

FILIPA MARGARIDA DE CAMPOS LANÇA

**ESTUDO DAS PARASITOSES GASTROINTESTINAIS
EM BOVINOS LEITEIROS DA ILHA DE S. MIGUEL,
AÇORES**

Orientadora: Professora Doutora Ana Maria Duque de Araújo Munhoz

UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIAS

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

Lisboa

2016

FILIPA MARGARIDA DE CAMPOS LANÇA

**ESTUDO DAS PARASIToses GASTROINTESTINAIS
EM BOVINOS LEITEIROS DA ILHA DE S. MIGUEL,
AÇORES**

Dissertação defendida em prova pública na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 11 de Novembro de 2016, perante o júri, nomeado por despacho nº403/2016, de 3 de Novembro de 2016, com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Sofia van Harten

Arguente: Professor Doutor Eduardo Marcelino

Orientadora: Professora Doutora Ana Araújo Munhoz

UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIAS

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

Lisboa

2016

"Tudo é considerado impossível até acontecer."

Nelson Mandela

À minha mãe, ao meu pai, aos meus tios, ao meu
primo e, em especial, à minha avó.

Agradecimentos

À Professora Doutora Ana Maria Duque de Araújo Munhoz, pela escolha do tema de dissertação, por toda a disponibilidade que sempre demonstrou, pelo incentivo, pelos conselhos e apoio constante ao longo de todas as fases do trabalho.

À Dra. Luísa Soares pela oportunidade que me proporcionou, de realizar o meu estágio curricular na Associação de Jovens Agricultores Micaelenses (AJAM) e por tudo o que me ensinou.

Ao Dr. Carlos Pinto e restante equipa dos Serviços de Desenvolvimento Agrário de São Miguel, pela ajuda incansável, pelos conselhos, pelas ideias, pelas críticas construtivas e pelo incentivo constante.

Ao Laboratório Regional de Veterinária pela ajuda prestada.

Ao Sr. António Medeiros da secção de Geografia do Departamento de Biologia da Universidade dos Açores.

Ao Dr. Adolfo Paz-Silva, e restante equipa do Departamento de Parasitologia da Faculdade de Veterinária da Universidade de Santiago de Compostela, por me possibilitar a realização da última parte do meu estudo e por tudo o que me ensinou.

À Professora Dra. Inês Viegas pela ajuda e por toda a disponibilidade.

A todos os produtores que se mostraram disponíveis para participar neste estudo e aos restantes elementos da equipa da AJAM, por toda a amizade, apoio e disponibilidade que sempre demonstraram.

Às minhas queridas amigas Marta Silva e Ana Rodrigues por estarem sempre presentes nos piores e nos melhores momentos da minha vida.

Ao meu querido primo Francisco e à Ana, pelo carinho e preocupação que sempre demonstraram.

Àqueles que fizeram destes 5 anos uma etapa inesquecível, porque foram e são os melhores colegas e amigos desta que foi a "nossa faculdade".

Resumo

A produtividade dos bovinos leiteiros pode ser amplamente afetada pelo parasitismo gastrointestinal, principalmente quando se trata de animais criados em sistemas de produção extensivos. Nos Açores a indústria pecuária é uma atividade de extrema importância económica, nomeadamente no que diz respeito à produção leiteira, que representa cerca de 30% do total nacional. Neste tipo de produção existem diversos fatores ligados ao manejo que podem contribuir para a produtividade dos animais. Como nesta região o parasitismo gastrointestinal é muito favorecido pelas condições climáticas e pela presença de hospedeiros intermediários, como no caso da fasciolose, o seu controlo torna-se importante. Porém, na maioria das vezes os tratamentos antiparasitários são realizados de forma inadequada com o uso repetido de princípios ativos que além de contribuírem para o aumento dos custos de produção, não alcançam o objetivo do controlo eficiente. Neste estudo foram identificados alguns fatores relacionados com o manejo, como sendo possíveis práticas que poderiam contribuir para a existência de parasitismo.

Foram analisadas 149 explorações que correspondem a 10,5% do total de explorações de bovinos leiteiros da ilha de São Miguel (ISM). Constatou-se através dos exames coprológicos que 47,7% destas explorações apresentavam animais positivos para nematodoses, 8,7% para cestodoses, 13,4% para trematodoses e em 13,4% ocorreram animais positivos para coccidioses.

Quanto à fasciolose, os resultados obtidos na pesquisa de anticorpos contra *Fasciola hepatica* através da técnica de ELISA indireto, revelaram que 46,7% das vacas testadas foram positivas e que 74,5% das explorações apresentaram animais com serologia positiva para esta parasitose.

Palavras-chave: Bovinos leiteiros, Açores, Parasitoses gastrointestinais, Fasciolose.

Abstract

The dairy cattle productivity can be widely affected by gastrointestinal parasitism, especially in animals raised in extensive production systems. In Azores the livestock industry is an activity of great economic importance, particularly the milk production, which represents 30% of national output. In this type of systems there are many factors related with management practices which can contribute to the productivity of animals. In Azores cattle gastrointestinal parasitism is increased due to climatic conditions and presence of intermediate hosts, as in the case of fasciolosis, and its control becomes very important. However, most often the antiparasitic treatments are performed inappropriately with repeated use of active principles that in addition to the increase of production costs, do not reach the goal of efficient control. In this study some factors related to the dairy farms management were identified as possible practices that could contribute to the existence of parasitism.

In this study 149 farms were analyzed which represented 10,5% of total dairy farms in São Miguel island. The results obtained through coprologic tests showed that in 47,7% of all farms were positive to nematodes, 8,7% to cestodosis, 13,4% to trematodosis and 13,4% to coccidiosis.

Concerning fasciolosis, the results of antibodies detection against *Fasciola hepatica*, which were analyzed by indirect ELISA technique, showed that 46,7% of analyzed cows were positive and 74,5% of farms had animals with positive serology for this parasitosis.

Keywords: Dairy cattle, Azores, Gastrointestinal parasitism, Fasciolosis.

Lista de abreviaturas e símbolos

ADN	Ácido Desoxiribonucleico
AJAM	Associação de Jovens Agricultores Micaelenses
BVD	<i>Bovine Virus Diarrhea</i>
EGI	Estrongilídeos Gastrointestinais
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ES	Excreção-Secreção
FhrAPS	Proteína recombinante de <i>Fasciola hepatica</i>
g	Grama
GGT	Gama Glutamil Transpeptidase
GLDH	Glutamato Desidrogenase
HCl	Ácido Clorídrico
IBR	<i>Infectious Bovine Rhinotracheitis</i>
IgG	Imunoglobulina G
IS	Intervalo de Segurança
ISM	Ilha de São Miguel
kDa	Quilodalton
km	Quilómetros
km ²	Quilómetros quadrados
l	Litros
L1	Estádio larvar 1
L2	Estádio larvar 2
L3	Estádio larvar 3
L4	Estádio larvar 4
L5	Estádio larvar 5
m	Metros
µl	Microlitros
µm	Micrometros
mg	Miligramas
ml	Mililitros
mm	Milímetros
OPG	Ovos por grama de fezes
PBS	Phosphate Buffered Saline

RAA	Região Autónoma dos Açores
SAL	Superfície Agrícola Útil
spp.	Espécies
US\$	Dólares
UHT	Ultra High Temperature
%	Percentagem
°C	Graus Célsius

Índice Geral

Agradecimentos.....	1
Resumo	2
Abstract.....	3
Lista de abreviaturas e símbolos.....	4
Índice de Figuras	9
Índice de Gráficos.....	10
Índice de Tabelas	11
Capítulo I - Descrição das atividades realizadas durante o estágio curricular	12
Capítulo II.....	17
1. Introdução.....	17
2. Caracterização da área do estudo.....	18
3. Maneio sanitário	22
3.1 Controlo Parasitário	24
3.2 Parasitoses gastrointestinais em bovinos	25
3.2.1 Classe Nematoda	25
3.2.1.1 Métodos de diagnóstico	35
3.2.1.2 Tratamento e Controlo.....	35
3.2.2 Classe Trematoda	38
3.2.2.1 Métodos de diagnóstico	49
3.2.2.2 Tratamento e controlo	55
3.2.3 Classe Cestoda.....	58
3.2.3.1 Métodos de diagnóstico	60
3.2.3.2 Tratamento e Controlo.....	60
3.2.4 Classe Coccidia	61
3.2.4.1 Métodos de diagnóstico	62
3.2.4.2 Tratamento e controlo.....	62

4. Trabalho experimental	64
4.1 Objetivos	64
4.2 Material e Métodos	64
4.2.1 Seleção das explorações	64
4.2.2 Seleção dos animais	65
4.2.3 Inquérito aos produtores	65
4.2.4 Análises coprológicas	65
4.2.5 Análise serológica	67
4.2.6 Análise Estatística	69
5. Resultados	70
5.1 Resultados dos inquéritos aos produtores	70
5.2 Resultados das análises coprológicas	79
5.3 Resultados da análise serológica	81
5.4 Distribuição geográfica das explorações positivas para a serologia, na ilha de S. Miguel	82
6. Discussão	83
6.1 Inquérito aos produtores	83
6.2 Análises coprológicas	86
6.3 Análise serológica	88
6.4 Distribuição geográfica das explorações positivas para a serologia, na ilha de S. Miguel	90
7. Conclusões	93
Bibliografia	94
Anexos	I
Anexo I - Inquérito ao produtor e recolha de dados individuais dos animais incluídos no estudo	I
Anexo II - Procedimentos das técnicas coprológicas	III
Anexo III - Procedimento da técnica de ELISA indireto	IV

Anexo IV - Chaves de codificação	VII
Anexo V - Distribuição geográfica do número de explorações com animais que apresentaram resultado positivo ao teste ELISA por freguesia.	VIII

Índice de Figuras

Figura 1 - Ovos do tipo estrogilídeo presentes numa amostra de fezes (X40).....	26
Figura 2 - Ciclo de vida da <i>Fasciola hepatica</i>	40
Figura 3 Ovo de <i>Fasciola</i> spp. observado na técnica de sedimentação simples.	41
Figura 4 - Exemplar da espécie <i>Lymnea truncatula</i>	43
Figura 5 - Formas adultas de <i>F. hepatica</i>	44
Figura 6 - Ovo de <i>Paramphistomum</i> spp.....	47
Figura 7 - Oito formas adultas de <i>Paramphistomum</i> spp. recolhidas do rúmen de um bovino abatido no matadouro.	48
Figura 8 - Ovo de nemátode tipo estrogilídeo (a cima) e um ovo de <i>Moniezia benedeni</i> (a baixo), observados através da técnica de Willis.	59
Figura 9 - Acondicionamento das amostras para envio ao laboratório.	66
Figura 10 - Técnica de McMaster.....	67
Figura 11 - Tubo de separação rápida de soro.....	67
Figura 12 - Tubos de Eppendorf com soros de bovinos congelados a -20°C	68
Figura 13 - Preenchimento dos poços da placa de ELISA com antigénio diluído em PBS	68
Figura 14 - Placa ELISA após a aplicação do ácido sulfúrico	69
Figura 15 - Presença de caracóis aquáticos num bebedouro sujeito a uma fraca higienização.	85
Figura 16 - Presença de caracóis aquáticos num bebedouro sujeito a uma fraca higienização.	85

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Espécies mais observadas nas atividades clínicas durante o período de estágio. ..	12
Gráfico 2 - Frequência dos casos clínicos por área de intervenção.....	13
Gráfico 3 - Frequência dos casos clínicos observados em neonatologia e animais jovens, dos procedimentos cirúrgicos e outros procedimentos realizados.	14
Gráfico 4 - Frequência relativa de explorações conforme a classe de número de vacas leiteiras.	70
Gráfico 5 - Frequência relativa das explorações conforme o tipo de sistema de produção praticado.	71
Gráfico 6 - Frequência relativa das explorações conforme o tipo de reposição do efetivo utilizado.	71
Gráfico 7 - Frequência relativa quanto à prática de contraste leiteiro.....	72
Gráfico 8 - Prática de desparasitação nas explorações.	72
Gráfico 9 - Frequência de higienização dos bebedouros presentes nas explorações.....	73
Gráfico 10 - Distribuição dos animais de acordo com as zonas de prevalência de fasciolose pré-estabelecidas.....	74
Gráfico 11 - Distribuição dos animais pelas freguesias da zona de alta prevalência de fasciolose.	75
Gráfico 12 - Distribuição dos animais pelas freguesias da zona de média prevalência de fasciolose.	75
Gráfico 13 - Distribuição dos animais pelas freguesias da zona de baixa prevalência de fasciolose.	76
Gráfico 14 - Produto utilizado na última desparasitação dos animais incluídos no estudo.	77
Gráfico 15 - Data da última desparasitação dos animais incluídos no estudo.....	77
Gráfico 16 - Ação dos princípios ativos selecionados pelos produtores sobre a <i>F. hepatica</i> . .	78
Gráfico 17 - Data da última desparasitação com fasciolicida.	78

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Casos clínicos observados na área das doenças do aparelho reprodutor, doenças metabólicas pós-parto e do úbere.	14
Tabela 2 - Casos clínicos observados na área das doenças gastrointestinais.	15
Tabela 3 - Casos clínicos observados na área das doenças do aparelho respiratório.	15
Tabela 4 - Casos clínicos observados na área das doenças do trato urinário.	15
Tabela 5 - Casos clínicos observados na área das doenças do neonato e animais jovens (<1 ano de idade).....	15
Tabela 6 - Casos clínicos observados na área das doenças do aparelho locomotor.	16
Tabela 7 - Casos clínicos observados na área das doenças oftalmológicas.....	16
Tabela 8 - Casos clínicos observados na área da dermatologia.....	16
Tabela 9 - Procedimentos cirúrgicos observados.	16
Tabela 10 - Outros procedimentos.	16
Tabela 11 - Estatística descritiva da variável quantitativa, idade.....	78
Tabela 12 - Frequências absolutas e relativas de ovos por grama de fezes (OPG) de EGI e <i>Moniezia benedeni</i> e oocistos por grama de fezes (oPG) de <i>Eimeria</i> spp. obtidas pela técnica de McMaster.....	80
Tabela 13 - Diferentes graus de infecção parasitária consoante a contagem de OPG de nemátodes gastrointestinais	80
Tabela 14 - Frequências absolutas e relativas de casos positivos e negativos, relativamente à presença de EGI, <i>Eimeria</i> spp. e <i>Moniezia benedeni</i> nas fezes, observados pela técnica de flutuação de Willis.....	81
Tabela 15 - Frequências absolutas e relativas de casos positivos e negativos, relativamente à presença de ovos de tremátodes nas fezes, observados pela técnica de sedimentação simples.	81
Tabela 16 - Resultados da técnica de ELISA indireto.....	81

Capítulo I - Descrição das atividades realizadas durante o estágio curricular

O estágio curricular foi realizado na Associação de Jovens Agricultores Micaelenses (AJAM), localizada na ilha de S. Miguel nos Açores entre 4 de Janeiro a 4 de Julho de 2016.

A Associação de Jovens Agricultores Micaelenses tem como finalidade a prestação de serviços técnicos aos seus associados, entre os quais serviços de contabilidade, apoio jurídico, apoio de projetos e ao rendimento, acompanhamento técnico às explorações no que diz respeito à qualidade do leite, inseminação artificial e podologia, assim como serviços médico-veterinários e farmácia para venda de medicamentos veterinários direcionados ao setor pecuário. Relativamente ao serviço médico-veterinário prestado aos associados nas explorações, este é diurno e noturno, sendo o último realizado em sistema de urgências, por uma equipa constituída por seis profissionais.

Este estágio baseou-se no acompanhamento destes profissionais que compunham o corpo veterinário da AJAM que normalmente se realizava de segunda a sábado, das sete horas da manhã até às dezanove horas da tarde (período de serviço diurno). Porém, como o trabalho experimental foi desenvolvido em paralelo com as atividades de estágio, foi igualmente necessário despender dois dias por semana para a realização das análises coprológicas no laboratório desta associação. Os Médicos Veterinários da AJAM prestam serviço a cerca de 300 sócios, dispersos por toda a ilha. Desta forma foi possível acompanhar e realizar vários procedimentos no âmbito da clínica, cirurgia e acompanhamento reprodutivo dos bovinos e pequenos ruminantes em diversas explorações.

Em termos de espécies observadas nas atividades clínicas, a mais frequente foi a bovina, seguida da caprina e suína, tal como mostra o Gráfico 1.

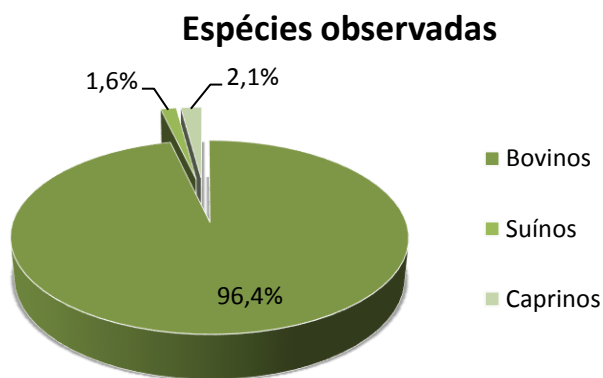


Gráfico 1 - Espécies mais observadas nas atividades clínicas durante o período de estágio.

Verificou-se que a espécie mais comum foi a bovina devido ao facto das vacas leiteiras serem os animais mais utilizados no setor pecuário, na ilha de São Miguel. A raça predominante é a Holstein-Frísia, sendo que também se observam muitos exemplares de outras raças leiteiras como a Jersey e a Angus, Limousine e raça autóctone, Ramo Grande. Estas raças além de terem aptidão leiteira eram de aptidão para carne.

Foram acompanhados diferentes casos clínicos das mais diversas áreas de intervenção, nomeadamente, doenças do foro reprodutivo, metabólico pós-parto e do úbere, gastrointestinal, respiratório, urinário, locomotor, oftalmológico e dermatológico. As patologias mais frequentes foram as doenças do aparelho reprodutivo, metabólicas pós-parto e do úbere (49,9%), seguidas das doenças do aparelho gastrointestinal (22,4%) e do aparelho respiratório (18,3%), ilustradas no Gráfico 2.

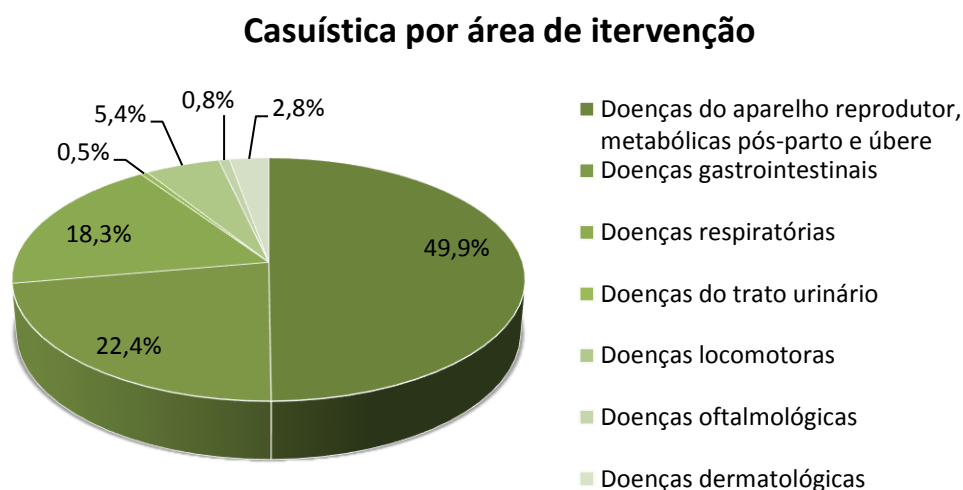


Gráfico 2 - Frequência dos casos clínicos por área de intervenção.

As consultas acompanhadas iniciaram-se sempre pelo exame físico do animal, pois este é uma importante ferramenta para chegar ao diagnóstico e, por vezes, até mesmo o único recurso disponível no campo para diagnosticar as diversas patologias e estabelecer qual o tratamento mais apropriado. Por isto, ocorreram situações em que os diagnósticos foram apenas presuntivos e não definitivos, devido à impossibilidade da realização de outros exames complementares.

Para além da casuística acima referida, também foram examinados e tratados vários animais jovens (com menos de 12 meses de idade) e neonatos, que foram incluídos e contabilizados numa área de intervenção distinta. Assim, estes últimos bem como os procedimentos cirúrgicos e outros procedimentos (inseminações artificiais, vacinações,

colheita de troncos cerebrais, eutanásias, etc) foram referidos no Gráfico 3 que apresenta a frequência com que foram praticados.

Casuística de outras áreas de intervenção

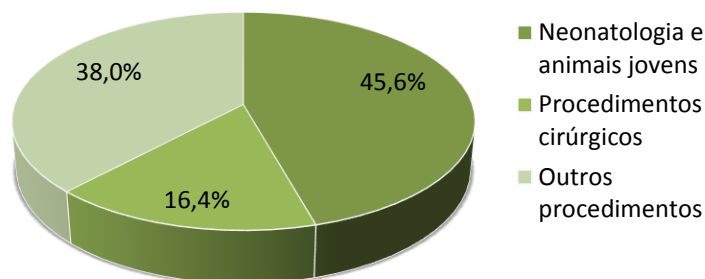


Gráfico 3 - Frequência dos casos clínicos observados em neonatologia e animais jovens, dos procedimentos cirúrgicos e outros procedimentos realizados.

Nas diversas áreas anteriormente mencionadas foi possível observar uma casuística bastante variada, tal como é possível visualizar nas tabelas seguintes (1,2,3,4,5,6,7,8,9 e 10).

Tabela 1 - Casos clínicos observados na área das doenças do aparelho reprodutor, doenças metabólicas pós-parto e do úbere.

Casuística das patologias Reprodutivas, Metabólicas pós-parto e do Úbere	Frequência absoluta	Frequência relativa
Aborto	5	2,6%
Anestro	4	2,1%
Cetose	8	4,2%
Cio silencioso	1	0,5%
Edema do úbere	4	2,1%
Endometrite	2	1,0%
Hidrópia	1	0,5%
Hiperqueratose dos tetos	1	0,5%
Hipocalcemia	32	16,7%
Mamite	64	33,3%
Metrite	26	13,5%
Mumificação fetal	2	1,0%
Obstrução do teto	2	1,0%
Parto distócico	16	8,3%
Prolapso uterino	2	1,0%
Quistos ováricos	2	1,0%
Retenção placentária	18	9,4%
Rotura de ligamento suspensor do úbere	1	0,5%
Vaginite	1	0,5%
Total Geral	192	100%

Tabela 2 - Casos clínicos observados na área das doenças gastrointestinais.

Casuística das patologias Gastrointestinais	Frequência absoluta	Frequência relativa
Actinobacilose/Actinomicose	2	2,3%
DAD	4	4,5%
DAE	3	3,4%
Diarreia	39	44,3%
Indigestão	12	13,6%
Intoxicação	2	2,3%
Melena	1	1,1%
Parasitose	1	1,1%
Peritonite	1	1,1%
Pneumonia	8	9,1%
Prolapso rectal	1	1,1%
Reticulo-pericardite traumática	3	3,4%
Timpanismo espumoso	4	4,5%
Timpanismo gasoso	5	5,7%
Torsão intestinal	2	2,3%
Total Geral	88	100%

Tabela 3 - Casos clínicos observados na área das doenças do aparelho respiratório.

Casuística das patologias do Aparelho Respiratório	Frequência absoluta	Frequência relativa
Pneumonia	70	98,6%
Traqueíte	1	1,4%
Total Geral	71	100%

Tabela 4 - Casos clínicos observados na área das doenças do trato urinário.

Casuística das patologias do trato Urinário	Frequência absoluta	Frequência relativa
Lesão uretral	1	50,0%
Urovagina	1	50,0%
Total Geral	2	100%

Tabela 5 - Casos clínicos observados na área das doenças do neonato e animais jovens (<1 ano de idade).

Casuística das patologias neonatais e dos animais jovens	Frequência absoluta	Frequência relativa
Actinobacilose/Actinomicose	1	0,6%
Caquexia	1	0,6%
Diarreia	57	32,9%
Edema da glote	2	1,2%
Fotossensibilidade	2	1,2%
Fraturas	6	3,5%
IBR/BVD	2	1,2%
Lesão neuro-muscular	1	0,6%
Lesões por ataque de cães	11	6,4%
Meningite	1	0,6%
Parasitose	1	0,6%
Pneumonia	82	47,4%
Ruminal drinkers	4	2,3%
Traqueíte	2	1,2%
Total Geral	173	100%

Tabela 6 - Casos clínicos observados na área das doenças do aparelho locomotor.

Casuística das patologias do Aparelho Locomotor	Frequência absoluta	Frequência relativa
Claudicação	4	19,0%
Edema dos membros	2	9,5%
Fraturas	3	14,3%
Lesão neuro-muscular	12	57,1%
Total Geral	21	100%

Tabela 7 - Casos clínicos observados na área das doenças oftalmológicas.

Casuística das patologias Oftalmológicas	Frequência absoluta	Frequência relativa
Conjuntivite	1	33,3%
Exoftalmia	2	66,7%
Total Geral	3	100%

Tabela 8 - Casos clínicos observados na área da dermatologia.

Casuística das patologias Dermatológicas	Frequência absoluta	Frequência relativa
Enfisema subcutâneo	1	10,0%
Escoriações	2	20,0%
Fotosensibilidade	3	30,0%
Papilomatose	4	40,0%
Total Geral	10	100%

Tabela 9 - Procedimentos cirúrgicos observados.

Procedimentos cirúrgicos	Frequência absoluta	Frequência relativa
Drenagem de abscessos	7	11,1%
Castrações	5	7,9%
Cesarianas	2	3,2%
Fixação de deslocamento de abomaso à direita	1	1,6%
Fixação de deslocamentos de abomaso à esquerda	18	28,6%
Enucleações	2	3,2%
Redução de hérnias umbilicais	5	7,9%
Excisão de quistos/neoplasias oculares	23	36,5%
Total Geral	63	100%

Tabela 10 - Outros procedimentos.

Outros procedimentos	Frequência absoluta	Frequência relativa
Colheita de tronco cerebral	11	7,6%
Cuidados pós-cirúrgicos	3	2,1%
Desparasitação	4	2,8%
Diagnóstico de gestação	54	37,5%
Eutanásia	8	5,6%
IA	25	17,4%
Indução do parto	2	1,4%
Profilaxia cetose	1	0,7%
Profilaxia Hipocalcémia	4	2,8%
Programa reprodutivo	18	12,5%
Vacinação	14	9,7%
Total Geral	144	100%

Capítulo II

1. Introdução

Atualmente existem cada vez mais exigências no que respeita à produção animal, nomeadamente as que se relacionam com a qualidade dos produtos, a utilização de práticas agropecuárias sustentáveis e com o bem-estar animal. Em relação à produção leiteira, a estas exigências juntam-se outros fatores como as diversas consequências da atual crise económica, o fim do regime de quotas leiteiras, os elevados custos de produção e a diminuição do preço do leite pago ao produtor. Por isso, existe uma pressão cada vez maior para que qualquer exploração leiteira apresente uma boa produtividade, com o mínimo de gastos económicos possível. Assim, para que o negócio possa permanecer competitivo os produtores têm de tomar decisões adequadas aos mais variados obstáculos de acordo com as regras existentes. Por vezes o papel do Médico Veterinário é de extrema importância na tomada de decisões, pois muitos dos problemas das explorações passam pela presença de doenças que afetam a produtividade dos animais. Para evitar ao máximo as consequências negativas destas patologias, estes profissionais devem informar adequadamente os produtores acerca da necessidade de investir no bom manejo sanitário da exploração. Este deve ter em conta alguns pontos-chave que incluem a avaliação e aconselhamento de práticas de higiene e de um plano de vacinação e desparasitação apropriados à exploração em causa.

As doenças parasitárias provocadas por helmintes constituem uma das mais importantes causas de perdas económicas na produção animal por todo o mundo, sendo que a maior parte destas estão associadas a parasitoses gastrointestinais. Deste modo, o controlo do parasitismo em bovinos apresenta diversos benefícios associados à produtividade, incluindo o aumento do ganho de peso, aumento da taxa de conversão do alimento, melhor qualidade da carcaça, aumento da produção de leite, melhor performance reprodutiva e melhor estado imunitário dos animais (Parkins & Holmes, 1989).

O presente estudo foi desenvolvido na ISM, que é a maior das ilhas do arquipélago dos Açores. Esta região tem como principal atividade económica a indústria leiteira cuja matéria prima se destina essencialmente à comercialização de leite UHT e à indústria do queijo.

A ISM apresenta condições climáticas que favorecem o desenvolvimento de várias espécies de parasitas podendo provocar doença clínica ou diminuição da produtividade dos animais. Assim, este trabalho foi realizado com o sentido de contribuir para uma atualização

acerca das práticas de manejo utilizadas pelos produtores e na realização de análises parasitológicas para avaliar o estado do parasitismo gastrointestinal nos bovinos, particularmente no que respeita à fasciolose bovina. Também se pretendeu esclarecer qual a distribuição geográfica dos animais seropositivos para *Fasciola hepatica* e relacionar as práticas de manejo identificadas através de inquéritos com os resultados obtidos nas análises parasitológicas.

2. Caracterização da área do estudo

Geografia e Clima

O arquipélago dos Açores localiza-se no Oceano Atlântico Norte, a sua superfície é de 2.322 km², representando 2,6% do território nacional. É composto por nove ilhas que apresentam uma grande desigualdade territorial, variando entre 750 km² (São Miguel) e 17 km² (Corvo), a maior e a mais pequena parcela, respetivamente (Secretaria Regional do Ambiente e do Mar [SRAM], 2015).

