhas. Está dividido em outros dois grupos:  $B_1$  e  $B_2$ . O subgrupo  $B_1$  é formado por 17 ovelhas e o subgrupo  $B_2$ , inclui 18 ovelhas.

Grupo C: à semelhança com o grupo A, este grupo é formado por poucos animais, apenas 5 (7,81%), que estão ligados entre si a nível de 3200.

Grupo D: formado por dois subgrupos ( $D_1$  e  $D_2$ ), está constituído por 18 animais (28,13%).

b)Análise das K-médias

A análise das k-médias apresenta praticamente os mesmos grupos que a análise de Cluster. Há um grupo formado pelas mesmas ovelhas do subgrupo  $B_2$ . Um grupo classifica os mesmos animais do grupo C e outro grupo é formado pelo  $D_2$  e por uma das dicotomias do  $D_1$ .

As ovelhas classificadas como resistentes na hipótese 05, baseada no valor de OPG da 16ª colheita de fezes, são exatamente as mesmas que o subgrupo  $B_2$ . Os animais incluídos no grupo A e subgrupo  $B_1$  corresponderiam aos animais de resposta intermediária. O grupo C da análise de Cluster, por sua vez, é formado por animais altamente susceptíveis, com valores de OPG na 16ª colheita de fezes superiores a 9700. Se fossem considerados todos os animais do grupo D como susceptíveis, o OPG de corte equivalente na hipótese 05, seria 3750 e contaria com 10 animais a mais. Porém, se somente o subgrupo  $D_2$  fosse considerado, o corte equivalente seria em 6700, deixando duas ovelhas classificadas como susceptíveis na hipótese 05 de fora.

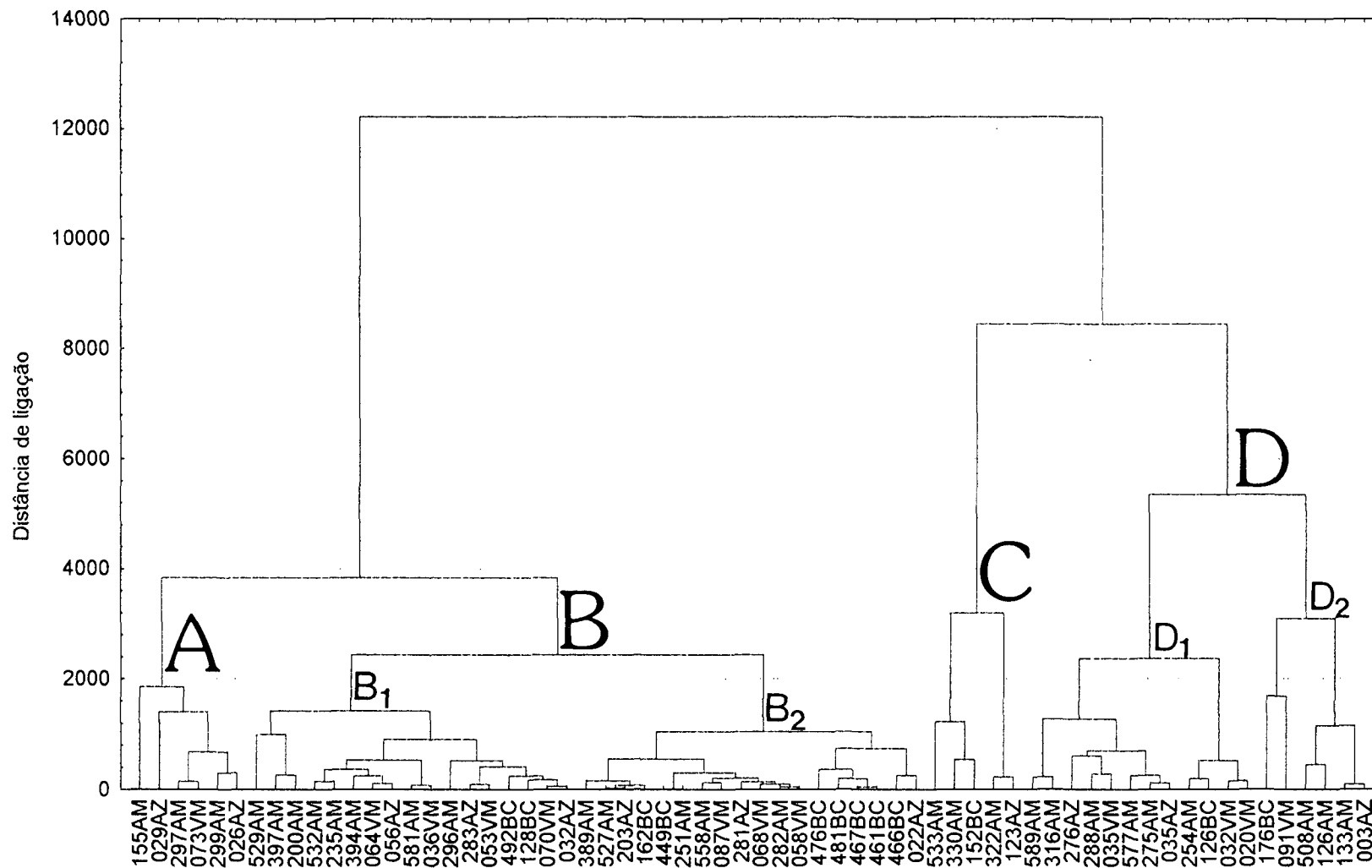


Figura 11 - Dendrograma construído segundo método hierárquico ascendente, utilizando a distância euclidiana a linhas completas. Foram utilizados os dados do valor de OPG da 16ª colheita de fezes e dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos da 4ª colheita de sangue das ovelhas.

