

Uso de NIRS portátil para predição de anemia e diagnóstico de ovinos infectados por nematódeos gastrintestinais visando o tratamento seletivo



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pecuária Sudeste
Ministério da Agricultura e Pecuária**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
56**

Uso de NIRS portátil para predição de anemia
e diagnóstico de ovinos infectados
por nematódeos gastrintestinais
visando o tratamento seletivo

*Márcio Dias Rabelo
Avelardo Urano de Carvalho Ferreira
Isabella Barbosa dos Santos
Sérgio Novita Esteves
Ana Carolina de Souza Chagas*

Embrapa Pecuária Sudeste
São Carlos, SP
2023

Embrapa Pecuária Sudeste
Rod. Wasghinton Luiz, km 234
13560-970, São Carlos, SP
Fone: (16) 3411-5600
<https://www.embrapa.br/pecuaria-sudeste>
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

**Comitê Local de Publicações
da Embrapa Pecuária Sudeste**

Presidente

André Luiz Monteiro Novo

Secretário-Executivo

Luiz Francisco Zafalon

Membros

Gisele Rosso

Mara Angélica Pedrochi

Maria Cristina Campanelli Brito

Silvia Helena Picirillo Sanchez

Revisão de texto

Gisele Rosso

Normalização bibliográfica

Mara Angélica Pedrochi

Editoração eletrônica

Maria Cristina Campanelli Brito

Foto da capa

Isabella Barbosa dos Santos

1ª edição

Publicação digital (PDF): 2023

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Pecuária Sudeste

Rabelo, Márcio Dias

Uso de NIRS portátil para predição de anemia e diagnóstico de ovinos infectados por nematódeos gastrintestinais visando o tratamento seletivo / Marcio Dias Rabelo; Avelardo Urano de Carvalho Ferreira; Isabella Barbosa dos Santos; Sérgio Novita Esteves, Ana Carolina de Souza Chagas. -- São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2023.

40 p.: il. (Embrapa Pecuária Sudeste. Boletim e Pesquisa e Desenvolvimento, 56).
ISSN 1981-2078.

1. Diagnóstico. 2. Nematóide. 3. Ovino. I. Rabelo, M. D. II. Ferreira, A. U. de C. III. Santos, I. B. dos. IV. Esteves, S. N. V. Chagas, A. C. de S. VI. Título. VII. Série.

CDD 616.075

Mara Angélica Pedrochi (CRB-8/6556)

© Embrapa, 2023

Sumário

Introdução.....	8
Material e Métodos.....	10
Resultados	18
Discussão	31
Conclusões.....	36
Referências.....	37

Uso de NIRs portátil para predição de anemia e diagnóstico de ovinos infectados por nematódeos gastrintestinais visando o tratamento seletivo

Márcio Dias Rabelo¹

Avelardo Urano de Carvalho Ferreira²

Isabella Barbosa dos Santos³

Sérgio Novita Esteves⁴

Ana Carolina de Souza Chagas⁵

Resumo - *Haemonchus contortus* é o nematódeo gastrintestinal (NGI) de maior prevalência e importância em pequenos ruminantes, por reduzir os valores de volume globular (VG), causando anemia. O diagnóstico precoce da infecção por NGI pela anemia pode ser utilizado para o tratamento seletivo direcionado (TST) de ovinos, reduzindo o uso de antiparasitários e a resistência anti-helmíntica. Esta pesquisa desenvolveu modelos para a predição da anemia (valores de VG) e produziu uma ferramenta para diagnóstico de ovinos da raça Morada Nova (MN) infectados por NGI a partir da análise multivariada de dados de espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS), coletados diretamente no sangue dos cordeiros. No total, 1728 espectros foram coletados em amostras de sangue de 216 cordeiros, usando um equipamento portátil. Paralelamente, foram medidos os parâmetros indicativos de infecção: VG, grau FAMACHA, contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e o ganho médio diário de peso (GMD). Empregou-se a análise de componentes principais (PCA) para análise exploratória dos dados, a regressão pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS) para a predição dos valores de VG via NIRS e a análise discriminante linear (PCA-LDA) para o modelo de classificação e diagnóstico. A combinação dos procedimentos de alisamento, padronização normal de sinal (SNV) e primeira derivada foi a mais eficiente para o pré-tratamento dos dados. Os picos de absorção na região NIR associados à excitação de sobretons de grupos funcionais NH de

1 Márcio Dias Rabelo, Químico, mestre em Agroquímica, analista da Embrapa Pecuária Sudeste. marcio.rabelo@embrapa.br

2 Avelardo Urano de Carvalho Ferreira, Químico, doutor em Físico-Químico, analista da Embrapa Pecuária Sudeste.

3 Isabella Barbosa dos Santos, Médica veterinária, bolsista da Embrapa Pecuária Sudeste.

4 Sérgio Novita Esteves, Médico veterinário, doutor em Ciência dos Alimentos, pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste.

5 Ana Carolina de Souza Chagas, Bióloga, doutora em Ciência Animal, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste.

proteínas tiveram grande peso nas componentes principais (PCs), indicando que a técnica NIRS é sensível às proteínas presentes no sangue.

O modelo para predição do VG pela PLS apresentou erro padrão de predição (SEP) de 2,27%, raiz da média quadrática dos erros de predição (RMSEP) de 2,26%, e coeficiente de determinação (R^2) de 0,74, indicando boa correlação entre os valores de VG preditos pelo modelo desenvolvido e o VG obtido pelo hematócrito. O modelo PCA-LDA apresentou acurácia de 77,73% e sensibilidade de 78,98%, superando a sensibilidade verificada para o método FAMACHA (sensibilidade de 3,20%). Os modelos multivariados associados à técnica NIRS reportados neste trabalho poderão ser empregados futuramente como uma ferramenta rápida e versátil para o diagnóstico da infecção por NGI e para a realização do TST em cordeiros Morada Nova.

Termos para indexação: controle parasitário, pequenos ruminantes, anemia, método FAMACHA, diagnóstico, NIRS, Análise Discriminante Linear.

Use of portable NIRS for anemia prediction and Diagnosis of sheep infected by gastrointestinal nematodes for selective treatment

Abstract - *Haemonchus contortus* is the most prevalent and important gastrointestinal nematode (GIN) in small ruminants, reducing packed cell volume (PCV) values, and causing anemia. Early diagnosis of GIN infection by anemia can be used for targeted selective treatment (TST) of sheep, reducing antiparasitic use and anthelmintic resistance. The goals of this study were to develop models for the prediction of anemia (PCV values) and to create a tool for the diagnosis of GIN-infected Morada Nova (MN) sheep, based on multivariate analysis of near-infrared spectroscopy (NIRS) data collected directly from the blood of the lambs. In parallel, other parameters indicative of infection were measured: PCV, FAMACHA grade, eggs per gram of feces (EPG) count and mean daily weight gain (DWG). Principal component analysis (PCA) was used for exploratory data analysis, regression by the partial least squares method (PLS) for the prediction of PCV values via NIRS and linear discriminant analysis (PCA-LDA) for the model classification and diagnosis. The combination of smoothing procedures, normal signal standardization (SNV) and first derivative was the most efficient pre-treatment of the data being adopted in the proposed procedure. The absorption peaks in the NIRS region associated with the excitation of overtones of NH functional groups of proteins had strong impact on the principal components (PCs), indicating that the NIRS technique is sensitive to the proteins in the blood. The model for predicting PCV by PLS presented a standard error of prediction (SEP) of 2.27%, root mean square error of prediction (RMSEP) of 2.26% and coefficient of determination (R^2) of 0.74, indicating a good correlation between the PCV values predicted by the model and the PCV obtained by hematocrit. The PCA-LDA model presented 77.73% accuracy and 78.98% sensitivity, surpassing the sensitivity verified for the FAMACHA method (sensitivity 3.20%). The multivariate models associated with the NIRS technique reported here can be used in the future as a quick and versatile tool for GIN infection diagnosis and to apply TST in Morada Nova lambs.

Index terms: parasite control, small ruminants, anemia, FAMACHA method, diagnosis, NIRS, Linear Discriminant Analysis.

Introdução

Os nematódeos gastrintestinais (NGI) representam uma das maiores causas de perdas produtivas na criação de pequenos ruminantes no Brasil, com destaque para a espécie *Haemonchus contortus*, causadora da hemoncose (Maia; Rosalinski-Moraes; Sotomaior, 2013). *H. contortus* adere-se à mucosa do abomaso e provoca lesões que alteram a secreção do ácido clorídrico e do pepsinogênio, promovendo uma falha na digestão proteica do animal. Porém, o maior prejuízo deve-se ao fato deste helminto ser hematófago. Com isto, ovinos com infecção maciça por esta espécie desenvolvem um quadro de anemia, causando perda de produtividade e elevada taxa de mortalidade (Muchiut et al., 2019). *Trichostrongylus colubriformis* provoca lesões entéricas que diminuem a eficiência no uso de alimentos (menor absorção e diarreia), o que reduz a produtividade e aumenta a ocorrência de óbitos (Roeber; Jex; Gasser, 2013), quadro similar ao provocado por *Cooperia sp.*, que em ovinos leva à infecção leve (Amarante, 2014). *Oesophagostomum columbianum*, por sua vez, causa enterite nodular, decorrente das mudas larvais, que provocam formações calcificadas no intestino grosso (Jas; Ghosh; Das, 2010). Assim, sendo a verminose causada por NGI o principal problema sanitário dos rebanhos de ovinos, o controle adequado dessa enfermidade é imperativo, caso contrário, a atividade pode se tornar inviável economicamente, uma vez que reduz a produtividade e pode levar os animais à morte (Amarante, 2014).

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

O hematócrito é a metodologia mais indicada para diagnóstico clínico da anemia, principal sintoma da hemoncose. Essa técnica consiste na centrifugação da amostra de sangue e mede o volume globular (VG) compactado com a separação e a determinação da fração de glóbulos vermelhos (eritrócitos) presente no sangue total. O VG é considerado um método preciso para determinação da anemia, porém, requer a preparação

das amostras e a realização dos ensaios em laboratório (Diaz González; Silva, 2008). O tempo necessário para esse procedimento é inadequado para o TST, uma vez que o laudo só chega ao produtor após a análise clínica em laboratório. Assim, não é possível diagnosticar os animais já contidos nos currais e tratá-los imediatamente e seletivamente.

