

Tratamento anti-helmíntico seletivo de ovinos pelo peso (TST) visando assegurar a eficácia dos fármacos desparasitantes e a segurança dos produtos

Ana Carolina de Souza Chagas^{a*}, Isabella Barbosa dos Santos^b, Yousmel Aleman Gainza^b, Gustavo Avelar de Sousa^b, Luís Adriano Anholetto^a, Waldomiro Barioni-Junior^a, Sérgio Novita Esteves^a, Simone Cristina Méo Niciura^a

^aEmbrapa Pecuária Sudeste (CPPSE), Rodovia Washington Luiz, Km 234 s/n, Fazenda Canchim, PO Box 339, Zip Code 13560-970, São Carlos, São Paulo, Brasil. *Autor correspondente: carolina.chagas@embrapa.br

^bFaculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Zip Code 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar se a média de ganho de peso diário dos cordeiros (GMD) pode ser um parâmetro para o tratamento anti-helmíntico seletivo (TST) em cordeiros Morada Nova, raça autóctone do Brasil. Os 114 cordeiros foram randomizados em três grupos experimentais: Controle (C): tratado com levamisol quando o hematócrito (VG) < 21%, Supressivo (TS): tratado a cada 42 dias e Seletivo (TST): tratado de acordo com o GMD. Do 63º dia de vida (D63) até o D210 os animais foram pesados e tendo sido recolhidas amostras de sangue para hematócrito e de fezes para a contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) e coprocultura. Para averiguar a resistência parasitária ao levamisol, realizou-se o teste de redução da contagem de OPG (TRCOF), o RESISTA-Test® e o teste de reação em cadeia de polimerase (PCR). Para os tratamentos C, TS e TST, as médias do OPG foram 4665,1^a, 3063,5^b e 3462,1^{ab}, as médias do VG foram 32,9%^b, 33,4%^a e 32,4%^b e as médias do peso foram 13,77 kg^a, 14,57 kg^a e 14,27 kg^a, respectivamente ($p \leq 0,05$). A eficácia do levamisol no TRCOF foi 66,4%, 24,1% e 76,4% e a PCR detectou a presença do genótipo de resistência de 56,5%, 70,6% e 35,3%, respectivamente. As menores CLs foram obtidas para o TST no RESISTA-Test®. O TS promoveu menor OPG e VG mais elevado em relação ao C, entretanto, se mostra

insustentável devido ao rápido desenvolvimento da resistência. Já no TST não houve diferença significativa em relação ao TS para as médias do OPG e do peso, com menor desenvolvimento da resistência. O TST revelou-se uma ferramenta interessante para ser avaliada e validada em raças ovinas e caprinas, pois a redução de uso de antiparasitários possibilita menor risco de resíduos na carne, leite e queijos.

Palavras-Chave: *Haemonchus contortus*, resistência, Happy Factor™, RESISTA-Test®, gene *acr8*, raça Morada Nova

1. Introdução

A resistência que os nemátodes gastrointestinais (NGI) têm desenvolvido aos anti-helmínticos são um grande entrave para a produção de pequenos ruminantes. A resistência anti-helmíntica tem levado ao desenvolvimento de formas racionais de controle parasitário por meio do tratamento seletivo dos animais. Com essa nova abordagem ocorre a conservação da *refugia*, parcela da população parasitária que não é exposta aos anti-helmínticos, o que é extremamente importante para desacelerar o estabelecimento da resistência, pois dilui os genótipos resistentes presentes na população de helmintos (Greer *et al.*, 2009).

O tratamento anti-helmíntico seletivo em pequenos ruminantes deve ser de fácil implementação e deve apresentar um custo benefício suportável pelos produtores (Kenyon *et al.*, 2013). Para isto, deve ser desenvolvido um modelo matemático para descobrir qual o indicador de produção que representaria menor perda para o rebanho e manteria a *refugia*. O tratamento seletivo direcionado (TST) conhecido como Happy Factor™, envolve um modelo matemático que tem em consideração o ganho médio de peso de cordeiros de raças produtoras de lã, a qualidade e quantidade da pastagem e os fatores climáticos (Greer *et al.*, 2009). Este modelo foi considerado o mais eficiente, pois a redução no ganho de peso ocorre logo no início da infecção, antes do aparecimento dos sinais clínicos, pois os NGI reduzem a ingestão alimentar voluntária e a eficiência da conversão do alimento (Busin *et al.*, 2013). Dessa forma, o ganho de peso

apresenta-se como um indicador sensível, afetando a performance animal e rentabilidade do sistema de produção.

Para a maioria dos NGI, interações mais complexas, incluindo o clima e o manejo, tornam o uso dessas ferramentas de previsão mais desafiadoras, havendo necessidade de estudo de modelos que sustentem os TST (Charlier *et al.*, 2014). Portanto, há necessidade de validação de indicadores amigáveis e sustentáveis, pois as consequências do tratamento anti-helmíntico também dependem da biologia e ecologia dos parasitas em nível regional (Edith *et al.*, 2018). A raça ovina Morada Nova, raça autóctone do Brasil (naturalizada), é considerada resistente aos NGI na fase adulta (Lobo *et al.*, 2011; Issakowicz *et al.*, 2016). Entretanto, na fase de cordeiro, é considerada resiliente, necessitando de atenção quanto à infecção parasitária, pois a perda de peso nessa fase tem impacto direto no peso final (Toscano *et al.*, 2019). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar se a média de ganho de peso diário dos cordeiros (GMD) pode ser um parâmetro para o tratamento anti-helmíntico seletivo (TST) em cordeiros Morada Nova, favorecendo a *refugia* e desacelerando o estabelecimento da resistência dos NGI.