O clima destas ilhas é temperado e húmido, com uma taxa de insolação pouco elevada, chuvas regulares e abundantes (SRAM, 2015).

Junto ao litoral a temperatura média anual em todo o arquipélago ronda os 17,5°C. A temperatura pode variar regularmente ao longo do ano sendo em média as máximas em agosto próximas dos 22,0°C. As temperaturas médias mensais mais baixas ocorrem em fevereiro situando-se próximas dos 14,5°C. Em altitude, a temperatura decresce de forma regular, à razão de 0,9°C por cada 100 metros até aos 400 metros de altitude. A partir daí, devido à condensação, a temperatura decresce de uma forma menos brusca à razão média de 0,6°C por cada 100 metros (SRAM, 2015).

A humidade relativa do ar dos Açores caracteriza-se por ser elevada ao longo de todo o ano apresentando valores médios mensais próximos dos 80%. A precipitação média anual ao nível do mar varia entre os 900 e os 3.000 mm, sendo que esta aumenta de forma significativa com a altitude (SRAM, 2015).

O clima desta região apresenta boas potencialidades para a produção de pastagens durante todo o ano pois não existem invernos muito frios que impeçam o crescimento da erva, tal como não apresenta verões muito quentes e secos (apenas um ou dois meses com chuvas à volta de 30 mm. Trata-se de uma característica que esta região partilha com outras de clima semelhante, tais como as Pampas da Argentina, Uruguai e Rio Grande do Sul, no Brasil (Feio,

1991). Isto significa que nos Açores e nestes locais existem as condições ideais para a criação de gado, devido à disponibilidade de pastagem verde praticamente durante todo o ano, permitindo assim que esta seja realizada a reduzidos custos.

Importância da agropecuária

Segundo o Massot, A. (2015), a economia da Região Autónoma dos Açores (RAA) representa 2,1% da economia portuguesa, sendo que a sua maior contribuição é no setor primário (agricultura, floresta, pesca).

Em relação à produção agropecuária, é necessário ter em conta o forte contributo da indústria leiteira do arquipélago, representando 30% da produção nacional (Almeida & Silva, 2015). Este setor tem sido capaz de abastecer o mercado em Portugal continental, para onde fornece tradicionalmente a maioria dos seus produtos (75,3% em 2014). É igualmente importante referir que no ano de 2014, na ilha de São Miguel foi onde a produção de leite foi maior, com 64,4% do total da região, seguindo-se a ilha Terceira com 26,5% (DGIP, 2015).

Porém, a recente abolição das quotas leiteiras vieram afetar este equilíbrio frágil, devido à competição desigual com o valor dos produtos estrangeiros, no mercado português (Rodrigues, 2016).

Segundo o Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral (GPPAG) (2015) entre 1999 e 2013, o número de explorações leiteiras foi reduzido em 76% em Portugal e 43% só nos Açores. Quanto à variação do número de explorações por classe de vacas leiteiras, verificou-se que ocorreu um decréscimo acentuado das explorações da classe de menor dimensão (inferior ou igual a 30 animais) na ordem dos 84% a nível nacional (58% para os Açores). Porém, ocorreu um aumento de 49% das explorações com mais de 100 animais a nível nacional (70% nos Açores). Relativamente ao número de explorações de classe intermédia (entre 30 a 100 animais), verificou-se que ocorreu um ligeiro aumento na RAA. Relativamente à ISM e de acordo com dados da Secretaria Regional da Agricultura e Ambiente (SRAA) (2016), tem-se verificado um decréscimo no número de produtores de leite entre 2011 e 2015. Segundo os dados cedidos pelos Serviços de Desenvolvimento Agrário de São Miguel existem atualmente cerca de 1.424 explorações com um total de aproximadamente 51.590 bovinos leiteiros nesta mesma ilha.

Apesar da crise que tem afetado o setor leiteiro nos últimos anos, o queijo açoriano é um produto lácteo que tem vindo a adquirir grande importância, tanto pelo seu volume (12.614 toneladas produzidas em 2014) como pelo seu valor de mercado. Note-se que, com

exceção dos volumes de leite produzidos por ano, o queijo está a tornar-se num produto cada vez mais valorizado para a indústria dos lacticínios dos Açores (Massot, A. 2015).

Devido ao limitado mercado interno das ilhas, a maior parte dos produtos lácteos comercializados são exportados, sendo que apenas 15% das toneladas produzidas no ano de 2014 foram consumidas no arquipélago. O principal destino das exportações é Portugal continental (75,4% do total de toneladas exportadas em 2014) com preferência para o leite (60% do comércio com o continente). O queijo enviado para Portugal continental está em segundo lugar em termos de toneladas (18%) mas está em primeiro lugar em termos de valor monetário (50% das vendas) (Massot, A. 2015).

Para além de Portugal continental, o segundo destino mais comum dos produtos lácteos açorianos é a União Europeia (3,7% das toneladas exportadas em 2014) (Massot, A. 2015). Porém, a abolição das quotas leiteiras anteriormente referida, tem sido um desafio de primeira ordem para a região dos Açores, pois afetou bastante a produção e o comércio dos seus lacticínios (Rodrigues, 2016).

Contudo, tanto o Governo Regional como as empresas do setor e os próprios produtores, têm melhorado diversos aspetos e apostado cada vez mais na qualidade do leite, de forma a valorizar os produtos desta região. Um exemplo bastante recente é o programa "Leite de Vacas Felizes", elaborado pela marca Terra Nostra em parceria com a multinacional Bel. Este programa tem como principais bases a utilização de práticas agrícolas sustentáveis, de elevado critério de qualidade em que a regra mais importante é a de os animais serem mantidos em pastagens ao ar livre durante todo o ano (Rodrigues, 2016).

Caracterização das estruturas produtivas

Destaca-se que 95% da superfície agrícola útil (SAU) da RAA é ocupada por pastagens, prados e forragens. Na ilha de S. Miguel, cerca de 83% da SAU é ocupada por pastagens permanentes, compostas por azevém (*Lolium perenne* L.) e trevo branco (*Trifolium repens* L.)(Pinto, 2010).

Apesar de algumas explorações de bovinos leiteiros estarem a fixar-se num só local, como é o caso daquelas com maiores dimensões, a grande maioria é fragmentada por pequenas parcelas de pastoreio. Os animais deslocam-se frequentemente entre as diferentes parcelas de terreno de pastagem que compõem a exploração. A ordenha é maioritariamente realizada em unidades móveis, durante a qual, as vacas em lactação são suplementadas com alimento concentrado. Por sua vez, nas unidades fixas as vacas são estabuladas

temporariamente durante a ordenha, tendo acesso a alimentos concentrados e forragem em sistemas “unifeed”. Estes sistemas apresentam algumas vantagens como a menor necessidade de mão-de-obra e uma alimentação mais equilibrada (Pinto, 2010).

O facto das explorações se encontrarem distribuídas por pequenas parcelas, exige mais mão-de-obra, mais gastos energéticos e a ordenha acaba por ser realizada em condições higiénicas precárias. Como consequência, representa mais um importante fator de pressão económica que torna necessária a modernização das estruturas produtivas (Pinto, 2010).

3. Maneio sanitário

O maneio sanitário tem sido definido como a promoção da saúde, aumento da produtividade e prevenção de doenças nos animais de acordo com o ponto de vista económico do proprietário e da indústria, que defende cada vez mais o bem estar animal, a segurança alimentar, a saúde pública e sustentabilidade ambiental (LeBlanc *et al.*, 2006).

No caso da indústria leiteira, a *Food and Agriculture Organization* (FAO) & *International Dairy Federation* (IDF) (2011) defendem que para produzir leite de forma segura e de qualidade, deve ser seguido um conjunto de boas práticas de maneio. Assim, este tipo de produção deve ser realizado a partir de animais saudáveis, utilizando práticas de maneio sustentáveis relativamente ao bem-estar animal e aos aspetos socioeconómicos e ambientais.

Para uma exploração apresentar um bom estado sanitário, deve cumprir com alguns princípios básicos de biossegurança. Desta forma, um bom programa de maneio sanitário de uma exploração leiteira deve assentar nos seguintes fundamentos:

- Elevar o nível de resistência dos animais da exploração às doenças;
- Prevenir a entrada de novas doenças na exploração;
- Prevenir a disseminação de doenças existentes na exploração;
- Prevenir a presença de resíduos de produtos químicos e de medicamentos veterinários no leite.

Para o primeiro fundamento apresentado, a FAO & IDF (2011) exemplificam algumas medidas que devem ser adotadas como: escolher raças e animais bem adaptados ao ambiente onde se localiza a exploração, determinar o tamanho ideal do efetivo conforme as condições do local, mão-de-obra disponível, tamanho dos terrenos e infraestruturas, quantidade de alimento disponível, entre outros e vacinar os animais de acordo com as recomendações das autoridades de sanidade animal locais.

Na prevenção do aparecimento de novas doenças na exploração, tanto infecciosas como parasitárias, é recomendada a compra de animais cujo estatuto sanitário seja conhecido e realizar a respetiva quarentena caso seja necessário; garantir que os animais de outras explorações vizinhas não tenham acesso à exploração e aos seus animais e utilizar um programa de controlo de pragas (FAO & IDF, 2011).

No terceiro fundamento, são sugeridas várias medidas, como por exemplo, o uso de um sistema de identificação dos animais, monitorização regular dos mesmos de forma a detetar sinais de doença, examinar e tratar rapidamente, de forma adequada os animais

doentes e mantê-los isolados, separar o leite dos animais doentes e dos animais em tratamento, registar sempre os tratamentos realizados a cada animal, identificar devidamente os animais doentes e uma das mais importantes medidas, possuir um plano de manejo para casos de doenças zoonóticas (FAO & IDF, 2011).

Para prevenir o aparecimento de resíduos de produtos químicos ou de medicamentos veterinários no leite, apenas devem ser utilizados produtos que se encontrem de acordo com a legislação de cada país; estes devem ser mantidos num local seguro devendo ser a sua utilização de acordo com as recomendações do fabricante; as doses devem ser calculadas cuidadosamente e apenas se devem utilizar medicamentos veterinários quando forem prescritos por um Médico Veterinário (FAO & IDF, 2011).

Nos Açores ao longo dos últimos anos foram identificados diversos problemas sanitários que condicionavam não só a rentabilidade das explorações como a qualidade dos produtos de origem animal produzidos nesta região. Com a globalização, surgiram novos mercados, o que contribuiu para a formação de novos requisitos de natureza sanitária e económica. Recentemente foram criadas novas estruturas de abate, fábricas de transformação de produtos lácteos com tecnologia de ponta e foram modernizadas as infraestruturas aeroportuárias, permitindo melhores condições de preparação e expedição dos produtos açorianos. Para além disto, também tem sido realizado um enorme esforço para erradicar determinadas doenças nos bovinos, com a finalidade de que a região dos Açores tenha um melhor estatuto sanitário. Assim sendo, o Governo Regional deu início ao Plano Global de Sanidade Animal, implementado a partir de 2007. Este veio englobar não só os planos de erradicação, vigilância e controlo já existentes (Brucelose, Leucose, Tuberculose e BSE) mas também fazer frente às "doenças de produção": IBR, BVD, Hematúria Enzoótica, Eczema facial, entre outras (Presidência do Governo dos Açores, 2016).

Tal como já foi anteriormente referido, na região dos Açores a criação dos bovinos leiteiros é realizada maioritariamente em sistemas de produção extensivos, pelo que os animais se alimentam essencialmente da pastagem. Deste modo, estes encontram-se mais expostos aos diversos parasitas, tornando-os suscetíveis às infeções provocadas pelos mesmos. Assim, o controlo parasitário torna-se de igual modo um ponto importante do manejo sanitário destes efetivos.

3.1 Controle Parasitário

As doenças provocadas por helmintes são uma das mais importantes causas de perdas económicas na produção animal por todo o mundo (Parkins & Holmes, 1989). Segundo estes autores, a maior parte destas perdas estão associadas a infeções gastrointestinais, bem como a parasitoses pulmonares, que também podem contribuir para graves perdas na produtividade em ruminantes.

As infeções parasitárias gastrointestinais dos bovinos podem ser causadas por helmintes (nemátodes, tremátodes e céstodes) e protozoários. Estas parasitoses e a sua relação com a faixa etária dos animais tem sido alvo de vários estudos (Lichtenfels *et al.*, 1994; Bresciani *et al.* 2001). Estudos sobre a ocorrência das helmintoses gastrointestinais em animais adultos têm sido relatados mundialmente (Waruiru *et al.*, 1998; Agneessens *et al.*, 2000; Chollet *et al.*, 2000) e tem sido demonstrado que o desenvolvimento da resposta imune está associado principalmente a uma resposta prévia contra o parasita, que se torna efetiva ao redor dos 18 a 24 meses de idade (Padilha, 1996). Assim, a partir dessa faixa etária, a tendência é ocorrer a redução da carga parasitária, diminuição no número de ovos excretados nas fezes e baixa incidência de casos clínicos de verminose (Charles, 1992).

Apesar dos sinais clínicos de doença devido ao parasitismo gastrointestinal em animais adultos serem pouco frequentes, esta condição pode ter consequências profundas na sua produtividade (Mason *et al.*, 2012).

Os efeitos do parasitismo gastrointestinal em ruminantes incluem menor ganho de peso, em animais jovens, ou perda de condição corporal, em animais adultos, menor qualidade da carcaça nos animais destinados ao abate, diminuição da produção de leite, baixa performance reprodutiva e em situações mais graves, a morte dos animais afetados (Parkins & Holmes, 1989).

Neste estudo, para além dos inquéritos realizados aos produtores acerca de algumas práticas de manejo que podem predispor os animais às parasitoses gastrointestinais e das análises coprológicas para a deteção de infeções causadas por nemátodes, céstodes, tremátodes e coccídias, foi realizada uma análise serológica. Esta teve como objetivo a deteção de anticorpos contra *Fasciola hepatica* no sangue de bovinos leiteiros, dada a crescente importância deste parasita a nível mundial.

De acordo com alguns autores (Arias *et al.*, 2010; Van Dijk *et al.*, 2010; Díez Baños, 2011; Charlier *et al.*, 2014; Selemetas *et al.*, 2015) a fasciolose tem vindo a tomar contornos cada vez mais preocupantes, pois tem-se verificado um aumento dos riscos de infeção por

Fasciola spp., bem como do número de animais infetados em várias regiões. Os mesmos autores referem que isto pode estar relacionado com o aquecimento global, isto é, com a ocorrência de invernos menos rigorosos e o aumento da pluviosidade, propícias ao desenvolvimento do hospedeiro intermediário deste parasita. Porém, outros fatores importantes que contribuem para esta situação incluem falhas no planeamento da desparasitação, na seleção do antiparasitário e na aplicação das medidas de controlo necessárias por parte dos produtores (Selemetas *et al.*, 2015). Deste modo o aumento da prevalência de *F. hepatica* aumenta ainda mais o impacto económico que esta parasitose pode ocasionar, sendo que as perdas potenciais ainda estão subestimadas (Molina-Hernández *et al.*, 2015).

3.2 Parasitoses gastrointestinais em bovinos

3.2.1 Classe Nematoda

Segundo Suarez & Lorenzo (2000), os nematodes gastrointestinais que afetam os bovinos constituem uma importante limitação económica reduzindo a performance destes animais em sistemas de pastoreio. Vários autores indicam que os nemátodes mais prevalentes em bovinos pertencem aos géneros *Ostertagia*, *Haemonchus*, *Trichostrongylus* e *Cooperia* spp. (Suarez *et al.*, 1990; Urquhart *et al.*, 1996; Borgsteede *et al.*, 2000; Smith, 2009). As infeções mistas são muito frequentes e outros géneros, como *Nematodirus*, *Oesophagostomum* e *Trichuris* que compõem uma menor porção da população total de nemátodes, também contribuem para grandes perdas económicas (Divers & Peek, 2008; Smith, 2009).

As espécies pertencentes a esta Classe diferem entre si no que respeita ao seu microbiótomo e efeitos patológicos mas no geral, o seu ciclo de vida e alguns fatores epidemiológicos e imunitários são muito semelhantes (Smith, 2009).

Ciclo de vida dos Nemátodes

Nas várias espécies de nemátodes, existe dimorfismo sexual. Os ovos dos nemátodes (Figura 2) são produzidos por fêmeas adultas e levados para o exterior do hospedeiro através das fezes (Smith, 2009). Estes também variam quanto ao tamanho e forma. A maior resistência dos ovos verifica-se naqueles cuja espessura da cápsula é mais desenvolvida, o que

protege a larva da dessecação. Assim, parasitas cuja forma infecciosa são os ovos com a larva já desenvolvida, apresentam uma casca bastante espessa, que lhes permite sobreviver por vários anos no ambiente (Urquhart *et al.*, 1996).



Figura 1 - Ovos do tipo estrongilídeo presentes numa amostra de fezes (X40) (Fotografia original).

Os ciclos de vida dos nemátodes gastrointestinais dos bovinos são muito semelhantes entre si. Possuem uma fase interna, no hospedeiro e uma fase externa, no meio ambiente.

A fase não parasitária, também chamada de fase de vida livre, é aquela em que é possível encontrar cerca de 90% da população total dos nemátodes. O seu conhecimento é de extrema importância pois permite estabelecer programas mais eficazes de controlo de infeções parasitárias nos bovinos (Fiel *et al.*, 2012).

Durante o seu desenvolvimento os nemátodes realizam mudas, libertando a sua cutícula. Num ciclo de vida completo, existem 4 mudas que correspondem aos 4 estádios larvares, designadas por L1, L2, L3, L4 e L5 (adulto imaturo) (Urquhart *et al.*, 1996).

No ambiente exterior os ovos embrionados eclodem e dão origem às L1. Estas mudam para o segundo estádio (L2), que continuam o seu desenvolvimento até atingir o terceiro estádio (L3). Ao todo, para que o parasita evolua desde a fase de ovo até à fase de larva infetante é necessário um período de 7 a 10 dias. As larvas 3 são mais desenvolvidas, possuem esófago distinto e apresentam uma bainha como revestimento, o que as protege das condições ambientais adversas até que sejam ingeridas por um hospedeiro - larvas infetantes (Hansen & Perry, 1994). Após a ingestão, as L3 desenvolvem-se até atingirem o quarto estádio (L4), que posteriormente evolui até à fase de adultos imaturos. Os nemátodes que passam a adultos sexualmente maduros, desenvolvem-se ao fim de 2 a 4 semanas; a menos

que ocorra uma interrupção do seu desenvolvimento (Smith, 2009). Deste modo, o período compreendido entre o momento da infecção do hospedeiro definitivo até à presença de parasitas adultos capazes de produzir ovos é denominado período pré-patente que difere entre parasitas (Urquhart *et al.*, 1996).

Uma das principais características do ciclo de vida dos nemátodes é que a infecção de um hospedeiro definitivo para outro, raramente acontece. É necessário que ocorra algum desenvolvimento das formas parasitárias excretadas nas fezes, ou num hospedeiro intermediário, antes que possa suceder a infecção (Urquhart *et al.*, 1996). Assim, o ciclo de vida dos nemátodes pode ser direto ou indireto, consoante o género do parasita em questão. No caso dos nemátodes gastrointestinais dos bovinos, estes apresentam apenas o ciclo de vida direto (Foreyt, 2001). A infecção dos hospedeiros ocorre através da ingestão das L3 presentes na pastagem. Porém, podem existir algumas variações quanto à via de infecção como no caso de *Bunostomum phlebotomum*, em que pode ser oral ou por penetração cutânea das larvas. Outros exemplos incluem o caso de *Capillaria bovis* cuja infecção ocorre por ingestão de ovos embrionados que contêm as L1 infetantes, ou ainda o caso de *Nematodirus* spp. pela ingestão de ovos que contêm as L3 infetantes (Urquhart *et al.*, 1996; Foreyt, 2001; Smith, 2009).

Epidemiologia dos Nemátodes

O clima e o manejo das pastagens e dos animais estão entre os fatores que influenciam o grau de parasitismo. Normalmente, quando os animais já infetados entram em contacto com as pastagens, promovem a sua contaminação, dando continuidade ao ciclo de vida dos parasitas. O desenvolvimento e a capacidade de sobrevivência das L3 infetantes dependem principalmente das características do ambiente como a temperatura e a humidade.

A temperatura ideal para o desenvolvimento e manutenção das L3 infetantes está entre os 18 e os 26°C, com níveis de humidade entre 80 e 100%. Mesmo nas regiões de climas secos, em que os níveis de humidade são baixos, o microclima criado pelas fezes e a humidade à superfície do solo podem ser suficientes para permitir a sobrevivência e o desenvolvimento das larvas nas pastagens (Urquhart *et al.*, 1996).

O desenvolvimento e a transmissão das larvas tendem a ocorrer de acordo com padrões de sazonalidade e condições climáticas de cada região (Smith, 2009).

Fenómenos como a hipobiose e o aumento do número de ovos nas fezes do hospedeiro durante o peri-parto são fatores que também influenciam a epidemiologia das nematodoses (Urquhart *et al.*, 1996).

Quando as condições climáticas não são as ideais para o desenvolvimento larvar, pode ocorrer a paralisação do seu desenvolvimento no interior dos hospedeiros, permanecendo enquistadas nas paredes do intestino, mecanismo conhecido por hipobiose. Nas regiões de clima temperado, este fenómeno ocorre normalmente, no fim do outono, início do inverno podendo estender-se até à primavera. Nemátodes como *Ostertagia ostertagi*, *Haemonchus* spp., *Cooperia* spp. e *Nematodirus* spp. são parasitas cujo mecanismo de hipobiose é mais observado (Urquhart *et al.*, 1996; Smith, 2009). O fenómeno de hipobiose coincide geralmente com as temperaturas baixas, nas zonas de clima temperado ou em condições muito secas nas regiões subtropicais ou tropicais (Urquhart *et al.*, 1996).

Assim, a importância epidemiológica da hipobiose é a garantia de sobrevivência dos nemátodes durante os períodos de adversidade e assegurar a maturação destas larvas, que após a ocorrência de determinado estímulo reiniciam o seu desenvolvimento. Este comportamento é particularmente acentuado nos parasitas que pertencem à Ordem Strongylida, aumentando a contaminação do ambiente e podendo originar doença clínica (Bowman, 2009).

Nos tratamentos antiparasitários nem sempre se observa ação sobre as formas hipobióticas de grande parte dos nemátodes, contribuindo para o aparecimento de resistência (Apifarma, 2016; SimposiumVet, 2016).

O fenómeno da maturação e desenquistamento das larvas que se encontravam em hipobiose parece estar relacionado com o ciclo reprodutivo do hospedeiro ocorrendo geralmente no peri-parto. As larvas que se encontravam enquistadas, desenvolvem-se passando a adultos capazes de produzir ovos. Assim, significa que existe um aumento no número de ovos de nemátodes nas fezes perto da altura do parto (Urquhart *et al.*, 1996).

Já se conhece, principalmente em ovelhas, o fenómeno "spring rise" ou de diminuição da imunidade no peri-parto com o aumento do número de ovos por grama de fezes (OPG) no pós-parto e início da lactação. Neste período a baixa imunidade do hospedeiro permite o desenvolvimento das larvas que se encontravam em hipobiose, ou o estabelecimento de novas larvas ou ainda o aumento da fecundidade das formas adultas pré-existentes. Este aumento pode estar igualmente relacionado com alterações hormonais ocorridas durante o peri-parto e que levam à imunossupressão, cujo mecanismo ainda é pouco conhecido (Gennari *et al.*, 2002). Segundo Fleming *et al.* (1988) a prolactina pode estar direta ou indiretamente relacionada com a maior produção de ovos por nematodes como *Haemonchus contortus* devido ao aumento da sua concentração na circulação, antes do parto e durante a lactação.

A importância deste fenômeno é a ocorrência do aumento do número de novos hospedeiros suscetíveis, assegurando assim a sobrevivência e disseminação destas parasitoses (Urquhart *et al.*, 1996).

Imunidade

O desenvolvimento da resposta imune está associado principalmente a uma resposta prévia contra o parasita, que se torna efetiva entre os 18 e 24 meses (Padilha, 1996). Assim, a partir dessa faixa etária, a tendência é de ocorrer redução na carga parasitária, diminuição no número de ovos excretados nas fezes e baixa incidência de casos clínicos (Charles, 1992).

Após a exposição inicial e estimulação do sistema imunitário os animais adultos raramente apresentam sinais clínicos de infecção por nemátodes ou requerem tratamento anti-helmíntico. Apesar destes ingerirem larvas infetantes, apenas algumas estabelecem infecção e por isso a carga parasitária e a excreção de ovos são consideradas muito baixas. Deste modo, a maioria dos tratamentos preventivos são dirigidos aos animais mais novos, como os vitelos de carne e as novilhas de leite, visto terem imunidade reduzida (Smith, 2009).

***Ostertagia* spp.**

De todos os nemátodes que infetam os bovinos, a espécie *O. ostertagi* tem sido considerada a mais patogénica nas regiões temperadas e nas subtropicais (Divers & Peek, 2008; Smith, 2009). A via de infecção deste parasita é a oral, o microbiótomo é o abomaso e este parasita é responsável pela maior parte das gastrites parasitárias em bovinos. (Urquhart *et al.*, 1996).

Os indivíduos adultos são castanho-avermelhados, com cerca de 1,0 cm de comprimento. O período pré-patente é de 3 semanas (Hansen & Perry, 1994).

A fisiopatologia da ostertagiose consiste no desenvolvimento das formas L3 nas glândulas gástricas do abomaso. À medida que estas larvas se desenvolvem no interior destas estruturas, causam hiperplasia das glândulas e uma intensa infiltração eosinofílica. As células glandulares da mucosa perdem a sua capacidade de diferenciação e as junções celulares tornam-se fracas. As células parietais também perdem as suas funções normais, ocorrendo uma diminuição da produção de ácido clorídrico (HCl). A consequente alteração do pH estimula a produção excessiva de gastrina que dá início à proliferação celular e hiperplasia da mucosa gástrica. Este meio alcalino também diminui a atividade bactericida do abomaso,

resultando no sobrecrecimento bacteriano a partir do rúmen e que se prolonga até ao intestino. Para além disto, um pH superior a 5 impede a conversão do pepsinogénio em pepsina. Devido ao enfraquecimento das junções celulares acima referido, há um aumento da permeabilidade do epitélio abomasal (Urquhart *et al.*, 1996; Smith, 2009). Deste modo é possível ocorrer a passagem livre de macromoléculas através do epitélio da mucosa gástrica, isto é, da corrente sanguínea para o lúmen do trato gastrointestinal e vice-versa, onde as macromoléculas de maior importância são o pepsinogénio e a albumina. Assim, à medida que os níveis plasmáticos de pepsinogénio aumentam, ocorre a perda de proteínas plasmáticas para o lúmen do trato digestivo, resultando em hipoalbuminemia (Urquhart *et al.*, 1996).

Posteriormente, as formas ainda imaturas (L5), emergem das glândulas e sofrem a maturação sexual na superfície da mucosa abomasal. Este processo coincide normalmente com a manifestação de sinais clínicos no animal parasitado (Urquhart *et al.*, 1996; Smith, 2009).

Em infeções severas, a hiperplasia e a perda de diferenciação celular acabam por atingir todo o abomaso. Macroscopicamente, este órgão adquire um aparência típica de "couro marroquino", onde as pregas ficam normalmente edemaciadas, hiperémicas, ocorrendo por vezes necrose, destacando-se e produzindo membranas diftéricas (Urquhart *et al.*, 1996; Smith, 2009).

A ostertagiose pode apresentar-se de duas formas clínicas distintas: do tipo I e do tipo II (Smith, 2009).

O tipo I ocorre normalmente em vitelos criados em sistemas de produção extensivos, durante a sua primeira época de pastoreio, três a quatro semanas após a ingestão das formas infetantes L3 (Urquhart *et al.*, 1996).

O tipo II ocorre em animais adultos com idade entre os 2 e 4 anos ou superior. Este tipo de ostertagiose pode observar-se normalmente no final do inverno ou primavera seguinte à primeira época de pastoreio. O sinal clínico comum aos dois tipos de ostertagiose é a diarreia aquosa profusa. No tipo I, quando os vitelos estão no pasto, esta diarreia é normalmente persistente e tem uma cor verde brilhante característica. Em contraste, na maioria dos animais com ostertagiose do tipo II, a diarreia é geralmente intermitente e também se observam anorexia e desidratação. A pelagem dos animais afetados em ambas as síndromes, encontra-se baça e os quartos posteriores bastante conspurcados pelas fezes (Urquhart *et al.*, 1996).

Ainda no tipo II, há uma anemia moderada de etiologia desconhecida e a hipoalbuminemia é mais marcada, tendo como resultado a presença de edema submandibular (Urquhart *et al.*, 1996; Smith, 2009).

A morbidade dos animais afetados pela ostertagiose do tipo I é geralmente elevada mas a mortalidade é rara, caso seja instituído um tratamento adequado. Na ostertagiose do tipo II, a prevalência da doença clínica é comparativamente mais baixa e apenas afeta uma parte do efetivo. A mortalidade destes animais é normalmente elevada, a menos que seja instituído um tratamento anti-helmíntico que atue sobre as larvas em desenvolvimento e em hipobiose (Urquhart *et al.*, 1996).

Haemonchus spp.

Quanto a este género, é importante referir o seu elevado potencial biótico, com uma capacidade de produção de cerca de 5000 a 15000 ovos por fêmea por dia, bastante acima da média dos restantes nemátodes gastrointestinais (Hansen & Perry, 1994). Nos bovinos, a espécie mais comum é o *Haemonchus placei*, cuja via de infeção é a oral e o microbiótoto é o abomaso (Urquhart *et al.*, 1996; Divers & Peek, 2008). O género *Haemonchus spp.* é muito importante regiões tropicais e subtropicais, principalmente durante as épocas de chuva. As formas adultas são hematófagas e são facilmente identificadas devido à sua localização específica e o seu tamanho (2,0 a 3,0 cm de comprimento) (Urquhart *et al.*, 1996).