O método FAMACHA tem sido utilizado para a detecção do grau de anemia a campo, o qual é associado à coloração da mucosa conjuntival dos animais (Wyk; Bath, 2002; Wyk; Mayhew, 2013). Todavia, treinamento técnico para utilização correta do cartão e tempo adequado para adaptação e implantação da técnica na propriedade são requisitos indispensáveis para o sucesso da técnica (Chagas; Carvalho; Molento, 2007). Dessa forma, esse método pode estar sujeito a falhas devido à subjetividade, imprecisão, falta de sensibilidade e especificidade. O diagnóstico impreciso pode levar à disseminação da hemocose, perda de produtividade, óbitos ou ainda contribuir para o uso excessivo de anti-helmínticos, favorecendo a resistência (Pereira et al., 2016). Assim, o estabelecimento do TST requer tecnologia de diagnóstico analiticamente precisa, rápida e acessível, que possa ser aplicada a campo no momento da coleta das amostras.

Os contínuos desenvolvimentos e aplicações instrumentais observados nos últimos anos lançaram a Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIRS) em uma nova era de análises, tanto em laboratórios como em campo (Béc et al., 2020). A espectroscopia no NIR emprega a radiação eletromagnética na região do infravermelho próximo com fótons que apresentam comprimentos de onda entre 750 nm e 2.500 nm (4.000 cm^{-1} e 13.333 cm^{-1}). Os espectros NIRS são formados pela absorção da radiação pelas amostras, promovendo a excitação dos sobretons e combinações dos modos vibracionais associados às seguintes ligações C-H, N-H, S-H e O-H. Métodos matemáticos, como as técnicas de análise multivariada, são necessários para resgatar a informação química presente nos espectros (Pasquini, 2003).

Segundo Pasquini (2018), os desenvolvimentos recentes relacionados à técnica NIRS estão baseados em três pilares: os aspectos fundamentais da espectroscopia vibracional, já bem estabelecidos; os avanços instrumentais incorporados nos últimos anos, voltados principalmente à miniaturização e sistemas de imagens; e no tratamento e técnicas de processamento dos dados quimiométricos. Com o suporte da análise multivariada de dados

(AMV), a técnica NIRS tem sido amplamente utilizada para determinar os constituintes majoritários de diversas matrizes de interesse agrícola desde a década de 80 (Jintao et al., 2017), mas seu uso como ferramenta de diagnóstico na zootecnia e na medicina veterinária ainda são pouco explorado. Na área da saúde, equipamentos NIRS têm sido utilizados para determinações em sangue como: teor de glicose em camundongos (Jintao et al., 2017), alterações para o diagnóstico precoce de câncer (Raja et al., 2019) e anemia em humanos (Sakudo et al., 2009). O NIRS também vem sendo empregado na análise do plasma sanguíneo para diagnóstico da AIDS (Sakudo et al., 2005; Bahmani et al., 2009), da doença de Alzheimer (Burns et al., 2009; Carmona et al., 2013; Paraskevaidi et al., 2018), além da prenhez em ovelhas (Andueza et al., 2014) e da Doença Respiratória Bovina (DRB) em bezerros leiteiros (Santos-Rivera et al., 2021). Portanto, este estudo teve por objetivos desenvolver modelos para a predição da anemia (valores de VG) e criar uma ferramenta para diagnóstico dos animais infectados por NGI a partir da AMV de espectros NIR coletados no sangue de ovinos da raça Morada Nova. O interesse em longo prazo é criar uma ferramenta de diagnóstico para detecção dos animais infectados por NGI para tratamento com anti-helmíntico, de modo a atingir os objetivos do TST.

Material e métodos

Animais experimentais e coleta das amostras

O trabalho experimental foi desenvolvido com um rebanho ovino da raça Morada Nova, da Embrapa Pecuária Sudeste, localizada no município de São Carlos, no estado de São Paulo. O experimento foi conduzido em dois anos e participaram 216 animais (114 no ano 1 e 102 no ano 2), sendo 117 machos e 99 fêmeas, submetidos à infecção natural por NGI. As coletas das amostras foram realizadas do 63º dia de vida (D63) aos 210º dias de vida (D210), a cada 21 dias, totalizando oito datas de coleta (D63, D84, D105, D126, D147, D168, D189 e D210), quando foram medidos os parâmetros OPG, GMD, VG, grau FAMACHA, e também coletados os espectros com o equipamento NIRS portátil. Todos os animais receberam tratamento anti-

helmíntico no D63 (Ripercol® L - 150F, levamisol 18,8% injetável, 9,4 mg /kg) para estabelecer o início do experimento.

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

A avaliação do grau FAMACHA foi realizada por um único veterinário habilitado e experiente na realização do método na tentativa de reduzir o viés de subjetividade. Após a contenção dos cordeiros, a mucosa ocular conjuntiva foi exposta e classificada em uma das cinco categorias, variando de 1 (coloração vermelho brilhante, animal saudável) até 5 (coloração pálida, quase branca, anemia grave). Animais com graus 1 e 2 são apresentados na literatura como animais saudáveis e animais graus 3, 4 e 5 precisam de tratamento. Os graus FAMACHA estão associados a diferentes valores de VG (Wyk; Bath, 2002).

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

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

Alíquotas de um mL das amostras de sangue foram transferidas dos tubos Vacutainer para placas de cultivo em acrílico de 12 poços de 2,5 cm de diâmetro (Kasvi, Brasil), utilizadas como porta-amostras. Na sequência, os espectros NIRS de cada uma das amostras foram coletados de forma estacionária, no modo de reflectância difusa, em triplicata, com o espectrômetro portátil de infravermelho próximo (DLP®NIRscan™ Nano da Texas Instruments, EUA),

equipado com detector de InGaAs (Arseneto de índio e gálio), com faixa espectral de 900 a 1700 nm para compor espectros com 200 pontos, com resolução de quatro nm e cinco varreduras por espectro.

Análise Multivariada e classificação dos dados

Foram obtidas 1728 amostras de sangue referentes aos 216 animais em oito coletas com intervalo de 21 dias. Os espectros NIRS coletados foram tratados pelo software de análise multivariada Unscrambler X (v.10.3, Camo Analytics, Noruega). Em cada uma das amostras foram coletados espectros em triplicata e obtido o espectro médio de cada amostra. Os espectros médios originais foram submetidos aos seguintes pré-tratamentos matemáticos: alisamento pelo método de Savitzky-Golay com polinômio de grau dois e janela simétrica de nove pontos; o método de transformação conhecido como variação normal padrão ou padronização normal de sinal (SNV) e a primeira derivada empregando o algoritmo de Savitzky-Golay com polinômio de grau dois e janela simétrica de nove pontos.

Após os pré-tratamentos, os dados foram submetidos à análise exploratória pela análise de componentes principais (PCA). Foram selecionados apenas 925 espectros do conjunto inicial. Essa redução teve como objetivo balancear a relação entre espectros de amostras de animais saudáveis e doentes devido ao elevado número de amostras classificadas como saudáveis. Foram selecionados 768 espectros de animais saudáveis e incluídas todas as amostras classificadas como doentes (157 espectros), fixando-se uma relação de pelo menos um cordeiro doente para cada cinco saudáveis.

Os 768 espectros de amostras de animais saudáveis selecionados foram escolhidos dentro dos quatro quadrantes do gráfico de escores da análise de PCA, para selecionar um subconjunto de dados que ainda fosse representativo da variância do conjunto de dados inicial. Desenvolveram-se modelos multivariados NIRS de predição para quantificação de VG pelo método de regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS) a partir dos espectros NIR pré-tratados. Diferentes combinações de pré-tratamentos foram avaliadas para determinar a que apresentasse maior coeficiente de determinação (R^2) e menores erros de calibração e predição. Em seguida, foram criados modelos de classificação empregando-se o método de análise discriminante linear (PCA-LDA) para o diagnóstico da infecção por NGI.

Análise dos Componentes Principais (PCA)

A PCA foi realizada centrando-se os dados na média empregando-se o algoritmo de NIPALS. As amostras anômalas foram identificadas pelo gráfico de resíduos e influência, sendo em seguida eliminadas. Posteriormente, foi selecionado um subconjunto de dados de 925 espectros a partir dos 1728 espectros originais. Esse procedimento foi realizado para aumentar a probabilidade de ocorrência de animais doentes. A probabilidade de ocorrência ou probabilidade do pré-teste é definida como a razão entre o número de casos positivos (animais doentes) no conjunto total de dados. Dessa forma, no conjunto inicial de 1728 amostras, a probabilidade de ocorrência da doença era de 9,1% e no subconjunto selecionado a probabilidade de ocorrência passou a ser de 17%. O subconjunto resultante manteve grande variabilidade entre as amostras e uma boa representatividade do conjunto de dados inicial.

Método de regressão Linear dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Os 925 espectros pré-tratados selecionados foram divididos em um conjunto de calibração e validação cruzada (685 espectros – 80%) e em um conjunto de validação externa (240 espectros – 20%) para a construção do modelo PLS. Na validação cruzada, a partir do método randômico, escolheu-se aleatoriamente 20 segmentos contendo aproximadamente 34 amostras por segmento. O processo de validação cruzada consiste da subtração das 34 amostras pertencentes a um dos 20 segmentos e o desenvolvimento de um modelo de calibração a partir das 651 amostras restantes, utilizando-se as 34 amostras retiradas para determinar a validação estatística do modelo. Em seguida, o segmento previamente retirado é reincorporado ao conjunto de calibração e um novo segmento com 34 amostras é retirado. Dessa maneira, o processo repete-se com a criação de um novo modelo de calibração com 651 amostras e a utilização do segmento retirado contendo 34 amostras para realizar a validação do novo modelo. O processo é realizado 20 vezes com os 20 segmentos desenvolvendo-se 20 modelos. Assim, obteve-se um modelo médio em que todas as 685 amostras foram utilizadas no processo de calibração e de validação interna. Na validação externa foram selecionadas 240 amostras, não utilizadas na construção do modelo, para avaliar o desempenho do modelo simulando uma situação de rotina com amostras desconhecidas. Os espectros das amostras provenientes de animais

doentes e saudáveis foram aleatoriamente distribuídos entres os conjuntos de calibração/validação cruzada e o conjunto de validação externa. Para o conjunto de validação externa foi mantida uma relação similar entre a razão de espectros de animais doentes e saudáveis do conjunto de calibração (Tabela 1). As amostras anômalas foram detectadas pelos gráficos de resíduos e pelo gráfico de influência e removidas do conjunto de amostras analisadas.