## 5.6.2 CORDEIROS

Baseados nas análises propostas no item 4.7.2.2, são os seguintes os resultados encontrados para os cordeiros:

**HIPÓTESE 01** - Para a construção do dendograma e análise de k-médias, foram utilizadas a média de OPG de todas as colheitas de fezes e as médias dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos de todas as colheitas de sangue.

### a) Análise de Cluster

Esta análise divide os cordeiros em três grupos distintos (A, B e C - Figura 12):

Grupo A: é formado por 32 animais (41,56%), e apresenta, no seu interior, uma dicotomia a nível de 1000. São formados, então, dois sub-grupos ( $A_1$  e  $A_2$ ), constituídos respectivamente por 15 e 16 cordeiros.

Grupo B: possui, no total, 39 animais, representando 50,65% do rebanho. Este grupo apresenta uma dicotomia, a nível de 1600, formando dois sub-grupos. O grupo  $B_1$ , é constituído por 9 cordeiros. O grupo  $B_2$ , por sua vez, também sofre uma nova dicotomia, formando dois novos grupos com 12 e 18 animais classificados.

Grupo C: este grupo, com apenas 6 animais (7,79%), encontra-se nitidamente separado do restante do grupo.

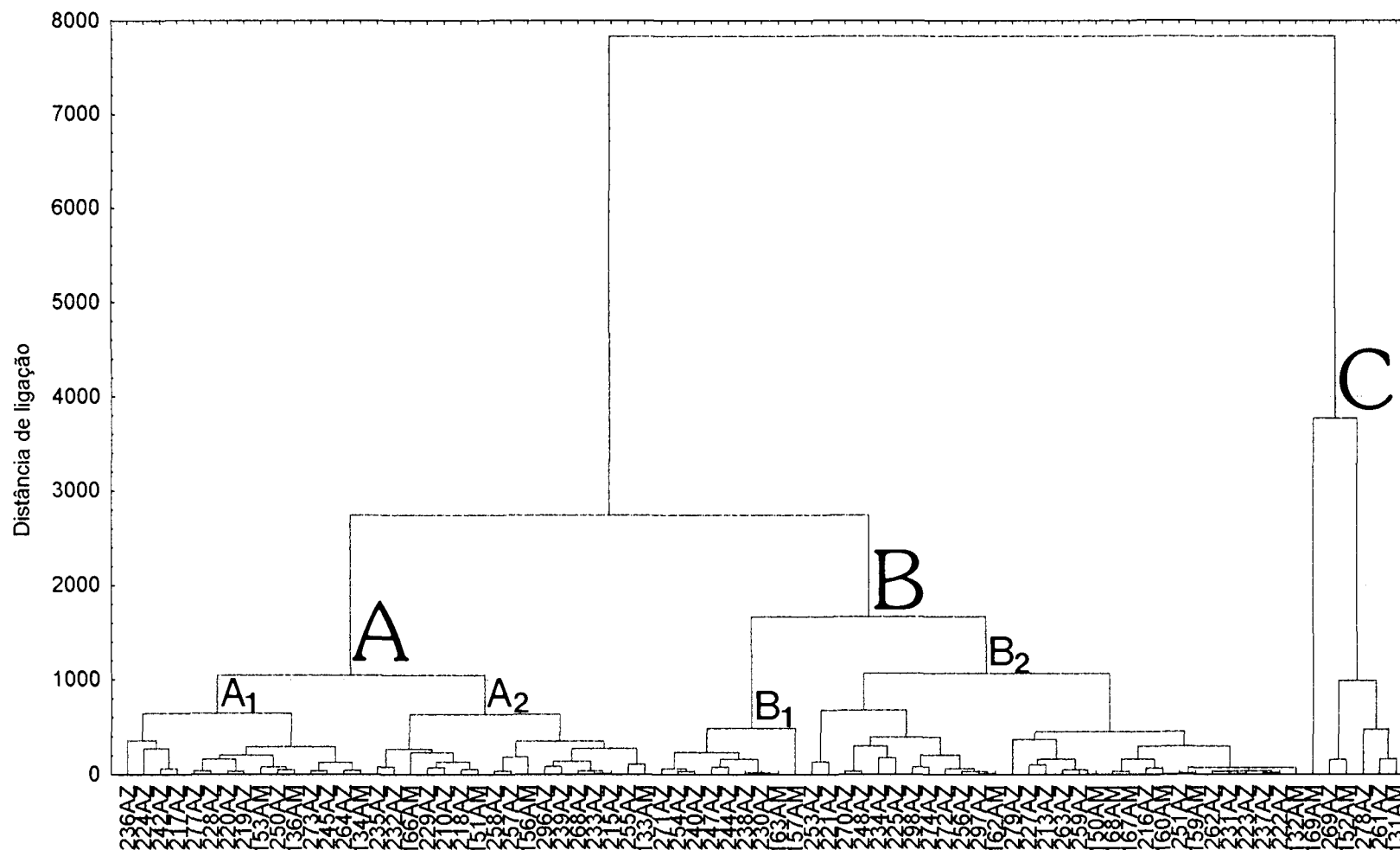


Figura 12 - Dendrograma construído segundo método hierárquico ascendente, utilizando a distância euclidiana a linhas completas.