Nas regiões tropicais e subtropicais, onde as condições de desenvolvimento do parasita são ótimas, os seus ovos eclodem no pasto, libertando as L1, podendo desenvolver-se até à fase L3 num período de cinco dias. Após a sua ingestão, as L3 penetram na mucosa do abomaso onde continuam o seu desenvolvimento. Por fim, os adultos permanecem na superfície da mucosa abomasal, onde podem movimentar-se livremente e alimentar-se a partir dos vasos sanguíneos presentes na mesma, provocando a sua erosão e irritação. Nos bovinos, o período pré-patente é em torno de quatro semanas (Urquhart *et al.*, 1996).

Os sinais clínicos da haemoncose são anemia e graus variáveis de edema. Também se verifica letargia, fezes escuras e queda de pêlo nos animais afetados. Na forma aguda pode ocorrer uma gastrite hemorrágica. Por sua vez, a forma crónica está associada à perda de peso progressiva e enfraquecimento do animal (Urquhart *et al.*, 1996).

***Trichostrongylus* spp.**

Em bovinos, a espécie *Trichostrongylus axei* é raramente considerada como causa primária de doença parasitária em regiões temperadas. Porém nas subtropicais, é uma das principais causas de gastrite parasitária. A via de infecção deste parasita é oral, o microbiótomo é o abomaso, sendo que as formas adultas são pequenas e medem normalmente menos de 7,0 mm, tornando-se difíceis de observar a olho nu (Urquhart *et al.*, 1996; Divers & Peek, 2008).

Quanto ao ciclo de vida, em condições ótimas, o desenvolvimento do ovo até à fase larvar infetante ocorre em uma a duas semanas. O período pré-patente, por sua vez, pode ocorrer cerca de duas a três semanas (Urquhart *et al.*, 1996).

No caso do *T. axei*, as alterações induzidas na mucosa gástrica são semelhantes às que são provocadas pela *Ostertagia* spp.. A única diferença é que este parasita não penetra nas glândulas gástricas mas sim na mucosa abomasal (Hansen & Perry, 1994). A coalescência das lesões nodulares consequentes da ação do *T. axei*, resultam na formação de placas ou lesões em forma de anel (Urquhart *et al.*, 1996).

Em infecções severas, os principais sinais clínicos são a rápida perda de peso e diarreia. Por sua vez, em infecções leves, observa-se inapetência e baixas taxas de crescimento (Urquhart *et al.*, 1996).

***Cooperia* spp.**

Nas regiões temperadas, o género *Cooperia* está normalmente em segundo plano na patogénese da gastroenterite parasitária em ruminantes. Contudo, em zonas tropicais e subtropicais, algumas espécies são responsáveis por enterites severas em vitelos. Nos bovinos, as espécies mais relevantes são *Cooperia oncophora*, *C. punctata* e *C. pectinata* (Urquhart *et al.*, 1996; Divers & Peek, 2008). A via de infecção é oral, o seu microbiótomo é o intestino delgado, sendo que as formas adultas presentes neste órgão são avermelhadas e têm um tamanho compreendido entre 5 a 9mm (Monnig, 1950; Urquhart *et al.*, 1996).

No caso da *C. oncophora*, a epidemiologia é semelhante à da ostertagiose, sendo que a hipobiose das L4 é comum durante o outono e inverno nas regiões temperadas. Por sua vez, as espécies *C. punctata* e *C. pectinata* são mais comuns nas regiões tropicais e subtropicais e a sua epidemiologia assemelha-se à do género *Haemonchus* spp.. Nestes casos, a hipobiose ocorre durante as estações secas muito prolongadas (Urquhart *et al.*, 1996).

A *C. oncophora* é considerada pouco patogénica, pois não ocorre penetração da mucosa intestinal ao longo do seu desenvolvimento, embora alguns estudos a tenham associado a sintomas como a inapetência e baixas taxas de crescimento em vitelos. Por sua vez, a *C. punctata* e a *C. pectinata* são mais patogénicas devido à sua penetração na mucosa do intestino delgado, provocando a atrofia das vilosidades e redução da superfície de absorção. Nestes casos, ocorrem normalmente sinais como diarreia, perda de peso acentuada e edema submandibular (Monnig, 1950).

***Nematodirus* spp.**

A espécie *Nematodirus helvetianus* é a que afeta mais os bovinos e é mais comum em zonas temperadas (Urquhart *et al.*, 1996; Divers & Peek, 2008). Os adultos são finos e com 2,0 cm de comprimento, a via de infeção é oral e localizam-se no intestino delgado. Neste género, tal como anteriormente referido, o desenvolvimento das L3 dá-se ainda no interior dos ovos. Este desenvolvimento é normalmente muito lento e em climas temperados demora cerca de dois meses. Uma vez atingida a fase L3, os ovos só eclodem após um longo período de tempo, sendo que este varia entre espécies. (Urquhart *et al.*, 1996).

A patogenia desta parasitose consiste igualmente na lesão das microvilosidades e erosão da mucosa intestinal, culminando na atrofia das vilosidades. Este processo resulta normalmente em diarreia e desidratação dos animais afetados (Urquhart *et al.*, 1996).

***Oesophagostomum* spp.**

Neste género, a espécie que afeta os bovinos é o *Oesophagostomum radiatum*, sendo que este tem maior importância em regiões tropicais e subtropicais. O seu microbiótomo é o cólon, a via de infeção é oral e as suas formas adultas são robustas e medem 1,0 a 2,0 cm de comprimento (Urquhart *et al.*, 1996; Divers & Peek, 2008).

A infeção dá-se pela ingestão das L3 que posteriormente, penetram na mucosa de qualquer parte do intestino e permanecem no interior de nódulos. A partir daí, são capazes de se desenvolver até atingir a fase L4. Quando atingem esta fase, emergem na superfície da mucosa, migrando para o cólon, onde se desenvolvem até atingir a fase adulta. O período pré-patente é cerca de 45 dias (Hansen & Perry, 1994). Em casos de reinfeção, as L4 podem permanecer em hipobiose no interior dos nódulos até cerca de um ano (Urquhart *et al.*, 1996).

Esta espécie, bem como as restantes do género *Oesophagostomum* spp., tem capacidade de provocar enterite severa. Isto ocorre devido à penetração das L3 na mucosa intestinal, tal como referido anteriormente, provocando uma resposta inflamatória, com a formação de nódulos (Hansen & Perry, 1994). Em casos de reinfeção, esta resposta é mais marcada, e os nódulos chegam a atingir 2,0 cm de diâmetro, contendo exsudado purulento de cor esverdeada e eosinofílico. Quando as L4 emergem, pode dar-se a ulceração da mucosa e diarreia, sendo que este processo ocorre cerca de uma semana após a infeção primária, ou após vários meses, em casos de reinfeção. Em casos de infeção severa pode ocorrer colite ulcerativa e a doença adquire um carácter crónico e debilitante. Nos bovinos, o *O. radiatum* é capaz de provocar sinais clínicos no animal com um número relativamente baixo de larvas (cerca de 500) (Urquhart *et al.*, 1996).

No caso dos bovinos, estes desenvolvem uma boa imunidade em relação à *O. radiatum*, devido à idade e à exposição prévia, pelo que este é um problema importante em vitelos desmamados (Urquhart *et al.*, 1996).

***Trichuris* spp.**

Este género tem como microbiótomo o ceco, a via de infeção é oral e as espécies mais importantes em bovinos são o *Trichuris globulosa* e o *T. discolor*, sendo o último menos comum (Urquhart *et al.*, 1996; Divers & Peek, 2008). Os indivíduos adultos são hematófagos, medem entre 4,0 a 6,0 cm de comprimento e possuem um longo filamento anterior, que perfura e permanece fixado à mucosa intestinal. O período pré-patente pode variar entre 6 a 12 semanas, de acordo com a espécie (Urquhart *et al.*, 1996).

Este género tem a particularidade de as formas larvares infetantes serem as L1 que se encontram ainda no interior dos ovos. Após a ingestão, as L1 são libertadas dos ovos e penetram nas glândulas da mucosa do ceco, onde completam o seu desenvolvimento até atingirem a fase adulta. Posteriormente, estas emergem das glândulas, permanecendo na superfície da mucosa. As maiorias das infeções são leves e assintomáticas. Em casos em que o animal é infetado por um grande número de parasitas, pode-se observar inflamação diftérica da mucosa do ceco (Urquhart *et al.*, 1996).

3.2.1.1 Métodos de diagnóstico

No diagnóstico destas parasitoses, a observação dos sinais clínicos, a sazonalidade, a história pregressa, os exames coprológicos para identificação e contagem de ovos, a coprocultura e exame *pos-mortem*, são de extrema importância. Para além disto, no caso da ostertagiose, a medição dos níveis de pepsinogénio plasmático também é uma importante ferramenta de diagnóstico (Urquhart *et al.*, 1996). Contudo, nestas parasitoses os meios de diagnóstico de maior relevância incluem as técnicas coprológicas quantitativas e qualitativas e coprocultura. As técnicas coprológicas quantitativas são normalmente realizadas através da utilização da câmara de McMaster. As técnicas coprológicas qualitativas podem ser divididas em técnicas de flutuação ou de sedimentação dos ovos de helmintes. Contudo, para nemátodes as técnicas de flutuação são as mais adequadas. Podem também ser realizadas coproculturas que permitem a eclosão dos ovos e desenvolvimento das formas larvares infetantes L3. Assim, torna-se possível realizar a identificação das espécies de nemátodes presentes nas fezes dos animais (Hansen & Perry, 1994).

3.2.1.2 Tratamento e Controlo

Os efeitos dos nemátodes gastrointestinais podem ser diretos, prejudicando o desenvolvimento e a produtividade dos bovinos, atuando sobre a digestão e absorção de nutrientes. Podem ter também efeitos indiretos atuando sobre o sistema imunitário, com a diminuição da sua resposta contra outros agentes infecciosos (Stromberg & Gasbarre, 2006).

O controlo parasitário baseia-se principalmente na utilização de produtos farmacológicos com exceção das explorações de produção do tipo biológico.

Quanto aos grupos de fármacos antiparasitários, estes variam quanto ao espectro de atividade, duração e especificidade da atividade parasiticida, dosagens e intervalos de segurança (IS) para o leite e carne.

A desparasitação pode ter um carácter terapêutico ou preventivo. Quando se trata de ação terapêutica, os animais são tratados com um anti-helmíntico devido ao elevado número de ovos eliminados nas fezes ou quando estão clinicamente afetados pelos parasitas. Este procedimento pode ser repetido em intervalos variáveis (Stromberg & Gasbarre, 2006).

A desparasitação preventiva é aquela em que são realizados tratamentos em intervalos regulares de 6 semanas ou menos (Stromberg & Gasbarre, 2006) como no caso das novilhas de leite, as quais devem ser desparasitadas antes da mudança de pastagem e depois 3

e 6 semanas após a mesma (Divers & Peek, 2008). Este esquema de desparasitação permite numa primeira fase, reduzir a carga parasitária ingerida recentemente, antes que as fêmeas adultas dos parasitas comecem a produzir e contaminar as pastagens com ovos. O segundo tratamento tem como objetivo eliminar as larvas em hipobiose, que posteriormente irão contaminar a pastagem (Divers & Peek, 2008). O principal benefício de um elevado número de tratamentos é permitir uma desparasitação supressiva, que tem como objetivo a manutenção da carga parasitária dos animais e da pastagem o mais baixa possível. Contudo, este método para além de se tornar dispendioso, tem o potencial de aumentar a resistência dos parasitas à substância ativa utilizada (Stromberg & Gasbarre, 2006).

De acordo com Perri *et al.* (2013) a desparasitação tem vários efeitos vantajosos em novilhas de leite, nomeadamente na sua performance reprodutiva e produtiva na fase adulta. Segundo o mesmo autor, as vacas adultas parasitadas na altura do peri-parto também podem beneficiar de um tratamento anti-helmíntico melhorando assim os níveis de produção leiteira.

Os fármacos disponíveis para o combate das infeções por nemátodes estão classificados em três grupos: os benzimidazóis, os agonistas nicotínicos e as lactonas macrocíclicas (Hsu, 2008).

Os princípios ativos mais utilizados em ruminantes são o albendazol, febendazol e oxfendazol, pertencentes ao grupo dos benzimidazóis, sendo estes efetivos contra as formas adultas e larvares da maioria destes parasitas (Hsu, 2008).

Quanto aos agonistas nicotínicos, os princípios ativos incluídos neste grupo são: levamisol, pirantel e morantel. No caso do levamisol, este tem ação sobre a maioria das formas adultas dos nemátodes gastrointestinais e pulmonares, mas não é completamente efetivo contra *Stongyloides* spp. e formas imaturas dos nemátodes gastrointestinais (Hsu, 2008). Em relação ao pirantel e morantel, apenas apresentam ação sobre as formas adultas de nemátodes (Smith, 2009).

O grupo das lactonas macrocíclicas divide-se em dois sub-grupos: avermectinas e milbemicinas. No grupo das avermectinas encontram-se as substâncias ativas como a ivermectina, doramectina e eprinomectina. No grupo das milbemicinas está a moxidectina (Hsu, 2008; Smith, 2009). Estas substâncias atuam sobre as formas adultas e larvares de nemátodes gastrointestinais e pulmonares, incluindo as L4 em hipobiose, bem como ectoparasitas (Hsu, 2008).

Em Portugal, apenas estão disponíveis no mercado os seguintes fármacos com ação sobre nemátodes gastrointestinais: albendazol, febendazol, oxfendazol, doramectina, eprinomectina, ivermectina, moxidectina, closantel, nitroxinil e associação de moxidectina

com triclabendazol (Apifarma, 2016; SimposiumVet, 2016). Os fármacos que pertencem ao grupo das lactonas macrocíclicas, como as formulações *pour-on* de eprinomectina e moxidectina, são considerados de eleição para administração em bovinos em lactação. As suas principais vantagens incluem não apresentar intervalo de segurança para o leite, ser de fácil aplicação e eficácia contra as diversas fases da maioria dos helmintes gastrointestinais dos bovinos (Charlier *et al.*, 2009; Smith, 2009). Contudo em Portugal, a única formulação que contém moxidectina, também inclui o triclabendazol, sendo que a sua utilização está interdita em vacas cujo leite é para consumo humano (SimposiumVet, 2016).

Existem estudos que comprovam o aparecimento de resistências dos nemátodes em relação aos anti-helmínticos como benzimidazóis e algumas lactonas macrocíclicas, o que implica que o seu uso seja cada vez mais ponderado (De Graef, Claerebout, & Geldhof, 2013; Gasbarre, 2014).

Outros métodos alternativos ao controlo químico para combater as parasitoses gastrointestinais, incluem técnicas de manejo das pastagens que permitem criar pastagens "seguras" (Stromberg & Gasbarre, 2006). Isto é possível através da rotação do pastoreio que possibilita a diminuição do risco de infeção parasitária para os animais, devido ao reduzido número de larvas infetantes na erva. A rotação de pastagens é uma prática zootécnica, normalmente empregada para garantir a qualidade nutricional das pastagens e forragens, podendo também ser utilizada com o interesse de controlar o parasitismo, tendo como princípio a descontaminação através do descanso da pastagem. A prática determina o repouso da pastagem durante um determinado período, estabelecido de acordo com a ação das condições climáticas da região e as fases de vida livre dos parasitas. (Divers & Peek, 2008).

Devido à ação do sistema imunitário, a maioria dos bovinos com exposição prévia aos nemátodes gastrointestinais, pode também apresentar uma diminuição do número de ovos libertados nas fezes. Este fenómeno resulta de diversos tipos de respostas imunitárias, desde as que alteram a morfologia e fisiologia do parasita até às que protegem o hospedeiro da reinfeção, devido à eliminação das larvas em desenvolvimento ou das L3 infetantes. Esta imunidade pode ser observada em animais que foram mantidos por vários meses em sistema de pastoreio (Claerebout & Vercruysse, 2000).

Existem evidências de que também podem haver fatores genéticos que influenciam o número de ovos eliminados nas fezes como observado por Stromberg & Gasbarre, (2006), num estudo onde os machos reprodutores revelaram valores superiores aos observados nas fêmeas.

Outra forma de controlo parasitário biológico é a utilização de fungos nematófagos como *Duddingtonia flagrans* que têm a capacidade de reduzir a população de nemátodes através da sua ação predadora das formas larvares presentes nas pastagens (Stromberg & Gasbarre, 2006; Paz-Silva *et al.*, 2011).

Para diminuição da presença de nemátodes também é possível conjugar a rotação de pastagens, com a desparasitação dos animais antes da entrada no novo pasto (Divers & Peek, 2008). Estes programas são conhecidos por desparasitação estratégica, nos quais os anti-helmínticos são utilizados estrategicamente para manter a carga parasitária da pastagem o mais baixa possível e reduzir a probabilidade de infeção do hospedeiro (Stromberg & Gasbarre, 2006).

3.2.2 Classe Trematoda

A Classe Trematoda pode ser dividida em duas subclasses: Monogenea e Digenea, sendo que a última encontra-se exclusivamente em animais vertebrados e é de considerável importância veterinária (Urquhart *et al.*, 1996).

Na Europa, as infeções por trematodes mais prevalentes em bovinos são frequentemente causadas por parasitas pertencentes aos géneros *Fasciola* spp., *Paramphistomum* spp. e *Dicrocoelium* spp. (Arias *et al.*, 2011). Um fator comum a todos estes géneros é que apresentam um ciclo de vida indireto, isto é, necessitam da presença de um ou mais hospedeiros intermediários que lhes permite completar o seu desenvolvimento (Urquhart *et al.*, 1996).

Estes parasitas têm uma forma achatada dorsoventralmente, os seus ovos são libertados juntamente com as fezes do hospedeiro definitivo e as larvas desenvolvem-se normalmente no interior de um ou mais hospedeiros intermediários. São parasitas maioritariamente hermafroditas, sendo possível ocorrer fertilização cruzada ou autofertilização. Os ovos são normalmente maiores e mais densos em relação aos de nemátodes e céstodes e a maioria apresenta opérculo (Urquhart *et al.*, 1996).

***Fasciola* spp.**

A fasciolose é causada pelo tremátode *Fasciola hepatica* que apresenta grande importância nos bovinos assim como em outros ruminantes (ovinos, caprinos), podendo também afetar outros hospedeiros como equinos, suínos e o Homem. Tem uma distribuição

cosmopolita, sendo mais prevalente em zonas de clima temperado húmido e tropical (Araújo et al, 1995; Díez Baños, 2011). Estas regiões são caracterizadas por elevados níveis de humidade, chuvas frequentes e temperaturas amenas, proporcionando as condições climáticas ideais para o desenvolvimento do hospedeiro intermediário deste parasita, o caracol do género *Lymnea* spp. (Urquhart et al., 1996; Kaplan, 2001). Estas condições verificam-se normalmente em áreas de baixa altitude, visto que nas de maior altitude a temperatura é mais baixa e a taxa de evaporação de água do solo é mais elevada (Aleixo et al., 2015). Esta parasitose assume também um papel importante na saúde pública, devido ao seu carácter zoonótico (Girão & Ueno, 1985a).

A infecção do hospedeiro definitivo ocorre por via oral, através da ingestão de metacercárias, sendo que o microbiótomo deste parasita são os ductos biliares e vesícula biliar. As formas imaturas provocam a maior parte das lesões no parênquima hepático e as formas adultas são hematófagas; estão normalmente presentes nos ductos biliares e apresentam uma forma de folha, de cor cinzenta acastanhada, medindo cerca de 2,5 a 3 cm de comprimento e 1,3 cm de largura (Urquhart et al., 1996; Carrada-Bravo & Martínez, 2005).

A fasciolose é normalmente mais grave em ovinos do que em bovinos. Porém, em ambos os hospedeiros, além dos casos em que ocorre a morte dos animais, o maior prejuízo económico deve-se à rejeição de fígados no matadouro e à redução da taxa de crescimento em animais jovens, que pode atingir os 30%, inclusive em casos de infeções mais leves. No que respeita à rejeição dos fígados no matadouro, esta pode superar os 20% (Araújo et al., 2007; Díez Baños, 2011).

O ciclo de vida da *Fasciola hepatica* (Figura 2) apresenta 5 fases: excreção dos ovos juntamente com as fezes do hospedeiro e seu desenvolvimento no exterior; eclosão dos ovos e libertação do miracídio que localiza e penetra no molusco hospedeiro intermediário *Lymnea* (*Galba*) *truncatula*; desenvolvimento e multiplicação de fases larvares (esporocistos e rédias) no interior do molusco; libertação das cercárias a partir do caracol, que enquistam nas plantas passando à fase de metacercárias e ingestão das metacercárias infetantes pelo hospedeiro definitivo e consequente desenvolvimento dos adultos maduros no fígado (Díez Baños, 2011).

Este parasita apresenta um ciclo de vida indireto, necessitando de um hospedeiro intermediário para completar o seu desenvolvimento, um caracol aquático *Lymnea truncatula*. Para além desta característica, neste processo estão envolvidos vários estádios larvares nomeadamente miracídio, esporocisto, rédia, cercária e metacercária, originando a forma adulta da *F. hepatica* que produz ovos. Para que este complexo ciclo de vida seja possível, ainda é necessário que existam condições extrínsecas favoráveis de temperatura e humidade,

que determinam a sobrevivência do parasita e a duração dos seus estádios de desenvolvimento tanto no meio externo como no interior do hospedeiro intermediário.

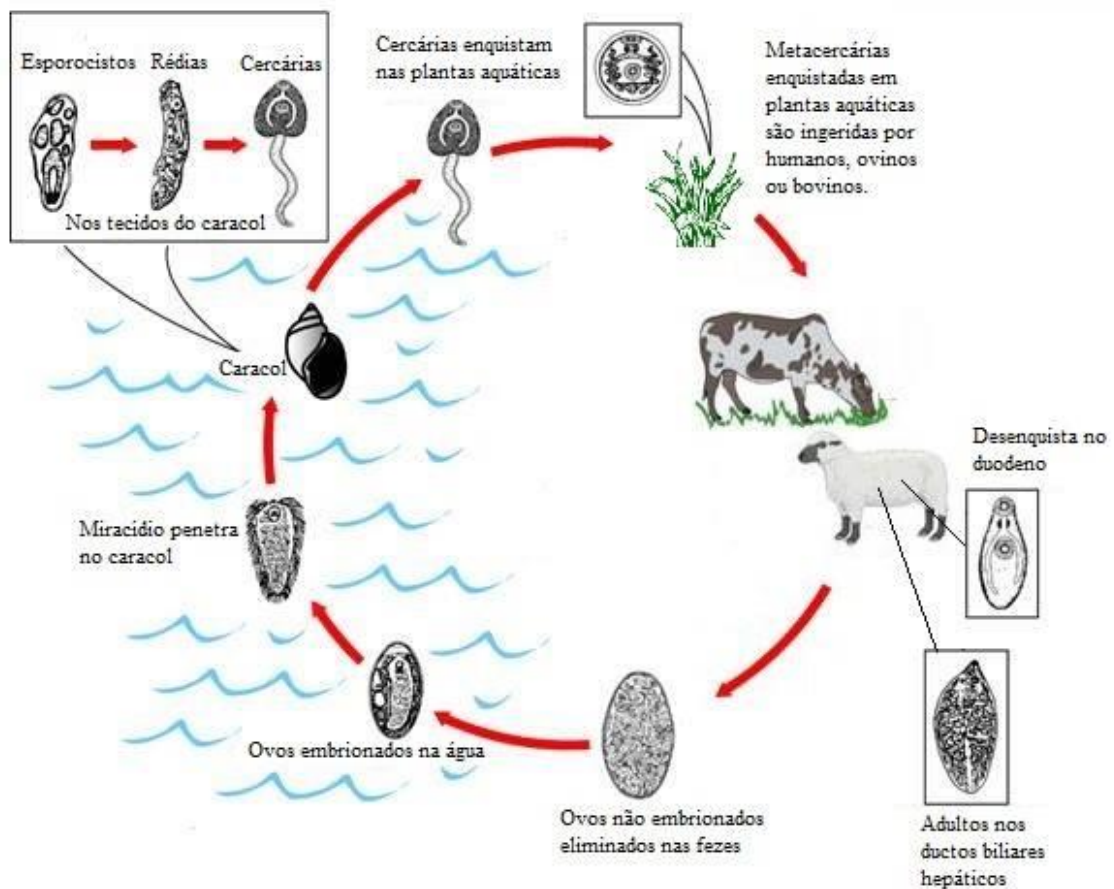


Figura 2 - Ciclo de vida da *Fasciola hepatica* (Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

Fase exógena

- Os ovos

Os ovos são excretados juntamente com a bÍlis e expulsos nas fezes. Possuem forma ovóide, cor amarelo-acastanhados, medem entre 130 a 145µm de comprimento e 70 a 90µm de largura, apresentam um opérculo e não são embrionados (Figura 3) (Thienpont *et al.*, 1979; Urquhart *et al.*, 1996). Uma característica epidemiológica importante da *F. hepatica* é o seu grande potencial biótico com produção de cerca de 20.000 a 50.000 ovos por dia (Hansen & Perry, 1994; Van Dijk *et al.*, 2010). Porém, este número pode variar conforme a idade e a resistência adquirida do hospedeiro (animais mais jovens excretam mais ovos do que animais mais velhos) e com a nutrição do parasita, sendo que em casos de calcificação dos ductos biliares, o parasita fica mais debilitado. A excreção dos ovos é intermitente devido ao facto de após serem libertados, ficarem acumulados na vesícula biliar e libertados apenas quando a

vesícula biliar se contrai, normalmente durante a digestão. Por este motivo, o número de ovos eliminados nas fezes não pode ser considerado um bom indicador da carga parasitária do hospedeiro definitivo (Hansen & Perry, 1994; Díez Baños, 2011).

Os ovos de *F. hepatica* só se desenvolvem em condições adequadas de temperatura, humidade e oxigénio. A temperatura ideal ao seu desenvolvimento está compreendida entre os 22 e 26°C, não resiste a temperaturas superiores ou à dessecação, sendo que o seu desenvolvimento cessa a uma temperatura inferior a 10°C. Para que se inicie o desenvolvimento larvar, os ovos têm de ser separados da matéria fecal pela ação da água. Contudo, os ovos podem sobreviver por vários meses nas fezes, sendo que estas constituem um reservatório (Hansen & Perry, 1994).

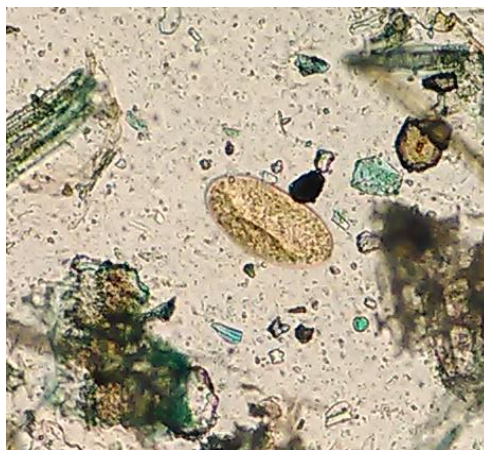


Figura 3 Ovo de *Fasciola* spp. observado na técnica de sedimentação simples (Fotografia original).

Cada ovo de *Fasciola* spp., ao contrário do que acontece nos nemátodes, tem a capacidade de se desenvolver e dar origem a centenas de novos indivíduos. Na presença de condições climáticas adequadas o embrião desenvolve-se, no interior do ovo, e dá origem à primeira fase larvar denominada de miracídio. Após ser estimulado pela luz, ocorre a libertação de uma enzima que atua sobre a substância proteica que mantém o opérculo encerrado. Quando o opérculo se abre, o miracídio é libertado para o exterior do ovo em poucos minutos. Normalmente, o desenvolvimento embrionário e eclosão dos ovos ocorrem ao fim de 9 dias (Urquhart *et al.*, 1996).

- **De miracídio a cercária**

O miracídio tem um período de vida curto, cuja duração não ultrapassa as 10 horas após a eclosão, dependendo da temperatura ambiente e da energia disponível (Hussein *et al.*, 2010). Este movimenta-se pela água através da ação dos cílios por forma a encontrar em

poucas horas um hospedeiro intermediário, um caracol, adequado para continuar o seu desenvolvimento. Este processo dá-se por quimiotaxia e fatores como o volume e velocidade da água, temperatura, pH, salinidade e turvação da água podem influenciar a detecção do caracol pelo miracídio (Christensen, 1980).

Na Europa, o hospedeiro intermediário da *Fasciola hepatica*, tal como referido anteriormente, é o caracol *Lymnea truncatula* (Figura 4) (Arias *et al.*, 2011). Porém, existem algumas evidências de que a espécie *F. hepatica* tem a capacidade de infetar outros caracóis como por exemplo, *Radix* spp., *Omphiscola glabra*, *Lymnaea palustris* e *Planorbis leucostoma*, considerados hospedeiros intermediários alternativos para este parasita (Abrous *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2015).

Lymnea truncatula é um caracol aquático que se encontra maioritariamente em água doce, pouco profunda e pouco agitada (cursos de água lentos, lagos, pastos com inundações periódicas ou em redor de fontes de água e bebedouros). O caracol emerge periodicamente, podendo permanecer também em zonas pantanosas. As condições ótimas ao seu desenvolvimento incluem um meio aquático com pH ligeiramente ácido, presença de algas, a partir das quais se alimenta e uma temperatura entre os 10 e 25°C (Díez Baños, 2011). Em temperaturas inferiores a 5°C o seu desenvolvimento é interrompido. Possui também a capacidade de sobreviver a altas e baixas temperaturas através dos mecanismos de estivação e hibernação, respetivamente (Urquhart *et al.*, 1996).