Tabela 1. Número de animais doentes e saudáveis no conjunto de calibração e validação externa.

Número de amostras	Total	Calibra-	Validação Externa
Total	925	685	240
Espectros de animais doentes	157	110	47
Espectros de animais saudáveis	768	575	193

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

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{N_c}} \quad RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{N_{cv}}} \quad RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{N_p}}$$

PCA-LDA para classificação dos ovinos

A técnica da PCA-LDA foi utilizada para obter o modelo supervisionado usado na classificação dos ovinos. O modelo PCA-LDA descreve matematicamente a associação das informações químicas contidas nos espectros NIR com o rótulo dado aos animais doadores das amostras, na ocasião da coleta. Utilizou-se a combinação de três parâmetros (OPG, VG e

GMD) medidos pelos métodos convencionais para fechar o diagnóstico dos animais e gerar os rótulos da função alvo atribuídos às respectivas amostras.

Um total de 925 espectros previamente selecionados foi utilizado para a construção de um modelo PCA-LDA de classificação binária (animais saudáveis ou doentes) e outro modelo de classificação ternária (animais saudáveis, com doença moderada ou doença intensa).

Para a criação do modelo de classificação binária o cordeiro era diagnosticado e rotulado em duas classes, 'saudável ou doente'. O rótulo 'saudável' era dado quando o animal apresentava pelo menos dois dos três critérios definidos com base nos parâmetros de referência, a saber: OPG < 2000, GMD \geq 0,05 kg/dia, VG > 25%. Caso essa condição não fosse observada, o animal era diagnosticado como 'doente'.

Para a classificação ternária os cordeiros foram diagnosticados em três classes distintas: 'saudável, doença moderada e doença intensa'. Estabeleceram-se estratos para os valores dos parâmetros OPG, GMD e VG e atribuiu-se uma nota a cada um deles (Tabela 2). Assim, em função do valor medido, cada parâmetro recebia uma nota e a resultante da somatória de notas (SN) definia o diagnóstico final. Para ser diagnosticado como 'doente', o animal obrigatoriamente precisava ser classificado por pelo menos dois dos três parâmetros adotados. Caso o animal fosse classificado como doente em somente um parâmetro a SN seria no máximo igual a três e neste caso: $SN \leq 3$ corresponde à classificação saudável. Se o animal fosse classificado como doente por dois ou mais parâmetros, $2 \leq SN < 6$ seria indicado como doença moderada. Quando $SN \geq 6$ seria descrito como doença intensa. Assim, nenhum animal foi diagnosticado como 'doente' quando apresentava este diagnóstico advindo de um único parâmetro, ainda que tal parâmetro, isoladamente, pudesse caracterizar doença intensa. Essa decisão foi adotada para limitar a interferência de outras condições de saúde do rebanho (gravidez, anemia, pneumonia, etc.) no diagnóstico de NGI. Além disso, toda vez que o ovino apresentava pelo menos dois parâmetros com nota três, o mesmo era inevitavelmente diagnosticado com 'doença intensa'.

Tabela 2. Notas atribuídas aos níveis dos parâmetros OPG(1), GMD(1) e VG(1) para classificação ternária dos ovinos Morada Nova infectados por nematódeos gastrintestinais em: saudável (0), doença moderada (1) e doença intensa (3).

Parâmetro	Critério	Nota
OPG(1)	≥ 4000	3
	≥ 2000 e < 4000	1
	< 2000	0
GMD (Kg/dia)(1)	< 0	3
	≥ 0 e $\leq 0,05$	1
	$> 0,05$	0
VG(%)(1)	< 20	3
	≥ 20 e ≤ 25	1
	> 25	0

⁽¹⁾ Ovos por grama (OPG); Ganho médio diário de peso (Kg/dia) (GMD); Volume globular (%) (VG).

Dada à peculiaridade da raça Morada Nova em relação à manifestação dos sinais clínicos característicos da infecção, ou seja, animais resilientes/resistentes (Toscano et al., 2019a; Toscano et al., 2019b; Haehling et al., 2020), a adoção desses critérios pareceu adequada para a nossa abordagem. Todavia, alguns autores consideram que, em infecções mistas por helmintos em ovinos, as contagens de OPG acima de 1000 seriam classificadas como moderadas e a partir de 2000 intensas (Ueno; Gonçalves, 1998).

Construíram-se matrizes de confusão para cada método de referência e para os modelos NIRS (PCA-LDA) de classificação binária e ternária. As figuras de mérito de cada método foram calculadas e o desempenho no diagnóstico de cada método foi avaliado.

Como foi muito baixa a porcentagem de ovinos classificados com grau FAMACHA três (1,3 %), quatro (0,2%) e cinco (0%), e, muitas vezes, não apresentava concordância com os demais métodos de referência, optou-se por excluir este método como critério de diagnóstico que integraria o modelo NIRS de classificação obtido pelo PCA-LDA. Entretanto, as figuras de mérito do FAMACHA foram calculadas para avaliar o seu desempenho frente aos outros métodos de diagnóstico.

Figuras de mérito dos modelos de diagnóstico

Os métodos OPG, GMD, OPG, FAMACHA e os modelos de classificação PCA-LDA desenvolvidos foram avaliados pelas seguintes figuras de mérito: sensibilidade, especificidade, precisão, escore F_1 e acurácia. A sensibilidade do método de diagnóstico é a capacidade de reconhecer corretamente um resultado verdadeiro positivo para o alvo em questão (Wong; Lim, 2011), conforme a equação:

$$(1) \quad \text{Sensibilidade (\%)} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FN}) \times 100, \text{ onde:}$$

VP = verdadeiro positivo
FN = Falso negativo.

A especificidade é definida como a capacidade de identificar corretamente uma amostra oriunda de um animal saudável, resultado verdadeiro negativo, dentre o conjunto de indivíduos sem a doença, representada pela equação:

$$(2) \quad \text{Especificidade (\%)} = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FP}) \times 100, \text{ onde:}$$

VN = verdadeiro negativo
FP = falso positivo.

Já a acurácia é a medida da proporção de indivíduos classificados corretamente (Glas et. al., 2003) conforme a equação:

$$(3) \quad \text{Acurácia (\%)} = (\text{VP} + \text{VN}) / (\text{VP} + \text{VN} + \text{FP} + \text{FN}) \times 100.$$

A precisão é definida pela razão entre os casos classificados corretamente como positivos e o total de casos positivos, de acordo com a equação:

$$(4) \quad \text{Precisão (\%)} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FP}) \times 100.$$

O escore F_1 é uma métrica que varia entre zero e um sendo a média harmônica entre a precisão e a sensibilidade e, conseqüentemente, avalia em um único parâmetro estas duas figuras de mérito, dando um indicativo

da qualidade geral do modelo desenvolvido. Quanto mais próximo de um, melhor o desempenho do modelo de classificação de acordo com a equação:

$$(5) \quad F_1 = 2 * \text{Precisão} * \text{Sensibilidade} / (\text{Precisão} + \text{Sensibilidade})$$

Resultados

Diagnóstico dos animais

Dentre as 925 amostras utilizadas, 157 (17%) foram rotuladas (diagnosticadas) doentes e 768 (83%) saudáveis de acordo com os critérios da classificação binária. Quando adotados os critérios da classificação ternária, as 157 amostras doentes foram reclassificadas em doença moderada 116 (12,54%) e doença intensa 41 (4,43%) (Tabela 3).

Na classificação binária, o critério OPG ≥ 2000 foi o mais frequente e esteve presente em 100% das amostras classificadas como doentes, seguido pelo critério GMD $\leq 0,05$ (91,72%). Já entre os animais diagnosticados como saudáveis, o critério VG $\geq 25\%$ ocorreu em 100% das amostras, seguido novamente pelo critério GMD $> 0,05$ (91,02%).

O critério baseado no parâmetro GMD foi o mais frequente entre os animais com doença moderada (81,03%) e o OPG mais frequente para doença intensa (87,80%), segundo a classificação ternária.

Tabela 3. Contribuição dos parâmetros OPG(1), GMD(1), e VG(1), para classificação dos ovinos Morada Nova quanto ao grau de infecção por nematódeos gastrintestinais.

Categories	OPG(1)	GMD(1)	VG(1)
Classificação Binária			
Saudáveis 768 (83,03%)(2)	680 (88,54%)(3)	699 (91,02%)(3)	768 (100%)(3)
Doentes 157 (16,97%)(2)	157 (100,00%)(4)	144 (91,72%)(4)	45 (28,66%)(4)
Classificação Ternária			
Saudáveis 768 (83,03%)(2)	680 (88,54%)(3)	699 (91,02%)(3)	768 (100%)(3)
Doença moderada 116	49 (42,24%)(5)	94 (81,03%)(5)	25 (21,55%)(5)
Doença intensa 41 (4,43%)(2)	41 (100%)(6)	36 (87,80%)(6)	12 (29,27%)(6)

(1) Ovos por grama (OPG); Ganho médio diário de peso (Kg/dia) (GMD); Volume globular (%) (VG);

(2) Relativo ao total de amostras (925);

(3) Relativo ao total de amostras saudáveis (768);

(4) Relativo ao total de amostras doentes (157);

(5) Relativo ao total de amostras com doença moderada (116);

(6) Relativo ao total de amostras com doença intensa (41).

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

NIRS e pré-tratamentos

A coleta dos espectros ocorreu no modo de reflectância, mas os espectros NIR foram transformados para as intensidades serem expressas em unidades de absorbância ($\log 1/R$), de modo a preservar a relação linear dos espectros com a concentração dos analitos conforme a lei de Lambert-Beer. Uma vez que a radiação NIR é sujeita à reflectância difusa, é comum a existência de uma variância sistemática indesejável que dificulta a aquisição da variância química de interesse.