Foram utilizados os dados da média de OPG de todas as colheitas de fezes e das médias dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos de todas as colheitas de sangue dos cordeiros.

#### b)Análise das K-médias

Os cinco grupos formados pela análise das K-médias são semelhantes aos da análise de Cluster.

Ao compararmos esses dois métodos à hipótese formulada com os mesmos critérios e tendo como base o OPG (hipótese 01), observa-se que o grupo A<sub>1</sub> possui exatamente os mesmos cordeiros classificados como resistentes. Já o grupo C, bastante destacado na análise de Cluster, é formado pelos animais altamente susceptíveis, cuja média de OPG nas quatro amostragens realizadas está entre 4000 e 7850. O grupo B<sub>1</sub> também está constituído de animais susceptíveis, porém com dois animais a menos, que equivaleriam, na hipótese 1, ao nível de corte de 2275 OPG (e não 2000 OPG, como foi utilizado).

**HIPÓTESE 02** - Para a análise das k-médias e construção do dendograma foram utilizadas a média de OPG das três primeiras colheitas de fezes e as médias dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos das três primeiras colheitas de sangue.

#### a)Análise de Cluster

Esta análise, numa primeira dicotomia, separa um grupo nitidamente (grupo C). Numa segunda dicotomia, o restante dos animais são divididos em dois grandes grupos (A e B), com suas sub-divisões (Figura 13):

Grupo A: formado por 17 animais (22,08%), apresentando dois sub-grupos ( $A_1$  e  $A_2$ ).

Grupo B: é o mais numeroso, comportando 55 cordeiros, que representam 71,43% do número total. Apresenta no seu interior uma dicotomia, a nível de 2400, formando os sub-grupos  $B_1$ , com 17 animais, e o  $B_2$ , com 38 animais.

Grupo C: é o grupo que primeiro se destaca, sendo formado por 5 cordeiros (6,49%)

#### b)Análise das K-médias

A análise das K-médias confirma os grupos formados na análise precedente.

A comparação com a hipótese correspondente (hipótese 02), baseada somente no OPG, mostra que os animais pertencentes ao sub-grupo  $A_2$  da análise de Cluster estão todos classificados como susceptíveis pela hipótese de OPG. Caso fosse considerado todo o grupo A como susceptível, o nível de corte na hipótese 02 deveria ser de 2100 OPG. O grupo C representaria animais altamente susceptíveis, cuja média chega próximo de 6500 OPG. Os cordeiros resistentes corresponderiam aos do grupo  $B_1$ , com dois animais a mais que a hipótese do OPG. Estes dois animais têm médias de 566 OPG e 583 OPG, muito próximas ao nível de corte da hipótese 02, que foi de 500 OPG.