Assim, a penetração do miracídio nos tecidos moles do molusco dá-se pela combinação da ação mecânica e da secreção de enzimas citolíticas das glândulas apicais. O processo completa-se ao fim de 30 minutos, sendo que após este período o cílios desaparecem. O miracídio migra até à região periesofágica do caracol e transforma-se em esporocisto. Cada esporocisto corresponde a uma estrutura em forma de saco que contém inúmeras células germinativas que dão origem a rédias, sendo que estas migram para o hepatopâncreas do caracol. A partir das células germinativas das rédias, desenvolvem-se várias cercárias que emergem ativamente do hospedeiro intermediário em grande número, após a sua estimulação devido a variações de temperatura ou intensidade da luz. Contudo, se as condições ambientais forem desfavoráveis ao caracol, em vez de serem produzidas cercárias, é produzida uma segunda geração de rédias (Urquhart *et al.*, 1996).



Figura 4 - Exemplar da espécie *Lymnea truncatula*. (Fotografia cedida pelo Dr. Carlos Pinto)

As cercárias, em condições ideais, emergem ativamente do caracol, sendo que a maioria dos moluscos morre prematuramente devido à vasta destruição do hepatopâncreas. Assim, um miracídio, em condições ambientais favoráveis, continua o seu desenvolvimento, multiplicando-se, passando pelas fases de esporocisto e rédias, podendo dar origem a cerca de 600 a 1000 cercárias (Urquhart *et al.*, 1996; Van Dijk *et al.*, 2010).

- **De cercária a metacercária**

As cercárias deslocam-se pela água até que se fixam na vegetação, em cerca de 1 hora, segregando uma substância gelatinosa que solidifica rapidamente, enquistando-se e passando à fase de metacercárias. Estas têm um grande potencial de sobrevivência que se pode estender a meses, em condições de elevada humidade e temperatura moderada e são a forma infetante para os hospedeiros definitivos. As metacercárias são capazes de sobreviver durante o inverno, sendo que a taxa de mortalidade aumenta durante períodos prolongados de seca (Hansen & Perry, 1994; Urquhart *et al.*, 1996).

Em regiões de clima temperado as condições ótimas para o desenvolvimento do hospedeiro intermediário verificam-se entre os meses de maio e outubro, sendo que o aumento marcado do número de metacercárias no pasto ocorre durante dois períodos. O primeiro verifica-se entre agosto e outubro, devido à infeção do caracol por um miracídio que eclodiu a partir de ovos excretados na primavera ou início do verão ou a partir de ovos que sobreviveram ao inverno. Assim, o desenvolvimento do parasita no interior do caracol ocorre durante o verão e as cercárias são libertadas desde o mês de Agosto até Outubro (Urquhart *et al.*, 1996).

No segundo período, as metacercárias são observadas no pasto entre os meses de Maio e Junho. Isto deve-se à presença de hospedeiros intermediários que foram infetados no

outono anterior e cujo desenvolvimento do parasita foi interrompido devido à hibernação do caracol durante o inverno (Urquhart *et al.*, 1996).

Fase endógena

- **Infeção do hospedeiro definitivo**

Após a ingestão das metacercárias enquistadas na erva pelo hospedeiro definitivo, a parede externa do quisto formado é removida mecanicamente pela mastigação. Por sua vez, já no intestino delgado, ocorre a destruição da parte interna do quisto e dá-se a libertação das formas imaturas do parasita. Estas penetram no intestino e migram através das paredes, atravessam o peritoneu e penetram na cápsula de Glisson. Assim, as formas imaturas do parasita atravessam o parênquima hepático, em cerca de 2 meses, até chegarem aos ductos biliares menores passando para os maiores, podendo atingir ocasionalmente a vesícula biliar (Urquhart *et al.*, 1996). Durante esta fase de migração das formas imaturas ocorre a destruição do parênquima hepático (Figura 5), originando numerosas zonas hemorrágicas com reação inflamatória acompanhada de eosinofilia, fibrose e morte celular (Baños, 2011). No caso dos bovinos também ocorre a calcificação dos ductos biliares e o aumento da vesícula biliar. As migrações erráticas deste parasita são frequentes nestes hospedeiros e é possível observar parasitas encapsulados nos pulmões (Urquhart *et al.*, 1996; Díez Baños, 2011).

O período pré-patente no hospedeiro definitivo é em torno de 8 a 12 semanas, e o período mínimo necessário para concluir um ciclo de vida está compreendido entre 17 a 18 semanas. Quanto à longevidade deste parasita no organismo de um bovino calcula-se que seja menos de 1 ano (Hansen & Perry, 1994; Urquhart *et al.*, 1996).



Figura 5 - Formas adultas de *F. hepatica* (Fotografia original).

A manifestação da doença pode estar relacionada a fatores intrínsecos como a idade do animal, condição corporal e a quantidade de metacercárias ingeridas (Arias *et al.*, 2011; Baños, 2011), podendo apresentar uma forma aguda, subaguda ou crônica (Kaplan, 2001).

A forma aguda ocorre após a ingestão de um grande número de metacercárias (mais de 2000), quando estas realizam a migração através do parênquima hepático, normalmente 2 a 6 semanas, provocando hepatite traumática, com perda de sangue, anemia hemorrágica aguda (normocítica e normocrômica) e falência hepática. Os sinais clínicos no período de pré-patência tais como palidez das mucosas, dispneia, depressão, inapetência, hipertermia, dor abdominal, atonia ruminal, ascite e ocasionalmente morte súbita (Urquhart *et al.*, 1996). Ao contrário do que acontece nos ovinos e caprinos, este quadro agudo é muito raro em bovinos adultos mas pode ocorrer em vitelos (Skuce & Zadoks, 2013).

A forma subaguda pode ocorrer no fim do outono e inverno, 6 a 10 semanas após a ingestão de um menor número de metacercárias (entre 500 a 1500), durante um período suficientemente longo para não causar um processo agudo. Os sinais clínicos são semelhantes, porém a morte dos animais ocorre normalmente 10 a 20 semanas após a infecção. É de salientar que, assim como na forma aguda, a subaguda ocorre essencialmente em ovinos e caprinos, devido aos seus hábitos alimentares. Segundo Hodasi, (1972) a distribuição das metacercárias ocorre maioritariamente na base da erva. Como os pequenos ruminantes se alimentam das porções mais baixas da mesma, estão expostos a um maior número de metacercárias. Ao contrário, os bovinos alimentam-se da porção superior da erva, fazendo com que sejam menos suscetíveis à ingestão de um grande número de metacercárias (Urquhart *et al.*, 1996).

A fasciolose crônica é observada maioritariamente em bovinos, no final do inverno e início da primavera e ocorre 4 a 5 meses após a ingestão de 200 a 500 metacercárias, ou seja, a ingestão de um número reduzido de metacercárias durante um período de tempo prolongado. As reinfeções consecutivas permitem que o animal desenvolva alguma resistência ao parasita.

Na fasciolose crônica é caracterizada pelo desenvolvimento de anemia hipocrômica macrocítica, acompanhada de eosinofilia e hipoalbuminemia. Estes processos resultam no aparecimento de sinais clínicos como palidez das mucosas, edema submandibular e ascite. A anemia deve-se não só às várias hemorragias causadas pelas formas imaturas no parênquima hepático, como também à ação hematófaga contínua das formas adultas nos ductos biliares. Estas são responsáveis pela cirrose hepática progressiva com distensão dos condutos biliares, espessamento, fibrose e calcificação (Leitão, 1983; Urquhart *et al.*, 1996; Kaplan, 2001).

Nos bovinos adultos, a fasciolose crónica é a forma mais frequente e provoca importantes perdas de produtividade, provocando diretamente a diminuição do peso da carcaça e rejeição dos fígados no matadouro, ou indiretamente pela diminuição da fertilidade dos animais e da sua produção leiteira (Kaplan, 2001). Schweizer *et al.* (2005) realizaram um estudo na Suíça, em que foi estimado o total anual das perdas económicas devido à fasciolose bovina. Para isto, consideraram vários fatores como o baixo rendimento da produção de carne e leite, o aumento do período entre parto e conceção, necessidade de inseminações artificiais adicionais, fígados rejeitados no matadouro e tratamento dos animais afetados. Assim, o valor mediano das perdas económicas causadas pela fasciolose na Suíça foi cerca de 52 milhões de euros, por ano, representando um prejuízo de 299 euros por animal infetado.

Sariözkan & Yalçın (2011) realizaram outro estudo na Turquia no qual se concluiu que a estimativa do custo total da fasciolose bovina em 2010 a nível nacional teria sido de cerca de 42.8 milhões de US\$, sendo que o valor aproximado por cada bovino de leite infetado foi cerca de 430.7 US\$.

As interações entre fatores intrínsecos como a idade do hospedeiro, a resistência inata, exposição prévia e carga parasitária podem determinar o grau de patogenicidade da infeção (Kaplan, 2001). No que diz respeito à idade existem estudos que indicam que a fasciolose seja mais prevalente em animais jovens (Kaplan, 2001). Porém, existem estudos contraditórios que indicam que esta aumenta com a idade do animal (Yildirim *et al.*, 2007; Arias *et al.*, 2011).

Atualmente, também existe alguma controvérsia quanto aos mecanismos de proteção contra a reinfeção pela *F. hepatica* em ruminantes, por não estar comprovado que estes sejam imunomediados ou que resultem apenas da lesão e fibrose dos tecidos causados pela infeção primária (Molina-Hernández *et al.*, 2015).

Paramphistomum spp.

Paramphistomum cervi é uma das espécies mais comuns em bovinos, apesar de alguns estudos (Arias *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 2015) revelarem também uma prevalência crescente de *Calicophoron daubneyi* (anteriormente denominado *Paramphistomum daubneyi*). A via de infeção é oral e as formas adultas encontram-se no retículo e rúmen e as imaturas no duodeno (Urquhart *et al.*, 1996). Alguns estudos revelam que estes parasitas podem não ser muito patogénicos em zonas temperadas, apesar de poderem causar sinais de doença em animais de zonas tropicais e subtropicais, onde a sua prevalência revela ser mais

elevada (Urquhart *et al.*,1996; Divers & Peek, 2008; González-Warleta, et al., 2012). Isto deve-se ao facto das condições ambientais nestas regiões serem ótimas para o desenvolvimento do hospedeiro intermediário, que incluem a presença de humidade e maior número de áreas com águas pouco profundas ou pantanosas, na época das chuvas (Urquhart *et al.*,1996).

O ciclo de vida do *Paramphistomum* spp. é indireto e envolve um caracol aquático como hospedeiro intermediário como por exemplo o *Galba truncatula*, *Planorbis leucostoma*, *Bulinus* spp. ou *Omphiscola glabra* (Urquhart *et al.*,1996; Abrous *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2015). Em condições ideais de temperatura (20 a 30°C), o parasita realiza o seu desenvolvimento no interior do caracol até atingir a fase de cercárias (ao fim de 4 semanas) que emergem do molusco e enquistam na vegetação, passando à fase de metacercárias (Urquhart *et al.*, 1996). Posteriormente, estas formas são ingeridas pelos ruminantes juntamente com a pastagem e as formas imaturas do parasita irão instalar-se inicialmente no intestino delgado, alimentando-se a partir da mucosa intestinal. Após 6 semanas, estas migram para o retículo e rúmen, onde atingem a fase adulta, produzindo ovos que são posteriormente eliminados pelas fezes. O período pré-patente é de cerca de 7 a 10 semanas (Urquhart *et al.*,1996; González-Warleta *et al.*, 2012).

Os ovos de *Paramphistomum* spp. (Figura 6) são de cor cinzenta e quase transparentes. Possuem forma oval, são operculados, não embrionados e medem cerca de 160µm de comprimento e 90µm de largura, sendo ligeiramente maiores do que os de *Fasciola hepatica* (Thienpont *et al.*, 1979).



Figura 6 - Ovo de *Paramphistomum* spp. (Fotografia cedida pela Prof^a. Dr.^a Ana Munhoz).

Por sua vez, as formas adultas do *Paramphistomum* spp. são pequenas, com cerca 1,0 cm de comprimento, apresentam uma forma cónica e de cor rosa-avermelhada, tal como mostra a Figura 7.



Figura 7 - Oito formas adultas de *Paramphistomum* spp. recolhidas do rúmen de um bovino abatido no matadouro (Fotografia original).

Alguns estudos, segundo González-Warleta *et al.* (2012) revelaram que as formas imaturas de *Paramphistomum* spp., que migram através da mucosa do duodeno, causam lesões mais severas do que as suas formas adultas estabelecidas no retículo e rúmen. Assim, a presença de um grande número de formas imaturas no intestino de animais jovens causa normalmente enterite, caracterizada por edema, hemorragia e ulceração da mucosa intestinal. Nestes casos, ocorre a manifestação de sinais clínicos como diarreia, anorexia, desidratação e morte (Urquhart *et al.*,1996).

***Dicrocoelium* spp.**

Nos bovinos, a espécie mais relevante é o *Dicrocoelium dendriticum*, apesar de ser pouco patogénico, e ocorre em várias regiões geográficas, incluindo na Europa. À semelhança da *F. hepatica*, as formas adultas desta espécie também têm como microbiótomo os ductos biliares e a vesícula biliar (Otranto & Traversa, 2002). Porém, estas medem menos de 1,0 cm de comprimento, têm uma forma lanceolada e corpo semitransparente, tornando-os inconfundíveis (Urquhart *et al.*,1996). Os ovos deste parasita, excretados nas fezes do hospedeiro definitivo, são muito resistentes no ambiente exterior, inclusive a variações de temperatura, podendo sobreviver ao inverno e continuarem viáveis por mais de 20 meses na pastagem (Otranto & Traversa, 2002).

O ciclo de vida é indireto, sendo constituído por dois hospedeiros intermediários: um caracol terrestre (*Cionella lubrica*) e uma formiga (*Formica fusca*). Deste modo, os ovos do parasita só eclodem após serem ingeridos pelo primeiro hospedeiro intermediário, o caracol terrestre. Neste, desenvolvem-se duas gerações de esporocistos que posteriormente produzem cercárias. Estas são excretadas através da baba do caracol, formando pequenas massas

esféricas. Por sua vez, as formigas alimentam-se destas massas que contêm as cercárias, permitindo a estas continuar o seu desenvolvimento até à fase de metacercárias. Devido à sua capacidade de provocar lesão cerebral nas formigas, estas ascendem até ao topo da erva e mantêm-se aí, permitindo aumentar a probabilidade de serem ingeridas pelo hospedeiro definitivo (Urquhart *et al.*,1996).

Após a ingestão das formigas infetadas pelo gado, as metacercárias permanecem no intestino delgado do hospedeiro definitivo e posteriormente as formas larvares do *Dicrocoelium* spp. migram através do ducto colédoco até atingirem os ductos biliares menores e depois os maiores, onde se encontram normalmente as formas adulta. No caso deste parasita, as formas imaturas não efetuam migrações através do parênquima hepático e o período pré-patente é de 10 a 12 semanas. As formas adultas têm o período de vida longo, podendo sobreviver no hospedeiro definitivo por vários anos (Urquhart *et al.*,1996; Otranto & Traversa, 2002).

Na região da Galiza e norte de Portugal, Arias *et al.* (2011) concluíram que a maior frequência de infeção dos bovinos por este parasita está relacionada com a temperatura. Assim, de acordo com estes autores, a altura do ano em que a temperatura é mais alta e os níveis de precipitação são muito baixos (desde o final da primavera até ao início do outono), é quando ocorre a maioria das infeções. Isto deve-se ao facto destas condições climáticas permitirem uma elevada atividade das formigas.

Apesar do *Dicrocoelium* spp. se encontrar nos ductos biliares, o fígado pode não apresentar lesões graves, permanecendo com uma aparência normal (Urquhart *et al.*,1996). Porém, apesar de pouco comum, as infeções mais graves podem provocar uma reação inflamatória, fibrose e obstrução dos ductos biliares e da vesícula biliar. Nestes casos, os animais apresentam sinais de anemia, edema e emaciação (Otranto & Traversa, 2002). Contudo, os bovinos raramente manifestam estes sinais clínicos, sendo que a maior parte dos casos são auto-limitantes (Divers & Peek, 2008).

3.2.2.1 Métodos de diagnóstico

A. Clínico

Este baseia-se nos quadros clínicos manifestados (agudo, subagudo ou crónico), anteriormente descritos, na ocorrência sazonal, condições ambientais e na história prévia de fasciolose na exploração ou de identificação de habitats de caracóis.

B. Laboratorial

a. Bioquímico

Nos exames laboratoriais podem ser medidos alguns parâmetros sanguíneos que resultam das alterações hepáticas causadas pela *F. hepatica*. Assim, pode realizar-se a medição dos níveis plasmáticos de enzimas libertadas pelas células hepáticas danificadas, nomeadamente a glutamato desidrogenase (GLDH) e a gama glutamil transpeptidase (GGT). A primeira enzima é libertada quando os hepatócitos são danificados, sendo que os níveis plasmáticos aumentam nas primeiras semanas de infeção. Quanto à GGT, esta aumenta quando ocorre danificação das células epiteliais dos ductos biliares. Normalmente isto acontece após os parasitas atingirem e estabelecerem-se nos ductos biliares, pelo que os níveis elevados desta enzima são mantidos por períodos longos (Urquhart *et al.*, 1996). Apesar destas alterações nos níveis de enzimas hepáticas serem uma ajuda no diagnóstico, estas não são específicas de infeção parasitária.

A presença de anemia, eosinofilia e hipoalbuminémia sugerem a possível presença de parasitas no organismo do animal. Porém, na ausência destes parâmetros, não deve ser excluída a possibilidade de doença parasitária (Simsek *et al.*, 2006).

b. Coprológico

O exame coprológico constitui uma importante ferramenta no diagnóstico das parasitoses gastrointestinais. A maioria dos autores considera o exame fecal como o diagnóstico mais utilizado que confirma a presença de parasitas adultos. Porém, nos bovinos, os ovos de alguns parasitas como *Fasciola hepatica* podem ser eliminados irregularmente e em pequeno número nas fezes dos hospedeiros, podendo não ser diretamente proporcional à carga parasitária. A deteção de um só ovo num único animal numa exploração ou num grupo deve ser considerado como uma prova de infeção do rebanho (Dorchies, 2006)).

Os ovos de *F. hepatica* são pesados e densos, portanto não flutuam em água e requerem ou líquidos de elevada densidade para técnicas de flutuação ou a utilização de técnicas de sedimentação que são as mais indicadas para a sua deteção. Na literatura estão descritas diversas técnicas que têm como princípio a sedimentação para pesquisa de ovos de *Fasciola* spp., como a técnica de 4 filtros descrita por Girão & Ueno, (1985b), McMaster modificado descrita por Conceição *et al.*, (2002) ou sedimentação simples referida por Thienpont *et al.*, (1979).

A técnica de sedimentação simples com água é a mais rotineiramente empregada por ser um método simples e de baixo custo. Contudo, uma desvantagem desta técnica é a possibilidade de existirem resultados falsos negativos devido à sua baixa sensibilidade. Os resultados negativos podem estar associados também ao longo período de pré-patência (10 a 12 semanas), às cargas parasitárias baixas e ao baixo número de ovos eliminados nas fezes (Girão & Ueno, 1985a; Avcioglu *et al.*, 2014). Segundo Dorchies, (2006) se existirem menos de 20 formas adultas de *F. hepatica* nos ductos biliares a sensibilidade da técnica de sedimentação é demasiado baixa para detecção de ovos nas amostras fecais. Porém, um aumento na quantidade de fezes analisadas pode melhorar substancialmente a sensibilidade desta técnica (Charlier *et al.*, 2014). É importante referir que com estes testes, não é possível estabelecer qualquer relação entre o número de ovos presentes nas fezes e a carga parasitária (Dorchies, 2006). Os ovos observados na técnica de sedimentação devem ser diferenciados conforme as suas características morfológicas e coloração, visto que ao adicionar o corante azul de metileno ao sedimento obtido, é possível evidenciar a cor amarelo-acastanhado dos ovos de *Fasciola* spp., observando-se os de *Paramphistomum* spp. com uma coloração acinzentada (RVC/FAO, 2016).

c. Serológico

Os testes serológicos utilizados no diagnóstico de infecções por *F. hepatica* incluem hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e a técnica ELISA (do inglês "*enzyme-linked immunosorbent assay*"), sendo que a última é a mais utilizada nos estudos realizados em bovinos. A técnica de ELISA baseia-se na detecção de anticorpos e/ou antígenos em amostras de sangue, fezes ou leite. As grandes vantagens deste tipo de teste são apresentar uma elevada especificidade e sensibilidade, permitindo também o diagnóstico precoce da fasciolose ainda durante o período pré-patente (Aleixo *et al.*, 2015).

ELISA indireto

- Pesquisa de anticorpos no sangue

Dentre os testes de imunodiagnóstico disponíveis destaca-se o teste ELISA indireto, sendo amplamente indicado para estudos epidemiológicos e representando uma ferramenta importante para a detecção de infecções por *F. hepatica*. Este teste tem a vantagem de permitir o diagnóstico precoce desta parasitose, no período pré-patente durante o qual é possível a detecção de

anticorpos. Isto possibilita por vezes evitar o impacto negativo da doença nos animais através da administração precoce de fasciolícidias, reduzindo os danos do tecido hepático causados pela migração das formas imaturas do parasita, a excreção fecal de ovos pelo hospedeiro e baixa produtividade (Dixit *et al.*, 2004; Molloy *et al.*, 2005; Sanchez-Andrade *et al.*, 2000). Contudo, é necessário ter em atenção que o reconhecimento da IgG sérica específica da *Fasciola* spp. pode persistir por longos períodos, mesmo após as formas adultas já não estarem presentes no fígado (Sánchez-Andrade *et al.*, 2000).

Atualmente o teste de ELISA indireto é amplamente utilizado, tendo como base a pesquisa de anticorpos circulantes a partir da utilização de antígenos somáticos f2 purificados e de superfície, antígenos de excreção/secreção (ES) bruto ou sob a forma de frações purificadas/recombinantes como a enzima catepsina L1 (Díez Baños, 2011). Esta consiste numa das frações antigénicas mais ativas das células do epitélio intestinal, que realiza clivagem das imunoglobulinas e inibe a ação dos eosinófilos sobre os parasitas jovens (Cornelissen *et al.*, 2001).

Contudo, comprovou-se que a qualidade do antígeno é essencial para o melhor rendimento desta técnica, dado que a aplicação de um extrato bruto facilita a ocorrência de reações cruzadas ou inespecíficas (Díez Baños, 2011).

Assim, recentemente têm sido produzidas proteínas purificados/recombinantes obtidos a partir dos antígenos de ES como a proteína recombinante de 2,9kDa de *F. hepatica*, denominada FhrAPS (Dorchies, 2006; Arias *et al.*, 2010; Díez Baños, 2011).

Alguns estudos têm demonstrado que a utilização da proteína recombinante FhrAPS apresenta algumas vantagens: possibilitar a deteção de anticorpos IgG numa fase inicial da doença (Paz-Silva *et al.*, 2005); apresentar um bom potencial para estudos de campo para determinação da prevalência de infeções recentes e ativas por *F. hepatica* (Arias *et al.*, 2007) e ser um método promissor para avaliar a eficácia dos fasciolícidias também em situações de campo (Arias *et al.*, 2009; Díez Baños, 2011).

Segundo Sánchez-Andrade *et al.* (2000) a utilização de uma técnica de ELISA capaz de detetar os antígenos circulantes em conjunto com uma técnica de ELISA para deteção de anticorpos no soro pode oferecer uma forma

de diagnóstico de fasciolose mais fiável do que o exame coprológico clássico. Os mesmos autores referem que o resultado da conjugação destes dois tipos de técnicas é bastante apropriado para estudos epidemiológicos em áreas com elevado número de animais.

- Pesquisa de anticorpos no leite

A detecção de fasciolose em bovinos, a partir de amostra recolhida do tanque de leite é mais rápida e implica menos custos. Porém, no caso da técnica de f2-ELISA, esta aparenta ser menos fiável do que pela técnica de ELISA para detecção de anticorpos no soro, visto que apresenta uma sensibilidade e especificidade de 96 e 80%, respetivamente (Salimi-Bejestani *et al.*, 2005). Com esta técnica foi demonstrado que apenas se conseguem identificar casos em que exista uma prevalência de infeção superior aos 60% no efetivo. Por sua vez, Bloemhoff *et al.* (2015) utilizaram outra técnica ELISA, com base na enzima catepsina L1 recombinante como antígeno, demonstrando que este teste apresentava uma sensibilidade e especificidade de 98%.

ELISA direto

- Pesquisa de antígenos no sangue

Esta técnica é ideal para confirmar a presença de infeção ativa por *F. hepatica* em fases precoces da doença desde a primeira até à quinta semana após a infeção (Paz-Silva *et al.*, 2003). Durante a fase migratória dos parasitas, os antígenos da *F. hepatica* estão em circulação e acessíveis ao sistema imunitário, sendo possível a sua detecção através de provas serológicas tal como a técnica de ELISA em sanduiche. Após o parasita se estabelecer nos ductos biliares, passa a haver menos antígenos em circulação, pelo que a sua detecção deve ser dirigida a amostras fecais ou biliares. Assim, a ELISA em sanduiche demonstrou ser um método sensível, específico e adequado para a detecção da *F. hepatica* no soro, no diagnóstico da fasciolose. Quando combinado com uma técnica de ELISA para detecção de anticorpos, permite recolher informações mais claras acerca da interação hospedeiro-parasita (Sánchez-Andrade *et al.*, 2000).

- Pesquisa de copro-antigénios

A técnica de ELISA-sanduiche é capaz de detetar copro-antigénios, mas, um método de captura ultra sensível e específico, utilizando anticorpos monoclonais (MM3), foi descrito por Mezo *et al.* (2004). Este consiste na deteção de copro-antigénios de ES específicos de *F. hepatica*, nas fezes, com base em anticorpos monoclonais MM3. De acordo com os mesmos autores, este teste permitiu detetar 100% dos bovinos incluídos no estudo, que apresentavam no mínimo 2 Fascíolas no seu organismo e 2 de 7 bovinos que apresentavam apenas 1 Fascíola.

A grande vantagem da conjugação de um teste ELISA direto com um indireto é a possibilidade de distinguir infeções recentes e ativas, causadas por formas imaturas de *F. hepatica* e de infeções causadas por formas adultas deste parasita. Desta forma, é possível elaborar um plano de desparasitação adequado e económico para o produtor. Isto prende-se ao facto de que, em países onde são permitidos, os antiparasitários com ação sobre formas imaturas da *F. hepatica* são mais caros do que aqueles com ação sobre as formas adultas deste parasita (Sánchez-Andrade *et al.*, 2000).

C. Necrópsia

O diagnóstico *pos-mortem* permite identificar macroscopicamente as lesões e os parasitas presentes no fígado. As lesões normalmente detetadas incluem zonas de fibrose no parênquima hepático correspondentes aos trajetos de migração das formas imaturas de *F. hepatica* e ductos biliares espessados e calcificados. A parede da vesícula biliar pode apresenta-se distendida e o seu conteúdo ser escuro, mais espesso e contendo alguns exemplares de *F. hepatica*.

No caso dos géneros *Dicrocoelium* spp. e *Paramphistomum* spp., o diagnóstico é essencialmente realizado a partir da observação de ovos através do exame coprológico, pela técnica de sedimentação, bem como da observação das lesões e dos parasitas através da necrópsia (Urquhart *et al.*, 1996; Otranto & Traversa, 2002).

3.2.2.2 Tratamento e controle

O tratamento e controle da fasciolose são realizados através da administração terapêutica de anti-helmínticos aos animais doentes e através da implementação de medidas que permitam reduzir a população de hospedeiros intermediários, respetivamente.

Quanto ao tratamento desta doença através do uso de anti-helmínticos, existem alguns princípios ativos com ação sobre as formas imaturas e sobre as formas adultas da *F. hepatica*. Atualmente em Portugal existem disponíveis no mercado fármacos fasciolícidias, cujos princípios ativos são: albendazol, closantel, ivermectina juntamente com clorsulon, nitroxinil e moxidectina combinada com triclabendazol (Urquhart *et al.*, 1996; Hsu, 2008; Apifarma, 2016; SimposiumVet, 2016). O triclabendazol, closantel e o nitroxinil têm ação sobre formas imaturas do parasita com mais de 6 a 8 semanas de desenvolvimento e adultos. Por sua vez, substâncias ativas como o clorsulon e o albendazol apenas permitem eliminar formas adultas do parasita (Forbes *et al.*, 2014; Apifarma, 2016; SimposiumVet, 2016).

O triclabendazol tem sido o fármaco de eleição para combater a fasciolose devido à sua ação eficaz sobre formas adultas e imaturas do parasita (Sargison, 2012; Brockwell *et al.*, 2014), porém, segundo alguns autores (Robles-Pérez *et al.*, 2013; Sargison 2012; Brockwell *et al.*, 2014; Ortiz *et al.*, 2013), a resistência do parasita a este produto tem sido identificada em várias partes do mundo, como Austrália, Europa e América do Sul. Para além disto, Álvarez-Sánchez *et al.*, (2006) e Novobilský & Hoglund (2015) concluíram que a *F. hepatica* também apresenta resistência ao albendazol e ao closantel.

