



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

PREVALÊNCIA E CONTROLO DOS PARASITAS GASTROINTESTINAIS EM
EXPLORAÇÕES BOVINAS LEITEIRAS EM PORTUGAL CONTINENTAL

FRANCISCO CÂNDIDO BOAVIDA MALCATA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

VOGAL

Doutor Rui José Branquinho de Bessa
Dr. José Pedro do Rosário Ribeiro Lima

ORIENTADOR

Dr. José Pedro do Rosário Ribeiro Lima

CO-ORIENTADOR

Doutor George Thomas Stilwell

2014
LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

PREVALÊNCIA E CONTROLO DOS PARASITAS GASTROINTESTINAIS EM
EXPLORAÇÕES BOVINAS LEITEIRAS EM PORTUGAL CONTINENTAL

FRANCISCO CÂNDIDO BOAVIDA MALCATA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

VOGAL

Doutor Rui José Branquinho de Bessa
Dr. José Pedro do Rosário Ribeiro Lima

ORIENTADOR

Dr. José Pedro do Rosário Ribeiro Lima

CO-ORIENTADOR

Doutor George Thomas Stilwell

2014
LISBOA

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a Lua toda
Brilha, porque alta vive.”

Ricardo Reis

Dedicatória

À minha família, principalmente aos meus pais e minha irmã, que com mais experiência e consciência do mundo me deixaram errar sem que nunca me permitissem desistir de tentar e de sonhar.

Agradecimentos

Quero agradecer ao Professor Doutor George Stilwell, pela sugestão do tema deste trabalho, por todo o tempo que me dedicou, todos os seus conselhos e o vasto conhecimento partilhado antes e durante a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Dr. José Pedro Lima, pela disponibilidade e paciência em me receber como seu estagiário, por todos os ensinamentos, histórias partilhadas e todas as oportunidades que me proporcionou.

Ao Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, que com muita amizade e alegria colaborou neste projecto, me recebeu e tratou como se fosse seu orientando, disponibilizando-se sempre para me ajudar e dar dicas valiosas. Agradecer também o seu sentido de humor único que tornaram os momentos de aprendizagem inesquecíveis.

A todos os produtores, que me permitiram obter os dados essenciais à realização do meu estudo. Todo o conhecimento que partilharam, as oportunidades que me proporcionaram e todos os momentos agradáveis de convívio.

À Dra. Lídia Gomes, por me ter recebido no Laboratório de Doenças Parasitárias, me ter ensinado todas as técnicas laboratoriais, ter sido uma excelente companhia ao longo deste tempo e muito me ter ensinado para além do mundo da parasitologia.

Aos colegas de laboratório, por toda a alegria que comigo partilharam durante este período.

Aos doutorandos Ana Margarida Alho e Daniel Murta, pelas suas sugestões e conselhos que muito me ajudaram no meu pequeno percurso científico.

Ao meu pai e à minha mãe, por terem tornado este sonho possível, por me terem proporcionado tudo ao longo destes 24 anos. Por serem os meus maiores ídolos e também os meus orgulhosos fãs.

À minha irmã Rita e minha melhor amiga, pela ajuda preciosa na estatística e principalmente pela importância que tem na minha vida.

Aos economistas da família, Sérgio e Zé Maria, pela leitura atenta e preciosas sugestões no tema que melhor dominam.

À restante família: avós, tios e primos, por serem o maior vínculo que o ser humano pode ter.

Aos amigos da turma D, do Futsal, da AEFMV e de Erasmus, por terem feito com que os bons momentos não passassem depressa mas que durassem para sempre.

À Adelaide, por ser uma amiga extraordinária e me ter ajudado a crescer como pessoa.

Aos amigos de uma vida, por me fazerem sentir sempre “que os amigos são a família que nós escolhemos”.

Resumo

Prevalência e controlo dos parasitas gastrointestinais em explorações bovinas leiteiras em Portugal continental

Nos tempos que correm é cada vez mais imprescindível a obtenção de produtos de origem animal utilizando os recursos de forma eficiente e evitando o desperdício. Os parasitas geralmente são vistos como tendo um efeito substractor na produção de leite e em todo o ciclo de produção desde o nascimento do vitelo, recria e futura produção leiteira. Este estudo pretende fazer uma análise da forma como estes parasitas estão presentes nas vacarias de leite na região centro e sul de Portugal e qual a melhor forma para os controlar.

Foram colhidas amostras fecais de animais em diferentes fases produtivas (n=380) em várias explorações com maneio intensivo (n=7) ou semi-intensivo (n=3), que foram submetidas a diferentes análises coprológicas para a detecção de formas parasitárias. Foram efectuados também esfregaços fecais para a pesquisa de *Cryptosporidium* sp. em vitelos (n=82).