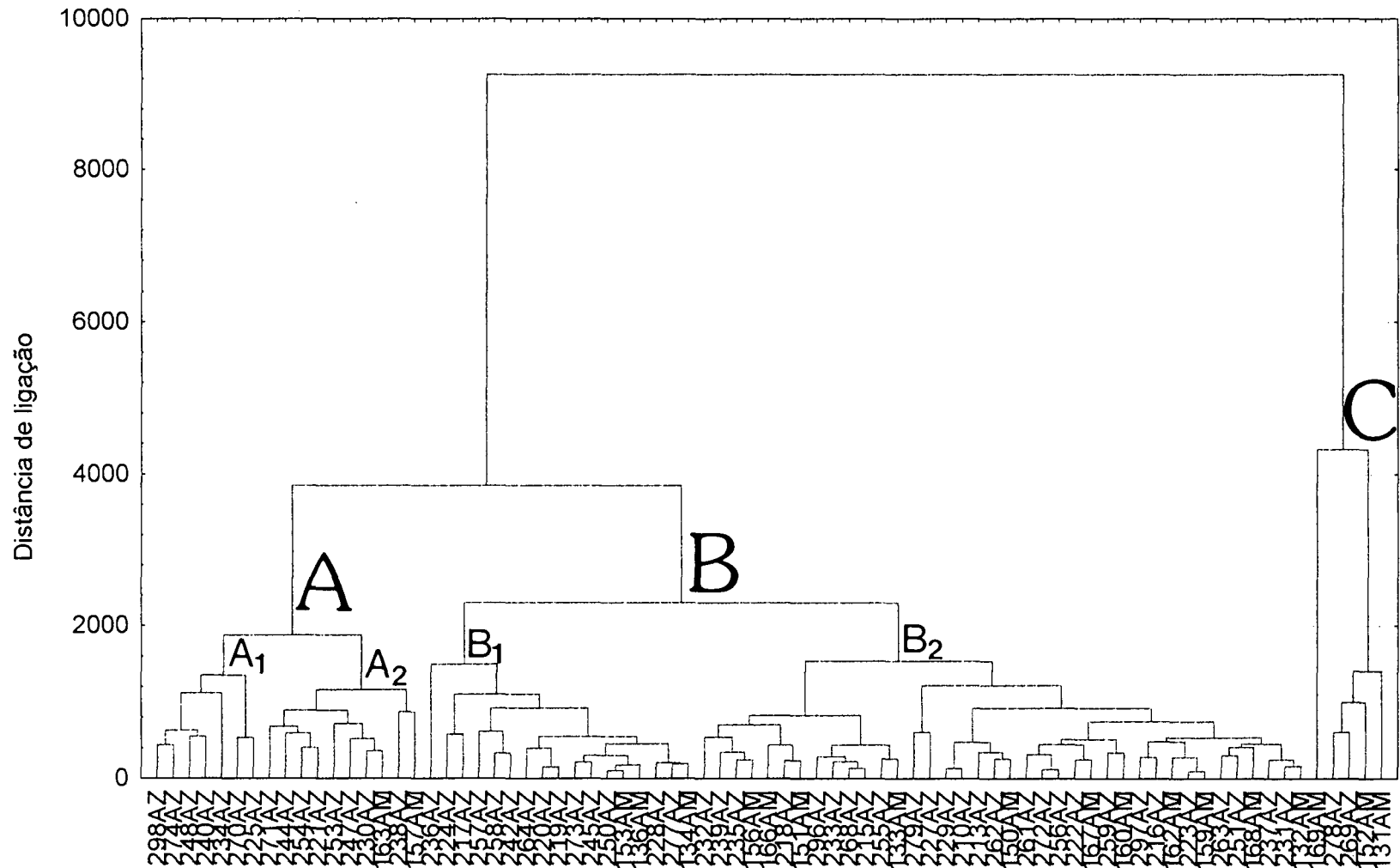


Figura 13 - Dendrograma construído segundo método hierárquico ascendente, utilizando a distância euclidiana a linhas completas. Foram utilizados os dados da média de OPG das três primeiras colheitas de fezes e das médias dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos das três primeiras colheitas de sangue dos cordeiros.

**HIPÓTESE 03** - Para a construção do dendograma e análise de k-médias, foram utilizados o valor de OPG da 3ª colheita de fezes e os valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos da 3ª colheita de sangue.

#### a)Análise de Cluster

Observa-se, no dendograma, uma primeira dicotomia a nível bem elevado, correspondendo à distância de ligação de 20000. A nível de de 12000, três grupos se separam (A, B e C - Figura 14):

Grupo A: é formado por 31 cordeiros (40,26%), apresentando no seu interior, uma dicotomia a nível de 2500, com a separação de um sub-grupo, constituído por 10 animais ( $A_1$ ), e de outro sub-grupo ( $A_2$ ), formado por 21 cordeiros..

Grupo B: este grupo é formado por 35 cordeiros, que representam 45,45% do rebanho. Separa-se em outros dois sub-grupos:  $B_1$  e  $B_2$ .

Grupo C: este grupo, bastante heterogêneo, é formado por 11 animais (14,26%) e se separa nitidamente dos demais.

#### b)Análise das K-médias

Este método, com a formação de cinco grupos mostra uma semelhança com o método anterior.

Ao comparar esses dois métodos com a hipótese 05 (que considera somente a terceira colheita de OPG), nota-se que o sub-grupo  $A_2$  da análise de Cluster possui os animais considerados resistentes, acrescido de um cordeiro. Este cordeiros seria o próximo a ser classificado pela hipótese do OPG. Se fossem

considerados como resistentes todos os cordeiros do grupo A, eles seriam os mesmos que os da hipótese 05 se esta tivesse usado um nível de corte mais alto (2450 OPG). O grupo C representaria os animais susceptíveis. Ele é constituído pelos cordeiros com OPG acima de 7000 OPG. Portanto, com 06 animais a menos que a hipótese do OPG, cujo corte foi proposto a nível de 6000 OPG.