Os espectros coletados nas amostras de sangue de ovinos apresentaram o espalhamento e consequente deslocamento da linha de base para o conjunto de espectros originais (Figura 1A). Os espectros originais centrados

na média foram obtidos pela subtração do espectro médio em cada um dos espectros individuais. Os espectros centrados na média removeram a variabilidade comum a todos e acentuaram as diferenças químicas entre as diferentes classes de amostras de modo que foi possível encontrar diferenças nas características dos espectros coletados em amostras de animais saudáveis e animais doentes (Figura 1B). Além disso, observou-se que os espectros provenientes de animais com doença moderada e doença intensa são mais semelhantes entre si quando comparados aos espectros de animais saudáveis. A combinação de pré-tratamentos (Alisamento, SNV e 1ª Derivada) foi a mais eficiente para a remoção da variância indesejada. Os espectros pré-tratados não apresentaram deslocamento ou inclinação na linha de base de modo que foi possível atribuir os comprimentos de onda nos quais ocorreram as maiores diferenças associadas às amostras de animais saudáveis, com doença moderada e com doença intensa (em destaque na Figura 1C). As atribuições de banda dos grupos funcionais que apresentam maiores variações entre os espectros de amostras de animais doentes e saudáveis. Destacam-se ainda as atribuições de banda dos grupos funcionais que apresentam maiores variações entre os espectros de amostras de animais doentes e saudáveis. As regiões de maior informação química nos espectros estão presentes nas bandas em 993, 1007 e 1139 nm, referentes ao 2º sobretom dos estiramentos dos grupos funcionais N-H, e as regiões de 1214, 1375, 1487 e 1552 nm, referentes ao 1º sobretom destes estiramentos. As absorções nas regiões 1625 e 1680 nm são referentes ao 1º sobretom dos estiramentos dos grupos funcionais C-H (Figura 1C). O pré-tratamento com os dados centrados na média (Figura 1D) destacaram ainda mais as diferenças espectrais para as três classes de amostras, principalmente no que diz respeito aos espectros dos animais classificados com doença moderada e doença intensa em relação aos saudáveis.

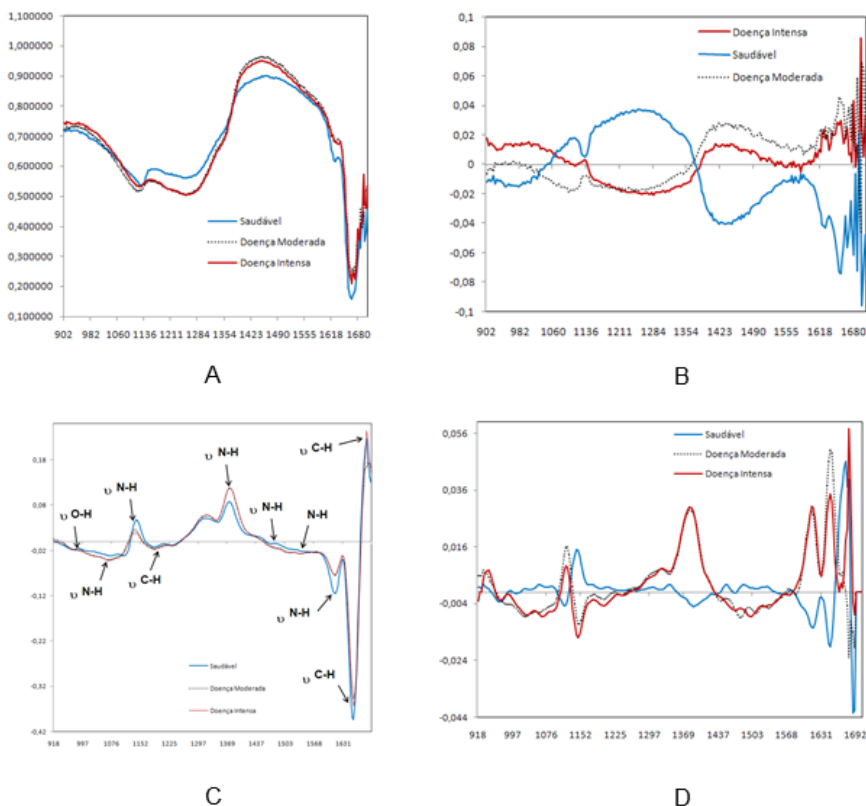


Figura 1. Espectros de amostras de sangue de ovinos classificados como saudáveis (—), doença moderada (....), doença intensa (—) quanto à infecção por NGI, de acordo com todos os métodos de referência (VG, OPG e GMD): Espectros NIR originais (A); Espectros NIR originais centrados na média (B); Espectros NIR pré-tratados (alisamento, SNV e 1ª derivada). Nos espectros pré-tratados estão destacadas as atribuições de bandas dos grupos funcionais com maior variação entre os espectros de amostras de animais doentes e saudáveis (C). Espectros NIR pré-tratados centrados na média, ressaltando as regiões com maior variação entre as classes (saudável, doença moderada e doença intensa) (D).

Análises dos Componentes Principais (PCA)

Os 925 espectros médios pré-tratados foram analisados através da PCA e a utilização das 11 primeiras PCs foram suficientes para explicar 96% da variância observada nos dados originais, indicando não ser necessário um aumento na complexidade do modelo. A projeção dos dados dos espectros

nas novas coordenadas (escores) acentuou as similaridades e disparidades do conjunto de amostras. Dessa forma, a partir da análise do gráfico de escores da PCA (PC2 x PC5), foi possível observar a separação entre os espectros de animais doentes e saudáveis (Figura 2A). O gráfico de escores entre a segunda e a quinta PC apresentou a maior separação entre os dois agrupamentos (Figura 2A). As diferenças presentes nos espectros aparentam ser características das diferentes classes, o que permite a formação de agrupamentos e uma separação relativa das classes no gráfico de escores. A análise de loadings das PCs um a cinco apontou os comprimentos de onda cuja variação exibe a maior contribuição para as primeiras componentes principais (Figura 2B). Pela análise de loadings foi possível observar que as regiões de comprimentos de onda de 1139 nm, 1375 nm e 1680 nm apresentam maiores loadings na formação das PCs e devem ter maior informação química para distinguir entre os espectros de amostras de animais doentes e saudáveis.

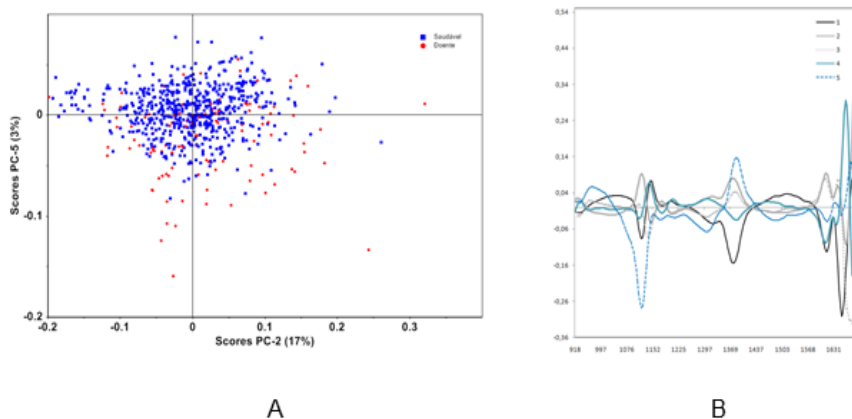


Figura 2. Análise de Componentes Principais dos espectros NIR (900 – 1700 nm) provenientes de amostras de sangue de ovinos classificados como doentes ou saudáveis em relação à infecção por nematódeos gastrintestinais. Gráfico de escores entre as componentes principais PC2 e PC5 indicando a separação entre os espectros de animais doentes (vermelho) e saudáveis (azul) (A); Análise de Loadings com as variáveis com a contribuição majoritária dos comprimentos de onda para as componentes principais (PC1 até a PC5) (B).

Métodos de regressão Linear dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Os valores de VG obtidos pelo método de referência no conjunto de calibração tiveram variaram de 9% a 46%, com VG médio de 34,4%. Das 685 amostras selecionadas para o modelo de calibração apenas 36 apresentaram $VG \leq 25\%$, 51 apresentaram $VG \geq 41\%$, enquanto para a maioria das amostras, 598, os valores de VG ficaram entre 26% e 40%.

Para avaliar a influência dos pré-tratamentos, foram gerados 10 modelos PLS para selecionar aqueles com as melhores características de desempenho de predição. Além dos espectros originais, foram utilizados o alisamento, 1ª derivada, 2ª derivada, MSC e o SNV. Após a comparação dos diferentes modelos PLS obtidos, foi selecionado aquele com os seguintes pré-tratamentos: Alisamento, SNV e a 1ª derivada nesta sequência. A escolha deste modelo foi determinada por apresentar o maior coeficiente de correlação de calibração ($R_{Cal} = 0,86$) e coeficiente de correlação de validação ($R_{Val} = 0,86$) e os menores valores de erro padrão de predição ($SEP = 2,27\%VG$) e raiz quadrada do erro médio de predição ($RMSEP = 2,26\%VG$), conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Influência de diferentes pré-tratamentos no modelo NIRS(1) de regressão

Métodos de pré-tratamentos	FL ⁽³⁾	Inc. ⁽⁴⁾	Int. ⁽⁵⁾	R _{cal} ⁽⁶⁾	R ² _{cal} ⁽⁷⁾	RMSECV ⁽⁸⁾	SECY ⁽⁹⁾	RMSEP ⁽¹⁰⁾	SEP ⁽¹¹⁾	R _{val} ⁽¹²⁾	R ² _{val} ⁽¹³⁾	Tendência ⁽¹⁴⁾
Dados Brutos	14	0,74	8,84	0,86	0,73	2,50	2,51	2,36	2,37	0,85	0,72	0,07
Alisamento	11	0,74	9,02	0,85	0,73	2,46	2,46	2,43	2,45	0,84	0,71	0,13
Alisamento + 1ª Derivada	12	0,74	8,87	0,85	0,73	2,53	2,53	2,40	2,41	0,84	0,71	0,14
Alisamento + 2ª Derivada	14	0,63	12,85	0,77	0,59	3,11	3,11	2,78	2,80	0,78	0,61	0,18
Alisamento + SNV ⁽¹⁵⁾	10	0,72	9,80	0,84	0,71	2,62	2,62	2,46	2,47	0,84	0,70	0,12
Alisamento + MSC ⁽¹⁶⁾	12	0,73	9,35	0,85	0,72	2,53	2,53	2,32	2,33	0,85	0,72	0,06
Alisamento + SNV + 1ª Derivada	11	0,75	8,73	0,86	0,74	2,47	2,47	2,26	2,27	0,86	0,74	0,09
Alisamento + SNV + 2ª Derivada	15	0,65	12,15	0,78	0,61	3,02	3,03	2,77	2,79	0,78	0,61	0,11
Alisamento + MSC + 1ª Derivada	11	0,73	9,17	0,85	0,72	2,58	2,59	2,40	2,42	0,84	0,71	0,11
Alisamento + MSC + 2ª Derivada	15	0,66	11,88	0,79	0,62	3,00	3,00	2,72	2,74	0,79	0,62	0,14

(1) Espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS);

(2) Regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS);

(3) Número de fatores latentes (FL);

(4) valor de inclinação da reta entre os valores preditos e os valores de referência (Inc);

(5) valor do intercepto da reta entre os valores preditos e os valores de referência (Int);

(6) coeficiente de correlação do conjunto de calibração (R Cal);

(7) coeficiente de determinação do conjunto de calibração (R² Cal);

(8) raiz quadrada do erro médio de validação cruzada expresso em VG (RMSECV);

(9) Erro padrão do conjunto de validação cruzada (SECY);

(10) raiz quadrada do erro médio de predição expresso em VG (RMSEP);

(11) Erro padrão do conjunto de validação externa (predição) (SEP);

(12) coeficiente de correlação do conjunto de validação externa (predição) (R Val);

(13) coeficiente de determinação do conjunto de validação externa (predição) (R² Val);

(14) Diferença sistemática entre os valores reais e os valores preditos pelo modelo (Tendência);

(15) Padronização normal de sinal; (16) MSC: Correção multiplicativa de sinal (SNV).