2. Material e Métodos

2.1. Local de realização do estudo e manejo dos animais

O estudo foi realizado em propriedade experimental localizada na cidade de São Carlos, estado de São Paulo, Brasil. O clima da região é classificado como Cwa (Koëppen), com duas estações bem definidas: seca de abril a setembro e chuvosa de outubro a março, na qual ocorreu o experimento. A temperatura média anual é 21,2°C e a umidade média anual do ar é de 75,6%. A investigação sobre os animais foi conduzida de acordo com o comitê institucional de utilização dos animais (Protocolo nº. 01/2020).

As mães foram mantidas em pastagem predominantemente de capim Aruãna, com aproximadamente 2,5 hectares e mantidas em sistema rotacional em piquetes

com período de ocupação de 7 dias e de descanso de 21 dias, durante todo o ano. Durante o período das chuvas, a alimentação das mães foi pastagem e 300 gramas/animal de concentrado, constituído de 1,2% de calcário calcítico, 39% de farelo de soja, 58,76% de milho em grão moído, 0,04% de Rumonosin e 1% sal mineral. Água e sal mineral foram mantidos *ad libitum*.

Após o nascimento, os cordeiros receberam identificação com brinco e chip subcutâneo e foram pesados. A mãe e o cordeiro com 10 a 15 dias de vida foram levados para a área de pastagem de capim Aruãna, onde os cordeiros permaneceram até o término do experimento. O desmame foi realizado quando os cordeiros apresentaram 150 dias. As mães foram retiradas do pasto e os cordeiros permaneceram na pastagem de Aruãna, até os 210 dias de vida (D210).

2.2. Delineamento experimental

Para a primeira fase do experimento foram selecionados 38 cordeiros para cada tratamento, um total de 114 cordeiros nascidos no período da seca e desmamados no período das chuvas. Esses cordeiros permaneceram com as suas mães até ao desmame que decorreu aos 150 dias (peso médio de 20 kg), quando então as mães foram retiradas.

Aos 63 dias de vida (D63), todos os animais receberam tratamento com Ripercol® L-150F (levamisol 18,8%, injetável, 0,5 mL/10 kg PV) para início dos tratamentos experimentais. Do D63 até o D210, a cada 21 dias, foram recolhidas amostras de sangue para realização de hematócrito (VG), de fezes para realizar a contagem de ovos por gramas de fezes individual (OPG) (Ueno e Gonçalves, 1998) e a coprocultura por pool de amostra do grupo (Roberts e O'Sullivan, 1950). Os cordeiros foram pesados a cada 21 dias a partir do nascimento até o D210 (11 pesagens por estação).

Os cordeiros foram separados em três grupos experimentais de modo a se obter médias semelhantes para: peso ao nascimento, tipo de parto (gemelar ou simples), sexo, OPG e VG, obtidos da colheita realizada no D63. Os tratamentos anti-helmínticos durante todo o período experimental foram realizados com Ripercol® L - 150F na dose supracitada. Os grupos foram:

- 1) Grupo Tratamento Controle (C): Animais tratados com desparasitante quando VG \leq 21% (indicando anemia e maior risco de óbito).
- 2) Grupo Tratamento Supressivo (TS): Animais tratados a cada 42 dias, do D63 ao D210.
- 3) Grupo Tratamento Seletivo (TST): Animais tratados de acordo com a fórmula: ganho de peso médio diário (GMD) \leq GMD do grupo TST – desvio padrão*0,5 (adaptado de Cintra et al, 2019), a cada 21 dias do D105 ao D210.

2.3. Análises de resistência anti-helmíntica realizadas após 210 dias de vida

2.3.1. Abate de cordeiros

Seis cordeiros que apresentaram contagem de OPG mais elevadas durante o período experimental foram selecionados, sendo dois de cada tratamento. Esses animais foram separados e eutanasiados para necrópsia parasitológica por insensibilização com pistola pneumática, segundo critérios técnicos de abate humanitário do Ministério da Agricultura e Abastecimento do Brasil - MAPA. Por animal, o trato gastrointestinal foi separado e os órgãos foram identificados em abomaso, intestino delgado e intestino grosso através de ligaduras duplas.

O abomaso foi cortado através da curvatura maior e os intestinos delgado e grosso foram alinhados e abertos por inteiro. Em seguida, o conteúdo foi lavado com água e recuperado em tamisadores com aberturas de 0,297 mm. Com o auxílio de uma lupa os parasitas foram separados por gênero e sexo, armazenados em álcool 70% e

congelados para posterior identificação morfológica e PCR (González-Garduño *et al.*, 2013).

2.3.2. Diagnóstico da resistência ao levamisol pelo Teste de Redução da Contagem de Ovos nas Fezes (TRCOF)

Após o término da coleta no D210, os cordeiros que não foram selecionados para a necropsia parasitológica, e que tinham OPG > 200, foram randomizados para o TRCOF. O objetivo foi averiguar o percentual de eficácia do levamisol (princípio ativo do Ripercol® L - 150F) em cada um dos três tratamentos, após seu uso contínuo. A eficácia desse anti-helmíntico foi de 81% em TRCOF realizado antes do início do estudo, a melhor dentre os demais grupos químicos e, portanto, selecionado para uso no presente estudo.