Nos métodos quantitativos, 94% e 92% dos animais apresentaram menos de 50 ovos (OPG) ou oocistos (oPG) por grama de fezes para Estrongilídeos Gastrointestinais (EGI) e *Eimeria* spp., respectivamente. Nas técnicas qualitativas foram identificadas 15,3% de infecções por EGI, 13,4% por *Eimeria* spp., 1% por céstodes e 1,6% foi mista (EGI e *Eimeria* spp.). Os EGI foram identificados predominantemente em explorações semi-intensivas e *Eimeria* spp. em explorações intensivas. Após coprocultura os géneros parasitários mais comuns foram *Ostertagia* (56.1%), *Cooperia* (28.3%) e *Trichostrongylus* (11.8%). A sedimentação simples efectuada em alguns animais em semi-intensivo (n=60) foi negativa para a pesquisa de tremátodes, no entanto através do método de McMaster modificado realizado em *pools* de 10 amostras (n=6) foi possível detectar o parasita *Paramphistomum* sp. em 2 desses testes. O protozoário *Cryptosporidium* sp. foi detectado em 9 explorações e em 42,7% das amostras.

Estes resultados não nos dão uma resposta definitiva em relação à necessidade de optar por determinado controlo antiparasitário. No entanto, o médico veterinário com a informação obtida através de inquéritos aos produtores juntamente com os conhecimentos de epidemiologia, biologia, clínica e economia tem a capacidade de ajuizar, para cada situação, a estratégia de controlo antiparasitário mais adequada. Assim, a abordagem ao parasitismo actualmente não envolve somente a relação entre hospedeiro e parasita, mas também toda a análise que lhe está associada. O médico veterinário é uma peça chave nessa avaliação global.

Palavras-chave: Parasitas gastrointestinais, bovinos leiteiros, prevalência, controlo, maneio, Portugal Continental

Abstract

Prevalence and control of gastrointestinal parasites in dairy farms in continental Portugal

Today it is increasingly necessary to produce food using resources efficiently and avoiding waste. Parasites in dairy cows generally have a negative effect on milk production throughout the whole cycle: birth, calf rearing and future milk production. This study aimed to examine which parasites are present in dairy farms in central and southern region of Portugal and to identify the best way to control parasites in these farms. Fecal samples from animals on different production stages (n=380) were collected in intensive (n=7) and semi-intensive (n=3) farms. These samples were analysed by distinct coprological techniques so as to identify different parasitic forms. Faecal smears were performed for the detection of *Cryptosporidium* sp. in calves (n = 82).

In quantitative techniques, 94% and 92% of the animals showed less than 50 eggs (EPG) or oocysts (oPG) per gram of faeces for gastrointestinal strongyles (EGI) and *Eimeria* spp., respectively. In qualitative techniques were identified 15,3% of infections by EGI, 13,4% by *Eimeria* spp., 1% by cestodes and 1,6% by mixed infection (EGI and *Eimeria* spp.). The EGI was mainly identified in semi-intensive farms and *Eimeria* spp. in intensive farms. The main genera detected in coproculture were *Ostertagia* (56.1%), *Cooperia* (28.3%) and *Trichostrongylus* (11.8%). The simple sedimentation technique performed in few semi-intensive animals (n=60) did not show any trematodes, however using the modified McMaster method performed in pools of 10 samples (n=6) the *Paramphistomum* sp. was detected in 2 of this tests. The protozoan *Cryptosporidium* sp. appeared in 9 farms in 42,7% of the samples.

These results did not give a precise answer regarding the best antiparasitic control measure to be used. Veterinarian expertise on epidemiology, biology, clinical and economy associated with the information gathered from farmers is crucial to adopt the best strategy to control such parasites. The current definition of parasitism involves not only the relationship between host and parasite but also the financial impact associated. The veterinarian is a key element in this complex evaluation.