Para a escolha do número de fatores latentes (FL), foi avaliada a redução dos parâmetros (RMSEC e RMSECV) até o 11º FL, indicando um aumento crescente na exatidão do modelo. Após o 11º FL os erros se estabilizam e o aumento na complexidade do modelo não reduziu os valores de RMSECV (Figura 3).

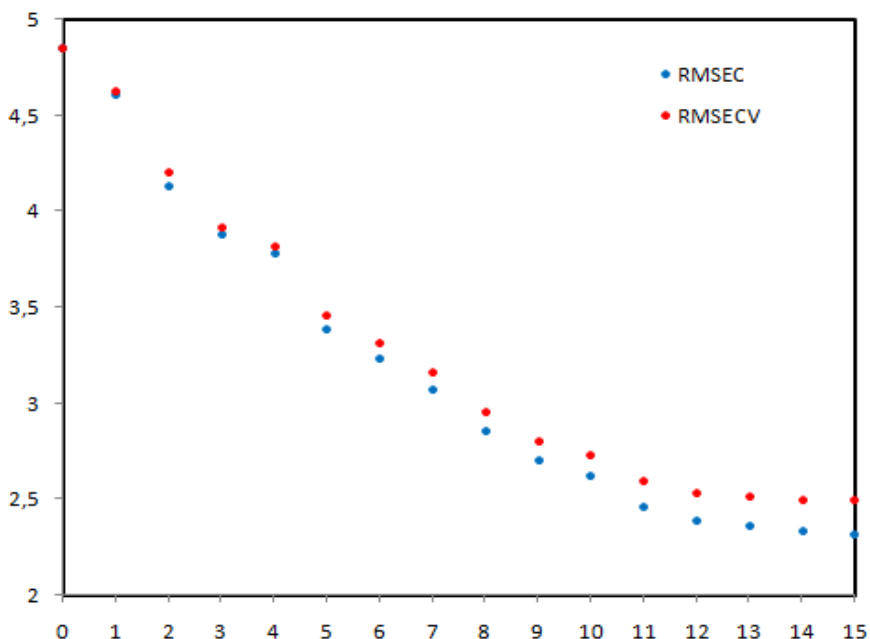


Figura 3. Variação da raiz quadrada do erro médio da calibração (RMSEC) e raiz quadrada do erro médio da validação cruzada (RMSECV) em função de diferentes números de fatores latentes.

O gráfico de escores para os fatores latentes FL1 e FL2 indicou uma separação entre os espectros de amostras de animais saudáveis, com doença moderada e doença intensa (Figura 4). Apesar das características distintas entre as classes de amostras, é possível observar um alto e desbalanceado número de amostras de animais saudáveis, e várias amostras classificadas como de animais doentes que estão presentes entre as amostras saudáveis, indicando que a separação das classes não foi completa.

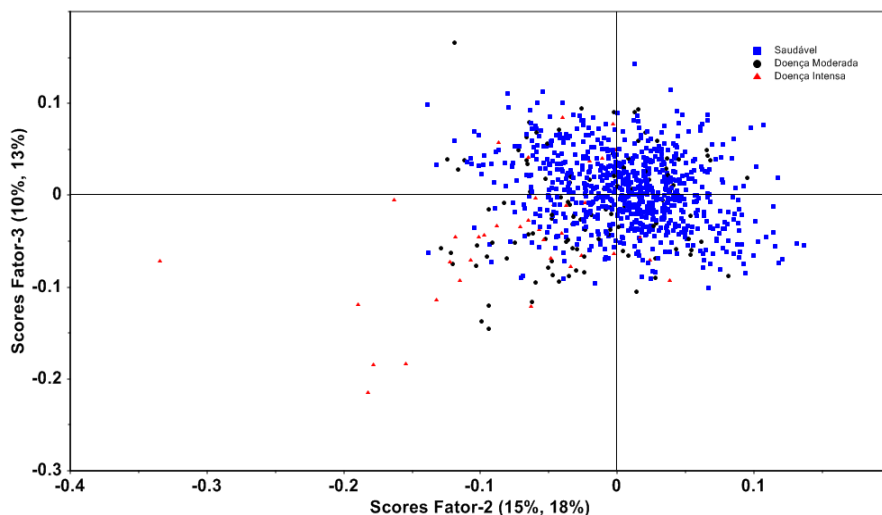


Figura 4. Escores entre os fatores latentes FL1 e FL2, indicando uma separação entre os espectros de amostras de animais saudáveis (azul), com doença moderada (preto) e com doença intensa (vermelho).

A eficiência do modelo PLS foi avaliada pela previsão de resultados de VG em relação aos valores medidos pelo método de referência, tanto para o conjunto de calibração/validação cruzada (Figura 5A) quanto para o conjunto de validação externa (predição), Figura 5B. Uma forte correlação foi determinada entre os valores de VG preditos via NIRS e o obtido via hematócrito ($R > 0,8$).

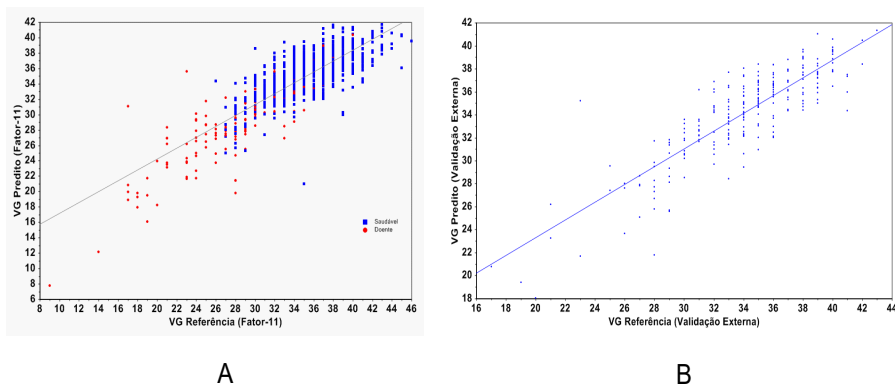


Figura 5. Modelo de regressão PLS: Valores obtidos pelo hematócrito versus valores preditos pelo modelo NIRS para o VG. Modelo obtido pelo conjunto de calibração e validação cruzada. Distinção entre amostras diagnosticadas como de animais doentes e animais saudáveis (A). Avaliação do modelo a partir da validação externa (B).

Análise discriminante linear (LDA)

Para as 925 amostras selecionadas, a probabilidade de ocorrência de animais doentes passou a ser de 17% no modelo NIRS (PCA-LDA) de classificação binária, enquanto na classificação ternária foi de 12,5% e 4,4%, para a ocorrência de animais com doença moderada e doença intensa, respectivamente (Tabela 2). O modelo PCA-LDA gerou uma função discriminante que conseguiu separar linearmente as amostras de animais doentes das amostras de animais saudáveis, maximizando o número de diagnósticos corretos (Figura 6).

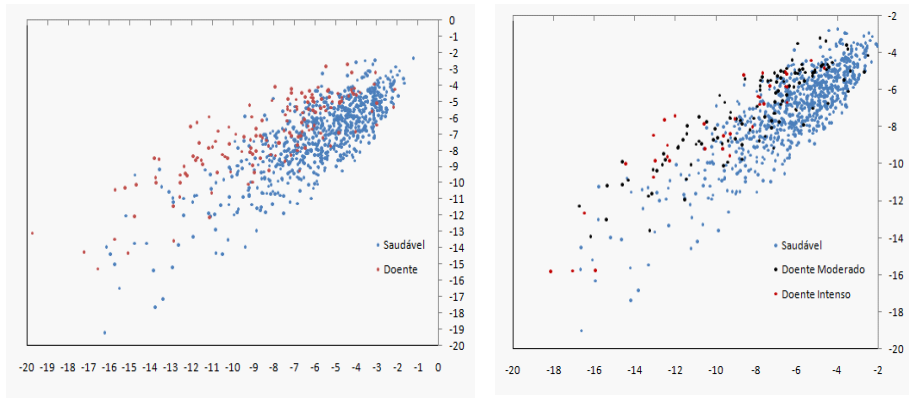


Figura 6. Modelo de calibração para a análise discriminante linear (PCA-LDA) obtido dos espectros NIR (900 – 1700 nm) provenientes de amostras de sangue de ovinos classificados como doentes e saudáveis quanto à infecção por nematódeos gastrintestinais.

Construiu-se matrizes de confusão para os modelos NIRS (PCA-LDA) de classificação binária e ternária e para os métodos de referência (VG, OPG, GMD e FAMACHA). Assim foi possível comparar o desempenho de cada método de classificação para o diagnóstico de infecção por NGI, baseando-se nos parâmetros de acurácia, precisão, sensibilidade, especificidade e escore F1 (Tabela 5).

Observa-se que para o modelo NIRS (PCA-LDA) de classificação binária, 48 amostras foram identificadas como falso negativo (FN), resultando numa taxa de erro de 30,57%, enquanto 140 amostras foram classificadas como falso positivo (FP), levando a uma taxa de erro de 18,23%. O modelo apresentou acurácia de 79,7%, tendo um bom equilíbrio entre sensibilidade (69,4%) e especificidade (81,8%). A precisão (43,8%) encontrada foi pobre comparada aos outros métodos, indicando que o NIRS classifica como doentes, animais classificados como saudáveis por outros métodos.