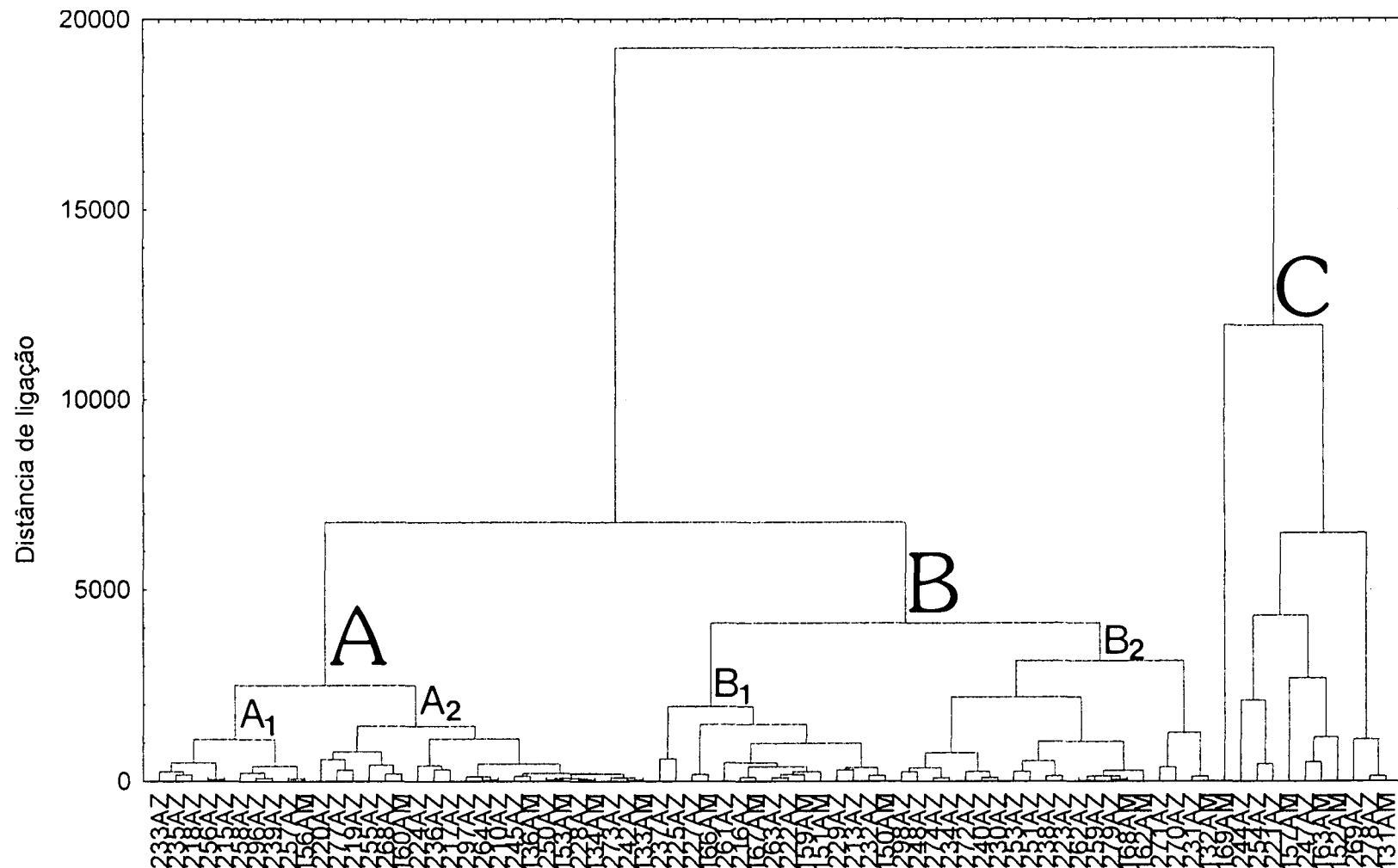


Figura 14 - Dendrograma construído segundo método hierárquico ascendente, utilizando a distância euclidiana a linhas completas. Foram utilizados os dados do valor de OPG da 3ª colheita de fezes e dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e eosinófilos da 3ª colheita de sangue dos cordeiros.

A comparação das hipóteses baseadas somente no OPG e das formuladas pelas análises de Cluster e K-médias, revelam muitas semelhanças. A ordem dos animais a serem classificados, como resistentes e susceptíveis, é a mesma. A principal diferença é que as hipóteses baseadas no OPG tiveram um nível de corte escolhido empiricamente. Já, na análise de Cluster, é o próprio método que define os grupos. Desta forma, observa-se que, em algumas hipóteses baseadas no OPG, o nível de corte poderia ser maior. Ou seja, poderia haver a inclusão de mais animais, tanto no grupo de resistentes quanto no de susceptíveis.

Conclui-se que, para ambas as metodologias, foi possível selecionar os animais em resistentes e susceptíveis. A grande contribuição das análises de Cluster e K-médias (que utilizaram todos os caracteres estudados para a seleção), foi permitir um nível de corte mais apropriado ao grau de infecção dos animais. Estas análises, além de considerarem os valores de OPG, que refletem o número de parasitas, consideraram também os valores que refletem os efeitos do parasitismo (hematócrito e concentração de hemoglobina) e como o animal está reagindo frente a estes parasitas (número de eosinófilos).

A principal característica da ovinocultura paranaense é o binômio: ALTA LOTAÇÃO - ALTA CONTAMINAÇÃO DE PASTAGENS. Isto torna necessário um maior número de desverminações. A maior frequência de desverminações, por sua vez, leva a um aumento da pressão de seleção das cepas de parasitas resistentes aos princípios ativos. Como consequência, há um aumento ainda maior da contaminação dos pastos, devido à falha dos anti-helmínticos, inviabilizando a produção animal.

Os resultados do presente trabalho demonstram que há um grupo de animais altamente susceptíveis, com alta contagem de OPG por longo período. Estes animais são os maiores responsáveis pela contaminação das pastagens. Nas condições da ovinocultura paranaense, uma das contribuições da seleção dos animais em resistentes e susceptíveis, seria a possibilidade de eliminação dos animais altamente susceptíveis, diminuindo, conseqüentemente, a contaminação das pastagens. Ou seja, ao invés de se trabalhar no sentido de selecionar os animais mais resistentes, trabalhar-se-ia no sentido de descartar os animais altamente susceptíveis. Isto porque, para selecionar os resistentes, haveria a necessidade de avaliar as características de interesse zootécnico, produtivo e reprodutivo, conjuntamente. Portanto, seria necessário, primeiramente, um estudo da ligação entre resistência aos parasitas e índices de produtividade, avaliando-se, também, os valores de herdabilidade destas características. Já, no caso de descarte dos animais, uma alternativa viável seria o confinamento dos animais altamente susceptíveis. Sem dúvida, os avanços em termos de incremento da resistência aos parasitas, na descendência destes animais, estaria prejudicado. Porém, suas características zootécnicas talvez justificassem isso. E, desta forma, haveria uma sensível diminuição da contaminação das pastagens, sem perda de material genético.