A randomização para o TRCOF utilizou os dados de OPG, VG e peso obtidos no D210. Dentro de cada um dos três tratamentos, os animais foram separados em grupo controle (sem tratamento) e o grupo tratado com Ripercol® (0,5 mL/10 kg PV). Após sete dias, foram recolhidas fezes foram diretamente da ampola retal para realização de OPG e avaliação da resistência ao fármaco. Foi realizada coprocultura por pool de fezes de cada grupo experimental para posterior identificação dos gêneros parasitários. O modelo matemático adotado para obtenção do percentual de eficácia do fármaco foi:

$$\% \text{ Eficácia} = (\text{Média do OPG do grupo controle} - \text{Média de OPG do grupo tratado}) / \text{Média de OPG do grupo controle}) \times 100$$

2.3.3. Diagnóstico da resistência ao levamisol pelo Teste de Desenvolvimento Larvar (TDL) - RESISTA-Test©

Este teste foi realizado no D210 com ovos oriundos do pool das fezes recolhidas em cada tratamento experimental e recuperados por uso sequencial de peneiras. Cerca de 70 ovos de *H. contortus* foram adicionados em cada poço de placas de cultura de 96 poços, que também recebeu meio de cultura (*Escherichia coli* [EC11303]

e anfotericina B [A9528] - Sigma-Aldrich). As placas foram identificadas, seladas com filme de PVC e mantidas em incubadora por 24h a $\pm 27^{\circ}\text{C}$ e umidade $\geq 80\%$ para o desenvolvimento das larvas (L_1). Após esse período, cada poço recebeu 12 diluições seriadas da base química representante do grupo do levamisol (tetramisole hydrochloride, Sigma-Aldrich L9756) conforme Gainza *et al.* (2021) (RESISTA-Test®) e as placas foram novamente incubadas por mais seis dias. O controle negativo foi composto de água destilada e meio nutritivo. Após a incubação, as larvas L_1 , L_2 e L_3 de cada poço foram quantificadas com auxílio de microscópio invertido para cálculo da eficácia e das concentrações letais (CLs) do levamisol. Todas as concentrações de anti-helmínticas e o controle negativo foram testados em duplicado.

2.3.4. Diagnóstico da resistência ao levamisol por Reação em cadeia de polimerase (PCR)

As amostras de fezes recolhidas no D210 foram submetidas à coprocultura. Com a obtenção das larvas infectantes (L_3) foi realizada a extração de DNA e a genotipagem da indel de 63 pb no gene *acr-8* para avaliação da resistência ao levamisol por meio da PCR.

Para a extração, foi adicionada solução de hipoclorito de sódio, e as larvas foram individualmente incubadas em solução tampão de digestão (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM EDTA pH 8,0, 50 mM NaCl, 2% SDS, 40 mM DTT e 0,4 mg/mL proteinase K) a 56°C *overnight*. O DNA foi extraído com solução Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (25:24:1), precipitado com isopropanol 100% e lavado com etanol 70%. Na sequência, o DNA foi suspenso em água, incubado a 37°C por 30 minutos e armazenado a -20°C (Niciura *et al.*, 2012).

A PCR para a genotipagem da resistência ao levamisol detecta uma indel de 63 bp no gene *acr-8*, pela qual a amplificação de banda de 256 bp (presença da deleção) indica resistência e a amplificação de banda de 319 bp (ausência da deleção) indica susceptibilidade ao fármaco (Barrère *et al.*, 2014). Os primers utilizados

na reação foram (LEVF: 5'-ACCTTACCTATACACCCGTC-3') e (LEVR: 5'-CTTGCCGTATTACACCCTCG-3'). Foram utilizados 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase e 2μL do DNA extraído, em volume final de 20 μL. Para a realização da termociclagem, as condições foram desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos e na sequência foram realizados 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C.

Os genótipos foram atribuídos por comparação ao padrão de 100bp por meio de eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE, coloração com 8 μg/mL de brometo de etídio e observação em um transiluminador de UV. Atribuiu-se o genótipo de acordo com o padrão de bandas que foi observado.

2.4. Medição da matéria seca da forragem e dos fatores climáticos

As colheitas de forragem foram realizadas semanalmente durante a estação chuvosa. Todo o material contido num quadrado de 1 m de lado foi cortado a 20 cm do nível do solo e pesado em balança do tipo dinamômetro para a determinação da produção de matéria verde da amostra. Após esse procedimento, sub amostras foram colocadas em estufa de circulação forçada de ar, a 65°C, por 72 h, para secagem, visando determinar a produção de matéria seca, expressa em kg/ha (Nogueira *et al.*, 2005).

Os dados climáticos foram aferidos pela estação climática presente na área experimental, tendo sido registadas as variáveis de temperatura (°C), humidade relativa (%) e pluviosidade (mm).

2.5. Análise estatística

Os dados de desempenho animal, OPG (log transformados), VG, TRCOF, RESISTA-Test© e a comparação das frequências alélicas e genotípicas foram submetidos à análise estatística descritiva e análise de variância pelo procedimento Proc Mixes do

SAS, considerando as medidas repetidas de tempo. Adotou-se o nível de significância de 5% nos testes estatísticos. Os resultados do RESISTA-Test® foram apresentados como valores de concentrações letais (CL_{50} , CL_{90} , CL_{95} e CL_{99}), definidos como as concentrações anti-helmínticas em que 50%, 90%, 95% e 99% do desenvolvimento das larvas de L₁ até L₃ são inibidos. Os dados foram analisados por modelo de regressão logística Probit do SAS.