Já no modelo de classificação ternária n1 a sensibilidade do método caiu de 69,43% para 62,5%% e a especificidade caiu para 74,7%. A acurácia (73,0%) e a precisão (28,4%) também foram reduzidas. O modelo NIRS (PCA-LDA) de classificação ternária n2 foi definido como o modelo em que caso a amostra tenha sido classificada como de animal doente, ainda que com grau de intensidade atribuída de forma errônea pelo modelo, a resposta clínica

deve ser a de indicação de tratamento para NGI. Ao proceder desta forma o número de diagnósticos FN cai para 33 (21,0%) com queda da precisão de 43,8% para 41,8%. Com acurácia de 77,7% e um melhor desempenho na sensibilidade (79,0%) e um maior equilíbrio entre os parâmetros especificidade (77,5%) e sensibilidade. Para a classificação binária, os métodos que apresentaram o melhor desempenho geral podem ser observados através dos escores F1 obtidos, tendo o OPG (0,78), o GMD (0,78) e o modelo NIRS (0,54). Na classificação ternária os escores F1 observados foram OPG (0,54), GMD (0,73) e modelo NIRS classificação ternária n2 (0,55). Os métodos VG (binária: 0,45 e ternária: 0,38) e FAMACHA (binária: 0,19 e ternária: 0,06) apresentaram desempenho geral inferior.

Tabela 5. Matriz de confusão obtida pelos critérios de referência (VG(1), OPG(1), GMD(1) e FAMACHA(1)) e pelo modelo NIRSPCA-LDA(2) construídos a partir dos espectros NIR coletados em amostras de sangue de ovinos classificados quanto ao grau de infecção por nematódeos gastrintestinais.

Critério	Classificação	Doentes		Não-Doentes		Falso Positivo		Falso Negativo		Acurácia	Precisão	Sensibilidade		Especificidade		F ₁ ⁽³⁾
		n	% acerto	n	% acerto	n	% erro	n	% erro			%	%	%	%	
OPG	Binária	157	100,0	680	88,5	88	11,5	0	0,0	90,5	64,1	100,0	88,5	0,78		
	Terária	90	57,3	680	88,5	155	20,2	0	0,0	83,2	36,7	100,0	81,4	0,54		
GMD	Binária	144	91,7	699	91,0	69	9,0	13	8,3	91,1	67,6	91,7	91,0	0,78		
	Terária	130	82,8	699	91,0	81	10,6	15	9,6	89,6	61,6	89,7	89,6	0,73		
VG	Binária	45	28,7	768	100,0	0	0,0	112	71,3	87,9	100,0	28,7	100,0	0,45		
	Terária	37	23,6	768	100,0	0	0,0	120	76,4	87,0	100,0	23,6	100,0	0,38		
FAMACHA	Binária	17	10,8	767	99,9	1	0,1	140	89,2	84,8	94,4	10,8	99,9	0,19		
	Terária	5	3,2	767	99,9	2	0,3	151	96,2	83,5	71,4	3,2	99,7	0,06		
NIRS _{PCA-LDA}	Binária	109	69,4	628	81,8	140	18,2	48	30,6	79,7	43,8	69,4	81,8	0,54		
	Terária ⁽ⁿ¹⁾	80	51,0	595	77,5	202	26,3	48	30,6	73,0	28,4	62,5	74,7	0,39		
	Terária ⁽ⁿ²⁾	124	79,0	595	77,5	173	22,5	33	21,0	77,7	41,8	79,0	77,5	0,55		

(1) Ovos por grama (OPG); Ganho médio diário de peso (Kg/dia) (GMD); Volume globular (%) (VG); Método de identificação de anemia em ovinos pela avaliação da mucosa ocular 'Fafa Malan Chart' (FAMACHA);

(2) Modelo de classificação obtido a partir da espectroscopia no infravermelho próximo através da Análise de Componentes Principais/Análise Discriminante Linear (NIRSPCA-LDA);

(3) Média harmônica da precisão e sensibilidade, avalia a qualidade geral do modelo desenvolvido. $F_1 = 2 * \text{Precisão} * \text{Sensibilidade} / (\text{Precisão} + \text{Sensibilidade})$. (Escore F1);

(n1) Considera-se, para fins de tratamento, como falso negativo (FN) ou falso positivo (FP) as predições erradas para a intensidade da doença (amostra com doença moderada e predita como doença intensa é considerada FP; amostra com doença intensa e predita como doença moderada é considerada FN);

(n2) Considera-se, para fins de tratamento, como diagnóstico correto, isto é, verdadeiro positivo (VP), as predições de doença mesmo que com a intensidade errada (amostra com doença moderada e predita como doença intensa ou amostra com doença intensa e predita como doença moderada são consideradas como predições exitosas). Nesta abordagem, animais identificados como doentes são indicados para o tratamento, independente da intensidade da doença. Esta classificação consegue identificar um número maior de animais doentes, aumentando a sensibilidade do método com uma pequena perda de especificidade.

Discussão

A introdução da tecnologia NIRS como método de diagnóstico vem ganhando espaço gradualmente na medicina humana. Estudos demonstram que a tecnologia tem potencial para ser utilizada em diagnósticos de doenças vasculares (Ozawa; Kanayama; Hikari, 2019) e mesmo no diagnóstico precoce de pequenos tumores (Li; Wang, 2019). Sua aplicação em medicina veterinária como método de diagnóstico e classificação ainda é incipiente. Porém, alguns autores vêm demonstrando que se trata de uma técnica promissora (Andueza et al., 2014; Santos-Rivera et al., 2021) e o presente estudo soma-se a esse pioneirismo.

Nos espectros NIR pré-tratados destacaram-se as bandas com maior variação entre os espectros de amostras de sangue de animais doentes e saudáveis, que foram atribuídas aos grupos funcionais (NH e CH). A presença de picos relacionados aos níveis de hematócrito com as interações da hemoglobina com a água e compostos orgânicos do sangue já foi abordada por outros autores (Sakudo et al, 2009). As ligações de amida e proteínas semelhantes à da hemoglobina já foram identificadas pelos espectros NIRS em outras substâncias que apresentam ligações orgânicas (Workman Jr., 2001). Os resultados obtidos pela PCA indicaram que os principais loadings da PC1 estão em 1371 e 1625 nm, associados, respectivamente, à absorção do 2º e 1º sobretons dos grupos funcionais NH de aminas alifáticas (Workman Jr.; Weyer, 2008). Na PC2, o loading principal ocorreu em 1680 nm, associado à região de absorção do estiramento assimétrico dos grupos CH em compostos aromáticos (Workman Jr.; Weyer, 2008).

A faixa dos valores do VG detectada no presente estudo variou de 9% a 46%. Uma ampla faixa de valores de referência se reflete em um modelo mais robusto e com uma maior faixa de trabalho. Porém houve grande concentração de amostras com VG entre 26% e 40%, sendo recomendado futuramente incluir mais amostras com valores superiores e inferiores a esta faixa.

A influência da combinação de diferentes pré-tratamentos foi avaliada para definir o modelo NIRS de regressão PLS com melhor desempenho de predição de VG. A combinação dos pré-tratamentos alisamento, SNV e 1ª derivada resultou em um modelo com performance superior àquela do modelo

obtido a partir dos dados brutos originais, reforçando a importância deste procedimento. O modelo NIRS de regressão selecionado apresentou o maior coeficiente de correlação de validação ($R_{Val} = 0,86$) e os menores valores de erro padrão de predição ($SEP = 2,27\%$ VG) e raiz quadrada do erro médio de predição ($RMSEP = 2,26\%$ VG). Os coeficientes de correlação do modelo de calibração e de validação apresentaram coeficiente de correlação ($R \geq 0,8$). O fato do RMSEC e o RMSEV possuírem valores similares indicou que o modelo está bem ajustado e o número de fatores latentes selecionados foi adequado e sem sobreajuste. Sakudo et al. (2009) desenvolveram modelo NIRS de regressão para aferição de hematócritos em humanos e obtiveram RMSEV de 3,7%, corroborando com os obtidos neste estudo. O SEP e o RMSEP estimados pelo método de regressão linear PLS indicaram que a informação presente nos espectros NIR gera modelos que estimam os valores de VG com precisão e exatidão adequadas para o propósito de monitoramento deste parâmetro no rebanho a campo.

A identificação correta dos ovinos que necessitam de tratamento com anti-helmínticos é fundamental para o TST. A redução do ganho de peso corporal, por exemplo, ocorre no início da infecção, antes do aparecimento dos sinais clínicos (Coop; Sykes; Angus, 1977). Porém, a dificuldade de obter um diagnóstico mais preciso é maior quando a infecção dos NGI se encontra nos estágios intermediários, uma vez que os sintomas clínicos ainda não se desenvolveram (Wyk, 2002). Quando essa situação ocorre, torna-se mais difícil definir os limiares ('cutoff') dos métodos para classificar os animais como 'doentes' ou 'saudáveis'. Desse modo, estudos são realizados empregando-se diferentes limiares com o objetivo de maximizar a sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico da infecção por NGI (Cintra; Ollhoff; Sotomaior, 2018). A determinação de cutoffs adequados para as diferentes raças e diferentes condições é um grande desafio.

Dentre os três métodos de referência utilizados para compor o diagnóstico da infecção por NGI, o OPG é mais objetivo por se tratar da contagem direta dos ovos dos nematódeos enquanto o GMD e VG são medidas dos sinais clínicos, ou seja, consequências associadas ao parasitismo nos ovinos. Por isso, o OPG foi o parâmetro mais importante para o diagnóstico dos animais, tanto para os saudáveis quanto para os doentes, sendo o mais frequente em ambos os casos. A menor frequência do GMD e VG na classe dos animais

doentes pode ser associada à resiliência dos cordeiros da raça Morada Nova à infecção por NGI, de modo que nem sempre o valor medido para esses parâmetros revela a presença da doença (Toscano et al., 2019a; Toscano et al., 2019b; Haehling et al., 2020).