Key-words: Gastrointestinal parasites, dairy cows, prevalence, control, animal husbandry, continental Portugal.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE GRÁFICOS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
1-Introdução.....	1
2-Breve descrição das actividades realizadas durante o estágio.....	3
3-Revisão bibliográfica.....	5
3.1- A Produção leiteira Bovina em Portugal.....	5
3.2- Parasitas que mais influenciam a produção leiteira e sua taxonomia	6
3.2.1-Epidemiologia, biologia e patogenia dos parasitas que afectam os bovinos leiteiros.....	7
3.2.1.1-Helminthes	8
3.2.1.2-Protozoários	16
3.2.2- As consequências das alterações climáticas.....	20
3.2.2-Diagnóstico	20
3.2.2.1-Diagnóstico <i>in vivo</i> dos Helminthes.....	21
3.2.2.2-Diagnóstico <i>Post-mortem</i> dos Helminthes.....	28
3.2.2.3-Diagnóstico dos protozoários.....	29
3.3-Tratamento, prevenção e controlo parasitário.....	30
3.3.1-Controlo farmacológico	30
3.3.2-Não Farmacológico.....	34
3.3.3-Resistências aos antihelmínticos	37
3.3.4-Tratamento e controlo dos protozoários.....	39
3.4-Impacto económico.....	42
3.4.1-Indicadores de performance produtiva (IPP)	43
3.4.2-Análise económica.....	46
3.4.3-Valor monetário	49
4-Trabalho Experimental	50
4.1-Objectivos	50
4.2-Material e métodos.....	50
4.2.1-Characterização das explorações	50
4.2.2-Characterização da população.....	51
4.2.3-Characterização da amostra	52
4.2.4-Análise Laboratorial.....	52
4.3-Resultados	56

4.3.1-Estatística descritiva.....	56
4.5-Discussão.....	66
4.5.1-McMaster	66
4.5.2-McMaster-Coccidiose (<i>Eimeria</i>).....	68
4.5.3-Willis ou Flutuação	71
4.5.4-Sedimentação simples	72
4.5.4-McMaster modificado	72
4.5.5-Baermann	74
4.5.6-Coprocultura e identificação larvar	76
4.5.7-Esfregaços- <i>Cryptosporidium</i>	78
4.5.8-Análise dos valores de OPG de EGI	79
4.5-Conclusões	85
5-Bibliografia.....	87
6-Anexos	105
A1- Contagens de ovos fecais (OPG) através do método de McMaster, técnica de flutuação e de sedimentação (Madeira de Carvalho, 2001).	105
A2- Método de Baermann (Alho <i>et al.</i> , 2013).....	106
A3- Técnica de Ziehl-Neelsen modificada (Martins <i>et al.</i> , 2007).....	107
A4- Método de sedimentação pelo McMaster modificado (Conceição <i>et al.</i> , 2002).	108
A5- Coprocultura e identificação das larvas L3 (Madeira de Carvalho, 2001).....	110
A6- Identificação das larvas L3 (RCV/FAO, 2014b).....	112
A7- Inquérito aos produtores.....	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Exemplos de ovos detectados através da técnica de Willis.. (Fotografias originais). A- <i>Moniezia benedeni</i> (Ampliação de 200x), B- EGI (Ampliação 100x), C- EGI (Ampliação de 200x).....	59
Figura 2- Ovo de <i>Paramphistomum</i> sp. detectado através do método de McMaster Modificado. (Ampliação de 200x. Fotografia original).	60
Figura 3- Larvas no estágio L3 detectadas após coprocultura. (Fotografias Originais) A- <i>Ostertagia</i> (Ampliação de 200x), B- <i>Haemonchus</i> (Ampliação de 100x), C e D- <i>Cooperia</i> (Ampliação de 200x), E- <i>Trichostrongylus</i> (Ampliação de 200x).....	61

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Distribuição relativa dos valores de EGIs da técnica de McMaster por cada grupo de animais.....	57
Gráfico 2- Distribuição relativa dos valores de oocistos de Coccídeos obtidos através da técnica de McMaster.....	58
Gráfico 3-Frequência relativa de infecção parasitária entre os diferentes grupos de animais detectada através do método de Willis.	59
Gráfico 4- Distribuição relativa dos testes de Willis.....	59
Gráfico 5- Frequência absoluta dos gêneros de larvas detectados e identificados em todas as coproculturas.	61
Gráfico 6- Frequência relativa dos resultados do teste de McMaster em animais tratados e sem tratamento anti-helmíntico.....	62
Gráfico 7- Distribuição dos resultados de McMaster nas amostras analisadas.....	63
Gráfico 8- Probabilidade de detectar ovos de EGI através do método de flutuação, segundo o tipo de exploração.....	64
Gráfico 9- Probabilidade de detectar ovos de EGI pelo método de flutuação, segundo a fase produtiva dos animais.....	64
Gráfico 10- Probabilidade de detectar ovos de EGI no método de flutuação, segundo a presença e a ausência de tratamento	65
Gráfico 11- Probabilidade de detectar ovos de EGI através do método de flutuação, segundo a fase produtiva dos animais e a presença ou ausência de tratamento	65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Taxonomia dos principais parasitas dos bovinos leiteiros. Adaptado de Bowman, (2009).	7
Tabela 2- Principais nematodes que parasitam os bovinos. Adaptado de Taylor <i>et al.</i> , (2007).9	
Tabela 3-Principais cestodes que parasitam os bovinos. Adaptado de Taylor <i>et al.</i> , (2007)..14	
Tabela 4- Principais trematodes que parasitam os bovinos. Adaptado de Taylor <i>et al.</i> , (2007); Eduardo, (1982); Rinaldi <i>et al.</i> , (2005); Silvestre, Saue & Cabaret, (2000).	15