3. Resultados e Discussão

Análises coproparasitológicas

Para a obtenção dos resultados foram selecionados 114 cordeiros divididos em 3 tratamentos (n = 38 animais): C, TS e TST. Na Figura 1, estão representadas as médias de OPG das oito amostragens nos tratamentos. Pode-se observar que as médias de OPG foram estatisticamente superiores nos animais do tratamento C, pois poucos tratamentos anti-helmínticos foram administrados no C, ao longo do período experimental. Os resultados colhidos até o D210 demonstraram que ocorreu diferença estatística ($p \leq 0,05$) da média geral entre os tratamentos para a contagem de OPG. O grupo C (4665,1) apresentou média diferente do TS (3063,5), enquanto o TST (3462,1) foi semelhante a ambos. No D126, D168 e D210, o tratamento TS apresentou valores de OPG estatisticamente inferiores aos outros dois tratamentos. Os tratamentos C e TST não diferiram entre si em nenhuma data experimental. Os tratamentos anti-helmínticos no TS ocorreram nos dias 105, 147 e 189, o que gerou o decréscimo da contagem de OPG nas datas seguintes, levando à diferença estatística (Tabela 1).

No exame de OPG também se visualizaram ovos de *Strongyloides papillosus*, *Moniezia* sp. e oocistos de *Eimerias* pp. Na coprocultura foram identificados os gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Cooperia* e *Oesophagostomum*. Do D63 ao D210, *Haemonchus* foi o mais prevalente (média de 81,6%), seguido por *Trichostrongylus*

(10,2%), *Cooperia* (8%) e *Oesophagostomum* (3,1%). Tais achados estão de acordo com estudos anteriores realizados na região (Amarante *et al.*, 2004; Chagas *et al.*, 2008).

Análises hematológicas

As colheitas de sangue para realização de hematócrito também ocorreram em oito datas experimentais e as médias estão demonstradas na Figura 2. Nos cordeiros criados na estação chuvosa, os valores de VG não sofreram muitas alterações, mesmo com contagens de OPG elevadas. Para o hematócrito até o D210, C (32,9%) apresentou média estatisticamente igual ao TST (32,4%), e ambos difeririam do TS (33,4%) ($p \leq 0,05$), embora muito parecidos. Da mesma forma, como ocorreu em relação ao OPG, o TS apresentou percentuais de VG estatisticamente superiores nas datas D126, D168 e D210, colheitas estas realizadas após os tratamentos anti-helmínticos de todos os cordeiros (Tabela 2).

O principal sinal clínico da infecção por *H. contortus* é a anemia, detetada através do hematócrito. Embora as mães dessa raça sejam consideradas resistentes aos NGI (Issakowicz *et al.*, 2016), tais resultados comprovam que os cordeiros dessa raça são resilientes. Animais resilientes são aqueles capazes de se manter saudáveis e produtivos apesar dos altos níveis de infecção, tolerando os danos causados pelo parasitismo (Bisset *et al.*, 2001). Ou seja, mesmo com OPG elevados, os valores médios de VG são de animais saudáveis (mesmo com a elevada prevalência de *H. contortus*), conforme já verificado por Okino *et al.* (2021) e por Toscano *et al.* (2019), este último detetando em cordeiros Morada Nova VGs médios de 31,1% a 35,2%, valores próximos aos do presente estudo.

Obtenção do peso

O peso dos cordeiros foi obtido ao nascimento e do D21 ao D210, totalizando 10 amostragens para cada animal (Figura 3). No D189 o tratamento TST não apresentou

diferença estatística em relação ao peso dos outros dois tratamentos, porém o tratamento TS foi estatisticamente superior ao C. O peso médio dos animais no D210 foi estatisticamente igual para o C (20,94 kg) e o TST (22,12 kg), e ambos difeririam do TS (23,80 kg). Para a média de peso geral até o D210, no entanto, não houve diferença entre os grupos (C=13,77, TS=14,57 e TST=14,27) (Tabela 3).

A média geral do GMD até o D210 foi estatisticamente igual para C (0,09) e TST (0,09), que diferiram do TS (0,10) ($p \leq 0,05$). No D126 e D168 o tratamento TS foi estatisticamente superior aos outros dois tratamentos, que não diferiram entre si. No D210 os três tratamentos apresentaram médias de GMD estatisticamente diferentes, sendo o do TS superior a todos e o do C inferior a todos (Figura 4, Tabela 4).

É importante lembrar que no TS os animais receberam tratamento anti-helmíntico a cada 42 dias, no D105, D147 e D189 (38 animais x 3 dias = 114 tratamentos). No C, 11 cordeiros foram tratados e apenas um cordeiro necessitou de duas doses (animais com VG $\leq 21\%$.) No TST foram realizados 62 tratamentos, quase a metade do TS (um cordeiro foi tratado cinco vezes, um tratado quatro vezes, quatro cordeiros três vezes e nove cordeiros duas vezes; o restante recebeu apenas uma aplicação do anti-helmíntico). O resultado do TST está de acordo com os encontrados em estudos na Escócia, que demonstraram que cordeiros tratados pelo GMD receberam 50% menos tratamentos anti-helmínticos em relação ao controle, sem perdas significativas no GMD ou tempo para atingir o peso de abate (Busin *et al.*, 2014). Existe um estudo em clima tropical com tratamento anti-helmíntico dos animais baseado no GMD do grupo controle (Cintra *et al.*, 2019). No presente estudo, entretanto, seguimos a metodologia do Happy Factor™, onde o animal é comparado com ele mesmo em relação ao GMD esperado, dentro de um intervalo de tempo. Dessa forma, tem-se em consideração o potencial individual do animal, dentro das variáveis que influenciam esse ganho de peso. Mesmo assim, o estudo de Cintra *et al.* (2019) indicou o peso como um critério mais seguro do que o FAMACHA, promovendo GMD significativamente maior.