O parâmetro acurácia consiste no número de acertos do modelo (VP + VN) dividido pelo número total do conjunto de amostras. Em um conjunto com baixa probabilidade de pré-teste, isto é, com um número elevado de elementos saudáveis e uma pequena quantidade de indivíduos doentes, a acurácia não é o parâmetro mais adequado para avaliar a qualidade do modelo, pois se o método empregado possuir um viés de classificação que favoreça o diagnóstico de animal saudável, os métodos possuirão elevada acurácia, mesmo quando o método não apresentar um bom desempenho. Para todos os métodos avaliados a acurácia foi igual ou superior a 73%.

Para um método de diagnóstico a sensibilidade é a razão entre os indivíduos diagnosticados corretamente como doentes dentro de todo o grupo de animais doentes. É considerada uma das figuras de mérito mais importante uma vez que não identificar um animal doente pode significar a morte do mesmo, enquanto nenhum dano é esperado ao tratar um falso positivo (Burke et al., 2007). Entretanto, esta afirmação pode ser contestada, sobretudo no contexto do TST, já que o aumento da vermifugação pode comprometer a *refugia* (Greer et al., 2009). Nos métodos avaliados o OPG (binária: 100%; ternária: 100%) apresentou a maior sensibilidade, seguido pelo GMD (binária: 91,7%; ternária: 89,7%) e pelo NIRS (binária: 69,4%; ternária: 79,0%). Os parâmetros VG e FAMACHA apresentaram reduzida sensibilidade e elevada precisão, isto é, são métodos que tendem a classificar um número elevado de animais erroneamente como saudáveis (FN) e poucos animais classificados como falsos positivos (FP).

O modelo NIRS (PCA-LDA) de classificação binária apresentou acurácia de 79,7%, e um bom equilíbrio entre sensibilidade (69,4%) e especificidade (81,8%). A baixa precisão encontrada indica que o método NIRS de classificação tem a tendência de identificar 'falsos positivos – FP' o que pode significar que o método NIRS talvez seja muito sensível e possa identificar sinais pré-clínicos ainda não captados nos outros métodos avaliados. Esta hipótese deve ser testada em trabalhos futuros.

O modelo NIRS de classificação ternária n1 apresentou uma menor sensibilidade, especificidade, acurácia e a precisão quando comparado ao modelo de classificação binária. A adição de uma terceira classe acrescenta além do erro de classificação de saudável para doente, o erro de atribuição da intensidade da doença (doença moderada e doença intensa). Caso uma amostra seja proveniente de um animal com doença intensa, e tenha sido diagnosticado como doença moderada, considera-se a instância como um FN. E caso a amostra seja proveniente de um doente moderado, e tenha sido diagnosticado como doente intenso, a instância é classificada como FP. Foi observado que ao se realizar a indicação de tratamento de NGI para todas as amostras diagnosticadas como provenientes de animais doentes, independente da intensidade da classificação da doença (classificação ternária n2), ocorre um aumento na sensibilidade (79,0%) e redução da precisão (41,8%), porém há o aumento no desempenho geral do modelo ($F1 = 0,55$). O parâmetro F1 é uma medida da qualidade geral do modelo, pois indica simultaneamente uma boa sensibilidade e especificidade. Os métodos OPG (0,78) e GMD (0,78) apresentaram os maiores escores F1 para a classificação binária, seguido pelo modelo NIRS (0,54) de classificação binária. No caso do modelo de classificação ternária ocorre uma redução do escore F1 para o método OPG (0,54), indicando que este método pode não ser tão sensível em estágios iniciais da doença. O GMD apresentou para a classificação binária escore F1 (0,78) e para a classificação ternária (0,73), indicando um desempenho superior ao OPG ao classificar os estágios iniciais da doença, sendo o melhor desempenho entre os métodos de classificação ternária.

O modelo NIRS (PCA-LDA) gerado apresenta escore $F1 = 0,54$ para classificação binária e escore $F1 = 0,55$ para classificação ternária n2 que recomenda tratamento de NGI para todos os animais classificados como doentes (doença intensa e doença moderada). O NIRS é sensível às variações químicas presentes no sangue e os modelos NIRS (classificação binária e ternária) apresentaram desempenho superior aos métodos VG e FAMACHA. A elevação da sensibilidade do modelo NIRS de classificação ternária está relacionada à ampliação da faixa de animais considerados como doentes na classificação ternária.

Se o objetivo do manejo sanitário for tratar o menor número possível de animais, garantindo que apenas aqueles indivíduos severamente doentes (VP) sejam tratados, o VG deveria ser o método escolhido para o diagnóstico de NGI em cordeiros Morada Nova, seguido do FAMACHA, uma vez que ambos praticamente não geraram resultados FP e apresentaram precisão de 100% e 94,44%, respectivamente. Baseado no VG, menos de 5% dos cordeiros seriam tratados, enquanto para o FAMACHA seria menos de 2%. Contudo, existiriam riscos de perdas de produtividade e morte de animais em decorrência da infecção por NGI, uma vez que esses métodos apresentam erros na detecção dos animais doentes superiores a 70% e 80%, para o método do VG e FAMACHA, respectivamente. Os dados obtidos nessa pesquisa corroboram com estudos que indicam que o FAMACHA não foi eficaz para o TST em cordeiros da raça Ile de France, pois identificam, na maioria das vezes, animais que já estão clinicamente afetados pela infecção por NGI (Cintra et al., 2018; Cintra et al., 2019). Observou-se perda de desempenho ao alterar a classificação binária para a ternária, desta forma, o uso do VG e do FAMACHA não se mostrou adequado para distinguir casos com doença moderada. Entretanto, o método FAMACHA pode ser uma ferramenta eficaz na manutenção da refugia, quando realizado por pessoas bem treinadas (Greer et al., 2020).

A vantagem da utilização do NIRS para o TST é o fato de ser um método não invasivo e que pode ser desenvolvido para amostragem in loco com equipamento portátil. Além disso, futuramente, a sua resposta também poderá ser avaliada na detecção de alterações de outros componentes do sangue e, desta forma, utilizado como ferramenta na detecção de várias enfermidades ou alterações clínicas em animais de produção, conforme já atestado por alguns estudos (Luiz et al., 2021; Santos-Rivera et al., 2021).

O diagnóstico baseado em NIRS nas 925 amostras indicaria tratamento anti-helmíntico de 26,9%, 30,5% ou 32,1% dos animais diagnosticados como positivos (VP + FP), para a classificação binária, ternária n1 e n2, respectivamente. O método do OPG indicaria o tratamento de 26,5% das amostras em ambos (binária e ternária). Resultado similar foi encontrado para o GMD (23,0% e 22,8%, respectivamente). Considerando que 17,0% das amostras avaliadas são VP, os métodos VG e FAMACHA estão prescrevendo tratamento abaixo do necessário, ao passo que o NIRS PCA-LDA estaria

mais coerente com o OPG, além de ter uma taxa de acerto bem superior em relação aos VP.

Para o modelo NIRS (PCA-LDA) ternário, os números de resultados FN obtidos indicam que se o tratamento anti-helmíntico fosse determinado pelo método NIRS, 21% dos animais doentes ficariam sem tratamento, dos quais 19% diagnosticados com doença moderada e apenas 2% diagnosticados com doença intensa. Um total de 173 animais, o que corresponde a 22,53% do rebanho saudável seria tratado, mesmo sem necessidade.

A classificação binária dos animais mostrou que o erro na categorização para falso negativo - FN (animais doentes que foram classificados como saudáveis) foi relativamente alto para VG e FAMACHA, indicando que ambos não conseguem realizar uma classificação fidedigna. Na classificação por meio da análise NIRS PCA-LDA observou-se que a classificação binária e ternária n1 apresentou o mesmo número de FN, comportamento que se mostrou inferior na classificação ternária n2. A variação entre os espectros de cordeiros doentes e saudáveis decorre do estado sanitário destes animais, indicando que a informação acessada pela técnica NIRS em n2 foi mais adequada ao diagnóstico, embora o OPG e GMD ainda tenham apresentado menor número de FN. O uso do OPG no diagnóstico é muito pouco usado pelos produtores e os resultados indicam que o GMD pode ser uma alternativa de diagnóstico da infecção por NGI, ainda pouco estudada e explorada em vários países. O acompanhamento do GMD em associação com a ferramenta NIRS portátil pode se mostrar uma estratégia bem sucedida para a aplicação do TST.

Conclusão

Os pré-tratamentos dos espectros NIR foram eficientes na remoção da variância dos espectros originais. Os picos de absorção na região NIR dos grupos funcionais NH de proteínas tiveram grande peso nas componentes principais (PCs), indicando sensibilidade às proteínas presentes no sangue. O modelo NIRS (PLS) alcançou boa correlação entre os valores de VG preditos e obtidos pelo hematócrito e se mostrou adequado para o propósito

de monitoramento da anemia em ovinos MN a campo. No diagnóstico de cordeiros MN doentes e saudáveis, o modelo NIRS (PCA-LDA) apresentou acurácia, especificidade e sensibilidade superiores a 77%, apresentando um desempenho geral superior ao método FAMACHA.

Este estudo demonstrou o potencial da espectroscopia NIR combinada com análise de dados quimiométricos como ferramentas analíticas para classificar de forma não destrutiva e *in loco* amostras de sangue de cordeiros Morada Nova. O método proposto é simples, rápido, ecologicamente correto e evita o laborioso pré-tratamento das amostras. Espera-se que a espectroscopia NIR se torne uma técnica alternativa a outros métodos de rotina usados para o diagnóstico de TST em cordeiros. Embora os resultados do presente estudo sejam promissores, ainda são necessárias mais pesquisas para validar os modelos de classificação desenvolvidos, tais como incluir um maior número de amostras de cordeiros infectados e, futuramente, outras raças, aumentando a robustez e a aplicabilidade da técnica.