Outras desvantagens do tratamento quimioterápico estão relacionadas com o intervalo de segurança para a carne que pode ir de 60 a 143 dias, exceto no caso do albendazol, que são apenas 14 dias. Por sua vez, a maioria destas substâncias não pode ser administrada em fêmeas lactantes cujo leite se destina a consumo humano, com igual exceção do albendazol, que apenas requer um intervalo de segurança de 4 dias para o leite. Outras fórmulas disponíveis no mercado, que incluem substâncias ativas como o triclabendazol conjugado com moxidectina, closantel e nitroxinil não podem ser administradas a estes animais, incluindo durante o período de secagem. No caso da ivermectina conjugada com clorsulon, existem em Portugal várias fórmulas que não são possíveis utilizar em bovinos leiteiros como é o caso do Alverin Plus®, Animec Super®, Bimectin Plus®, Virbamec F® e Clovertin Plus®. Contudo, produtos como o Ivomec F e o Clormec Plus podem ser utilizados nestes animais, durante o período de secagem, até 28 dias antes da data prevista do parto. Todas estas limitações aplicadas aos bovinos de aptidão leiteira, reduzem a lista de opções de

fasciolícidias disponíveis no mercado, dificultando o tratamento desta doença nestes animais (Schweizer *et al.*, 2005; Apifarma, 2016; SimposiumVet, 2016).

Para elaborar e executar um programa de controlo da população de hospedeiros intermediários da *F. hepatica*, existem algumas medidas que devem ser seguidas e aplicadas individualmente ou combinadas entre si. Estas medidas incluem a administração estratégica de anti-helmínticos; a redução do número de hospedeiros intermediários através do controlo químico ou biológico e o bom manejo das pastagens (Hansen & Perry, 1994).

Quanto à administração estratégica de anti-helmínticos, esta pode ser realizada de forma profilática, curativa ou como tratamento adicional. O tratamento profilático dos ruminantes deve ser aplicado normalmente no final de um período de atividade biológica reduzida tanto do parasita como dos hospedeiros intermediários. Considera-se um período de atividade biológica reduzida destes organismos quando o desenvolvimento das fases larvares do parasita no interior dos ovos é reduzida e quando as taxas de reprodução dos caracóis são baixas, devido à presença de condições ambientais desfavoráveis (épocas prologadas de seca ou extremamente frias). Assim, o efeito profilático é conseguido, reduzindo a contaminação da pastagem pelos ovos do parasita, antes da época cujas condições climáticas são favoráveis à atividade do mesmo e dos moluscos. Por sua vez, o tratamento curativo deve ser aplicado um a dois meses após o pico de infeção dos hospedeiros definitivos. O efeito curativo é conseguido pela aplicação de um único tratamento de forma a remover a carga parasitária residual adquirida a partir das metacercárias que sobreviveram na pastagem. Em relação às áreas altamente contaminadas, onde as variações sazonais não afetam significativamente o ciclo de vida do parasita, é necessário um tratamento adicional. Isto também pode ser realizado em zonas onde ocorre uma elevada ingestão de metacercárias, como resultado de pastoreio intensivo em áreas húmidas, durante a estação seca (Hansen & Perry, 1994).

O uso de moluscicidas para o controlo químico dos hospedeiros intermediários da *F. hepatica* é uma ferramenta importante para diminuir a prevalência desta doença. Porém, antes de considerar a aplicação destes produtos, deve notar-se que existem algumas áreas topograficamente desfavoráveis para o uso de moluscicidas; estes apresentam toxicidade para o ambiente; é necessário a cooperação dos proprietários dos terrenos vizinhos de forma a permitir um bom resultado; é necessária a sua aplicação regular (pelo menos anual), pois pode ocorrer uma rápida repopulação de caracóis; não são específicos para apenas uma espécie de caracóis e são dispendiosos. Posto isto, é possível optar por um método biológico para o controlo dos caracóis. Em várias partes do mundo existem estudos que indicam um elevado número de plantas com propriedades moluscicidas, pelo que a sua plantação em zonas

húmidas pode reduzir o número de caracóis (Hansen & Perry, 1994). Segundo Teixeira *et al.* (2012) existem três plantas endémicas açorianas (*Hedychium gardnerianum*, *Laurus azorica* e *Juniperus brevifolia*) que apresentam forte potencial moluscicida, com uma elevada toxicidade para as formas larvares e adultas de *Radix peregra*, um potencial hospedeiro intermediário alternativo da *F. hepatica*.

É igualmente importante o bom manejo das áreas de pastagem para evitar a infeção dos animais pela *F. hepatica*. Assim, medidas como a drenagem dos terrenos, ou evitar o pastoreio nas zonas de habitat dos caracóis, inclusive pela aplicação de vedações nestes locais, são importantes para o controlo desta doença (Hansen & Perry, 1994; Arias *et al.*, 2011).

Recentemente, tem sido realizados alguns estudos no sentido de desenvolver vacinas contra a *F. hepatica*. Porém, um dos maiores desafios é a eficácia necessária para gerar um melhoramento da produtividade dos animais. Isto está relacionado com a intensidade das cargas parasitárias que induzem perdas de produção em pequenos e grandes ruminantes. Estudos prévios indicam que estas perdas são significativas em bovinos, quando estão presentes mais do que 30 a 40 fascíolas. Assim, uma vacina ótima para a fasciolose é aquela que possa permitir a redução da carga parasitária para níveis inferiores a estes limiares, por forma a garantir benefícios sustentáveis na produção (Toet *et al.*, 2014).

Existem vários estudos nesta área que envolvem a utilização de antigénios com origem nos produtos de ES das formas adultas da *F. hepatica*, como por exemplo, as proteases da catepsina L, glutathione-S-transferase (GST) e proteína de ligação dos ácidos gordos. Verificou-se que a utilização destes antigénios induziu uma proteção significativa em bovinos e ovinos, pelo que estes podem ser interessantes para o desenvolvimento de vacinas contra a *F. hepatica* (Molina-Hernández *et al.*, 2015).

Os princípios ativos descritos no tratamento da paramfistomose em bovinos são por exemplo a oxiclozanida, clioxanida, niclosamida e resorantel (Hansen & Perry, 1994). Contudo, a oxiclozanida é considerada como o fármaco de primeira escolha para o tratamento deste parasita, com ação sobre as formas imaturas e adultos (Urquhart *et al.*, 1996). Há vários países onde este fármaco não está disponível, como é o caso de Portugal, pelo que se deve recorrer ao uso de closantel como alternativa, pois este apresenta uma eficácia semelhante à oxiclozanida (Ariasa *et al.*, 2013). Relativamente ao controlo do *Paramphistomum* spp., este baseia-se nos mesmos princípios que se aplicam na fasciolose: restringir o acesso dos animais a áreas pantanosas, ou com águas paradas e pouco profundas, através da aplicação de vedações, por forma a evitar a ingestão de pastagem contaminada (Tilling, 2013).

Relativamente ao *D. dendriticum*, devido ao seu complexo ciclo de vida e epidemiologia, o seu controlo torna-se difícil. Deste modo, este tem sido realizado com base nas práticas de manejo, evitando o pastoreio durante o período da manhã ou ao entardecer, durante os quais há um maior risco de infeção pelas formigas, ou até mesmo pela eliminação dos seus ninhos (Arias *et al.*, 2011). Em relação ao tratamento anti-helmíntico, têm sido utilizados vários princípios ativos como os benzimidazóis (albendazol, triclabendazol, fenbendazole, mebendazole, etc.) e pro-benzimidazóis (tiofanato), em doses superiores às utilizadas contra céstodes, nemátodes pulmonares e gastrointestinais e outros tremátodes (Otranto & Traversa, 2002). Entre os vários anti-helmínticos existentes, apenas o tiofanato apresenta eficácia contra este parasita, em bovinos (Otranto & Traversa, 2003). Contudo, este princípio ativo não se encontra disponível em Portugal (Apifarma, 2016; SimposiumVet, 2016).

3.2.3 Classe Cestoda

Nos ruminantes, os céstodes podem ser classificados em dois grupos distintos: um em que os ruminantes atuam como hospedeiros definitivos (inclui as espécies de céstodes gastrointestinais e céstodes presentes no fígado) e um outro em que os bovinos, búfalos, ovelhas e cabras atuam como hospedeiros intermediários para as fases larvares de *Cysticercus*, *Coenurus* e *Echinococcus granulosus* (quisto hidático). No último grupo, os parasitas adultos podem estar presentes no intestino delgado dos carnívoros domésticos e selvagens (*Taenia ovis*, *T. hydatigena*, *T. multiceps*, *Echinococcus granulosus*) e no Homem (*T. saginata*) (Hansen & Perry, 1994).

Como esta dissertação incide apenas sobre as parasitoses gastrointestinais, somente será feita referência ao grupo dos céstodes gastrointestinais, onde os bovinos são considerados os hospedeiros definitivos. A este grupo pertencem os géneros *Moniezia*, *Thysaniezia* e *Avitellina* spp.. Porém, visto que os dois últimos géneros não são observados na Europa, apenas se considera importante o género *Moniezia* spp. (Hansen & Perry, 1994).

***Moniezia* spp.**

A espécie que afeta principalmente os bovinos é a *Moniezia benedeni*, porém *Moniezia expansa* também pode infetar ocasionalmente estes animais (Urquhart *et al.*, 1996).

Tal como as restantes espécies da classe Cestoda, as formas adultas deste parasita são constituídas pelo escólex, que está normalmente ancorado às paredes do intestino delgado do hospedeiro definitivo, um pescoço curto e uma cadeia de segmentos, denominado estróbilo, sendo que cada segmento corresponde a uma proglótide. Ainda em relação às formas adultas destas espécies, estas podem medir cerca de 2 metros de comprimento ou mais, sendo que a largura da *M. benedeni* é cerca de 2,5 cm e a da *M. expansa* é aproximadamente 1,5 cm. Porém, para poder diferenciar as duas espécies é necessário observa-las ao microscópio de forma a visualizar o bordo posterior de cada proglótide, onde se localizam as glândulas interproglotídeas dispostas numa fila contínua. Na *M. expansa*, estas glândulas estão presentes ao longo de toda a margem do segmento, enquanto que na *M. benedeni* estas apenas ocupam um curto espaço central (Urquhart *et al.*, 1996).

Os ovos de *Moniezia expansa* são irregularmente triangulares e piramidais, com um diâmetro entre 50 a 60µm. No caso da *Moniezia benedeni* (Figura 8), os ovos têm uma forma quadrangular e medem cerca de 80 a 90µm de diâmetro. Ambos têm uma cápsula espessa, são de cor cinzenta escura e apresentam um embrião rodeado por um aparelho piriforme (Thienpont *et al.*, 1979).



Figura 8 - Ovo de nemátode tipo strongilídeo (a cima) e um ovo de *Moniezia benedeni* (a baixo), observados através da técnica de Willis (Fotografia original).

Quando as proglótides ou os ovos são eliminados através das fezes na pastagem, as oncosferas libertadas pelos ovos são ingeridas por ácaros oribatídeos que servem como hospedeiros intermediários. Os embriões hexacantos migram para a cavidade corporal do ácaro onde se desenvolvem em larvas cisticercóides ao fim de 1 a 4 meses. Posteriormente, a infecção do hospedeiro definitivo dá-se por ingestão dos ácaros infetados durante o pastoreio. O período pré-patente é de aproximadamente 6 semanas, porém as formas adultas têm um

período de vida curto, pelo que as infeções patentes duram apenas cerca de 3 meses (Urquhart *et al.*,1996).

As espécies do género *Moniezia* spp. não apresentam muita patogenicidade, a não ser no caso de infeções severas, poderem causar diarreia e até obstrução intestinal. Este tipo de infeções é mais comum em animais jovens, durante o seu primeiro ano de vida e a sua incidência está relacionada com os períodos de maior atividade dos ácaros que é durante o verão nas regiões temperadas. As larvas cisticercóides têm um papel importante na epidemiologia da *Moniezia* spp. pois são capazes de sobreviver durante o inverno no interior dos ácaros (Urquhart *et al.*,1996).

3.2.3.1 Métodos de diagnóstico

As infeções por este parasita são de fácil diagnóstico tanto em vida, como na necropsia devido à presença de proglótides nas fezes. Também podem ser realizadas técnicas coprológicas como a técnica de flutuação para identificar os ovos do parasita e a técnica de contagem de McMaster, para determinar o número de ovos presentes numa grama de fezes (Hansen & Perry, 1994; Urquhart *et al.*,1996).

3.2.3.2 Tratamento e Controlo

As infeções causadas pelas espécies de *Moniezia* spp. são consideradas não patogénicas, pelo que o tratamento específico para estes parasitas, não é normalmente recomendado. Para além disto, os animais jovens que não recebem qualquer tratamento desenvolvem imunidade, tornando-os resistentes às reinfeções. Contudo, tratamentos regulares interferem com o desenvolvimento desta imunidade, podendo resultar em reinfeções. Em casos de infeções severas, é aconselhado modificar as estratégias de tratamento e controlo aplicadas aos nemátodes, incluindo assim o uso de anti-helmínticos de largo espectro, que sejam também eficazes contra céstodes (Hansen & Perry, 1994). Existe um grande número de benzimidazóis que podem ser utilizados nestes casos, sendo que os que se encontram disponíveis em Portugal são o albendazol, febendazol e oxfendazol (Apifarma, 2016; SimposiumVet, 2016).

O controlo desta parasitose é dirigida aos hospedeiros intermediários da *Moniezia* spp.. Foi demonstrado que o habitat dos ácaros oribatídeos pode ser destruído através da

mobilização do solo, sendo que em locais onde isto se possa realizar, os pastos ficam livres de céstodos por vários anos (Hansen & Perry, 1994).

3.2.4 Classe Coccidia

Relativamente ao Filo Protozoa, na subclasse Coccidia, o género *Eimeria* é o mais importante agente etiológico das cocidioses gastrointestinais, sendo responsável por infetar várias espécies de animais tais como ovinos, caprinos e bovinos (Hansen & Perry, 1994). Das 13 espécies identificadas, *Eimeria zuernii* e *Eimeira bovis* são as mais patogénicas para os bovinos (Urquhart *et al.*,1996).

Esta doença é dependente de algumas condições epidemiológicas que incluem uma elevada ingestão de oocistos, o que ocorre normalmente em locais com um grande número de animais e pouco higienizados ou no pasto, perto dos bebedouros (Urquhart *et al.*,1996).

Todas as espécies de *Eimeria* spp. partilham um ciclo de vida monoxeno (necessitam de apenas um hospedeiro e não apresentam fase larvar), que se encontra dividido em 3 fases: esporulação, infeção e esquizogonia e, por fim, gametogonia e formação de oocistos. A esporulação ocorre em condições ótimas de elevada humidade e a uma temperatura de cerca de 27°C. Assim, em cada oocisto ocorre a formação 4 esporocistos, com 2 esporozoítos, passando a designar-se oocisto esporulado. Os oocistos são ovoides e medem entre 15 e 50µm de diâmetro. A fase de infeção e esquizogonia dá-se por reprodução assexuada e ocorre quando o hospedeiro ingere os oocistos esporulado, que libertam do seu interior os esporocistos e que, por sua vez, libertam os esporozoítos. Estes últimos penetram normalmente nas células do epitélio intestinal, passando à fase de trofozoíto, que mais tarde dão origem á primeira geração de merozoítos, contidos no seu interior. Finalmente, ocorre a rotura da célula parasitada e libertam-se os merozoitos, que invadem outras células vizinhas onde iniciam o desenvolvimento de uma segunda geração mais reduzida de merozoítos. A fase de gametogonia e formação de oocistos, ocorre por reprodução sexuada, pois a segunda geração de merozoítos dá origem aos microgamontes (masculino) e macrogamontes (feminino) que são libertados para o exterior das células intestinais. Após a fertilização, de um macrogamonte por um microgamonte, ocorre a formação de uma parede em redor do zigoto, passando a designar-se oocisto e que mais tarde é libertado juntamente com as fazes do hospedeiro. O período pré-patente da *E. zuernii* e *E. bovins* é de 17 e 18 dias, respetivamente (Urquhart *et al.*,1996; Dauschies & Najdrowski, 2005).

A *Eimeria zuernii* e a *Eimeira bovis* são particularmente patogénicas, atacando o epitélio do ceco e cólon dos animais infetados. Normalmente, os animais mais velhos adquirem imunidade a este tipo de infeções, mas permanecem como reservatórios de coccídeas e continuam a excretar oocistos nas fezes respetivamente (Urquhart *et al.*,1996). Por sua vez, os animais mais jovens, com idade entre as 3 semanas e os 6 meses, são mais suscetíveis à coccidiose e adquirem a infeção após a ingestão dos oocistos esporulados presentes na comida e na água (Daugschies & Najdrowski, 2005). Assim, infeções sucessivas nestes animais podem fazer com que estes excretem um grande número de oocistos que contaminam bastante as suas instalações e os locais com água(Hansen & Perry, 1994).

A multiplicação das espécies de *Eimeria* spp. nas células do intestino provoca lesões na mucosa, cuja severidade depende do número de oocistos ingeridos. Nestes casos, o sinal clínico mais frequentemente observado é a diarreia sanguinolenta, sendo que esta é normalmente acompanhada de febre, dor abdominal, tenesmo, anemia, desidratação, enfraquecimento, anorexia, perda de peso e, eventualmente, a morte dos animais afetados (Daugschies & Najdrowski, 2005).

3.2.4.1 Métodos de diagnóstico

Em casos de fezes hemorrágicas que contenham tecidos necrosados, a possibilidade de coccidiose causada por *Eimeria zuernii* e/ou *Eimeira bovis* deve ser sempre considerada. A observação microscópica de oocistos nas fezes do animal, através da técnica de flutuação e contagem de oocistos pela técnica de McMaster também são ferramentas importantes neste processo. Por sua vez, a análise das condições de higiene em que são mantidos os animais e do historial clínico da exploração também são fatores importantes no diagnóstico parasitológico (Hansen & Perry, 1994; Urquhart *et al.*,1996; Daugschies & Najdrowski, 2005).

3.2.4.2 Tratamento e controlo

No caso da coccidiose é recomendado administrar um tratamento sintomático, que suprima a diarreia e restantes sinais clínicos, juntamente com um tratamento específico para o parasita. Relativamente ao tratamento específico da coccidiose, estão indicados vários princípios ativos como sulfonamidas, toltrazuril, diclazuril, amprolium, decoquinato e monensina (Daugschies & Najdrowski, 2005). Em Portugal, para o tratamento da coccidiose,

apenas estão disponíveis alguns fármacos que incluem a sulfadimetoxina, toltrazuril, diclazuril, decoquinato e monensina (Apifarma, 2016; SimposiumVet, 2016). O controlo desta parasitose, por sua vez, baseia-se num bom manejo, particularmente em relação aos comedouros e bebedouros, que devem ser regularmente higienizados, bem como as camas, que devem ser mantidas secas e limpas. Outra medida que deve ser implementada é o isolamento dos animais afetados, prevenindo assim a propagação da doença (Urquhart *et al.*, 1996).

4. Trabalho experimental

4.1 Objetivos

O presente estudo sobre as parasitoses gastrointestinais em explorações de bovinos de leite da ilha de S. Miguel, nos Açores, foi realizado no período de 4 de Janeiro a 8 de Julho do ano de 2016 e teve como principais objetivos:

- 1) Identificar as principais parasitoses e o grau de parasitismo dos bovinos de leite de algumas explorações da ilha de S. Miguel, através de rastreio coprológico;
- 2) Identificar quais os fatores de risco relacionados com as práticas de manejo, que podem promover a ocorrência das parasitoses gastrointestinais;
- 3) Determinar a seroprevalência de *Fasciola hepatica* nos bovinos leiteiros através do rastreio serológico pela técnica de ELISA indireto;
- 4) Avaliar quais os fatores de risco que podem condicionar a ocorrência de fasciolose;
- 5) Elaborar um cartograma com a distribuição geográfica dos casos positivos à técnica de ELISA indireto.

4.2 Material e Métodos

O trabalho experimental que está na origem desta dissertação divide-se em duas componentes principais:

- Análise coprológica para identificação das principais parasitoses e o grau de parasitismo;
- Análise serológica para deteção de anticorpos contra *Fasciola hepatica*.

4.2.1 Seleção das explorações

Para este estudo foram seleccionadas 155 explorações (n=155). Estas eram todas localizadas na ilha de S. Miguel, nos Açores. A distribuição das explorações seleccionadas foi realizada a partir de dados preliminares de outro estudo científico (ainda não publicado) que também visa caracterização da distribuição de fasciolose nesta ilha através de dados colhidos no matadouro.

De acordo com as informações obtidas pelo estudo em matadouro acima referido, as freguesias que apresentaram uma prevalência de fasciolose menor que 6% constituíram um

grupo que foi denominado "zona de baixa prevalência"; naquelas em que a prevalência estava entre 6% e 14% foi denominada "zona de média prevalência" e as freguesias com prevalências entre 14% e 50% formaram o grupo denominado "zona de alta prevalência".

Com base nas informações acima descritas, procedeu-se à recolha de amostras em 59 explorações na zona de baixa prevalência, 45 na de média prevalência e 51 na zona de alta prevalência.

4.2.2 Seleção dos animais

As vacas leiteiras incluídas no estudo eram maioritariamente da raça Holstein-Frísia, havendo também alguns bovinos da raça Jersey e outros resultantes do cruzamento com Angus.

Todos os animais incluídos neste estudo eram fêmeas adultas em produção que já tinham realizado pelo menos um parto e que estavam em lactação no momento da recolha das amostras de fezes e sangue.

4.2.3 Inquérito aos produtores

Foi realizado um inquérito aos proprietários das explorações incluídas no estudo (Anexo 1), de forma a perceber quais as práticas de manejo utilizadas e informações acerca dos animais amostrados.

4.2.4 Análises coprológicas

Colheita e acondicionamento das amostras

Foi realizada colheita de cerca de 10g de fezes diretamente da ampola retal utilizando-se uma luva de palpação de um total de 447 animais (n=447).

As fezes foram acondicionadas em contentores de plástico (Figura 9) ou nas próprias luvas de palpação, devidamente identificadas e mantidas sob refrigeração a uma temperatura de 4°C até ao momento da análise laboratorial.

De cada 3 amostras recolhidas foi retirada uma alíquota para formar um *pool* de fezes, correspondente a cada exploração.



Figura 9 - Acondicionamento das amostras para envio ao laboratório (Fotografia original).

Análise coprológica

As análises coprológicas foram realizadas no laboratório da Associação de Jovens Agricultores Micaelenses e no Departamento de Parasitologia do Laboratório Regional de Veterinária na ilha Terceira.

As técnicas coprológicas utilizadas foram a técnica de McMaster (quantitativa), flutuação de Willis e de sedimentação simples (qualitativas). Estas técnicas foram realizadas em sequência, utilizando a mesma sub-amostra, de acordo com os protocolos estabelecidos pelo Royal Veterinary College (RVC) e pela FAO (Hansen & Perry, 1994; RVC/FAO, 2016).

Na técnica de McMaster (Figura 10) foi realizada a quantificação de ovos de nemátodes, céstodes ou oocistos presentes em 1 grama de fezes (OPG), permitindo a classificação da infeção. Nesta técnica utilizou-se uma solução saturada de açúcar onde a finalidade foi suspender os ovos devido à diferença de densidade utilizando-se uma câmara denominada "câmara de McMaster" (Thienpont, Rochette, & Vanparijs, 1979).

A segunda técnica utilizada foi a de flutuação pelo método de Willis recorrendo-se a uma solução saturada de açúcar e que permitiu identificar ovos de nemátodes, céstodes e oocistos presentes nas fezes (Hansen & Perry, 1994).

Também foi utilizada a técnica de sedimentação simples para a deteção de ovos de tremátodes como *Fasciola* spp. e *Paramphistomum* spp. pois estes ovos são maiores e mais pesados, podendo ser observados no sedimento (Hansen & Perry, 1994). Os protocolos das técnicas coprológicas utilizadas encontram-se no Anexo II.



Figura 10 - Técnica de McMaster (Fotografia original).

4.2.5 Análise serológica

Colheita das amostras

Para a realização desta parte do estudo, foram recolhidas amostras a um total de 443 animais (n=443).

As amostras de sangue foram colhidas a partir da veia coccígea, aproximadamente 3ml de sangue por animal em tubos de separação rápida de soro (Figura 11). Após a recolha, cada tubo foi devidamente identificado e refrigerado a uma temperatura de 4°C. Posteriormente, o soro correspondente a cada animal foi separado para um tubo de Eppendorf devidamente identificado e congelado a uma temperatura de - 20°C (Figuras 12).



Figura 11 - Tubo de separação rápida de soro (Fotografia original).



Figura 12 - Tubos de Eppendorf com soros de bovinos congelados a -20°C (Fotografia original).

Análise serológica

Os soros foram transportados sob refrigeração e analisados no laboratório da Faculdade de Veterinária de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela, em Espanha.

A técnica de ELISA selecionada foi aquela que utiliza a proteína FhrAPS que é obtida a partir de ADN clonado de *F. hepatica* e constituída por 25 aminoácidos apresentando um peso molecular de 2,9 kDa. Esta técnica possibilita a deteção de IgG contra *F. hepatica*, podendo ser um método de diagnóstico para a fasciolose que permite a análise de vários soros simultaneamente, sendo que os reagentes necessários apresentam relativamente baixo custo.

O procedimento da técnica de ELISA utilizada encontra-se descrito no Anexo III.



Figura 13 - Preenchimento dos poços da placa de ELISA com antígeno diluído em PBS (Fotografia original).



Figura 14 - Placa ELISA após a aplicação do ácido sulfúrico (Fotografia original).

4.2.6 Análise Estatística

A partir das informações presentes nos questionários e dos resultados das análises coprológicas e serológicas foram elaboradas duas bases de dados no programa Microsoft Office Excel 2013. Todas as variáveis categóricas foram codificadas, de acordo com as chaves de codificação em anexo (Anexo IV).

A avaliação estatística foi realizada com o auxílio do *software* SPSS (Statistical Package for Social Science, version 22).

A análise estatística inferencial baseou-se em testes de chi-quadrado no caso das variáveis qualitativas, e em testes de comparação de médias (testes t e ANOVA) no caso da variável quantitativa. Todos os testes estatísticos tiveram em consideração um nível de significância de 5%.

5. Resultados

5.1 Resultados dos inquéritos aos produtores

Após a análise das informações recolhidas a partir dos inquéritos, foi possível caracterizar as 149 explorações leiteiras visitadas quanto às práticas de manejo utilizadas.

Relativamente ao número de vacas leiteiras na exploração (pergunta 3), as respostas foram muito variáveis, pelo que foram criados três grupos, de acordo com as classes de número de vacas leiteiras estabelecido no relatório do Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral (2015). Assim, o gráfico seguinte (Gráfico 4) permite uma melhor leitura dos dados recolhidos:

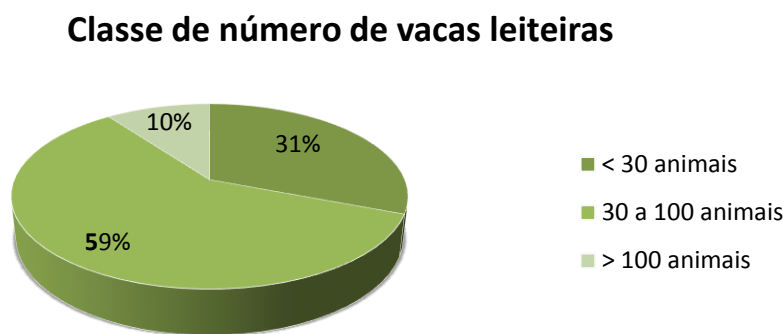


Gráfico 4 - Frequência relativa de explorações conforme a classe de número de vacas leiteiras.

Deste modo, 31% (46/149) das explorações inquiridas tinham menos de 30 animais, 59% (88/149) tinham entre 30 a 100 animais e apenas 10% (15/149) tinham mais de 100 animais.

Nas explorações cujo sistema de produção é extensivo existe maior suscetibilidade dos animais serem infetados por helmintes presentes na pastagem, do que em sistemas intensivos (Morgan *et al.*, 2013). Posto isto, considerou-se importante inquirir os produtores quanto ao sistema de produção praticado nas explorações incluídas no estudo (pergunta 4). Deste modo, verificou-se que 76% (113/149) das explorações são em sistema extensivo, sendo que 2% (3/149) são intensivas e 22% (33/149) são semi-intensivas (Gráfico 5).

Tipo de sistema de produção

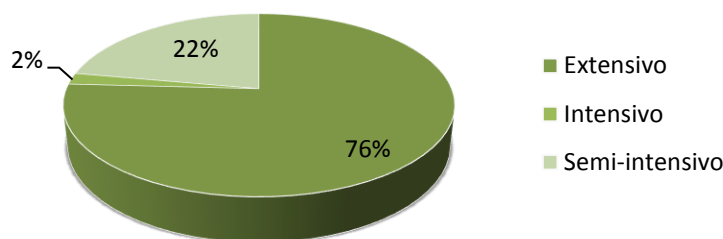


Gráfico 5 - Frequência relativa das explorações conforme o tipo de sistema de produção praticado.

Nas explorações extensivas ou semi-intensivas considerou-se relevante inquirir quanto à realização de pastoreio rotacional, ao longo do ano (pergunta 4.1). Os sistemas de pastoreio rotacional, para além de proporcionarem mais alimento aos animais, permitem que haja o vazio sanitário das pastagens. Deste modo, estes promovem o controlo das parasitoses devido à quebra no ciclo de infeção entre as pastagens e os hospedeiros durante o período em que estes locais permanecem sem animais (Parkins & Holmes, 1989). Assim, verificou-se que em 66% (96/146) das explorações incluídas no estudo é praticado o pastoreio rotacional, sendo que em 35% (50/146) realizam pastoreio contínuo.