Diagnóstico da resistência anti-helmíntica

No final do período experimental, D210, procurou-se verificar o impacto que o uso diferenciado do anti-helmíntico levamisol, nos três grupos experimentais, pudesse causar em relação ao desenvolvimento da resistência anti-helmíntica. O levamisol apresentou eficácia no TRCOF de 66,4% no C, de 24,1% no TS e de 76,4% no o TST. A PCR detectou a presença do genótipo de resistência de 56,5%, 70,6% e 35,3%, respetivamente. As concentrações letais obtidas na estação da chuvosa no RESISTA-Test® demonstraram um grau de resistência bastante elevado no grupo TS. O TST, por sua vez, foi o que apresentou as menores CLs, demonstrando maior susceptibilidade ao tratamento anti-helmíntico por levamisol no D210 (Tabela 5). O desenvolvimento de resistência pode ser drasticamente reduzido com o uso dessa abordagem TST. No Reino Unido, o Happy Factor™ foi um indicador eficaz, mantendo a produtividade e reduzindo significativamente ($p \leq 0,05$) o uso de anti-helmínticos nas cinco propriedades avaliadas (McBean *et al.*, 2016).

Na necrópsia parasitológica, para os géneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus* e *Oesophagostomum*, foram observadas as espécies *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* e *Oesophagostomum columbianum*. Somente um animal (111) apresentou exemplares de *O. columbianum* e em nenhum deles foi encontrado o género *Cooperia* (Tabela 6). Tais resultados estão coerentes com os achados da coprocultura. O teste molecular para deteção da resistência ao levamisol mostrou que o tratamento TS foi superior com 70,6% dos genótipos de resistência, o C 56,5% e o TST inferior com 35,3%.

Avaliação da matéria seca (MS) da forragem e dos fatores climáticos

Os resultados das análises da forragem no período chuvoso indicaram média de produção de MS do pasto de 1.612 kg/ha (Figura 5). Com o aumento dos índices

pluviométricos a partir do D84, conforme demonstrado na Figura 6, a produção de MS do pasto foi aumentando gradativamente, alcançando a produção média de 4.735 kg de MS/ha do D168 até o D210.

4. Conclusão

Ao utilizar o GMD como critério do tratamento anti-helmíntico, não houve diferença significativa entre as médias do TS e do TST em relação ao OPG e ao peso durante o período experimental. Embora os outros parâmetros (VG e peso no D210) tenham apresentado diferença significativa, as médias foram muito semelhantes entre os três tratamentos experimentais. Tais resultados demonstram que, durante a estação chuvosa, o GMD pode ser utilizado na tomada de decisão para a utilização racional de anti-helmínticos, visto que o desenvolvimento da resistência anti-helmíntica no TST foi muito mais lento em relação ao TS. O TST apresentou-se como uma ferramenta interessante para ser avaliada e validada em raças ovinas e caprinas, pois a redução de uso de antiparasitários possibilita menor risco de resíduos na carne, leite e queijos, indo ao encontro das preocupações crescentes dos consumidores.

Agradecimentos

Agradecemos o suporte financeiro fornecido ao projeto pela FAPESP (2019/02929-3), Embrapa (20.20.00.025.00-00) e às bolsas de estudo fornecidas pela FAPESP (2016/07132-8, 2018/16070-1 e 2019/20185-1).

Referências

Amarante, A.F.T., Bricarello, P.A., Rocha, R.A., & Genari, S.M. (2004). Resistance of Santa Inês, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Veterinary Parasitology*, 120, 91-106.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.12.004>

- Barrère, V., Beech, R.N., Charvet, C.L., & Prichard, R.K. (2014). Novel assay for the detection and monitoring of levamisole resistance in *Haemonchus contortus*. *International Journal Parasitology*, 44, 235-241. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.12.004>
- Bisset, S.A., Morris, C.A., McEwan, J.C., & Vlassoff, A. (2001). Breeding sheep in New Zealand that are less reliant on anthelmintics to maintain health and productivity. *New Zealand Veterinary Journal*, 49, 236-246. <https://doi.org/10.1080/00480169.2001.36238>
- Busin, V., Kenyon, F., Laing, N., Denwood, M.J., McBean, D., Sargison, N.D., & Ellis, K. (2013). Addressing sustainable sheep farming: application of a targeted selective treatment approach for anthelmintic use on a commercial farm. *Small Ruminant Research*, 110, 100-103. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.11.013>
- Busin, V., Kenyon, F., Parkin, T., McBean, D., Laing, N., Sargison, N., & Ellis, K. (2014). Production impact of a targeted selective treatment system based on live weight gain in a commercial flock. *Veterinary Journal*, 200, 248-252. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.02.012>
- Chagas, A. C. S., Oliveira, M. C. S., Esteves, S.N., Oliveira, H., Giglioti, R., Giglioti, C., Carvalho, C. O., Ferrezini, J., & Schiavone, D. (2008). Parasitismo por nematóides gastrintestinais em matrizes e cordeiros criados em São Carlos, São Paulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18, 50-58. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/110204/1/HelminTo008.pdf>
- Charlier, J., Morgan, ER., Rinaldi, L., van Dijk, J., Demeler, J., Höglund, J., Hertzberg, H., Ranst, BV., Hendrickx, G., Vercruyse, J., & Kenyon, F. (2014). Practices to optimise gastrointestinal nematode control on sheep, goat and cattle farms in Europe using targeted (selective) treatments. *Veterinary Records*, 175, 250-255. <https://doi.org/10.1136/vr.102512>