Tabela 5- Anti-helmínticos para bovinos. Adaptado de APIFARMA, (2013) e SIMPOSIUMVET.PT, (2014).	31
Tabela 6- Composição e distribuição da amostra de fezes colhidas em 10 vacarias.	51
Tabela 7- Distribuição relativa e absoluta das idades dos vitelos amostrados.....	52
Tabela 8- Frequências absolutas do método de McMaster para contagem de EGIs.....	57
Tabela 9- Frequências absolutas do método de McMaster para contagem de coccídeas de <i>Eimeria</i> spp.	57
Tabela 10- Frequências absoluta dos resultados do método de Willis ou flutuação.....	58
Tabela 11-Frequência relativa dos resultados do teste de McMaster modificado em <i>pools</i> de dez amostras de duas vacarias em regime semi-intensivo.	60
Tabela 12- Frequências absolutas dos resultados dos esfregaços fecais.....	61
Tabela 13- Anti-helmínticos administrados aos animais.	62
Tabela 14- Valores das probabilidades de detecção (e respectivos IC de 90%) de ovos de EGI em função do tipo de exploração nos testes de flutuação, de McMaster e em ambos.....	63
Tabela 15- Valores das probabilidades de detecção (e respectivos IC de 90%) de ovos de EGI em função da fase produtiva nos testes de flutuação, de McMaster e em ambos.	64
Tabela 16- Valores das probabilidades de detecção (e respectivos IC de 90%) de ovos de EGI em função do tratamento nos testes de flutuação, de McMaster e em ambos	65
Tabela 17- Valores das probabilidades de detecção (e respectivos IC de 90%) de ovos de EGI em função das variáveis tratamento e tipo de exploração nos testes de flutuação, de McMaster e em ambos.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AH	Anti-helmítico
BP	Bronquite parasitária
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent assay</i>
FECRT	<i>Fecal egg count reduction test</i>
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
FSC	<i>First season calves</i>
G	Gastrina
GEP	Gastroenterite parasitária
GMD	Ganho Médio Diário
IE	Indicadores económicos
IPP	Indicadores de <i>performance</i> produtiva
IS	Intervalo de segurança
L1	Primeiro estágio de desenvolvimento larvar
L2	Segundo estágio de desenvolvimento larvar
L3	Terceiro estágio de desenvolvimento larvar
L4	Quarto estágio de desenvolvimento larvar
L5	Quinto estágio de desenvolvimento larvar
NGI	Nematodos gastrointestinais
NP	Nematodos pulmonares
OD	Densidade óptica
OPG	Ovos por grama de fezes
oPG	Oocistos por grama de fezes
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
TST	<i>Targeted selective treatment</i>
VPPV	Vitelos que pastoreiam pela primeira vez

1-Introdução

A nível mundial o consumidor é cada vez mais exigente com a qualidade e segurança dos produtos que adquire, consciencioso e preocupado com o meio ambiente e com o bem-estar animal. Existem disponíveis actualmente no mercado uma série de regras que asseguram que estas características e princípios são tidos em conta em toda a cadeia produtiva, quer se trate da produção de origem animal ou não. Assim para um negócio permanecer competitivo têm que ser tomadas decisões correctas de acordo com as regras existentes. Se adicionarmos também, os condicionalismos produtivos de natureza ambiental, dada a sua imprevisibilidade, estamos perante um conjunto de factores que tornam a actividade de produção, além de complexa, muito vulnerável.

Situando tudo isto no contexto económico actual de grande instabilidade, a que o sector da produção animal também não escapa, existe nos dias de hoje uma pressão cada vez maior nos resultados de qualquer empresa, em consequência dos elevados custos de produção e da flutuação dos preços dos produtos. No entanto, é evidente que apesar de todos estes condicionantes, a produtividade está muito dependente de outros factores além dos enunciados e constitui um pilar para a saúde financeira de qualquer exploração.

Deste modo, e em termos veterinários, considera-se de extrema importância a prevalência ou ausência de determinadas doenças, pois além de poderem restringir a circulação animal ou a comercialização dos seus produtos, afectam também a eficiência biológica, e em ocasiões mais graves, causam a morte. As doenças parasitárias, muito comuns nos animais de produção, são um exemplo deste tipo: são infecções ou infestações de parasitas, que afectam órgãos, aparelhos e sistemas orgânicos, causando danos nos tecidos e importantes perdas de proteínas, que se reflectem em efeitos muito variados, como a diminuição da eficiência e da produtividade. No caso do sector leiteiro podem acarretar perdas significativas na produção de leite.