Relativamente à pergunta número 5 ("reposição do efetivo"), em 69% (103/149) dos casos os produtores têm preferência em utilizar apenas animais nascidos e criados na exploração, sendo que em 5% (7/149) todos os animais são comprados e em 26% (39/149) são utilizados animais da exploração e de compra (Gráfico 6). Esta questão é relevante na medida em que os animais adquiridos podem constituir uma importante fonte de contaminação dos pastos e, conseqüentemente, dos outros indivíduos presentes na exploração. Assim, caso os produtores não apliquem os devidos cuidados, estes animais podem contribuir para a disseminação de várias parasitoses.

Reposição do efetivo

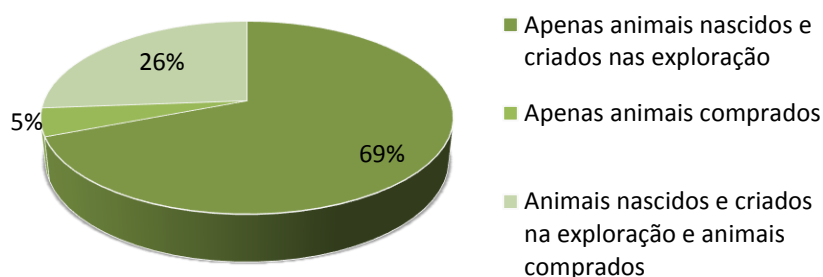


Gráfico 6 - Frequência relativa das explorações conforme o tipo de reposição do efetivo utilizado.

O contraste leiteiro é uma forma de monitorização da qualidade e quantidade de leite produzido por cada animal, na exploração. Esta é uma prática importante para a deteção de animais cuja produtividade pode estar alterada, o que permite ao produtor atuar, juntamente com o veterinário, de forma a maximizar os níveis de produção de leite da exploração. Assim, ao inquirir os produtores quanto à prática de contraste leiteiro (pergunta 6) foi possível perceber que esta é realizada em apenas 19% (28/149) das explorações, sendo que em 81% (121/149) esta forma de monitorização do leite produzido é dispensada (Gráfico 7).

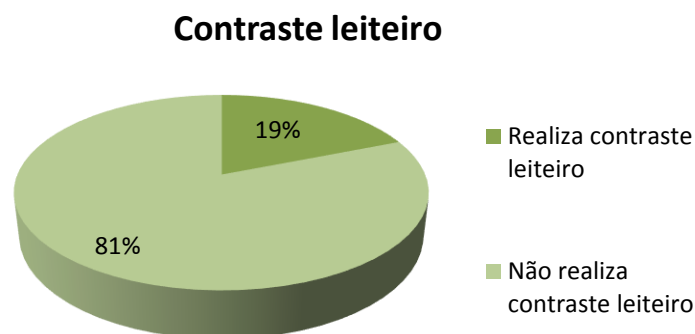


Gráfico 7 - Frequência relativa quanto à prática de contraste leiteiro.

A pergunta 7 teve como objetivo averiguar se os produtores fazem algum tipo de desparasitação dos seus animais. Após a análise dos dados recolhidos, verificou-se que em 88% (131/149) das explorações é realizada a desparasitação dos animais, sendo que nas restantes 12% (18/149) este procedimento não é aplicado (Gráfico 8).

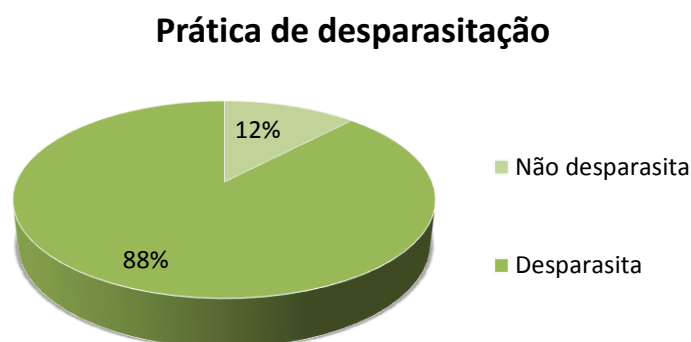


Gráfico 8 - Prática de desparasitação nas explorações.

Como uma parte deste trabalho é dedicada à fasciolose, foram incluídas algumas questões dirigidas mais especificamente a este tema.

Tal como referido anteriormente, um dos fatores que contribui para a ocorrência de fasciolose nos ruminantes é o pastoreio em zonas de águas paradas e pouco profundas ou em zonas pantanosas (Arias *et al.*, 2011). Assim, segundo os dados recolhidos através dos questionários quanto ao acesso a locais de águas paradas (pergunta 8), a resposta foi positiva em apenas 17% (26/149) das explorações. Nas restantes 83% (123/149) os produtores não

permitem o acesso dos animais a estes locais, ou simplesmente porque não existem áreas com estas características nestas explorações inquiridas.

Ainda em relação à fasciolose, as zonas onde se encontram os bebedouros podem constituir um micro-habitat para os hospedeiros intermediários deste parasita, pois nestas áreas o solo encontra-se normalmente mais húmido, permitindo o seu desenvolvimento. No caso de os bebedouros não serem devidamente higienizados, estes também poderiam constituir um micro-habitat para os possíveis hospedeiros intermediários (Díez Baños, 2011). Desta forma, também se interrogou os produtores quanto à realização da higienização dos bebedouros (pergunta 9) e com que frequência esta era realizada (pergunta 10).

Constatou-se que quanto a higienização dos bebedouros, esta era realizada em 80% (119/149) das explorações e em 20% (30/149) das restantes explorações nenhuma higienização era realizada.

Em relação à pergunta referente à frequência com que se realizava a higienização dos bebedouros, as respostas foram muito variadas. Assim, 5% dos produtores inquiridos realizava a higienização dos bebedouros todos os dias, 13% realizava de 15-15 dias, 15% de 30-30 dias, 9% de 60-60 dias, 16% de 90-90 dias, 12% de 180-180 dias e 11% referiu que apenas limpava os bebedouros uma vez por ano (Gráfico 9).

Frequência de higienização dos bebedouros

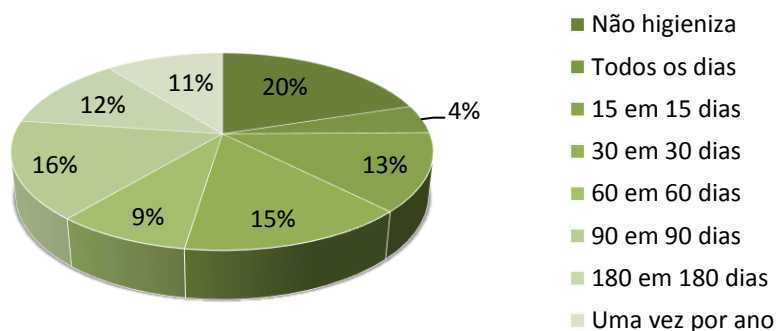


Gráfico 9 - Frequência de higienização dos bebedouros presentes nas explorações.

Também foi possível realizar a caracterização dos animais incluídos no estudo, com base nos dados individuais recolhidos através do questionário.

No que respeita às zonas de prevalência, estabelecidas através de dados preliminares de um estudo científico (ainda não publicado) sobre fasciolose na ilha de S. Miguel, com base em dados de matadouro, 39% (183/465) dos animais incluídos no estudo pertencem à zona de baixa prevalência, 28% (129/465) pertencem à zona de média prevalência e 33% (153/465) pertencem à zona de alta prevalência de fasciolose (Gráfico 10).

Distribuição dos animais de acordo com as zonas de prevalência de fasciolose pré-estabelecidas

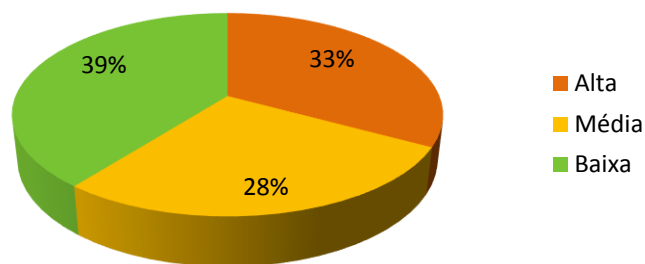


Gráfico 10 - Distribuição dos animais de acordo com as zonas de prevalência de fasciolose pré-estabelecidas.

Relativamente à localização dos animais rastreados, na zona de alta prevalência (Gráfico 11): 0,6% (3/465) pertencem à freguesia da Salga; para as freguesias da Achadinha, Água Retorta e Furnas corresponde o mesmo valor de 1,3% (6/465), respetivamente; para as freguesias da Achada e Ribeira Seca corresponde o mesmo valor de 1,9% (9/465), respetivamente; 3,9% (18/465) pertencem à freguesia da Povoação; 4,5% (30/465) aos Fenais da Ajuda; 6,5% (30/465) à Lomba da Maia e 9,7% (45/465) pertencem à freguesia de Ponta Garça.

Por sua vez, na zona de média prevalência, os animais incluídos no estudo distribuem-se da seguinte forma (Gráfico 12): para a freguesia da Fajã de Baixo e Santana corresponde o mesmo valor de 0,6% (3/465), respetivamente; Água d'Alto, Matriz e S. Miguel, corresponde a mesma percentagem de 1,3% (6/465); 1,7% (8/465) dos animais pertencem à freguesia da Conceição; 1,9% (9/465) pertence a Santa Cruz; 2,6% (12/465) à freguesia de Remédios (PDL), Cabouco e Feteiras apresentam igual valor de 3,2% (15/465); 4,5% (21/465) à Maia e 5,4% (25/465) à Covoadá.

Na zona de baixa prevalência a distribuição dos animais é realizada da seguinte forma (Gráfico 13): 0,9% (4/465) pertencem à freguesia dos Fenais da Luz; Ginetes, Livramento, Relva, Ribeira Chã e Sto. António representam igual valor de 0,6% (3/465); Água de Pau, Nordestinho e S. Braz apresentam o mesmo valor de 1,3% (6/465); 1,9% (9/465) pertencem à freguesia de Capelas; 3,2% (15/465) a Sta. Bárbara; 3,7% (17/465) à Fajã de Cima; Bretanha e Sete Cidades apresentam igual valor de 3,9% (18/465) e 14,8% (69/465) pertencem à freguesia dos Arrifes.

Distribuição dos animais pelas freguesias da zona de alta prevalência de fasciolose

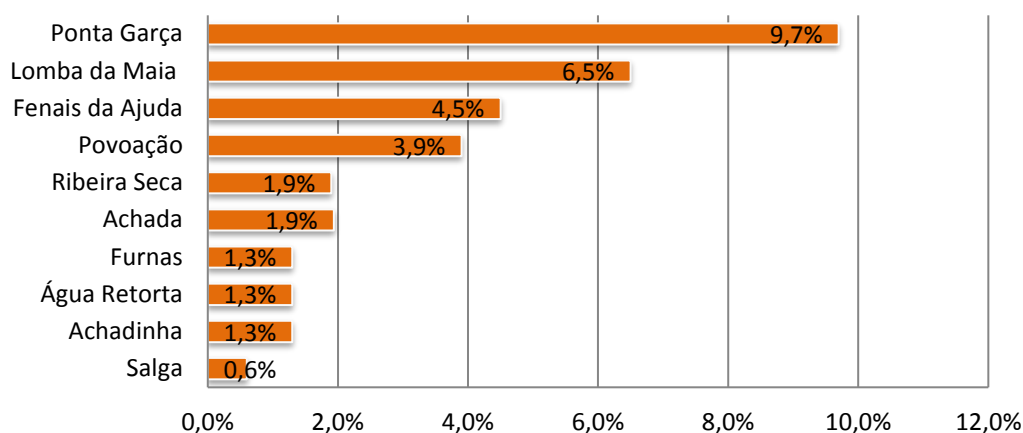


Gráfico 11 - Distribuição dos animais pelas freguesias da zona de alta prevalência de fasciolose.

Distribuição dos animais pelas freguesias da zona de média prevalência de fasciolose

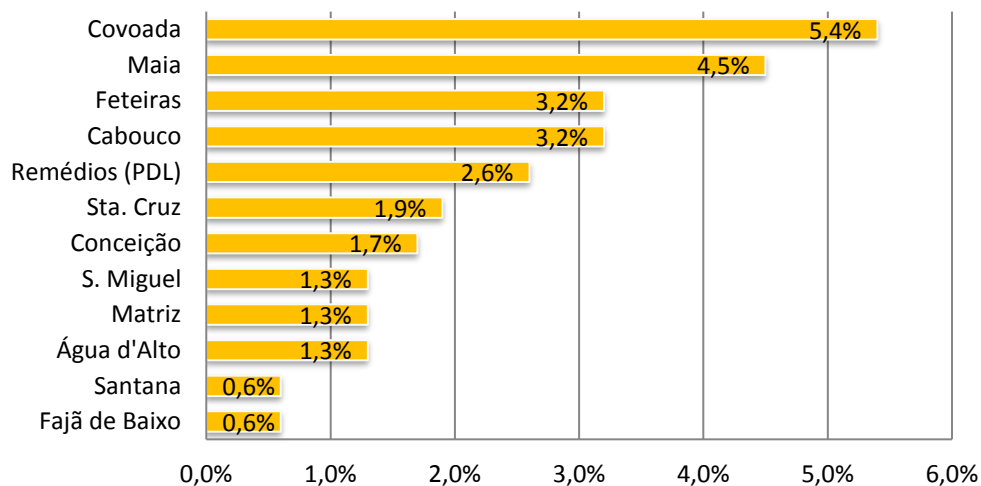


Gráfico 12 - Distribuição dos animais pelas freguesias da zona de média prevalência de fasciolose.

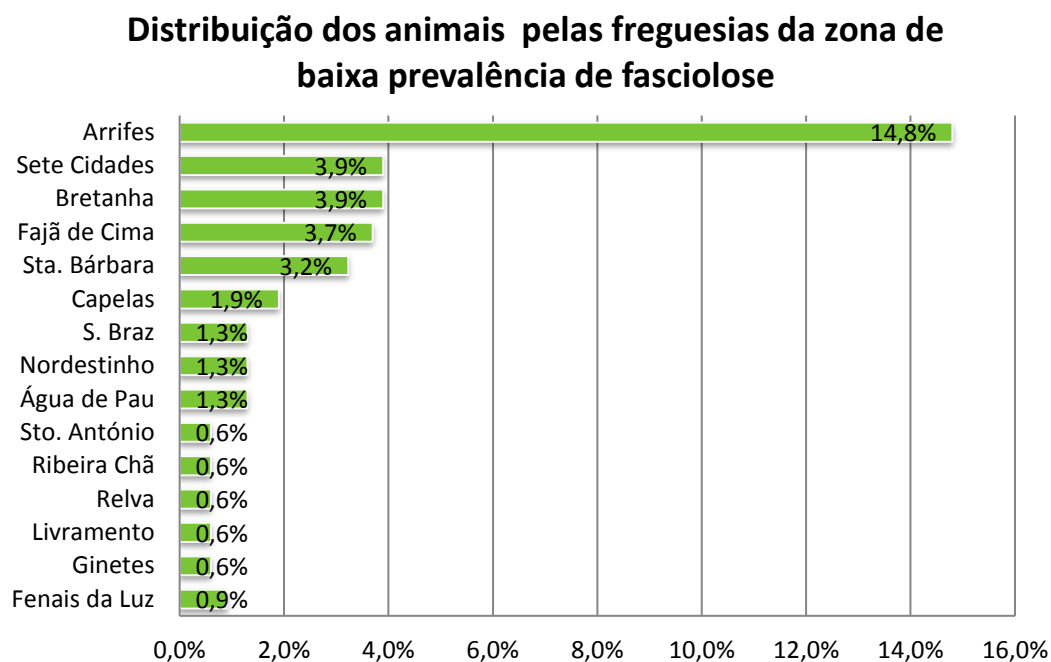


Gráfico 13 - Distribuição dos animais pelas freguesias da zona de baixa prevalência de fasciolose.

Quanto à desparasitação dos animais, os dados recolhidos acerca dos princípios ativos utilizados na última administração foram registados no Gráfico 14. Verificou-se que 12% (54/465) dos animais não foram desparasitados, 3% (14/465) foram desparasitados com albendazol, 1% (3/465) com doramectina, 21% (99/465) com eprinomectina, 58% (268/465) com um fármaco que conjuga a ivermectina com o clorsulon, 1% (6/465) com levamisol, 1% (3/465) com nitroxinil e 1% (3/465) com um produto que conjuga o triclabendazol com a moxidectina. Existem 3% (15/465) de casos em que não foi possível saber quais os princípios ativos utilizados na última desparasitação dos animais. Estes dados são importantes de forma a perceber quais os princípios ativos mais utilizados na desparasitação dos bovinos presentes nestas explorações.

Princípios ativos utilizados na última desparasitação dos animais

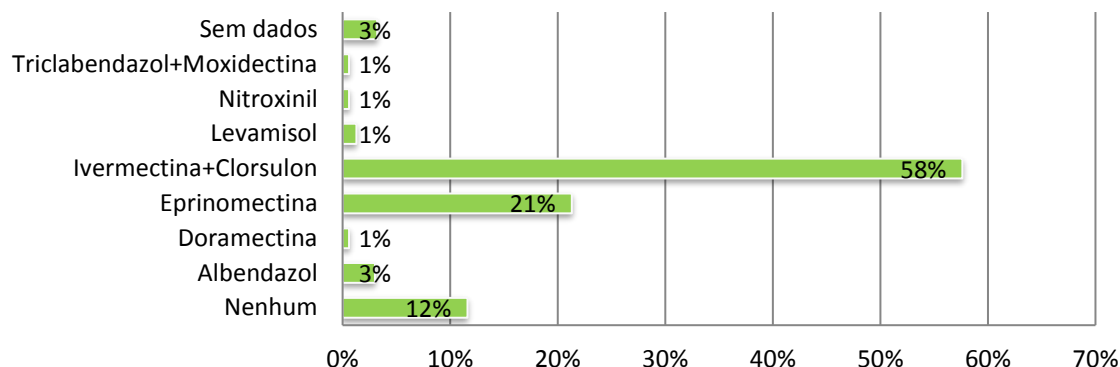


Gráfico 14 - Produto utilizado na última desparasitação dos animais incluídos no estudo.

No momento da colheita de amostras registou-se também a data da última desparasitação administrada. Verificou-se, então, que 12% (54/465) dos animais nunca foram desparasitados, 43% (198/465) tinham sido desparasitados há mais de 1 ano, 4% (20/465) entre 9 e 12 meses, 13% (62/465) entre 6 e 9 meses, 13% (62/465) entre 3 e 6 meses, 8% (35/465) entre 1 e 3 meses e 4% (19/465) há menos de um mês. Em 3% (15/465) dos casos, não foi possível saber qual a data da última desparasitação (Gráfico 15).

Última desparasitação administrada

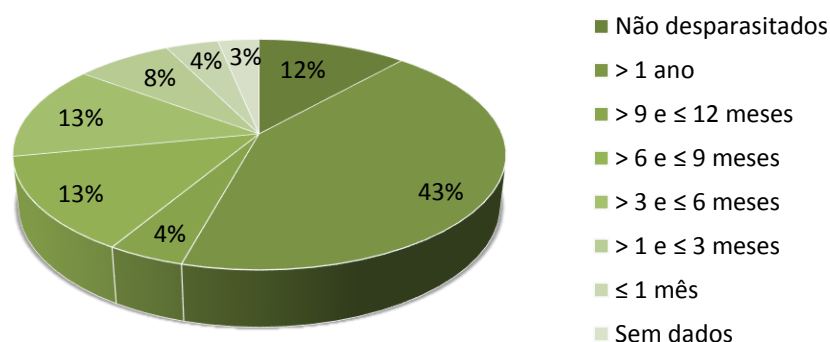


Gráfico 15 - Data da última desparasitação dos animais incluídos no estudo.

De acordo com o Gráfico 16 verificou-se que 62% (288/465) dos princípios ativos utilizados pelos produtores têm ação sobre a *F. hepatica* e que apenas 35% (162/465) não apresentam esta característica. Em 3% (15/465) dos casos não foi possível saber quais os princípios ativos utilizados.

Ação dos princípios ativos selecionados pelos produtores sobre a *F. hepatica*

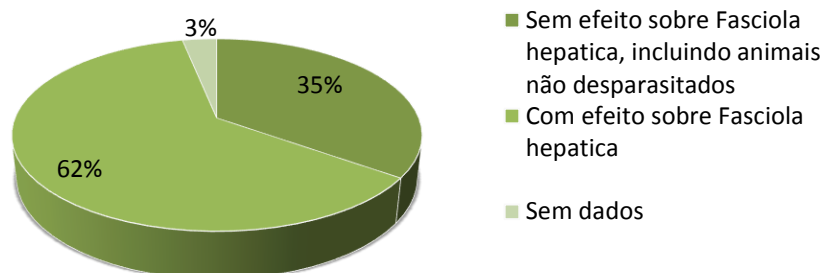


Gráfico 16 - Ação dos princípios ativos selecionados pelos produtores sobre a *F. hepatica*.

Dos animais que se sabe terem sido desparasitados com fasciolicidas, averiguou-se à quanto tempo foi realizada a sua administração. Assim, o Gráfico 17 indica que 61% (176/288) dos animais foram desparasitados há mais de 1 ano, 3% (10/288) há mais de 9 e menos de 12 meses, 11% (32/288) há mais de 6 e menos de 9, 15% (43/288) há mais de 3 e menos de 6, 7% (20/288) há mais de 1 e menos de 3 meses e 2% (7/288) há menos de 1 mês.

Data da última desparasitação com fasciolicidas

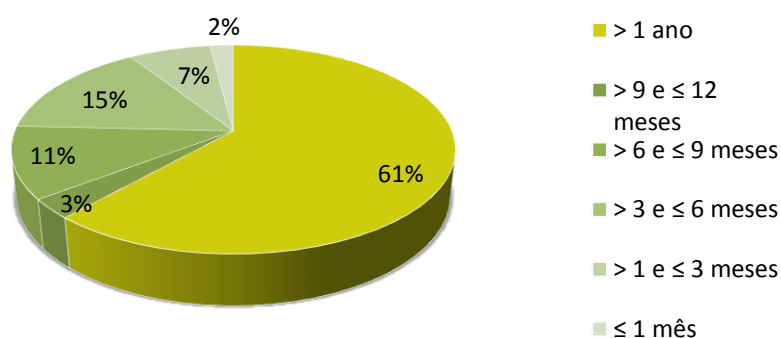


Gráfico 17 - Data da última desparasitação com fasciolicida.

A Tabela 11 apresenta a estatística descritiva da variável quantitativa recolhida neste estudo, referente à idade dos animais. São apresentados os resultados para a totalidade da amostra.

Tabela 11 - Estatística descritiva da variável quantitativa, idade.

Idade		
Média		5,347
I.C.95%	Mínimo	5,112
	Máximo	5,583
Mediana		5,000
Desvio Padrão		2,4313
Mínimo		2,0
Máximo		15,0

Devido à dimensão da amostra, superior a 50, considerou-se a normalidade dos dados (Ghasemi & Zahediasl, 2012).

5.2 Resultados das análises coprológicas

Foi realizada a análise estatística inferencial baseada em testes de chi-quadrado para pesquisa de relações entre os resultados dos testes coprológicos (técnicas de McMaster, flutuação de Willis e sedimentação simples) e as diferentes variáveis de caracterização das explorações e seu manejo, nomeadamente: sistema de produção, pastoreio rotacional, reposição do efetivo, contraste leiteiro, desparasitação, acesso a águas paradas, higiene dos bebedouros e frequência de higiene.

Não foram, contudo, encontradas relações significativas ($P>0,05$) ou dignas de referência específica nesta parte do trabalho. Nestas condições, os resultados apresentados baseiam-se na análise de frequências dos dados obtidos na coprologia.

Do total de 149 amostras analisadas, a contagem de OPG obtida pela técnica de McMaster para a contagem de ovos de *estrongilídeos* gastrointestinais (EGI) foi possível observar que em 70,5% (105/149) das amostras apresentavam-se negativas por este método, 21,4% (32/149) apresentavam 50 OPG, em 6% (9/149) o número de OPG era igual a 100, em 1,3% (2/149) apresentavam OPG igual a 150 e em 0,7% (1/149) o número de OPG era igual a 750 (Tabela 13).

Quanto à contagem de oocistos de *Eimeria* spp. pela técnica de McMaster, foi possível verificar que 93,3% (139/149) das amostras apresentavam valores menores que 50 oocistos de por grama de fezes (oPG), 4% (6/149) apresentava 50 oPG, em 2% (3/149) a contagem foi de 150 oPG e em 0,7% (1/149) das amostras verificou-se uma contagem de 1750 oPG (Tabela 12).

Quanto à contagem de ovos de *Moniezia benedeni* as contagens de ovos por grama de fezes através da técnica de McMaster revelaram-se negativas em 98% (146/149) das amostras e em apenas 2% (3/149) observou-se 50 OPG (Tabela 12).

Tabela 12 - Frequências absolutas e relativas de ovos por grama de fezes (OPG) de EGI e *Moniezia benedeni* e oocistos por grama de fezes (oPG) de *Eimeria* spp. obtidas pela técnica de McMaster.

OPG/oPG	EGI	<i>Eimeria</i> spp.	<i>Moniezia benedeni</i>
< 50	105 (70,5%)	139 (93,3%)	146 (98%)
50	32 (21,4%)	6 (4%)	3 (2%)
100	9 (6%)	0	0
150	2 (1,3%)	3 (2%)	0
750	1 (0,7%)	0	0
1750	0	1 (0,7%)	0
Total	149 (100%)	149 (100%)	149 (100%)

Consideraram-se como valores de referência (Tabela 13) para classificação das infecções por nemátodes gastrointestinais aqueles descritos por Soulsby (1987).

Tabela 13 - Diferentes graus de infecção parasitária consoante a contagem de OPG de nemátodes gastrointestinais (Adaptado de Soulsby, 1987)

Grau de infecção	Ligeiro	Moderado	Grave
Contagem de OPG	0 - 100	150 - 300	> 350

De acordo com esta classificação, as infecções ligeiras foram observadas em 97,9% das explorações (146/149), infecções moderadas observaram-se em 1,3% (2/149) e as infecções graves verificaram-se em 0,7% (1/149); ainda de acordo com os mesmos autores, as infecções consideradas graves são as que possuem significado clínico e exigem tratamento.

Relativamente às infecções por coccídeas, também determinadas pela técnica de McMaster, através da contagem de oocistos por grama de fezes (oPG), considerou-se o valor de 500 oPG como o patamar para as infecções com significado clínico e com necessidade de tratamento (Mundt *et al.*, 2005). Foram consideradas ligeiras as infecções em que o número oPG foi inferior a 500 oPG (Crespo *et al.*, 2007).

Pelos resultados obtidos, 99,3% (148/149) das explorações apresentaram infecções por cocídias consideradas ligeiras e apenas 0,7% (1/149) apresentou infecção com significado clínico. Também foi possível identificar parasitismo por *Moniezia benedeni* em 2% das explorações (3/149).

Ainda se verificou a presença de ovos de EGI na análise qualitativa através do método de Willis, embora 70,5% (105/149) das amostras apresentavam-se negativas pela técnica quantitativa de McMaster

Pelo método de Willis (Tabela 14) 52,3% (78/149) das amostras apresentaram resultado negativo, sendo que em 47,7% (71/149) o resultado foi positivo quanto à presença de ovos de EGI. Verificou-se que 86,6% (129/149) das amostras foram negativas para a presença de oocistos de *Eimeira* spp e em 13,4% (20/149) foram positivas. Observou-se que

91,3% (136/149) das amostras analisadas foram negativos para a presença de ovos de *Moniezia benedeni* e 8,7% (13/149) foram positivas.

Tabela 14 - Frequências absolutas e relativas de casos positivos e negativos, relativamente à presença de EGI, *Eimeria* spp. e *Moniezia benedeni* nas fezes, observados pela técnica de flutuação de Willis.

	EGI	<i>Eimeria</i> spp.	<i>Moniezia benedeni</i>
Negativos	78 (52,3%)	129 (86,6%)	136 (91,3%)
Positivos	71 (47,7%)	20 (13,4%)	13 (8,7%)
Total	149 (100%)	149 (100%)	149 (100%)

A Tabela 15 revela os resultados obtidos pela técnica de sedimentação simples, pelo que 86,6% (129/149) das amostras foram negativas e 13,4% (20/149) foram positivas quanto à presença de ovos de tremátodes nas fezes dos animais.

Tabela 15 - Frequências absolutas e relativas de casos positivos e negativos, relativamente à presença de ovos de tremátodes nas fezes, observados pela técnica de sedimentação simples.

	Tremátodes
Negativos	129 (86,6%)
Positivos	20 (13,4%)
Total	149 (100%)

5.3 Resultados da análise serológica

Foi realizada a análise estatística inferencial baseada em testes de chi-quadrado para pesquisa de relações entre os resultados da técnica de ELISA indireto e as diferentes variáveis de caracterização dos indivíduos incluídos no estudo, nomeadamente: freguesia, zona de prevalência, data da última desparasitação, administração de fasciolicida e idade.

Também não foram, contudo, encontradas relações significativas ($P > 0,05$) ou dignas de referência específica nesta etapa do estudo, procedendo-se mais uma vez à análise de frequências dos resultados obtidos pela serologia.

Os resultados obtidos pela técnica de ELISA revelaram que das amostras analisadas 46,7% apresentavam-se positivas e 53,3% foram negativas. Os resultados obtidos após a análise dos soros pela técnica de ELISA indireto estão indicados na Tabela 16.

Tabela 16 - Resultados da técnica de ELISA indireto.

ELISA	Frequências absolutas	Frequências relativas
Negativos	236	53,3%
Positivos	207	46,7%
Total	443	100%

Com base nestes resultados, pode ser observada uma seroprevalência de fasciolose de 46,7%.