Referências

- Amarante, A. F. T. do. **Os parasitas de ovinos**. São Paulo: UNESP, 2014.
- ANDUEZA, D.; ALABART, J. L.; LAHOZ, B.; MUÑOZ, F.; FOLCH, J. Early pregnancy diagnosis in sheep using near-infrared spectroscopy on blood plasma. **Theriogenology**, v. 81, n. 3, p. 509–513, feb. 2014.
- BAHMANI, M. K.; KHOSRAVI, A.; MIRI, R.; IWABU, Y.; IKUTA, K.; SAKUDO, A. Spectroscopic characterization of human immunodeficiency virus type-1-infected plasma by principal component analysis and soft independent modeling of class analogy of visible and near-infrared spectra. **Molecular Medicine Reports**, v. 2, n. 5, p. 805–809, sep./oct. 2009.
- BÉC, K. B.; GRABSKA, J.; SIESLER, H. W.; HUCK, C. W. Handheld near-infrared spectrometers: where are we heading? **NIR News**, v. 31, n. 3-4, p. 28–35, apr. 2020.
- BURKE, J. M.; KAPLAN, R. M.; MILLER, J. E.; TERRILL, T. H.; GETZ, W. R.; MOBINI, S.; VALENCIA, E.; WILLIAMS, M. J.; WILLIAMSON, L. H.; VATTA, A. F. Accuracy of the FAMACHA® system for on-farm use by sheep and goat producers in the southeastern United States. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1-2, p. 89–95, june 2007.
- BURNS, D. H.; ROSENDAHL, S.; BANDILLA, D.; MAES, O. C.; CHERTKOW, H. M.; SCHIPPER, H. M. Near-infrared spectroscopy of blood plasma for diagnosis of sporadic Alzheimer's disease. **Journal Alzheimer's Disease**, v. 17, n. 2, p.391–397, 2009.
- CARMONA, P.; MOLINA, M.; CALERO, M.; BERMEJO-PAREJA, F.; MARTINEZ-MARTIN, P.; TOLEDANO, A. Discrimination analysis of blood plasma associated with Alzheimer's disease using vibrational spectroscopy. **Journal Alzheimer's Disease** v. 34, n. 4, p. 911–920, 2013.

- CHAGAS, A. C. de S.; CARVALHO, C. O. de; MOLENTO, M. B. **Método FAMACHA®**: um recurso para o controle da verminose em ovinos. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. 8 p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Circular técnica, 52).
- CINTRA, M. C. R.; OLLHOFF, R. D.; SOTOMAIOR, C. S. Sensitivity and specificity of the FAMACHA® system in growing lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 251, n. 15, p. 106-111, 2018.
- CINTRA, M. C. R.; OLLHOFF, R. D.; WEBER, S. H.; SOTOMAIOR, C. S. Is the FAMACHA® system always the best criterion for targeted selective treatment for the control of haemonchosis in growing lambs? **Veterinary Parasitology**, v. 266, p. 67-72, feb. 2019.
- COOP, R. L.; SYKES, A. R.; ANGUS, K. W. The effect of a daily intake of *Ostertagia circumcincta* larvae on body weight, food intake and concentration of serum constituents in sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 23, n. 1, p. 76-83, july 1977.
- COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 65-71, jan. 2011.
- DIAZ GONZÁLEZ, F. H.; SILVA, S. C. (Ed.). **Patologia clínica veterinária**: texto introdutório. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
- GLAS, A. S.; LIJMER, J. G.; PRINS, M. H.; BONSEL, G. J.; BOSSUYT, P. M. M. The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. **Journal Clinical Epidemiology**, v. 56, n. 11, p. 1129-1135, nov. 2003.
- GREER, A. W.; KENYON, F.; BARTLEY, D. J.; JACKSON, E. B.; GORDON, Y.; DONNAN, A. A.; MCBEAN, D. W.; JACKSON, F. 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**, v. 164, n. 1, p. 12-20, apr. 2009.
- GREER, A. W.; VAN WYK, J. A.; HAMIE, J. C.; BYARUHANGA, C.; KENYON, F. Refugia-based strategies for parasite control in livestock. **Veterinary Clinical North American Food Animal Practical**, v. 36, n. 1, p. 31-43, mar. 2020.
- HAEHLING, M. B. V.; CRUVINEL, G. G.; TOSCANO, J. H. B.; GIRALDELO, L. A.; SANTOS, I. B. dos; ESTEVES, S. N.; BENAVIDES, M. V.; BARIONI JUNIOR, W.; NICIURA, S. C. M.; CHAGAS, A. C. de S. Four single nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with resistance and resilience to *Haemonchus contortus* in Brazilian Morada Nova sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 279, 2020, 109053. 11 p.
- ISO 12099:2010. **Animal feeding stuffs, cereals and milled cereal products — guidelines for the application of near infrared spectrometry**. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/51197.html>.
- JAS, R.; GHOSH, J. D.; DAS, K. Polyclonal antibody based coproantigen detection immunoassay for diagnosis of *Oesophagostomum columbianum* infection on goats. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3-4, p. 262-267, 2010.
- JINTAO, X.; LIMING, Y.; YUFEI, L.; CHUNYAN, L.; HAN, C. Noninvasive and fast measurement of blood glucose in vivo by near infrared (NIR) spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 179, p. 250-254, may 2017.
- LI, C.; WANG, Q. Advanced NIR-II fluorescence imaging technology for in vivo precision tumor theranostics. **Advanced Therapeutics**, v. 2, n. 9, 1900053, sep. 2019.

LUIZ, L. C.; TEIXEIRA, V. A.; CAMPOS, M. M.; PEREIRA, L. G. R.; TOMICH, T. R.; LEITE, J. L. B.; BELL, M. J. V.; ANJOS, V. C. Uso da espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) para acompanhar processo de Tristeza Parasitária Bovina. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 2, p. 1594-1605, 2021.

MAIA, D.; ROSALINSKI-MORAES, F.; SOTOMAIOR, C. S. Revisão da literatura: o método FAMACHA® como tratamento seletivo de pequenos ruminantes. **Veterinária Notícias**, v. 19, n. 1, p. 41-66, jan./jun. 2013.

MUCHIUT, S. M.; FERNÁNDEZ, A. S.; LLOBERAS, M.; STEFFAN, P. E.; LUQUE, S. E.; CARDOZO, P. A.; BERNAT, G. A.; RIVA, E.; FIEL, C. A. Recovery of fenbendazole efficacy on resistant *Haemonchus contortus* by management of parasite refugia and population replacement. **Veterinary Parasitology**, v. 271, p. 31-37, 2019.

OZAWA, S.; KANAYAMA, N.; HIRAKI, K. Emotion-related cerebral blood flow changes in the ventral medial prefrontal cortex: an NIRS study. **Brain and Cognition** v. 134, p. 21-28, aug. 2019.

PARASKEVAIDI, M.; MORAIS, C. L. M.; FREITAS, D. L. D.; LIMA, K. M. G.; MANN, D. M. A.; ALLSOP, D.; MARTIN-HIRSCH, P.; MARTIN, F. L. Blood-based near-infrared spectroscopy for the rapid low-cost detection of Alzheimer's disease. **Analyst**, v. 143, p. 5959–5964, 2018.

Pasquini, C. Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 14, n. 2, p. 198–219, apr. 2003.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: a mature analytical technique with new. Perspectives: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1026, p. 8-36, oct. 2018.

PEREIRA, J. F. S.; MENDES, J. B.; JONG, G. de; MAIA, D.; TEIXEIRA, V. N.; PASSERINO, A. S.; GARZA, J. J.; SOTOMAIOR, C. S. FAMACHA® scores history of sheep characterized as resistant/resilient or susceptible to *H. contortus* in artificial infection challenge. **Veterinary Parasitology**, v. 218, p. 102–105, 2016.

RAJA, P.; ARUNA, P.; KOTEESWARAN, D.; GANESAN, S. Characterization of blood plasma of normal and cervical cancer patients using NIR Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 102, p. 1–7, may 2019.

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, J. P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 1, n. 1, p. 99–102, 1950.

ROEBER, F.; JEX, A. R.; GASSER, R. B. Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1135-1152, dec. 2013.

SAKUDO, A.; BABA, K.; IKUTA, K. Discrimination of influenza virus-infected nasal fluids by Vis-NIR spectroscopy. **Clinica Chimica Acta**, v. 414, p. 130–134, dec. 2012.

SAKUDO, A.; KATO, Y. H.; KURATSUNE, H.; IKUTA, K. Non-invasive prediction of hematocrit levels by portable visible and near-infrared spectrophotometer. **Clinica Chimica Acta**, v. 408, n. 1-2, p. 123–127, oct. 2009.

SAKUDO, A.; TSENKOVA, R.; ONOZUKA, T.; MORITA, K.; LI, S.; WARACHIT, J.; IWABU, Y.; LI, G.; ONODERA, T.; IKUTA, K. A novel diagnostic method for human immunodeficiency virus type-1 in plasma by near-infrared spectroscopy. **Microbiology and Immunology**, v. 49, n. 7, p. 695–701, 2005.

SANTOS-RIVERA, M.; WOOLUMS, A.; THORESEN, M.; BLAIR, E.; JEFFERSON, V.; MEYER, F.; VANCE, C. K. Profiling *Mannheimia haemolytica* infection in dairy calves using near infrared spectroscopy (NIRS) and multivariate analysis (MVA). **Nature Research - Scientific Reports**, v. 11, 1392, 2021.

TOSCANO, J. H. B.; OKINO, C. H.; SANTOS, I. B. dos; GIRALDELO, L. A.; HAEHLING, M. B. VON; ESTEVES, S. N.; CHAGAS, A. C. de S. Innate immune responses associated with resistance against *Haemonchus Contortus* in Morada Nova sheep. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, n. 3562672, p. 1-10, 2019a.

TOSCANO, J. H. B.; SANTOS, B. dos; HAEHLING, M. B. VON; GIRALDELO, L. A.; LOPES, L. G.; SILVA, M. H. da; FIGUEIREDO, A.; ESTEVES, S. N.; CHAGAS, A. C. de S. Morada Nova sheep breed: resistant or resilient to *Haemonchus contortus* infection? **Veterinary Parasitology**, v. 276, supplement, 9 p, 100019, 2019b.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4 ed. Tokyo: JICA, 1998.

WYK, J. A. van; BATH, G. F. The FAMACHA® system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. **Veterinary Research**, v. 33, n. 5, p. 509-529, sep. 2002.

WYK, J. A. van; MAYHEW, E. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 80, n. 1, p.1-14, 2013.

WONG, H. B.; LIM, G. H. Measures of diagnostic accuracy: sensitivity, specificity, PPV and NPV. **Proceedings Singapore Healthcare**, v. 20, n. 4, p. 316–318, 2011.

WORKMAN JR., J. **Manual de compostos orgânicos: espectros NIR, IR, Raman e UV-Vis com polímeros e surfactantes**. Massachusetts: Academic Press, 2001.

WORKMAN JR., J.; WEYER, L. **Practical guide to interpretive near-infrared spectroscopy**. Boca Raton: CRC Press, 2008.



Pecuária Sudeste

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA E
PECUÁRIA



CGPE: 018051