Durante anos o manejo dos animais de produção mudou a sua forma de actuação, por se saber que era mais rentável prevenir em vez de tratar e actuar na população em geral em vez de apenas no indivíduo (LeBlanc, Lissemore, Kelton, Duffield & Leslie, 2006). No entanto estas atitudes conduziram a um uso exagerado de fármacos, principalmente antibióticos e antiparasitários, e de forma pouco criteriosa, levando ao aparecimento de estirpes resistentes e de resíduos na cadeia produtiva e no meio ambiente que fazem com que actualmente se questione este modo de actuação e se volte a repensar em novas estratégias.

No sector leiteiro é prática comum o uso indiscriminado de fármacos antiparasitários em animais com infecções subclínicas, pois acredita-se que possam favorecer a produção. No entanto, além dos custos que pressupõem, cada vez mais importantes nos tempos que decorrem, estes fármacos têm-se tornado cada vez menos eficazes.

De modo a contrariar esta tendência, e o modo como o parasitismo afecta economicamente a produção, é importante a adopção de medidas sustentáveis de controlo antiparasitário.

A adopção de um raciocínio de deparasitação sustentado depende do conhecimento da biologia e epidemiologia do parasita, do entendimento dos seus efeitos na saúde animal, quer nas situações que são acompanhadas de sinais clínicos, quer nas situações subclínicas. Sobretudo nestas últimas, em que os animais não exibem quaisquer sinais clínicos, é importante aliar todo este conhecimento a técnicas laboratoriais de diagnóstico, cada vez mais desenvolvidas, para melhor avaliar a carga parasitária e melhor adoptar e dirigir todo o nosso raciocínio. Se a todo este conhecimento, conseguirmos incorporar ainda a avaliação económica específica de cada exploração, com base em alterações dos parâmetros produtivos, a opção de desparasitação, ou o seu aconselhamento, além de mais fundamentada, será mais facilmente compreendida e melhor justificada para cada circunstância.

Com base neste raciocínio surge então o presente trabalho que pretende contribuir para o conhecimento da prevalência de parasitas internos em animais de vacarias de leite do centro e sul de Portugal, e tenta ajudar no aconselhamento do controlo antiparasitário, fundamentando a necessidade de adoptar essa opção na sanidade animal.

2-Breve descrição das actividades realizadas durante o estágio

O estágio curricular do autor foi dividido em dois períodos: a) entre outubro de 2012 a janeiro de 2013 e b) entre fevereiro de 2013 a junho de 2013.

- a) No primeiro período, o autor acompanhou o médico veterinário Dr. Pedro Lima na sua actividade diária de consultor a nível da produção e assistência, a nível clínico, reprodutivo e cirúrgico, em inúmeras vacarias de produção de leite na região centro-oeste de Portugal continental. Neste período, o autor teve a oportunidade de assistir a diversos casos clínicos dos diferentes aparelhos, bem como a algumas cirurgias. Serão apenas enunciados alguns casos que se consideraram ter maior importância. No que se refere ao aparelho reprodutor, o autor realizou palpções rectais para diagnósticos de eventuais problemas reprodutivos e gestação e para estabelecimento de um programa de controlo reprodutivo para sincronização de cios e IA (inseminação artificial) a tempo fixo. Efectuou também alguns partos e teve oportunidade de assistir ainda a algumas cesarianas, e à resolução de outras complicações obstétricas, como laceração uterina e torção uterina.

Ao nível do aparelho locomotor, o autor teve ainda a oportunidade de acompanhar diversos casos clínicos de claudicação e efectuar algumas técnicas terapêuticas e correctivas ao nível das úngulas. No aparelho respiratório, os problemas mais frequentes foram as pneumonias em vacas adultas. No entanto, foi no aparelho digestivo que ocorreram os casos mais entusiasmantes para a formação do autor, nomeadamente as cirurgias para correcção de deslocamentos do abomaso à esquerda e à direita acompanhada de torção, e a ruminotomia para remoção de um corpo estranho que estaria a ser responsável por uma indigestão vaginal.

O autor considerou esta parte do estágio, uma excelente oportunidade de conhecer várias explorações com diferenças a nível de instalações, no seu efectivo, no maneio e consequentemente também nos respectivos problemas a nível clínico, possibilitando ao autor o contacto com vários produtores e trabalhadores envolvidos neste sector e o aporte de muitos conhecimentos não exclusivamente veterinários, que o autor considera terem sido determinantes para o seu crescimento e formação a nível profissional e de grande significado a nível pessoal.