A metodologia aqui empregada foi usada no sentido de estudar a possibilidade de seleção de ovinos resistentes e susceptíveis aos helmintos gastrintestinais. Pode-se dizer que, a nível de pesquisa, para se estabelecer uma metodologia, seria necessário a análise de todos os caracteres aqui estudados

(OPG, número de eosinófilos, hematócrito, concentração de hemoglobina). Porém, a nível comercial, após definido níveis de corte compatíveis com os índices de contaminação de pastagens e infecção do rebanho paranaense, a seleção baseada somente no OPG poderia ser efetiva. Este tipo de avaliação tem a grande vantagem de ser de fácil realização técnica, sem alto custo.

## PERSPECTIVAS

1. Estudar os mecanismo imunogenéticos, envolvidos no desenvolvimento da resistência aos parasitas gastrintestinais, na possibilidade de incluir novos caracteres para a seleção dos animais, tais como: níveis de anticorpos séricos e sistema OLA (Ovine Lymphocyte Antigens).

## 8 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

1. foi possível, no rebanho estudado, identificar os animais resistentes e susceptíveis aos helmintos gastrintestinais.

2. a contagem de ovos de helmintos nas fezes mostrou-se eficiente para esta identificação.

3. quanto aos valores de hematócrito e concentração de hemoglobina, observou-se diferença estatística significativa, entre os animais (ovelhas e cordeiros) considerados resistentes e susceptíveis, quando avaliados no momento de maior nível de infecção parasitária.

4. quanto ao número de eosinófilos sangüíneos, observou-se diferença estatística significativa, entre as ovelhas consideradas resistentes e susceptíveis. Entre os cordeiros considerados resistentes e susceptíveis, observou-se diferença quanto ao número de eosinófilos, porém esta não foi estatisticamente significativa.

5. não foi possível estabelecer relação entre o tipo de hemoglobina e resistência ou susceptibilidade dos animais (ovelhas e cordeiros) aos helmintos gastrintestinais.

6. os métodos baseados na análise de Cluster e K-médias, considerando todos os caracteres estudados (OPG, hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eosinófilos), foi eficiente para a identificação dos animais resistentes e susceptíveis. Estas análises, em comparação ao método baseado no OPG, permitiram o estabelecimento de um nível de corte mais compatível com o grau de infecção dos animais estudados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. LE JAMBRE, L.F.; BARGER, I.A.; BARKER, J.S.F. The effect of *Haemonchus contortus* infection on haematological parameters in young merino sheep and its significance for productivity. **Animal Production**, v. 50, p. 99-109, 1990.
- ALLONBY, E.W.; URQUHART, G.M. Self-cure of *Haemonchus contortus* infection under field conditions. **Parasitology**, v. 66, p. 43-53, 1973.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. A possible relationship between haemonchosis and haemoglobin polymorphism in Merino sheep in Kenya. **Research in Veterinary Science**, v. 20, p. 212-214, 1976.
- ALTAIF, K.I.; DARGIE, J.D. Genetic resistance to helminths. Comparison of the development of *Ostertagia circumcincta* infections in Scottish Blackface sheep of different haemoglobin type. **Research in Veterinary Science**, v. 24, p. 391-393, 1978 a.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Genetic resistance to helminths: The influence of breed and haemoglobin type on the response of sheep to re-infection with *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, v. 77, p. 177-187, 1978b.
- BEALE, D.; LEHMANN, H.; DRURY, A.; TUCKER, E.M. Haemoglobins of sheep. **Nature**, v. 209, n. 5028, p. 1099-1102, 1966.

- BECK, T.; MOIR, B.; MEPPEN, T. The cost of parasites to the Australian sheep industry. **Quarterly Review of the Rural Economy**, v. 7, p. 336-343, 1985.
- BEKELE, T.; KASALI, O.B.; REGE, J.E.O. Repeatability of measurements of packed cell volume and egg count as indicators of endoparasite load and their relationship with sheep productivity. **Acta Tropica**, v. 50, p. 151-160, 1992.
- 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 Romney sheep. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, n.35, p. 51-58, 1992.
- BLUNT, M.H.; EVANS, J.V. Changes in the concentration of potassium in the erythrocytes and in haemoglobin type in Merino sheep under a severe anaemic stress. **Nature**, v. 200, n. 4912, p. 1215-1216, 1963.
- 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.
- CARVALHO, R.E.S.; AZEVÊDO, E.S. Melhoria na separação eletroforética de proteínas através da substituição do amido importado por amido brasileiro comercial. **Ciência e Cultura**, v. 28, n. 12, p. 1507-1508, 1976.
- CHIMINAZZO, C.; RIBEIRO, L.A.O.; WEIMER, T.; CABRAL, P.C. Correlação dos tipos de hemoglobina com a resistência à verminose em ovinos da raça Corriedale. **XV Panvet Abstracts**, p. 307, 1996.
- CROFTON, H.D. Nematode parasite populations in sheep on lowland farms. I. Worm egg counts in ewes. **Parasitology**, v. 44, p. 465-477, 1954.