- Cintra, M.C.R., Ollhoff, R.D., Weber, S.H., & Sotomaior, C.S. (2019). Is the Famacha© system always the best criterion for targeted selective treatment for the control of haemonchosis in growing lambs? *Veterinary Parasitology*, 266, 67-72. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.12.015>
- Edith, R., Harikrishnan, T.J., & Balagangatharathilagar, M. (2018). Targeted selective treatment (TST): A promising approach to combat anthelmintic resistance in farm animals. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(1), 844-847. <https://www.entomoljournal.com/archives/2018/vol6issue1/PartL/5-6-187-664.pdf>
- Gainza, Y.A., Santos, I.B., Figueiredo, A., Santos, L.A.L., Esteves, S.N., Barioni-Junior, W., Minho, A.P., & Chagas, A.C.S. (2021). Anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* from sheep flocks in Brazil: concordance of *in vivo* and *in vitro* (RESISTA-Test©) methods. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 30(2), e025120. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120201093>
- González-Garduño, R., Mendoza-de-Gives, P., & Torres-Hernández, G. T. (2013). Variability in the fecal egg count and the parasitic burden of hair sheep after grazing in nematode infected paddocks. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33, 468-475. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2013000400010>
- Greer, A.W., Kenyon, F., Bartley, D.J., Jackson, E.B., Gordon, Y., Donnan, A.A., McBean, D.W., & Jackson, F. (2009). Development and field evaluation of a decision support model for anthelmintic treatments as part of a targeted selective treatment (TST) regime in lambs. *Veterinary Parasitology*, 164, 12-20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.04.017>
- Issakowicz, J., Issakowicz, A.C.K.S., Bueno, M.S., Da Costa, R.L.D., Katiki, L.M., Geraldo, A.T., Abdalla, A.L., Mcmanus, C., & Louvandini, H. (2016). Parasitic infection, reproductive and productive performance from Santa Inês and Morada Nova ewes. *Small Ruminant Research*, 136, 96–136. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.01.015>

- Kenyon, F., McBean, D., Greer, A., Burgess, C., Morrison, A., Bartley, D., Bartley, Y., Devin, L., Nath, M., & Jackson, F. (2013). A comparative study of the effects of four treatment regimes on ivermectin efficacy: body weight and pasture contamination in lambs naturally infected with gastrointestinal nematodes in Scotland. *International Journal Parasitology: Drugs Drug Resistance*, 3, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2013.02.001>
- Lobo, R.N.B., Pereira, I.D.C., Facó, O., & Mcmanus, C.M. (2011). Economic values for production traits of Morada Nova sheep in a pasture based production system in semi-arid Brazil. *Small Ruminant Research*, 96, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.01.009>
- McBean, D., Nath, M., Lambe, N., Morgan-Davies, C., & Kenyon, F. (2016). Viability of the Happy Factor™ targeted selective treatment approach on several sheep farms in Scotland. *Veterinary Parasitology*, 218, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.01.008>
- Niciura S.C., Verissimo, C.J., Gromboni, J.G.G., Rocha, M.I.P., Mello, S.S., Barbosa, C.M.P., Chiebao, D.P., Cardoso, D., Silva, G.S., Otsuk, I.P., Pereira, J.R., Ambrósio, L.A., Nardon, R.F., Ueno, T.E.H., & Molento, M.B. (2012). F200Y polymorphism in the beta-tubulin gene in field isolates of *Haemonchus contortus* and risk factors of sheep flock management practices related to anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 190, 608-612. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.07.016>
- Nogueira, A.R.A., & Souza, G.B. (2005). *Manual de Laboratório: Solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos* (pp. 7-21). São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPPSE/12337/1/ManualdeLaboratorios.pdf>
- Okino, C.H., Niciura S.C., Toscano, J.H.B., Esteves, S.N., Santos, I.B., Von Haehling, M. B., Figueiredo, A., Oliveira, M.C.S., & Chagas, A.C.S. (2021). Ovine β -globin gene: A

new qPCR for rapid haplotype identification and association with susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. *Veterinary Parasitology*, 294, 109434. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109434>.

Roberts, F.H.S., & O'sullivan, J.P. (1950). Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1, 99–102. <https://www.publish.csiro.au/cp/AR9500099>

Toscano, J.H.B., Santos, I.B., Von Haehling, M. B., Giraldelo, L. A., Figueiredo, A., Esteves, S.N., & Chagas, A.C.S. (2019). Morada Nova sheep breed: resistant or resilient to *Haemonchus contortus* infection? *Veterinary Parasitology*: X, 2, e100019. <https://doi.org/10.1016/j.vpoa.2019.100019>

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

Índice de legendas de figuras

Figura 1: Médias da contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) dos cordeiros Morada Nova nos tratamentos Controle (C), Tratamento Supressivo (TS) e Tratamento Seletivo (TST)

Figura 2: Médias de percentual do hematócrito (VG) dos cordeiros Morada Nova nos tratamentos Controle (C), Tratamento supressivo (TS) e Tratamento Seletivo (TST)

Figura 3: Médias de peso dos cordeiros Morada Nova nos tratamentos Controle (C), Tratamento supressivo (TS) e Tratamento Seletivo (TST)

Figura 4: Ganho médio diário de peso (GMD) dos cordeiros Morada Nova nos tratamentos Controle (C), Tratamento supressivo (TS) e Tratamento Seletivo (TST)

Figura 5: Quantidade de matéria seca da forragem presente na pastagem dos cordeiros Morada Nova dos tratamentos Controle (C), Supressivo (TS) e Seletivo (TST)

Figura 6: Condições meteorológicas, umidade relativa do ar (UR), pluviosidade (chuva) e temperatura (Temp) ao longo das datas experimentais

Índice de legendas de tabelas

Tabela 1: Médias e erro padrão (EP) da contagem de ovos por grama de fezes (OPG) dos tratamentos Controle (C), Supressivo (TS) e Seletivo (TST), em ovinos Morada Nova

Tabela 2: Médias e erro padrão (EP) do percentual de volume globular (VG) dos tratamentos Controle (C), Supressivo (TS) e Seletivo (TST), em ovinos Morada Nova