- b) O segundo período do estágio foi passado maioritariamente no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, intercalando-o com curtas mas obstinadas visitas às explorações para recolha de amostras essenciais à realização do presente estudo. Durante este período o autor efectuou as técnicas laboratoriais necessárias ao seu trabalho, teve a oportunidade de

acompanhar os trabalhos de outros colegas e ficou a conhecer a rotina de funcionamento e algumas das técnicas laboratoriais para pesquisa de parasitas que se realizam neste laboratório.

Durante o período de estágio o autor teve ainda a possibilidade de participar em alguns encontros e discussões promovidas por algumas empresas da indústria farmacêutica, colaborar em algumas saídas de campo para recolha de elementos ao projecto “AWIN-Animal Welfare Indicators”, participar em diversos congressos (“I Jornadas do Campo Branco”, “IIª Conferência do CPSU”, “Workshop sobre patologias de Vitelos”, “XV Jornadas da APB”, “Welfare Milk Quality”) e seminários organizados pelo Núcleo Buiátrico da Associação dos Estudantes da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, entre os quais num deles teve a oportunidade de ser orador do *workshop* com o tema “Abordagem Prática à Parasitologia em Ruminantes”.

Por último, consideramos sempre que toda e qualquer oportunidade pode ser útil para a nossa formação e crescimento, desde que nos consigamos envolver na própria experiência, clínica ou laboratorial, pois ao fazer, compreendemos melhor o que estamos a aprender.

3-Revisão bibliográfica

3.1- A Produção leiteira Bovina em Portugal

O sector leiteiro nacional caracteriza-se por possuir 7 mil produtores, dos quais apenas 4 mil se encontram em Portugal continental (APROLEP, 2012). A produção leiteira nacional assim como a de outros países tem sofrido com o enorme aumento dos custos das matérias-primas para alimentação animal, também resultantes dos sucessivos acontecimentos climatéricos desfavoráveis e com as consequências da especulação bolsista associada ao aumento dos preços das energias. Exacerbando ainda mais toda esta situação desfavorável, associa-se o facto dos valores pagos ao produtor pelo seu leite produzido não terem acompanhado toda esta tendência tornando a diferença entre a receita gerada pela produção e os custos a ela inerentes cada vez mais reduzida e colocando os produtores nacionais numa situação económica vulnerável.

Na tentativa de contrariar toda esta tendência os produtores portugueses de leite têm feito esforços para que o valor pago pelo leite seja cada vez mais justo (APROLEP, 2012). No entanto apesar dos ligeiros aumentos que houve ao longo do ano de 2012 e de 2013, estes são considerados ainda insuficientes.

É importante referir que, mesmo enfrentando todos estes condicionantes, a produção de leite de origem bovina em Portugal no passado ano de 2012, foi de 1.881 milhões de litros, correspondendo a uma subida de 1,1% em relação ao ano de 2011, justificando-se estes valores principalmente pelo aumento da produção dos maiores produtores e pela negociação de melhores contratos entre a produção e a indústria nacional (INE, 2013) com o objectivo de tentar diluir os custos fixos e os custos variáveis de produção pela maior quantidade de leite produzida.

Grande parte da produção leiteira bovina em Portugal continental ocorre em regime intensivo, nas quais os animais se encontram estabulados com elevada densidade animal e sem acesso ao exterior ou sendo este muito limitado. Toda a alimentação é normalmente efectuada exclusivamente na manjedoura. Este sistema contrasta com outros tipos de produção de bovinos em que os animais têm acesso à pastagem e estão mais predispostos às infecções parasitárias que ocorrem por transmissão fecal-oral durante o pastoreio. Muito se tem estudado e actualmente se conhece, sobre o modo como os parasitas afectam os bovinos leiteiros que pastoreiam, não existindo o mesmo conhecimento ou permanecendo sempre a dúvida na forma como afectam os animais que não pastoreiam. No sector leiteiro é prática comum o uso indiscriminado de antihelmínticos e de outros antiparasitários em animais com

infecções subclínicas, pois acredita-se que possam favorecer a produção. No entanto estes antiparasitários têm custos, relacionados com o próprio fármaco e a sua administração, e nem sempre podem ser justificáveis. Uma vez que as margens de lucro anteriormente anunciadas são tão pequenas, qualquer melhoria por mais subtil que possa ser a nível individual, pode-se traduzir em algo de grande importância ao nível de toda a exploração (van der Voort *et al.*, 2013).