Assim, após a análise dos dados obtidos pelo teste ELISA para detecção de anticorpos contra a *F. hepatica* no soro, foi possível constatar que das 150 explorações analisadas pelas quais estavam distribuídos os 443 animais, 74,5% (111/150) apresentavam animais positivos e 26% (39/150) eram negativos.

5.4 Distribuição geográfica das explorações positivas para a serologia, na ilha de S. Miguel

A distribuição do número de explorações por freguesia que apresentaram animais positivos para o teste ELISA indireto, pode ser observada no Anexo V.

6. Discussão

6.1 Inquérito aos produtores

Algumas práticas de manejo utilizadas nas explorações podem contribuir para o controlo do parasitismo gastrointestinal nos bovinos.

Através dos inquéritos que foram realizados neste estudo podemos concluir que em algumas explorações leiteiras de S. Miguel são utilizadas práticas de manejo que podem ser melhoradas, contribuindo para diminuir o risco de infeções por parasitas gastrointestinais.

A maior parte das explorações (76%) utilizam um sistema de produção extensivo, isto é, os animais eram mantidos em pastoreio ao longo de todo o ano. Segundo Morgan *et al.* (2013) os animais mantidos em sistemas extensivos são mais suscetíveis à infeção por helmintes ao contrário dos animais em sistemas intensivos (animais estabulados todo o ano). Isto deve-se à presença de um variado número de helmintes nas pastagens e cujas formas infetantes podem ser ingeridas pelos bovinos. Assim, em 76% das explorações estudadas os animais poderiam encontrar-se mais suscetíveis às parasitoses. Na ilha de S. Miguel a opção pelo sistema extensivo está relacionado com as limitações económicas, emparcelamento das terras, escassez de infraestruturas e pelo facto de existirem pastagens naturais que permitem produção animal a custos mais baixos.

Quanto aos produtores inquiridos sobre o pastoreio rotacional, 66% indicaram esta prática. Esta permite uma quebra no ciclo de vida dos parasitas e a diminuição do número de formas infetantes presentes nas pastagens (Parkins & Holmes, 1989). Contudo, Stear *et al.* (2007) refere que o pastoreio rotacional é positivo mas não efetivo no controlo das parasitoses devido à elevada resistência das formas larvares infetantes, mesmo em condições ambientais adversas.

Quanto à reposição do efetivo leiteiro, a maior parte dos produtores refere que apenas utiliza animais nascidos e criados na exploração. Contudo, em 31% das explorações, são adquiridos novos animais provenientes de outros locais, onde o manejo sanitário poderá ser diferente. Assim, estes indivíduos podem servir como meio de disseminação de doenças, entre as quais diversas parasitoses (Leathwick & Besier, 2014). Poder-se-ia questionar a respeito dos cuidados destes produtores relativamente aos procedimentos no momento de introdução de novos animais no rebanho procurando saber se os animais receberam algum tratamento antiparasitário antes de serem adquiridos, ou se quando introduzidos no rebanho eram desparasitados ou realizada quarentena antes de serem integrados.

Tal como referido anteriormente, as várias parasitoses gastrointestinais provocam diversos sinais clínicos, sendo que a diminuição da produção de leite é a mais importante. O contraste leiteiro é uma medida que permite o controlo frequente da quantidade e qualidade do leite produzido por animal numa exploração. Isto possibilita que as quebras na produção leiteira sejam detetadas, permitindo que o produtor, juntamente com o Médico Veterinário, analisem o conjunto de fatores que podem estar na origem do problema. Esta prática permite o diagnóstico e tratamento de diversas patologias, muitas vezes com quadros subclínicos, que contribuem para a baixa rentabilidade da exploração. No entanto, foi possível apurar que apenas 19% das explorações inquiridas realizavam este procedimento.

Quanto à prática de desparasitação, observou-se que em 88% das explorações este procedimento era realizado, o que leva a crer que existe alguma consciencialização dos produtores acerca dos benefícios que esta pode ter na produção leiteira. Segundo Stromberg & Gasbarre (2006), os bovinos desparasitados apresentam melhores níveis de produção de leite. De acordo com os mesmos autores, uma revisão de 87 estudos que avaliaram o impacto do tratamento anti-helmíntico na produção leiteira, mostrou que 80% destes apresentavam um aumento significativo nesta produção de cerca de 0,63 kg/dia.

Como este estudo também inclui uma parte dedicada especificamente à fasciolose, de uma forma breve os produtores foram igualmente questionados relativamente a algumas práticas de manejo que permitem o controlo deste parasita. Algumas destas incluem a restrição do acesso dos animais a locais com águas paradas (lagoas, charcos, cursos de água lentos) ou zonas pantanosas, higienização dos bebedouros nos pastos e utilização de fármacos e esquemas de desparasitação direcionados a esta parasitose.

No inquérito às explorações concluiu-se que 83% dos produtores referem que os animais não têm acesso a qualquer tipo de local com águas paradas ou zonas pantanosas. Quando inquiridos sobre a higienização dos bebedouros, 80% respondeu que realizam este procedimento. Contudo, daqueles que higienizam, 48% fazem-no em intervalos superiores a 30 dias. Nas explorações cuja frequência de higienização dos bebedouros era baixa (intervalos superiores a 30 dias), observou-se um grande número de caracóis aquáticos no interior dos mesmos (Figura 16 e 17).



Figura 15 - Presença de caracóis aquáticos num bebedouro sujeito a uma fraca higienização (Fotografia Joana Andrade).



Figura 16 - Presença de caracóis aquáticos num bebedouro sujeito a uma fraca higienização (Fotografia Joana Andrade).

Deste modo, existe a possibilidade dos bebedouros constituírem um local de desenvolvimento do hospedeiro intermediário mais comum da *F. hepatica* (*Lymnae truncatula*) bem como de possíveis hospedeiros intermediários alternativos. O facto do solo nestas áreas se tornar mais húmido devido à atividade dos animais ou porque muitas vezes estes bebedouros são de abastecimento contínuo de água, contribui para reunir as condições ideais para o desenvolvimento de caracóis que intervêm no ciclo de vida deste parasita (Díez Baños, 2011).

Relativamente aos dados recolhidos por cada animal através do questionário, foi possível identificar alguns fatores que podem condicionar a sua suscetibilidade às diversas parasitoses gastrointestinais, com especial foco a fasciolose.

Concluiu-se que as três principais substâncias ativas utilizadas pelos produtores na desparasitação destes animais são formulações de ivermectina com clorsulon (58%),

eprinomectina (21%) e albendazol (3%). É perceptível que a fórmula farmacêutica que inclui a ivermectina e o clorsulon na sua composição - Ivomec F®, era a formulação mais utilizada. Este facto pode estar relacionado com algumas características deste fármaco tais como o seu largo espectro de ação, poder ser utilizado até 28 dias antes do parto e ter ação sobre as formas adultas de *F. hepatica* (SimposiumVet, 2016). A eprinomectina, cujo nome comercial é o Eprinex pour-on®, foi o segundo antiparasitário mais utilizado pelos produtores, registando-se que 21% dos animais foram desparasitados com este princípio ativo, sendo esta a única formulação disponível no mercado sem intervalo de segurança para o leite e de fácil aplicação (Smith, 2009; SimposiumVet, 2016). O albendazol foi administrado a 3% dos animais devido à sua utilização na desparasitação de vitelos até aos 2 ou 3 meses de vida, sendo que o nome comercial desta formulação é o Valben® (SimposiumVet, 2016). Os restantes princípios ativos eram utilizados em menor escala, apenas em animais jovens (vitelos e novilhas) e podem ser observados no Gráfico 14.

Em relação à frequência de desparasitação concluiu-se que, para além de 12% das vacas nunca terem sido desparasitadas, 43% tinham sido desparasitados há mais de 1 ano. Isto sugere que existe algum descuido quanto à desparasitação destes animais, muitas vezes desvalorizando esta questão e administrando antiparasitários apenas quando os próprios produtores consideram necessário.

Quanto aos produtos de desparasitação administrados, 62% dos animais tinham sido tratados com fasciolicidas. Contudo, concluiu-se que destes, em 61% dos casos a desparasitação tinha sido realizada há mais de 1 ano. De acordo com a experiência de campo isto deve-se à grande utilização do Ivomec F, já referida, na desparasitação de animais adultos apenas na secagem, 28 dias antes do parto. Este produto também é comumente administrado apenas quando os animais são jovens (vitelos e novilhas), sendo que posteriormente estes não são sujeitos a mais tratamentos, a menos que seja clinicamente necessário. Assim, estes animais podem encontrar-se mais predispostos aos efeitos negativos da *F. hepatica* na sua saúde e produtividade.

6.2 Análises coprológicas

Segundo os resultados da técnica quantitativa de McMaster verificou-se que em 97,9% das explorações (146 explorações) as infeções por estrongilídeos gastrointestinais eram ligeiras, em 1,3% (2 explorações) estas eram moderadas e em 0,7% (1 exploração) as infeções eram graves. Também se observou que em uma exploração (0,7%) ocorreu uma infeção grave

por *Eimeria* spp.. Estes resultados estão de acordo com o que está descrito na bibliografia: em animais com idade superior a 2 anos, a tendência é de ocorrer redução na carga parasitária, diminuição no número de ovos excretados nas fezes e a baixa incidência de casos clínicos associados a infecções por parasitas (Charles, 1992).

Em relação à técnica executada é importante ter em conta a limitada sensibilidade do teste (limite de deteção de 50 OPG) (Hansen & Perry, 1994) e apesar dos resultados estarem de acordo com a bibliografia, devem ser analisados de forma prudente. Existe a possibilidade de as formas parasitárias no interior do hospedeiro serem ainda sexualmente imaturas ou de as larvas presentes estarem em hipobiose (Urquhart *et al.*, 1996). Assim, podem existir no organismo do animal parasitas que não têm a capacidade de eliminar ovos e o valor de OPG detetado nas fezes representar um valor subestimado da carga parasitária real.

Outro fator limitante das conclusões que possam ser retiradas a partir destes resultados é a recolha de fezes ter sido realizada apenas a 3 animais por exploração, o que pode não ser representativo de cada exploração. Segundo Morgan *et al.*, (2005) no exame de rotina para avaliação do grau de parasitismo por tricostrongilídeos, a utilização de um *pool* de fezes formado a partir de amostras individuais de 10 animais fornece uma boa estimativa na maioria das situações.

Os resultados da técnica de flutuação de Willis mostram que em 47,7% das explorações os bovinos apresentavam nematodoses, em 13,4% apresentavam coccidioses (*Eimeria* spp.) e 8,7% apresentavam cestodoses (*Moniezia benedeni*). A ocorrência destas 3 parasitoses é coincidente com as descritas noutros estudos desenvolvidos em Portugal (Cachapa, 2015; Malacata, 2014), que as identificam com a mesma ordem decrescente de ocorrência. Contudo, as infecções que têm maior relevância em bovinos adultos são as provocadas por nemátodes gastrointestinais, devido ao seu impacto na produtividade (Suarez & Lorenzo, 2000). A coccidiose provocada pelo género *Eimeira* spp. e cestodose causada por *Moniezia benedeni* são mais patogénicas em animais jovens (Daugischies & Najdrowski, 2005; Irie *et al.*, 2013).

Através da sedimentação simples foi possível diagnosticar 20 casos (13,4%) de infecções causadas por tremátodes. Porém, devido ao facto de na técnica de sedimentação simples aplicada apenas se terem utilizado 2g de fezes e da sensibilidade deste teste ser baixa, podem ter ocorrido falsos negativos. Poder-se-ia ter realizado a técnica de sedimentação simples (McMaster modificado) devido ao facto desta ser simples e adequada até mesmo para casos de baixa eliminação de ovos, que ocorrem frequentemente em bovinos, e que torna possível a quantificação de ovos de *F. hepatica* e de outros helmintes (Coceição *et al.*, 2002).

Também se poderia ter aumentado a quantidade de fezes analisadas, porém isto tem a desvantagem de aumentar a quantidade de detritos que dificulta a detecção dos ovos (Charlier *et al.*, 2014). Contudo, independentemente das técnicas de sedimentação utilizadas a distinção entre ovos de *Fasciola* spp. e *Paramphistomum* spp. é por vezes difícil de realizar. Também no caso da fasciolose, devido às características desta parasitose: longo período de pré-patência (8 a 12 semanas após a infecção), eliminação irregular de ovos nas fezes e em reduzidas quantidades, podem ocorrer resultados falsos negativos (Urquhart *et al.*, 1996).

Através da análise estatística verificou-se a inexistência de relações significativas entre os resultados dos testes coprológicos e as diferentes variáveis de caracterização das explorações e o seu manejo, nomeadamente: sistema de produção; pastoreio rotacional, reposição do efetivo, contraste leiteiro, desparasitação, acesso a águas paradas, higiene dos bebedouros e frequência de higienização. Isto poderá estar relacionado com vários fatores, nomeadamente: limitações descritas em cada técnica coprológica realizada; a maior parte das amostras pertencerem a explorações extensivas, sendo que apenas 2% eram intensivas; à diferente carga parasitária de cada pasto; às diferentes condições de humidade das pastagens e temperatura que podem variar consoante a altitude, proximidade de cursos de água ou lagoas, declive dos terrenos e drenagem e estado imunitário dos animais.

6.3 Análise serológica

Os resultados obtidos pela técnica de ELISA indireto para detecção de anticorpos contra *F. hepatica* revelaram que 47% das amostras foram positivas e 53% foram negativas. O número de casos positivos obtidos no presente estudo foi inferior aos obtidos por um estudo realizado em bovinos na região noroeste de Espanha (Arias *et al.*, 2010) através da mesma técnica de ELISA, que revelou que 65% dos soros analisados apresentavam IgG contra a *F. hepatica*.

Alguns estudos têm demonstrado que a utilização da proteína recombinante FhrAPS apresenta algumas vantagens: ser um método promissor para avaliar a eficácia da fasciolicidas em situações de campo (Arias *et al.*, 2009; Díez Baños, 2011); possibilitar a detecção de anticorpos IgG numa fase inicial da doença (Paz-Silva *et al.*, 2005) e apresentar um bom potencial para estudos de campo para determinação da prevalência de infeções recentes e ativas por *F. hepatica* (Arias *et al.*, 2007).

Contudo, segundo Sánchez-Andrade *et al.* (2000) a utilização de uma técnica de ELISA capaz de detetar os antigénios circulantes em conjunto com uma técnica de ELISA

para deteção de anticorpos no soro pode oferecer uma forma de diagnóstico de fasciolose mais fiável do que o exame coprológico clássico. O mesmo autor refere que o resultado da conjugação destes dois tipos de técnicas é bastante apropriado para estudos epidemiológicos levados a cabo em áreas amplas.

Tendo em conta que apenas foi utilizada a técnica de ELISA indireto com esta proteína, sem a utilização de outro teste ELISA para detetar antigénios circulantes e numa situação de campo, apenas é possível afirmar que os 47% de casos positivos obtidos correspondem a animais que estão ou podem ter estado em contacto com o parasita.

As condições climáticas da ilha de S. Miguel incluem uma baixa amplitude térmica, com uma temperatura média anual que ronda os 18°C e humidade com valores médios mensais elevados, próximos de 80%. A precipitação média anual ao nível do mar varia entre os 900 e os 3 000mm, sendo que esta aumenta de forma significativa com a altitude (SRAM, 2015). Assim, todas estas condições são bastante favoráveis para que o ciclo de vida da *F. hepatica* se complete. Isto deve-se ao facto do seu hospedeiro intermediário se desenvolver idealmente em regiões bastante húmidas, de elevada precipitação e temperatura compreendida entre 15 e 22°C (Urquhart *et al.*, 1996), correspondentes às observadas nesta região. Este facto, juntamente com as práticas de manejo de risco utilizadas nas explorações, podem justificar os valores encontrados.

Através da análise estatística verificou-se a inexistência de relações significativas entre os resultados da técnica de ELISA indireto e as diferentes variáveis de caracterização dos indivíduos incluídos no estudo, nomeadamente: freguesia, zona de prevalência, data da última desparasitação, administração de fasciolicida e idade. Tal facto estar relacionado com vários fatores, designadamente: o número variável de explorações visitadas por freguesia; a exposição dos bovinos a diferentes cargas parasitárias presentes nas pastagens; o desenvolvimento de resistência contra a *F. hepatica* em alguns animais; todos os animais terem idade superior a 2 anos; contacto constante com as pastagens infetadas e a presença de hospedeiros intermediários alternativos para este parasita.

6.4 Distribuição geográfica das explorações positivas para a serologia, na ilha de S. Miguel

De acordo com a distribuição geográfica das explorações com animais positivos ao teste ELISA é possível observar quais as freguesias da ISM onde estes tiveram origem e quais as que revelaram o maior número.

De acordo com o cartograma (Anexo V) é possível verificar que ocorreram casos positivos para o ELISA indireto na maior parte das freguesias onde foram recolhidas amostras. Isto poderá sugerir que a fasciolose bovina encontra-se disseminada por toda a ISM.

Os casos positivos encontrados nas várias freguesias analisadas podem estar relacionados com a movimentação (compra e venda) de alguns animais infetados pela *F. hepatica* e com a adaptação deste parasita a possíveis hospedeiros intermediários alternativos (Abrous *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2015) presentes na ISM. Este fenómeno também pode estar relacionado com práticas de manejo de risco utilizadas pelos produtores como a inexistência de drenagem dos terrenos e higienização pouco frequente e formação de micro-habitats nas zonas de bebedouro que poderão estar a contribuir para a disseminação desta parasitose. As grandes limitações quanto à utilização de fasciolicidas em bovinos leiteiros, devido ao seu intervalo de segurança, poderá estar a contribuir de igual modo para este facto.

Relativamente às freguesias com maior número de explorações positivas (>5), estas localizavam-se na sua maioria na região oriental da ilha, nomeadamente Lomba da Maia, Povoação, Ponta Garça, Maia e Fenais da Ajuda. Porém, nos Arrifes, Sete Cidades e Fajã de Cima pertencentes à região ocidental da ISM, também ocorreu um grande número de casos positivos.

Estes resultados parecem ser semelhantes às informações obtidas num estudo prévio (ainda não publicado), a partir de dados recolhidos em matadouro, indicando que a maioria dos bovinos com fasciolose têm origem em explorações situadas nas freguesias de Salga, Achada, Furnas, Achadinha, Lomba da Maia, Povoação, Água Retorta, Ponta Garça, Fenais da Ajuda, Lomba de S. Pedro, Ribeira Seca e Nossa Sra. do Rosário, a maior parte também na região oriental da ISM.

A presença de um maior número de explorações positivas na região oriental da ISM pode estar relacionada com as suas condições geoclimáticas. A maioria destas freguesias apresentam áreas de maior altitude (entre os 200 e 600m) e por isso com níveis de precipitação e humidade também mais elevados (SRAM, 2015) propícios ao desenvolvimento do caracol *Lymnea truncatula* e consequentemente de *F. hepatica*. No entanto, a temperatura

nestes locais de maior altitude é mais baixa, mas raramente inferior a 10°C, temperatura mínima para o desenvolvimento dos ovos de *F. hepatica* e do seu hospedeiro intermediário (Selemetas *et al.*, 2014).

Segundo um estudo realizado na Irlanda por Selemetas *et al.* (2014), foi possível observar que os efetivos bovinos expostos à *F. hepatica* localizavam-se em áreas cujos níveis de precipitação médios mensais eram superiores e onde os níveis de temperatura médios mensais eram inferiores, comparativamente com os efetivos não expostos a este parasita.

Contudo, para obter melhores informações quanto às áreas mais afetadas pela fasciolose bovina na ilha de S. Miguel seria necessária a realização de análises coprológicas e serológicas a um número de amostras mais representativo e proporcional em cada região da ilha, bem como o registo contínuo de dados no matadouro relativamente aos fígados rejeitados devido a esta parasitose. Seria de igual modo interessante elaborar em paralelo um registo das condições de temperatura, altitude, precipitação, humidade, tipo de solo das várias regiões e práticas de manejo de risco aplicadas nas explorações, de forma a perceber qual a sua influência no ciclo de vida deste parasita. Assim, talvez fosse possível identificar mais especificamente quais os fatores de risco envolvidos e consequentemente melhorar o controlo da fasciolose e minimizar o seu impacto negativo.

Também se considera importante a realização de um outro estudo acerca da possível existência de hospedeiros intermediários alternativos para *Fasciola hepatica* na ISM e de que forma estes poderão estar a contribuir para a evolução desta parasitose.

De forma a melhorar o controlo dos parasitas gastrointestinais nas explorações leiteiras na ISM, tendo em conta as características desta região, a atual situação económica deste setor e todas as limitações envolvidas na administração de fasciolicidas nestes animais, a solução que aparenta ser mais viável é a prevenção. Isto significa aliar o uso adequado de anti-helmínticos, com medidas de higiene e um bom manejo das pastagens.

Deste modo, os produtores devem adotar alguns procedimentos como:

- Drenagem dos terrenos (Urquhart *et al.*, 1996);
- Impedir através de vedações, o acesso dos animais a áreas com as características ideais para o desenvolvimento de formas infetantes dos vários parasitas (Hansen & Perry, 1994);
- Uso consciente de moluscicidas (primavera ou verão), devido ao seu impacto ambiental (Hansen & Perry, 1994);

- Quarentena dos animais adquiridos e respetiva desparasitação, caso ainda não tenha sido realizada, antes de serem integrados no restante efetivo (FAO & IDF, 2011);
- Manter os bebedouros limpos e mudar os bebedouros móveis de local, de forma a evitar que o terreno circundante se torne mais húmido (Urquhart *et al.*, 1996);
- Utilização cautelosa de lança-chamas para a incineração dos detritos provenientes da limpeza dos bebedouros e nas camas dos animais aquando da sua limpeza, após remoção e eliminação de toda a matéria orgânica presente (Araújo & Varela, 2014);
- Não alimentar animais confinados com erva proveniente de áreas suspeitas de elevada carga parasitária;
- Desparasitação estratégica na mudança de pastos (para o caso dos estrongilídeos gastrointestinais), de forma a obter pastagens "seguras", com baixas cargas parasitárias. Este e qualquer outro tipo de plano de desparasitação deverá ser implementado de acordo com o aconselhamento do Médico Veterinário e monitorizado através de análises coprológicas regulares. Estas deverão permitir a escolha adequada do antiparasitário a utilizar, consoante o grau de infeção dos animais e as parasitoses identificadas em cada exploração (Stromberg & Gasbarre, 2006).

7. Conclusões

1. Pelos resultados obtidos constatou-se que no total das explorações analisadas, 47,7% apresentavam-se positivas para nematodoses, 8,7% para cestodoses, 13,4% para trematodoses e 13,4% para coccidioses.
2. O grau de infeção por EGI foi considerado ligeiro em 97,9% das explorações, em 1,3% este era moderado e em 0,7% era grave. O grau de infeção por *Eimeira* spp. foi considerado grave em 0,7% das explorações.
3. Determinou-se que a seroprevalência de fasciolose nos bovinos leiteiros analisados (n=443) pela técnica de ELISA indireto, através da proteína recombinante FhrAPS foi de 46,7% e que 74,5% das explorações apresentaram pelo menos uma vaca com serologia positiva para esta parasitose.
4. Para o teste ELISA indireto, a maior parte das freguesias com maior número de explorações positivas (>5) localizam-se na região oriental da ISM, nomeadamente Lomba da Maia, Povoação, Ponta Garça, Maia e Fenaís da Ajuda. Contudo, nos Arrifes, Sete Cidades e Fajã de Cima também ocorreu um elevado número de explorações positivas.
5. Verificou-se que existem explorações positivas ao teste ELISA indireto na grande maioria das freguesias analisadas o que leva a crer que a fasciolose bovina é uma doença que se encontra disseminada por toda a ISM.
6. Não foram encontradas relações estatisticamente significativas entre os resultados coprológicos e as variáveis identificadas nos inquéritos, correspondentes às práticas de manejo utilizadas nas explorações.
7. Não foram encontradas relações estatisticamente significativas entre os resultados da técnica de ELISA indireto e as variáveis identificadas nos inquéritos, correspondentes à informação individual de cada animal.

Bibliografia

- Abrous, M., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., & Cabaret, J. (1998). Unusual Transmission of the Liver Fluke, *Fasciola hepatica*, by *Lymnaea glabra* or *Planorbis leucostoma* in France. *The Journal of Parasitology*, Vol. 84, No. 6, 1257-1259.
- Agneessens, J., Claerebout, E., Dorny, P., Borgsteede, F., & Vercruysse, J. (2000). Nematode parasitism in adult dairy cows in Belgium. *Veterinary Parasitology*, 89, 287-296.
- Aleixo, M. A., Freitas, D. F., Dutra, L. H., Malone, J., Martins, I. V., & Molento, M. B. (2015). *Fasciola hepatica*: epidemiology, perspectives in the diagnostic and the use of geoprocessing systems for prevalence studies. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 36, n. 3, 1451-1466.
- Almeida, B., & Silva, L. (2015). A eficiência das explorações leiteiras micalenses (Açores). *RESR*, vol. 53 (1), 129-142.
- Álvarez-Sánchez, M. A., Mainar-Jaime, R. C., Pérez-García, J., & Rojo-Vázquez, F. A. (2006). Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Veterinary Record*, 159, 424-425.
- Apifarma. (2016). *Simposium Veterinário Apifarma*. Obtido em 20 de Agosto de 2016, de <http://www.apifarma.pt/simposiumvet/Paginas/default.aspx>
- Araújo, A., & Varela, A. (2014). Método físico complementar para o controlo ambiental de formas infetantes de parasitas em instalações de equinos. *V Encontro de Formação OMV - Comunicação Livre*. Lisboa.
- Araújo, J., Garcia, A., & Linhares, G. (1995). Ocorrência de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda, Fasciolidae), no Estado de Goiás. *Revista de Patologias Tropicais*, v. 24 (2), 283-289.
- Araújo, J., Linhares, G., Oliveira, A., Amoril, J., Freitas, M., & Costa, I. (2007). Infecções autóctones de bovinos por *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda, Fasciolidae) no estado de Goiás. *Revista de Patologias Tropicais*, v. 36 (1), 96-100.
- Arias, M., Lomba, C., Dacal, V., Vázquez, L., Pedreira, J., Francisco, I., et al. (2011). Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and north-west Spain. *Veterinary Record*, 168, 408.
- Arias, M., Morondo, P., Hillyer, G., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J., Lomba, C., et al. (2007). Immunodiagnosis of current fasciolosis in sheep naturally exposed to *Fasciola hepatica* by using a 2.9 kDa recombinant protein. *Veterinary Parasitology*, 146, 46-49.
- Arias, M., Piñeiro, P., Hillyer, G. V., Suárez, J. L., Francisco, I., Cortiñas, F. J., et al. (2010). An Approach of the laboratory to the field: assessment of the influence of cattle management on the seroprevalence of fasciolosis by using polyclonal- and recombinant-based ELISAs. *The Journal of Parasitology*, v. 96 (3), 626-631.

- Arias, M., Sanchís, J., Francisco, I., Francisco, R., Piñeiro, P., Cazapal-Monteiro, C., et al. (2013). The efficacy of four anthelmintics against *Calicophoron daubneyi* in naturally infected dairy cattle. *Veterinary Parasitology* , 197, 126– 129.
- Arias, M., Suárez, J., Hillyer, G., Francisco, I., Calvo, E., Sánchez-Andrade, R., et al. (2009). A recombinant-based ELISA evaluating the efficacy of netobimin and albendazole in ruminants with naturally acquired fasciolosis. *The Veterinary Journal* , 182, 73-78.
- Avcioglu, H., Guven, E., Balkaya, I., Kaynar, O., & Hayirli, A. (2014). Evaluation of Coprological and Serological Techniques For Diagnosis of Bovine Fasciolosis. *Israel Journal of Veterinary Medicine* , v. 69, (4), 203-210.
- Bloemhoff, Y., Forbes, A., Danaher, M., Good, B., Morgan, E., Mulcahy, G., et al. (2015). Determining the Prevalence and Seasonality of *Fasciola hepatica* in Pasture-based Dairy herds in Ireland using a Bulk Tank Milk ELISA. *Irish Veterinary Journal* , 68:16.
- Borgsteede, F. H., Tibben, J., Cornelissen, J. B., Agneessens, J., & Gaasenbeek, C. P. (2000). Nematode parasites of adult dairy cattle in the Netherlands. *Veterinary Parasitology* , 89, 288-296.
- Bossaert, K., Jacquinet, E., Saunders, J., Farnir, F., & Losson, B. (2000). Cell-mediated immune response in calves to single-dose, trickle, and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* , 88, 17-34.
- Bowman, D. (2009). *Georgi's Parasitology for Veterinarian*. (9ª Edição ed.). Missouri: Saunders, Elsevier.
- Bresciani, K., Nascimento, A., Costa, A., Amarante, A., Perri, S., & Lima, L. (2001). Frequency and intensity of infection by helminths in cattle slaughtered at the abattoir, of the northwest of region state of São Paulo, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias* , v. 22, n. 1, 93-97.
- Brockwell, Y. M., Elliott, T. P., Anderson, G. R., Stanton, R., Spithill, T. W., & Sangster, N. C. (2014). Confirmation of *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in naturally infected Australian beef and dairy cattle. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* , 4, 48–54.
- Centers for Disease Control and Prevention. (Janeiro de 2013). *CDC - Fasciola - Biology*. Obtido em 28 de Agosto de 2016, de <http://www.cdc.gov/parasites/fasciola/biology.html>
- Charles, T. P. (1992). Verminoses dos bovinos de leite. In T. P. Charles, & J. Furlong, *Doenças parasitárias dos bovinos de leite* (pp. 55-110). Coronel Pacheco: EMBRAPA, CNPGL.
- Charlier, J., Hoglund, J., Samson-Himmelstjerna, G., Dorny, P., & Vercruysse, J. (2009). Gastrointestinal nematode infections in adult dairy cattle: Impact on production, diagnosis and control. *Veterinary Parasitology* , 164, 70-79.