Tabela 3: Médias e erro padrão (EP) da média de peso dos tratamentos Controle (C), Supressivo (TS) e Seletivo (TST), em ovinos Morada Nova

Tabela 4: Médias e erro padrão (EP) do ganho médio diário de peso (GMD) dos tratamentos Controle (C), Supressivo (TS) e Seletivo (TST), em ovinos Morada Nova

Tabela 5: Concentrações letais (CLs, µg/mL) obtidas no RESISTA-Test®, porcentagens de eficácia anti-helmíntica obtidas no TRCOF e dos genótipos de resistência obtidas na PCR, para a detecção da resistência parasitária ao levamisol nos tratamentos Controle (C), Tratamento supressivo (TS) e Tratamento Seletivo (TST)

Tabela 6: Quantificação, classificação e sexagem de parasitas identificados na necrópsia dos cordeiros dos tratamentos controle (C), Supressivo (TS) e Seletivo (TST)

Tabela 1

TRAT	D63	D84	D105	D126*	D147	D168*	D189	D210*	Média	EP
C	620,0	730,9	6109,2	6301,3a	12448,0	6138,4a	3040,3	1932,6a	4665,13a	490,67
TS	663,2	587,3	3884,2	1091,2b	10096,0	1736,9b	4130,4	676,2b	3063,54b	493,64
TST	686,8	554,0	3615,8	6237,4a	7317,1	5495,5a	2036,8	1753,1a	3462,05ab	492,12

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 2

TRAT	63	84	105	126*	147	168*	189	210*	Média	EP
C	35,1	35,0	33,3	31,7b	28,3	30,5b	31,6	31,2b	32,9b	0,2384
TS	34,3	35,6	32,4	35,4a	29,2	34,0a	32,1	34,3a	33,4a	0,2407
TST	34,9	35,5	33,3	31,3b	29,8	30,8b	31,3	31,9b	32,4b	0,2404

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 3

TRAT	0	21	42	63	84	105	126	147	168	189*	210*	Média	EP
C	2,43	5,32	8,17	11,23	13,77	16,18	17,52	18,22	17,96	19,75b	20,94b	13,77a	0,41
TS	2,47	5,51	8,36	11,41	13,72	16,03	18,48	19,12	19,63	21,71a	23,80a	14,57a	0,41
TST	2,40	5,69	8,47	11,63	14,08	16,37	17,98	19,03	18,69	20,51ab	22,12b	14,27a	0,41

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 0 = nascimento.

Tabela 4

TRAT	21	42	63	84	105	126*	147	168*	189	210*	Média	EP
C	0,13	0,14	0,15	0,12	0,12	0,06b	0,03	-0,01b	0,09	0,06c	0,09b	0,00
TS	0,14	0,14	0,15	0,11	0,11	0,12a	0,03	0,02a	0,10	0,10a	0,10a	0,00
TST	0,15	0,13	0,15	0,12	0,11	0,08b	0,05	-0,02b	0,09	0,08b	0,09b	0,00

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Tabela 5

TRAT	RESISTA-Test® ($\mu\text{L/mL}$)				TRCOF	PCR
	CL ₅₀	CL ₉₀	CL ₉₅	CL ₉₉	(%)	(%)
C	0,482	4,471	8,424	27,712	66,4	56,5
TS	1,926	17,277	32,340	105,593	24,1	70,6
TST	0,117	0,797	1,374	3,821	76,4	35,3

Tabela 6

Nº. cordeiro/Trat	<i>H. contortus</i>			<i>T. colubriformis</i>		<i>O. columbianum</i>	
	Fêmea	Macho	Imaturos	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho
1070 (C)	1300	900	1300	100	100	0	0
1121 (C)	1590	1070	1010	1370	920	0	0
1085 (TS)	1800	1900	4200	980	680	0	0
1129 (TS)	600	820	800	2390	1690	0	0
1111 (TST)	2500	1700	2070	760	430	30	20
1134 (TST)	1300	1100	1200	1130	950	0	0