3.2- Parasitas que mais influenciam a produção leiteira e sua taxonomia

Antes de se abordar o tema principal deste estudo, consideramos conveniente para sua melhor compreensão, relembrar o fenómeno do parasitismo e situar, de acordo com a Taxonomia e Sistemática, os principais parasitas que podem estar presentes nos bovinos produtores de leite. O parasitismo é um fenómeno bastante comum na Natureza, envolvendo a relação entre hospedeiro e parasita. Os parasitas são por definição prejudiciais para o seu hospedeiro, ao subtraírem os seus nutrientes para realizarem todas as suas funções vitais, sem qualquer benefício para o hospedeiro, chegando mesmo a provocar-lhe lesões. Este fenómeno, como será constatado mais à frente, engloba vários grupos taxonómicos, sendo que nos bovinos leiteiros os mais importantes são os helmintes e os protozoários (Tabela 1). Esta diversidade taxonómica está associada a uma vastíssima diversidade de ciclos biológicos, impactos no hospedeiro, modos de transmissão e graus de virulência.

Dadas as consequências que os parasitas podem provocar, os hospedeiros devem ter a capacidade de melhorar os seus mecanismos de defesa limitando o impacto negativo do parasitismo. De acordo com este ponto de vista, os hospedeiros desenvolveram um conjunto de adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais para combater e contrariar os ataques parasitários. No entanto, os parasitas responderam a esta pressão de selecção com o desenvolvimento de capacidades que contrariam estas adaptações para superar as defesas do hospedeiro. Estes ciclos entre parasita e hospedeiro, e entre adaptações e contra adaptações, definem o processo de co-evolução (Sorci & Garnier, 2008). É uma das características mais importantes das interacções entre parasitas e hospedeiros, e que corrobora a expressão de alguns mestres desta ciência, segundo os quais “ A Parasitologia é um Mundo”.

A sistemática tem uma grande importância em todos os ramos da biologia. Mesmo na actualidade, quando a tecnologia molecular está cada vez mais desenvolvida e possui maior evidência, não se deve desvalorizar a Sistemática como disciplina que combina a ciência que se dedica à morfologia, a Taxonomia, com a filogenia que explica a história natural dos seres vivos. Aquela é igualmente muito importante em Parasitologia, auxiliando não só na

identificação de diferentes géneros, espécies e até estirpes de parasitas, como também no estudo e compreensão da sua biologia (Monis, 1999).

Os seres vivos encontram-se organizados em Reino, Filo, Classe, Ordem, Família, Género e Espécie. Esta é igualmente a forma de classificação dos parasitas que serão abordados neste estudo e que se encontram resumidos na Tabela 1.

Tabela 1- Taxonomia dos principais parasitas dos bovinos leiteiros. Adaptado de Bowman, (2009).

Reino	Filo	Classe	Ordem	Superfamília(-oidea)/Família(-idae)			
Animalia	Nemathelminthes	Nematoda	Strongylida	Strongyloidea			
				Trichostrongyloidea			
				Ancylostomatoidea			
				Rhabditida	Rhabditoidea		
				Enoplida	Trichinelloidea		
					Trichuroidea		
					Ascaridoidea		
				Plathelminthes	Cestoda	Cyclophyllidea	Taeniidae
							Anaplocephalidae
							Fasciolidae
	Trematoda	Digenea	Paramphistomatidae				
			Dicrocoelidae				
Protista	Apicomplexa	Sporozoa	Eucoccidiorida	Eimeriidae			
				Cryptosporidiidae			

3.2.1-Epidemiologia, biologia e patogenia dos parasitas que afectam os bovinos leiteiros.

Os principais parasitas dos bovinos, como ilustrados na tabela anterior, são os nematodes, trematodes e cestodes, globalmente denominados de helmintes; e os protozoários, do género *Eimeria* e *Cryptosporidium*, também conhecidos como coccídeas.

O efeito do parasita no hospedeiro pode ser variável e está geralmente relacionado com vários factores: a espécie parasitária, a sua carga no hospedeiro, o estado imunitário e sanitário do hospedeiro e factores ambientais e de manejo como o *stress* ou a dieta (Taylor, Coop & Wall, 2007). Infecções múltiplas envolvendo mais do que um género ou espécies são muito comuns e possuem geralmente maior impacto do que uma infecção monoespecífica, do mesmo modo que a gravidade da doença é também variável com o tipo de parasitas envolvidos (Wimmer, Craig, Pilkington & Pemberton, 2004).