CUPERLOVIC, K.; ALTAIF, K.I.; DARGIE, J.D. Genetic resistance to helminths: a possible relationship between haemoglobin type and the immune responses of sheep to non-parasitic antigens. **Research in Veterinary Science**, v. 25, p. 125-126, 1978.

DAWKINS, H.J.S.; WINDON, R.G.; OUTERIDGE, P.M.; DINEEN, J.K. Cellular and humoral responses of sheep with different levels of resistance to *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, v. 18, n. 4, p. 531-537, 1988.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_.; EAGLESON, G.K. Eosinophil responses in sheep selected for high and low responsiveness to *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, v. 19, n. 2, p. 199-205, 1989.

DINEEN, J.K.; GREGG, P.; LASCELLES, A.K. The response of lambs to vaccination at weaning with irradiated *Trichostrongylus colubriformis* larvae: segregation into "responders" and "non-responders". **International Journal for Parasitology**, v. 8, p. 59-63, 1978.

EADY, S. How to find highly productive rams that are worm resistant. **Nemesis**, Austrália, jun. 1997.

EVANS, J.V.; KING, J.W.B.; COHEN, B.L.; HARRIS, H.; WARREN, F.L. Genetics of haemoglobin and blood potassium differences in sheep. **Nature**, v. 178, n. 4536, p. 849-850, 1956.

\_\_\_\_\_.; HARRIS, H.; WARREN, F.L. Haemoglobin types in british breeds of sheep. **Biochemical Journal**, v. 65, p. 42, 1957.

\_\_\_\_\_; BLUNT, M.H.; SOUTHCOTT, W.H. The effects of infection with *Haemonchus contortus* on the sodium and potassium concentrations in the erythrocytes and plasma, in sheep of different haemoglobin types. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 14, p. 549-558, 1963.

FAN, L.C.R.; MOREIRA, E.C.; FISCHER, R. Frequência dos tipos de hemoglobina em ovinos adultos no município de Santa Maria. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, v. 11, n. 1, p. 7-11, 1981.

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

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.

\_\_\_\_\_. The epidemiology of parasitic diseases with special reference to studies with nematode parasites of sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 24, p. 17-45, 1948.

GREGORY, P.W.; MILLER, R.F.; STEWART, M.A. An analysis of environmental and genetic factors influencing stomach-worm infestations of sheep. **Journal of Genetics**, v. 39, p. 391-400, 1940.

HARRIS, H.; WARREN, F.L. Occurrence of electrophoretically distinct haemoglobin in ruminants. **Biochem. J.**, v. 60, p. XXIX, 1955.

HENKES, L.E.; WEIMER, T.A.; FRANCO, M.H.; MORAES, J.C.F. Genetics characterization of the "Crioula Lanada" sheep. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 16, n. 2, p. 449-455, 1993.

HUEHNS, E.R. Starch gel electrophoresis - hemoglobins. In: SMITH, I. **Chromatographic and electrophoretic techniques. Vol. II: Zone electrophoresis.** Londres: William Heinemann, 1968.

HUISMAN, T.H.J.; VLIET, G. van; SEBENS, T. Sheep haemoglobins : Some genetic and physiological aspects os two different adult haemoglobins in sheep. **Nature**, v. 182, n. 4629, p. 171-172, 1958.

JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology.** 4 ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 1986.

\_\_\_\_\_. Comparative hematology of common domestic animals. In: \_\_\_\_\_. **Essentials of Veterinary Hematology.** Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p.19-52.

JILEK, A.F.; BRADLEY, R.E. Hemoglobin types and resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v. 30, n. 10, p. 1773-1778, 1969.

KASSAI, T.; FÉSÜS, L.; HENDRIKX, W.M.L.; TAKÁTS, Cs.; FOK, É.; REDL, P.; TAKÁCS, E.; NILSSON, R.; van LEEUWEN, M.A.W.; JANSEN, J.; BERNADINA, W.E.; FRANKENA, K. Is there a relationship between haemoglobin genotype and the innate resistance to experimental *Haemonchus contortus* infection in Merino lambs? **Veterinary Parasitology**, v. 37, p. 61-77, 1990.

KERBOEUF, D. L'Augmentation vernale ("spring-rise") de l'élimination des oeufs d'helminthes au cours des strongyloses gastro-intestinales. Étude du déterminisme et des incidences épidémiologiques. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v. 154, n. 10, p. 865-874, 1978.

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.

McEWAN, J. **Breeding sheep resistant to roundworm infection: Breeders' manual**. New Zealand Pastoral Agriculture Research Institute Limited (AgResearch), New Zealand, 1994.

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

MILLOT, P. Bent-Limb disease in lambs. **Journal of Immunogenetics**, v. 13, p. 341-348, 1986.

NARI, A.; CARDOZO, H.; BERDIE, J. Primera demostración del alza de lactación (spring-rise) en nematodos gastrointestinales de ovinos del Uruguay. **Veterinaria (Montevideo)**, v. 13, n. 65, p. 147-156, 1977.

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.