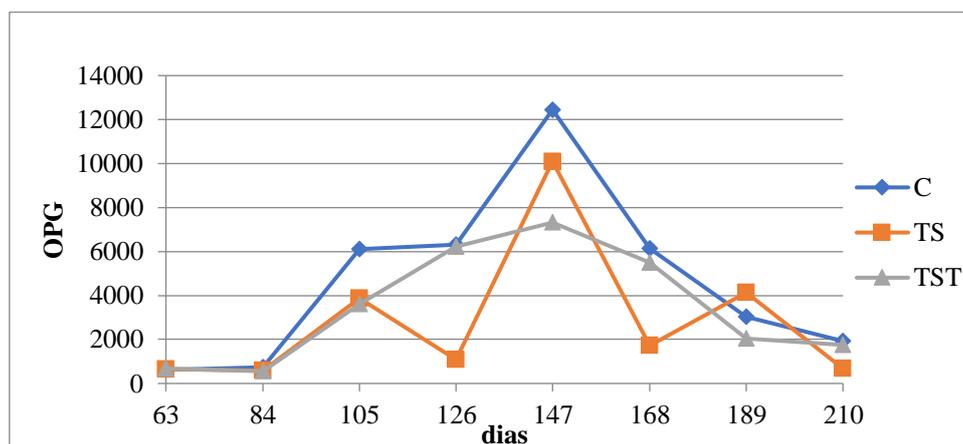


Figura 1

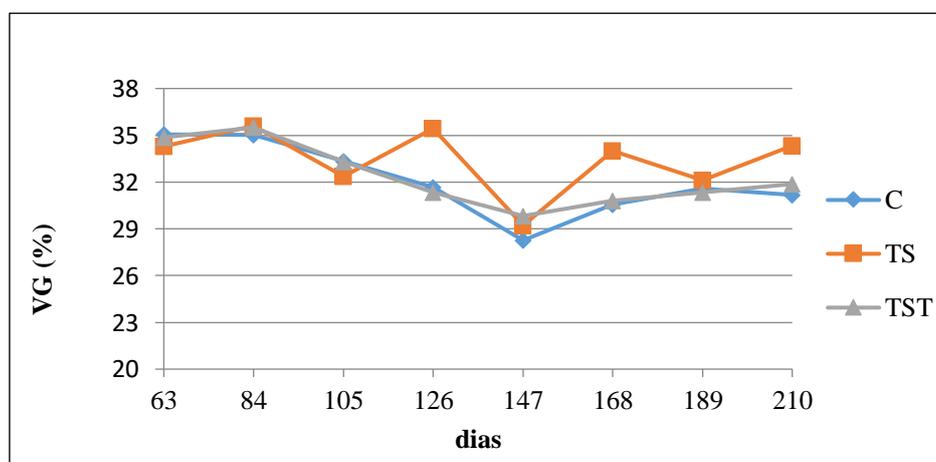


Figura 2

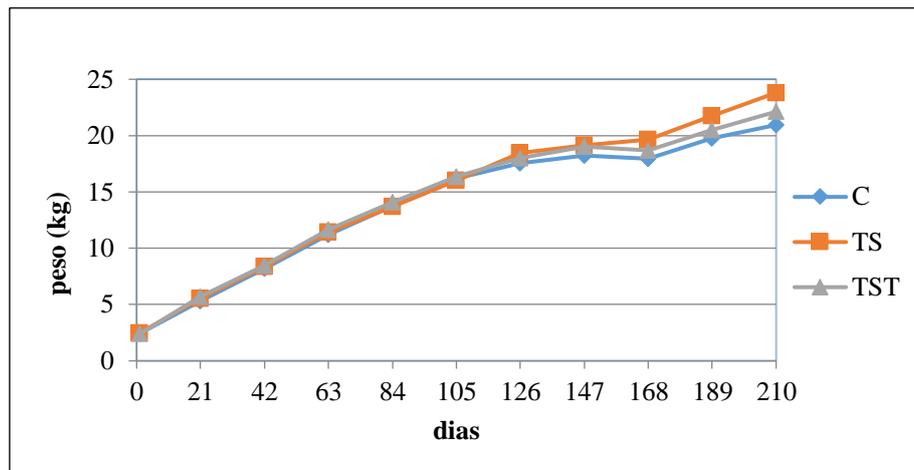


Figura 3

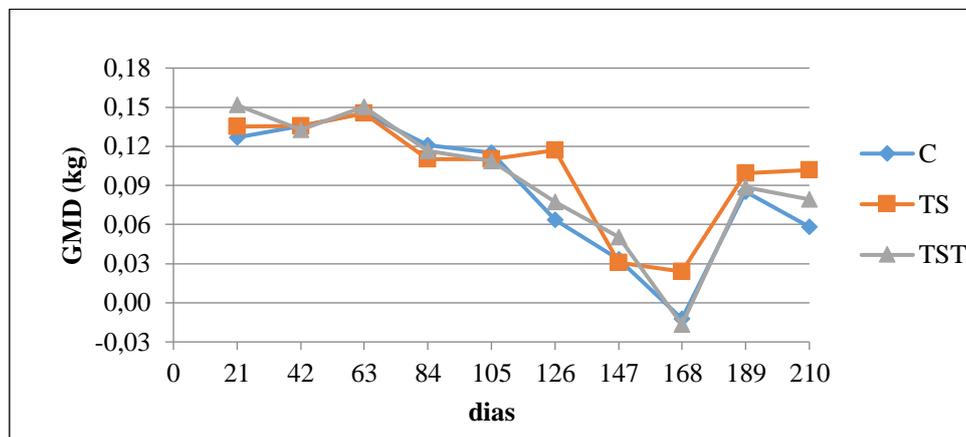


Figura 4

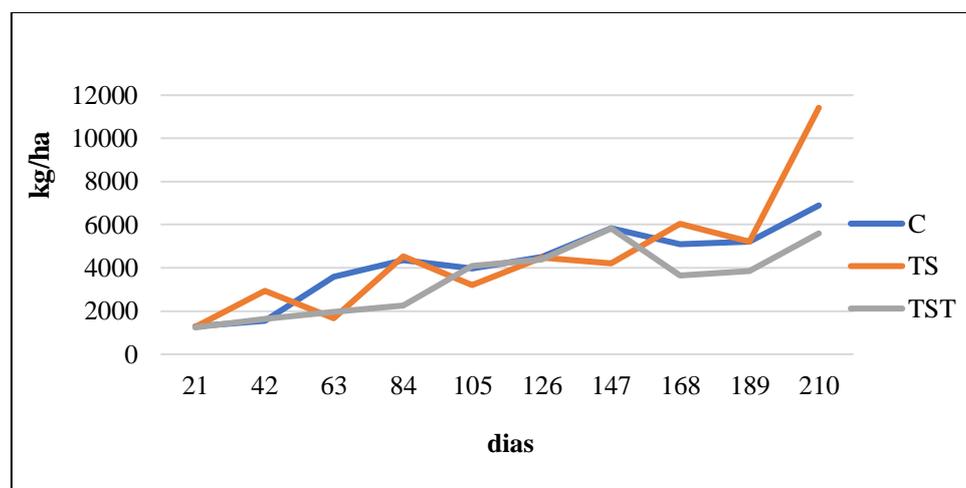


Figura 5