- Charlier, J., Vercruysse, J., Morgan, E., Van Dijk, J., & Williams, D. J. (2014). Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of *Fasciola hepatica* in cattle. *Parasitology* , 141, 326–335.
- Chollet, J. Y., Jacquiet, P., Cardinate, E., Ndamkou-Ndamkou, C., Diop, C., Thiam, A., et al. (2000). *Cooperia pectinata* and *C. punctata*, parasites of the abomasum of cattle in northern Cameroon (Central Africa). *Veterinary Parasitology* , 88, 135-138.
- Christensen, N. (1980). A review of the influence of host- and parasite-related factors and environmental conditions on the host-finding capacity of the trematode miracidium. *Acta Tropica* , 37 (4), 303-318.
- Claerebout, E., & Vercruysse, J. (2000). The immune response and the evaluation of acquired immunity against gastrointestinal nematodes in cattle: a review. *Parasitology* , 120, S25-S42.
- Coceição, M., Durão, R., Costa, I. H., & Costa, J. (2002). Evaluation of a simple sedimentation method (modified McMaster) for diagnosis of bovine fasciolosis. *Veterinary Parasitology* , 105, 337-343.
- Cornelissen, J. B., Gaasenbeek, C. P., Borgsteede, F. H., Holland, W., Harmsen, M. M., & Boersma, W. J. (2001). Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. *International Journal for Parasitology* , 31, 728-737.
- Crespo, M. V., Mariano, P., & Rosa, F. (2007). *Parasitismo em bovinos de raças de carne e brava no concelho de Coruche*. Obtido em 9 de Setembro de 2016, de Repositório Online do Instituto Politécnico de Santarém:
http://repositorio.ipsantarem.pt/bitstream/10400.15/857/1/CRESPOMV_BOVCoruche_REV_UIIPS_2013.pdf
- Dauguschies, A., & Najdrowski, M. (2005). Eimeriosis on cattle: current understanding. *Journal of Veterinary Medicine* , 52, 417-427.
- De Graef, J., Claerebout, E., & Geldhof, P. (2013). Anthelmintic resistance of gastrointestinal cattle nematodes. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* , 82, 113-123.
- Díez Baños, P. (2011). *Fasciola y Fasciolosis: un problema antiguo con nuevas soluciones impulsadas por la relación pluridisciplinar de la parasitología con otras ciencias*. Santiago de Compostela, Espanha.
- Divers, T. J., & Peek, S. F. (2008). *Diseases of Dairy Cattle*. St Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Dixit, A., Yadav, S., & Sharma, R. (2004). Experimental Bubalian Fasciolosis: Kinetics of Antibody Response using 28 kDa *Fasciola gigantica* Cysteine Proteinase as Antigen. *Tropical Animal Health and Production* , 36, 49-54.

- Dorchies. (2006). Flukes: old parasites but new emergence. *XXIV World Buiatrics Congress*. Nice, França.
- Dorny, P., Stoliaroff, V., Charlier, J., Meas, S., Sorn, S., Chea, B., et al. (2011). Infections with gastrointestinal nematodes, *Fasciola* and *Paramphistomum* in cattle in Cambodia and their association with morbidity parameters. *Veterinary Parasitology* , 175, 293–299.
- European Parliament, Directorate-General for Internal Policies. (2015). *The Agriculture of the Azores Islands*.
- Eysker, M., & Ploeger, H. W. (2000). Value of present diagnostic methods for gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Parasitology* , 120, 109-118.
- FAO, & IDF. (2011). *Guide to Good Dairy Farming Practice*. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations and International Dairy Federation.
- Feio, M. (1991). *Clima e Agricultura*. Lisboa: Ministério da Agricultura Pescas e Alimentação.
- Fiel, C. A., Fernández, A. S., Rodríguez, E. M., Fusé, L. A., & Steffan, P. E. (2012). Observations on the free-living stages of cattle gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* , 187, 217-226.
- Fleming, M., Rhodes, R., & Gamble, H. (1988). Evaluation of *Haemonchus contortus* infections in sexually intact and ovariectomized ewes. *American Journal of Veterinary Research* , 49 (10), 1733-1735.
- Forbes, A. B., Reddick, D., & Stear, M. J. (2014). Efficacy of treatment of cattle for liver fluke at housing: influence of differences in flukicidal activity against juvenile *Fasciola hepatica*. *Veterinary Record* , 176 (13), 333.
- Foreyt, W. J. (2001). *Veterinary Parasitology Reference Manual*. Iowa, United States of America: Blackwell Publishing.
- Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral. (2015). *Comissão Consultiva Setorial - Leite*.
- Gasbarre, L. (2014). Anthelmintic resistance in cattle nematodes in the US. *Veterinary Parasitology* , 204, 3-11.
- Gennari, S., Blasques, L., Rodrigues, A., Cilento, M., Souza, S., & Ferreira, F. (2002). Determination of nematode faecal egg counts during the periparturient period in cows. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* , v. 39, n. 1, 32-27.
- Ghasemi, A., & Zahediasl, S. (2012). Normality Tests for Statistical Analysis: A Guide for Non-Statisticians. *International Journal of Endocrinology Metabolism* , 10 (2), 486-489.
- Girão, E. S., & Ueno, H. (1985a). Diagnóstico coprológico quantitativo da Fasciolose de ruminantes no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* , 20 (4), 461- 466.

- Girão, E. S., & Ueno, H. (1985b). Técnica de quatro tamises para o diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose dos ruminantes. *Pesquisa agropecuária brasileira* , 20 (8), 905-912.
- González-Warleta, M., Lladosa, S., Castro-Hermida, J. A., Martínez-Ibeas, A. M., Conesa, D., Muñoz, F., et al. (2012). Bovine paramphistomosis in Galicia (Spain): Prevalence, intensity, aetiology and geospatial distribution of the infection. *Veterinary Parasitology* , 191, 252–263.
- Hansen, J., & Perry, B. (1994). *Table of contents: The epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of ruminants*. Obtido em 20 de Agosto de 2016, de Food and Agriculture Organization of the United Nations: <http://www.fao.org/Wairdocs/ILRI/x5492E/x5492e00.htm#Contents>
- Hodasi, J. (1972). The output of cercariae of *Fasciola hepatica* by *Lymnaea truncatula* and the distribution of metacercariae on grass. *Parasitology* , 64, 53-60.
- Hsu, W. H. (2008). *Handbook of Veterinary Pharmacology*. Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Hussein, A., Hassan, I., & Khalifa, R. (2010). Development and hatching mechanism of *Fasciola* eggs, light and scanning electron microscopic studies. *Saudi Journal of Biological Sciences* , 17, 247-251.
- Jones, R. A., Williams, H. W., Dalesman, S., & Brophy, P. M. (2015). Confirmation of *Galba truncatula* as an intermediate host snail for *Calicophoron daubneyi* in Great Britain, with evidence of alternative snail species hosting *Fasciola hepatica*. *Parasites and Vectors* , 8, 1-4.
- Jorge, L. M. (2013). Parasitismo gastrointestinal na raça Brava. *Novo Burladero* (1/2013) , 18-19.
- Kaplan, R. M. (2001). *Fasciola hepatica*: A Review of the Economic Impact in Cattle and Considerations for Control. *Veterinary Therapeutics* , v.2, n.1, 40-50.
- Leathwick, D., & Besier, R. (2014). The management of anthelmintic resistance in grazing ruminants in Australasia - Strategies and experiences. *Veterinary Parasitology* , 204, 44-54.
- LeBlanc, S. J., Lissemore, K. D., Kelton, D. F., Duffield, T. F., & Leslie, K. E. (2006). Major Advances in Disease Prevention in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* , v. 89, n.4, 1267–1279.
- Leitão, J. L. (1983). *Parasitologia Veterinária* (Vol. II). Lisboa, Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Lichtenfels, J., Pilitt, P., & Hoberg, E. (1994). New morphological characters for identifying individual specimens of *Haemonchus* spp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) and a key to species in ruminants of North America. *Journal of Parasitology* , 80, 107-119.

- Malacata, F. (2014). *Prevalência e controlo dos parasitas gastrointestinais em explorações bovinas leiteiras em Portugal continental*. Lisboa: Universidade de Lisboa: Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.
- Mason, W. A., Pomroy, W. E., Lawrence, K. E., & Scott, I. (2012). The effect of repeated, four-weekly eprinomectin treatment on milk production in pasture-based, seasonally-calving dairy cattle. *Veterinary Parasitology* , 189, 250-259.
- Massot, A. (2015). *The Agriculture of Azores islands*. Bruxelas: Catherine Morvan.
- Molina-Hernández, V., Mulcahy, G., Pérez, J., Martínez-Moreno, A., Donnelly, S., O'Neill, S. M., et al. (2015). Fasciola hepatica vaccine: We may not be there yet but we're on the right road. *Veterinary Parasitology* , 208, 101-111.
- Molly, J., Anderson, G., Fletcher, T., Landmann, J., & Knight, B. (2005). Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to Fasciola hepatica and Fasciola gigantica in cattle, sheep and buffaloes in Australia. *Veterinary Parasitology* , 130, 207-212.
- Monnig, H. O. (1950). *Veterinary Helminthology and Entomology* (3ª Edição ed.). Onderstepoort, South Africa: Baltimor.
- Morgan, E. R., Charlier, J., Hendrickx, G., Biggeri, A., Catalan, D., von Samson-Himmelstjerna, G., et al. (2013). Global change and helminth infections in grazing ruminants in Europe: impacts, trends and sustainable solutions. *Agriculture* , 3, 484-502.
- Morgan, E., Cavil, L., Curry, G., Wood, R., & Mitchell, E. (2005). Effects of aggregation and sample size on composite faecal egg counts in sheep. *Veterinary Parasitology* , 131, 79-87.
- Mundt, H. C. (2005). Control of clinical coccidiosis of calves due to Eimeria bovis and Eimeria zuernii with toltrazuril under field conditions. *Parasitology Research* , 97 (1), 134-142.
- Novobilský, A., & Hoglund, J. (2015). First report of closantel treatment failure against Fasciola hepatica in cattle. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* , 5, 172-177.
- Ortiz, P., Scarcella, S., Cerna, C., Rosales, C., Cabrera, M., Guzmán, M., et al. (2013). Resistance of Fasciola hepatica against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Veterinary Parasitology* , 195, 118– 121.
- Otranto, D., & Traversa, D. (2002). A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment. *Veterinary Parasitology* , 107, 317-335.
- Padilha, T. (1996). Estratégia para o controle da verminose gastrintestinal de bovinos de leite na região sudeste do Brasil. *Simpósio de controle de parasitos*, 1, (p. 57). Campinas.
- Parkins, J., & Holmes, P. (1989). Effects of Gastrointestinal Helminth Parasites on Ruminant Nutrition. *Nutrition Research Reviews* , 2, 227-246.

- Paz-Silva, A., Francisco, I., Valero-Coss, R., Cortiñas, F., Sánchez, J., Francisco, R., et al. (2011). Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydospores. *Veterinary Parasitology* , 179, 277-282.
- Paz-Silva, A., Hillyer, G. V., Sánchez-Andrade, R., Rodríguez-Medina, J. R., Arias, M., Morondo, P., et al. (2005). Isolation, identification and expression of a *Fasciola hepatica* cDNA encoding a 2.9-kDa recombinant protein for the diagnosis of ovine fasciolosis. *Parasitology Research* , 95, 129–135.
- Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J. L., Pedreira, J., Arias, M., C., L., et al. (2003). Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. *Parasitology Research* , 91, 328–331.
- Perri, A. F., Mejía, M. E., Licoff, N., Diab, S. S., Formía, N., Ornstein, A., et al. (2013). Gastrointestinal parasite control during prepuberty improves mammary parenchyma development in Holstein heifers. *Veterinary Parasitology* , 198, 345-350.
- Perri, A. F., Mejía, M. E., Licoff, N., Lazaro, L., Miglierina, M., Ornstein, A., et al. (2011). Gastrointestinal parasites presence during the peripartum decreases total milk production in grazing dairy Holstein cows. *Veterinary Parasitology* , 178, 311-318.
- Pinto, C. A. (2010). *Hematúria Enzoótica Bovina: Contribuição para o seu estudo etiopatogénico. Tese de Doutoramento. Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa. 8 pp.*
- Presidência do Governo dos Açores. (2016). *Plano Global de Sanidade Animal dos Açores*. Obtido em 30 de Agosto de 2016, de Governo dos Açores: <http://www.azores.gov.pt/Gra/srrn-agricultura/conteudos/livres/Plano+Global+de+Sanidade+Animal+dos+A%C3%A7ores.htm>
- Robles-Pérez, D., Martínez-Pérez, J. M., Rojo-Vázquez, F. A., & Martínez-Valladares, M. (2013). The diagnosis of fasciolosis in feces of sheep by means of a PCR and its application in the detection of anthelmintic resistance in sheep flocks naturally infected. *Veterinary Parasitology* , 197, 277– 282.
- Rodrigues, R. J. (19 de 6 de 2016). No leite dos Açores há uma história de sobrevivência. *Notícias Magazine* .
- RVC/FAO. (2016). *Faecal sedimentation: Procedure step 9*. Obtido em 30 de Agosto de 2016, de <http://www.rvc.ac.uk/review/parasitology/FaecalSedimentation/Step9.htm>
- Salimi-Bejestani, M., McGarry, J., Felstead, S., Ortiz, P., Akca, A., & Williams, D. (2005). Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. *Research in Veterinary Science* , 78, 177–181.
- Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Suárez, J., Panadero, R., Díez-Baños, P., & Morondo, P. (2000). Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology* , 93, 39-46.

- Sargison, N. (2012). Diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*. *Veterinary Record* , 171, 151-152.
- Sariozkan, S., & Yalçın, C. (2011). Estimating the total cost of bovine fasciolosis in Turkey. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* , v. 105, n. 6, 439-445.
- Schweizer, G., Braun, U., Deplazes, P., & Torgerson, P. R. (2005). Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Veterinary Record* , 157, 188-193.
- Secretaria Regional da Agricultura e Ambiente. (2016). *Classificações*. Obtido em 9 de Setembro de 2016, de Portal do Leite: <http://portaldoleite.azores.gov.pt/Classificacoes.aspx>
- Secretaria Regional do Ambiente e do Mar. (2015). *Plano de Gestão da Região Hidrográfica dos Açores (2009-2015)*. Obtido em 8 de Agosto de 2016, de PGRH-Açores: <http://www.azores.gov.pt/Gra/srrn-drotrh/conteudos/livres/PGRH-A%C3%A7ores.htm>
- Selemetas, N., Phelan, P., O’Kiely, P., & de Waal, T. (2015). The effects of farm management practices on liver fluke prevalence and the current internal parasite control measures employed on Irish dairy farms. *Veterinary Parasitology* , 207, 228–240.
- Selemetas, N., Phelan, P., O’Kiely, P., & de Waal, T. (2014). Weather and soil type affect incidence of fasciolosis in dairy cow herds. *Veterinary Record* , 175, 371.
- SimposiumVet. (2016). *SimposiumVet - Medicamentos Veterinários*. Obtido em 20 de Agosto de 2016, de <http://www.simposiumvet.pt/Especialidades?lista=M>
- Simsek, S., Koroglu, E., Utuk, A. E., & Altay, K. (2006). Use of Indirect Excretory/Secretory Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ES-ELISA) for the Diagnosis of Natural *Fasciola hepatica* Infection in Eosinophilic and Non-Eosinophilic Cattle from Eastern Turkey. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* , 30, 411-415.
- Skuce, P., & Zadoks, R. (2013). Liver fluke – A growing threat to UK livestock production. *Cattle Practice* , v.21, 138-149.
- Smith, B. P. (2009). *Large Animal Internal Medicine* (4ª edição ed.). St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier.
- Soulsby, E. (1987). *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. (7ª Edição ed.). México: Nueva Editorial Interamericana.
- Stear, M., Doligalska, M., & Schmelter, K. D. (2007). Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. *Parasitology* , 134, 139-151.
- Stromberg, B. E., & Gasbarre, L. C. (2006). Gastrointestinal Nematode Control Programs with an Emphasis on Cattle. *Vet Clin Food Anim* , 22, 543-565.
- Suarez, V. H., & Lorenzo, R. L. (2000). Ecology of the free living stages of cattle nematodes during summer contamination in Argentina Western Pampas. *Parasite Journal* , 7, 255-261.

- Suarez, V. H., Ciminari, O. E., Bedotti, D. O., Busetti, M. R., & Bello, E. M. (1990). Epidemiology, effects and control of nematode infections on zebucrossbred, hereford and hereford x brahman calves on argentina's western pampas. *Veterinary Parasitology* , 35, 79-91.
- Teixeira, T., Rosa, J. S., Rainha, N., Vaptista, J., & Rodrigues, A. (2012). Assessement of molluscicidal activity os essential oils from Azorean plants against *Radix peregra* (Müller, 1774). *Chemosphere* , 87, 1-6.
- Thienpont, D., Rochette, F., & Vanparijs, O. F. (1979). *Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico*. Beerse, Belgica: Janssen Research Foundation.
- Tilling, O. (2013). Rumen fluke in cattle in the UK: a review. *Livestock* , v. 18, n.6, 223-227.
- Toet, H., Piedrafita, D. M., & Spithill, T. W. (2014). Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *International Journal for Parasitology* , 44, 915-927.
- Urquhart, G. M., Armour, J., Duncan, J. L., Dunn, A. M., & Jennings, F. W. (1996). *Veterinary Parasitology*. Harlow, United Kingdom: Blackwell.
- Van Dijk, J., Sargison, N. D., Kenyon, F., & Skuce, P. J. (2010). Climate change and infectious disease: helminthological challenges to farmed ruminants in temperate regions. *Animal* , 4:3, 377–392.
- Viveiros, T. (2009). *Parasitoses gastrintestinais em bovinos na ilha de S. Miguel, Açores - Inquéritos de explorações, resultados laboratoriais e métodos de controlo*. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa: Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária .
- Waller, P. J. (2006). Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. *Animal Feed Science and Technology* , 126, 278-289.
- Waruiru, R. K., & Ngatho, J. (1998). Multiple anthelmintic resistance on a goat farm in Kenya. *Veterinary Parasitology* , 75, 191-197.
- Yildirim, A., Ica, A., & Inci, A. (2007). Prevalence and risk factors associated with *Fasciola hepatica* in cattle from Kayseri province, Turkey. *Revue de Médecine Vétérinaire* , v. 158, n. 12, 613-617.

Anexos

Anexo I - Inquérito ao produtor e recolha de dados individuais dos animais incluídos no estudo

Parte I - Recolha de dados acerca da exploração

1. Nome do proprietário:_____
2. Localização da exploração:_____
3. Qual o número de vacas leiteiras presentes na exploração?_____
4. Qual o tipo de sistema de produção da exploração?
 - a. Extensivo__
 - b. Intensivo__
 - c. Semi-intensivo__
- 4.1. Caso a resposta anterior corresponda à alínea a. ou c., realiza pastoreio rotacional?
 - a. Sim__
 - b. Não__
5. Como realiza a reposição do efetivo?
 - a. Animais nascidos e criados na exploração _____
 - b. Animais comprados _____
 - c. Animais nascidos e criados na exploração e comprados _____
6. Faz contraste leiteiro?
 - a. Sim__
 - b. Não__
7. Administrado algum tipo de antiparasitário aos seus animais?
 - a. Sim__
 - b. Não__

8. É permitido o acesso dos animais a locais com águas paradas?

a. Sim____

b. Não____

9. Realiza a higienização dos bebedouros?

a. Sim____

b. Não____

10. Com que frequência realiza a higienização dos bebedouros?

a. Não higieniza____

b. Todos os dias____

c. 15 em 15 dias____

d. 30 em 30 dias____

e. 60 e 60 dias____

f. 90 em 90 dias____

g. 180 em 180 dias____

h. Uma vez por ano____

Parte II - Recolha de dados dos animais amostrados

Identificação do animal	Idade	Data da última desparasitação	Princípio ativo utilizado

Anexo II - Procedimentos das técnicas coprológicas

Antes de dar início à análise coprológica propriamente dita, é necessária a produção de um *pool* de fezes correspondente aos animais amostrados, por cada exploração e de uma solução saturada de sacarose. Assim, para a construção de um *pool* de fezes:

- Homogeneizar as amostras refrigeradas, que irão ser analisadas;
- Pesar 2g de fezes a partir de cada amostra recolhida aos animais, da mesma exploração;
- Colocar as fezes pesadas no passo anterior, num copo de plástico e homogeneizar.

A análise dos *pools* de fezes começa pela aplicação do protocolo da técnica de McMaster:

- Colocar um copo de plástico na balança e tarar;
- Pesar 2g de fezes, a partir de cada *pool*, no copo de plástico;
- Adicionar 28 ml solução saturada de sacarose medida com a ajuda de um copo graduado;
- Homogeneizar com a ajuda de um agitador magnético;
- Filtrar a solução com a ajuda de um coador de malha fina, para outro copo;
- Preencher a câmara de McMaster (ambas as células), com a ajuda de uma pipeta de Pasteur;
- Deixar repousar 3-4 minutos;
- Observar ao microscópio ótico.

De seguida, procede-se à técnica de flutuação de Willis:

- Encher um tubo de ensaio na totalidade, com o restante da diluição das fezes, obtida no final do procedimento anterior, até formar um menisco convexo;
- Tapar com uma lamela;
- Aguardar 15 minutos;
- Retirar a lamela, colocando-a numa lâmina para observação ao microscópio ótico.

Por último, após a formação de um depósito no fundo do tubo de ensaio, realiza-se a técnica de sedimentação simples:

- Rejeitar o sobrenadante, deixando apenas o sedimento dentro do tubo de ensaio;
- Corar o sedimento com azul de metileno;
- Retirar duas alíquotas, com uma pipeta de Pasteur, para uma lâmina;
- Cobrir cada alíquota com uma lamela e observar ao microscópio ótico.

Anexo III - Procedimento da técnica de ELISA indireto

O protocolo da técnica de ELISA para detecção de anticorpos contra *F. hepatica* utilizado neste estudo foi o seguinte:

1. Sensibilizar as placas de microtitulação com o antígeno FhrAPS diluído em PBS (do inglês *Phosphate Buffered Saline*) (Nota 1 e 2) (figura 15):

- a) Não se sensibiliza a coluna de brancos;
- b) Colocar 100µl/poço do antígeno diluído em PBS;
- c) Incubar durante a noite (o mesmo número de horas para todas as placas) a 4°C, ou incubar na estufa a 37° durante 3-4h;
- d) Após incubação eliminar a solução sensibilizante, sem lavar.

2. Bloqueio dos pontos de união inespecíficos dos antígenos à placa com uma solução de leite magro em pó dissolvida a 2% em solução de PBS e Tween 20 (solução PT, referida na Nota 1). A solução resultante é denominada PTL (solução de PT e leite).

- a) Colocar na coluna de brancos;
- b) Dispor 300 µl/poço da solução bloqueante
- c) Incubar as placas durante meia hora a 37°C.
- d) Eliminar a solução bloqueante, sem lavar;
- e) Secar a placa contra o papel absorvente.

3. Adição dos soros diluídos em PTL. (Nota 3)

- a) Depositar 100µl/poço, incluindo o controlo positivo e o controlo negativo, com o intuito de os comparar com os soros problema.
- b) Na coluna de brancos colocar 100µl de PTL.
- c) Incubar durante 45 minutos a 37°C.

4. Lavagem dos poços com PT a fim de eliminar os anticorpos que não se unem ao poço:

- a) Realizar 2 lavagens por poço com PT;
- b) Secar a placa contra o papel absorvente.

5. Adição de imunoconjugado (RAB) marcado com peroxidase, diluído em PT. (Nota 4)

- a) Colocar na coluna de brancos;
- b) Colocar 100µl/poço de imunoconjugado;
- c) Incubar durante meia hora a 37°.

6. Lavar os poços para retirar a peroxidase que não se uniu e retirar restos de detergente.

- a) Realizar 2 lavagens com PT;
- b) Realizar 2 lavagens com água destilada;
- c) Secar a placa contra papel absorvente.

7. Adição do substrato da enzima peroxidase (OPD, ortofenildiamina, Sigma®) para valorizar a sua atividade. Aplica-se o substrato diluído em tampão citrato (pH 5) e água oxigenada a 30%. (Nota 5)

- a) Depositar 100µl/poço desta solução e colocar as placas num local escuro durante alguns minutos à temperatura ambiente;
- b) Colocar na coluna de brancos.

8. Deter a reação adicionando em cada poço 100µl de ácido sulfúrico 3N, colocando também na coluna de brancos (figura 16).

9. Leitura dos resultados no espectrofotómetro com um filtro de 490 e 450 nm.

Nota 1:

1. PBS (Phosphate Buffered Saline):

	1L	2L	3L	4L
NaCl	8,183g	16,366g	32,732g	40,91g
Na ₂ HPO ₄ +12H ₂ O	2,9g	5,8g	11,6g	14,5g
(Na ₂ HPO ₄ anidro)	(1,15g)	(2,3g)	(4,60g)	(5,75g)
KCl	0,201g	0,402g	0,804g	1,005g
KH ₂ PO ₄	0,204	0,408g	0,816g	1,02g

2. PT (PBS + Tween 20)

Para 1L: 1litro PBS + 1ml Tween 20

3. PTL (PT + Leite Magro em pó)

60ml PT + 1,2g Leite

Nota 2:

O antígeno FhrAPS encontrava-se conservado numa solução cuja concentração era de 2,3mg/ml, sendo que a concentração pretendida era de 3µg/ml. Assim, para uma placa, diluiu-se 13µl de FhrAPS em 10ml de PBS.

Nota 3:

Diluição dos soros em PTL com que se obtêm melhores resultados é 1/50 PTL.

Nota 4:

Diluição do imunoconjugado com que se obtêm melhores resultados é 1/1000 PTL.

Nota 5:

Preparação de OPD:

	H ₂ O destilada (ml)	Ác. Cítrico (gr)	Na ₂ HPO ₄ (gr)	OPD (gr)	H ₂ O ₂ (ml)
1 placa	12	0,084	0,1056	0,012	12
2 placas	25	0,175	0,22	0,025	25
3 placas	36	0,252	0,3168	0,036	36
4 placas	50	0,35	0,44	0,05	50

Técnica:

1. Misturar Ac. Cítrico e Na₂HPO₄ com a H₂O destilada. Ajustar o pH a 5 adicionando Na₂OH 2N para subir o pH e Ác. Clorídrico para baixar.
2. Apenas quando o pH for 5 se pode adicionar o OPD.
3. A H₂O₂ adiciona-se apenas no momento de colocar na placa de titulação.

Anexo IV - Chaves de codificação

a) Chave de codificação relativa à primeira parte do estudo.

Legenda	Descrição
ID exploração	E001, E002,...E155
Nr. oficial da exploração	9204230, 9200531,...etc.
Nome do proprietário	Nome do proprietário da exploração
McMaster EGI	Número de ovos por grama de fezes (OPG), em pool: <50: 0, 50, 100,...etc
McMaster <i>Eimeria</i> spp.	Número de ovos por grama de fezes (OPG), em pool: 0, 50, 100,...etc
McMaster <i>Moniezia</i> spp.	Número de ovos por grama de fezes (OPG), em pool: 0, 50, 100,...etc
Willis EGI	Ausente: 0; Presente: 1
Willis <i>Eimeria</i> spp.	Ausente: 0; Presente: 1
Willis <i>Moniezia</i> spp.	Ausente: 0; Presente: 1
Sedimentação Tremátodes	Ausente: 0; Presente: 1
Reposição animais	Casa: 1; Compra: 2; Compra e casa: 3
Nr. animais	Número de animais na exploração
Contraste leiteiro	Não: 0; Sim: 1
Sistema de produção	Extensivo: 1; Intensivo: 2; Semi-intensivo: 3
Rotação de pastos	Não: 0; Sim: 1
Acesso a águas paradas	Não: 0; Sim: 1
Higiene de bebedouro	Não: 0; Sim: 1
Frequência de higiene	Não limpa: 0; Todos os dias: 1; 15 em 15 dias: 2; mês a mês: 3; 2 em 2 meses: 4; 3 em 3 meses: 5;
Desparasitação	Não: 0; Sim: 1

b) Chave de codificação relativa à segunda parte do estudo.

Legenda	Descrição
ID interna	A001, A002, A003,...até A465
ELISA	Negativo: 0; Positivo: 1
Freguesia	Freguesias de S. Miguel
Zona anterior	Zonas de prevalência Baixa (<6%): 1; Média (6%-14%): 2; Alta (14%-50%): 3
Idade	Anos: 1, 2, 3, 4, 5,...etc
Princípio ativo utilizado na última desparasitação	Nenhum: 0, Albendazol: 1, Doramectina: 2, Eprinomectina: 3, Ivermectina+Clorsulon: 4, Levamisol: 5, Nitroxinil: 6, Triclabendazol+Moxidectina: 7, Sem dados.
Última desparasitação	Não desparasita: 0; > 1 ano: 1; >9 e ≤12 meses: 2; >6 e ≤9 meses: 3; >3 e ≤6 meses: 4; >1 e ≤3 meses: 5; ≤1 mês: 6
Antiparasitário	Sem efeito sobre <i>Fasciola</i> spp., incluindo animais não desparasitados: 0; Com efeito sobre <i>Fasciola</i> spp.: 1

Anexo V - Distribuição geográfica do número de explorações com animais que apresentaram resultado positivo ao teste ELISA por freguesia.