PETZL, M.L.; PRIMO-PARMO, S.L. Eletroforese de hemoglobina, haptoglobina, anidrase carbônica II e esterase em gel de amido de milho comercial (maizena). **Ciência e Cultura**, v. 31, n. 8, p. 895-896, 1979.

PRESSON, B.L.; GRAY, G.D.; BURGESS, S.K. The effect of immunosuppression with dexamethasone on *Haemonchus contortus* infections in genetically resistant Merino sheep. **Parasite Immunology**, v. 10, p. 675, 1988.

PRESTON, J.M.; ALLONBY, E.W. The influence of breed on the susceptibility of sheep to *Haemonchus contortus* infection in Kenya. **Research in Veterinary Science**, v. 26, p. 134-139, 1979 a.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. The influence of haemoglobin phenotype on the susceptibility of sheep to *Haemonchus contortus* infection in Kenya. **Research in Veterinary Science**, v. 26, p. 140-144, 1979 b.

RADHAKRISHNAN, C.V.; BRADLEY, R.E.; LOGGINS, P.E. Host response of worm-free Florida Native and Rambouillet lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 33, n. 4, p. 817-823, 1972.

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

ROBERTS, F.H.S.; O'SULLIVAN, P.J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agriculture Research**, v. 1, p. 99, 1950.

\_\_\_\_\_; SWAN, R.A. Quantitative studies on ovine haemonchosis. I Relationship between faecal egg counts and total worm counts. **Veterinary Parasitology**, v. 8, p. 165-171, 1981.

ROTHWELL, T.L.W.; DINEEN, J.K. Cellular reactions in guinea-pigs following primary and challenge infection with *Trichostrongylus colubriformis* with special reference to the roles of eosinophils and basophils in rejection of the parasite. **Immunology**, v. 22, p. 733-745, 1972.

SEAB. Departamento de Economia Rural. **Acompanhamento da situação agropecuária do Paraná - Prognóstico da Pecuária**, fev. 1997.

SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CARROL, E.J. **Veterinary Hematology**. 3 ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. p. 90-149

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

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, 1995.

STEWART, D.F. Studies on resistance of sheep to infestation with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus ssp.* and on the immunological reactions of sheep exposed to infestation. II. The antibody response to infestation with *H. contortus*. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1, p. 301-321, 1950 a.

\_\_\_\_\_. Studies on resistance of sheep to infestation with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus ssp.* and on the immunological reactions of sheep exposed to infestation. IV. The antibody response to natural infestation in grazing sheep and the "self-cure" phenomenon. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1, p. 427-439, 1950 b.

\_\_\_\_\_. Studies on resistance of sheep to infestation with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus ssp.* and on the immunological reactions of sheep exposed to infestation. V. The nature of the self-cure phenomenon. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 4, p. 100-117, 1953.

- STOLL, N.R. Studies with the strongyloid nematode, *Haemonchus contortus*. I. Acquired resistance of hosts under natural reinfection conditions out-of-doors. **Am. J. Hyg.**, v. 10, p. 384-418, 1929.
- THOMAS, R.J.; ALI, D.A. The effect of *Haemonchus contortus* infection on the pregnant and lactating ewe. **International Journal for Parasitology**, v. 13, n. 4, p. 393-398, 1983.
- VASCONCELOS, O.T.; ROCHA, V.F.; COSTA, A.J.; FERRARI, O. Fenômeno "post-lambing" em ovelhas parturientes naturalmente infectadas por nematóides parasitos. **Semina - Revista Cultural e Científica da Universidade Estadual de Londrina**, v.5, n. 16, p. 15-20, 1984.
- VLIET, G. van; HUISMAN, T.H.J. Changes in the haemoglobin types of sheep as a response to anaemia. **Biochemical Journal**, v. 93, p. 401-409, 1964.
- WAKELIN, D. Genetic control of susceptibility and resistance to parasite infection. **Advances in Parasitology**, v. 16, p. 219-246, 1978.
- WALLER, P.J. The development of anthelmintic resistance in ruminant livestock. **Acta Tropica**, v. 56, p. 233-243, 1994.
- WANG, S.; FOOTE, W.C.; BUNCH, T.D. Evolutionary implications of haemoglobin polymorphism in domesticated and wild sheep. **Small Ruminant Research**, v. 4, p. 315-322, 1991.
- WINDON, R.G.; DINEEN, J.K.; KELLY, J.D. The segregation of lambs into "responders" and "non-responders": response to vaccination with irradiated *Trichostrongylus colubriformis* larvae before weaning. **International Journal for Parasitology**, v. 10, n. 1, p. 65-73, 1980.

WHITLOCK, J.H.; MADSEN, H. The inheritance of resistance to trichostrongylidosis in sheep. II. Observations on the genetic mechanism in trichostrongylidosis. **Cornell Veterinarian**, v.48, p.134-145, 1958.

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.

\_\_\_\_\_. Selection of Merino sheep for increased and decreased resistance to *Haemonchus contortus*: peri-parturient effects on faecal egg counts. **International Journal for Parasitology**, v. 22, n. 7, p. 947-953, 1992.

YAZWINSKI, T.A.; GOODE, L.; MONCOL, D.J.; MORGAN, G.W.; LINNERUD, A.C. *Haemonchus contortus* resistance in straightbred and crossbred Barbados Blackbelly sheep. **Journal of Animal Science**, v.51, n. 2, p.279-284, 1980.