Na maior parte das infecções parasitárias há um nível de infecção que permite que o desenvolvimento de imunidade e as características produtivas estejam em equilíbrio (Vercruysse & Claerebout, 2001). No entanto, raramente se consegue encontrar este grau de infecção, sendo muito difícil estabelecer um limiar a partir do qual devemos optar pelo

tratamento antiparasitário. Com o objectivo de melhor avaliarmos o modo de prevenção ou de controlo é conveniente obter primeiro informação epidemiológica dos parasitas existentes.

3.2.1.1-Helmintes

Os helmintes englobam os nematodes, trematodes e cestodes.

Nematodes

São vermes redondos e não segmentados. Podem ser espécies livres ou parasitárias, cuja forma do corpo é pouco variável (Vicente & Martín, 2002), tornando complicada a sua identificação e a sua classificação taxonómica. Os mais importantes em bovinos pertencem a três ordens: Strongylida, a mais comum, Rhabditida e Enoplida. Por questões de conveniência de classificação os nematodes de cada ordem estão divididos consoante as suas características morfológicas, e assim organizados em superfamílias (Tabela 2) com particularidades mais ou menos semelhantes (Taylor *et al.*, 2007). A superfamília Trichostrongyloidea, compreende os parasitas mais frequentes dos ruminantes em todo o mundo, principalmente nas regiões temperadas e húmidas, e nos animais que pastoreiam, causando doenças crónicas com baixa mortalidade, mas elevada morbidade (Mañes & Vázquez, 2002). *Ostertagia ostertagi* e *Cooperia oncophora* são as espécies mais prevalentes nas regiões temperadas (Claerebout, Dorny, Vercruysse, Agneessens & Demeulenaere, 1998), sendo que a primeira é considerada a espécie mais patogénica e mais frequente, pelo que ao longo do trabalho ser-lhe-á dedicada especial atenção. Os nematodes são particularmente importantes em animais jovens em climas temperados que pastoreiam e, com a excepção do parasita *Dictyocaulus viviparus*, que está associado a bronquites parasitárias (BP), todos os outros estão associados a gastroenterites parasitárias (GEP).

Tabela 2- Principais nematodes que parasitam os bovinos. Adaptado de Taylor *et al.*, (2007).

Género	Espécies	Hospedeiro	Localização	Distribuição
Superfamília Trichostrongiloidea				
<i>Ostertagia</i>	<i>Ostertagia ostertagi</i>	Bovinos, ovinos, caprinos e cervídeos	Abomaso	Mundial, principalmente em regiões subtropicais e em climas temperados com chuvas no inverno.
	<i>Ostertagia leptospicularis</i>			Mundial, principalmente Nova Zelândia e Europa.
<i>Haemonchus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>	Bovinos e ovinos	Abomaso	Mundial a sua prevalência é mais importante em regiões tropicais e Subtropicais.
	<i>Haemonchus similis</i>	Bovinos e cervídeos		Europa e Norte da América.
<i>Trichostrongylus</i>	<i>Trichostrongylus axei</i>	Bovinos, ovinos, cervídeos, asininos, suínos e ocasionalmente o Homem	Abomaso e intestino delgado	Mundial
	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Bovinos, ovinos, caprinos e ocasionalmente suínos e Homem	Intestino delgado anterior	Mundial. Ocorrem em regiões temperadas mas é sobretudo um parasita de áreas tropicais e subtropicais.
	<i>Trichostrongylus longispicularis</i>	Bovinos, ovinos, cervídeos, camédeos e lamas	Intestino delgado	Ruminantes na Austrália e em bovinos na Europa.
<i>Cooperia</i>	<i>Cooperia oncophora</i>	Bovinos, ovinos, caprinos e cervídeos	Intestino delgado	Mundial
	<i>Cooperia punctata</i>	Bovinos e cervídeos		
	<i>Cooperia pectinata</i>			
	<i>Cooperia surnabada</i>	Bovinos, ovinos e camédeos		Partes da Europa, Norte da América e Austrália.
<i>Nematodirus</i>	<i>Nematodirus helvetianus</i>	Bovinos;	Intestino delgado	Mundial
	<i>Nematodirus spathiger</i>	ocasionalmente ovinos, caprinos e outros ruminantes		
	<i>Nematodirus battus</i>	Ovinos, caprinos e ocasionalmente bovinos (vitelos)		
	<i>Nematodirus filicolis</i>	Ovinos, caprinos, ocasionalmente bovino e cervídeos		Mundial, mas mais frequente em zonas temperadas.
<i>Dictyocaulus</i>	<i>Dictyocaulus viviparus</i>	Bovinos, cervídeos, búfalos e camédeos	Bronquios e traqueia	Mundial, particularmente importante em climas temperados com chuvas de inverno ¹
Superfamília Strongyloidea				
<i>Oesophagostomum</i>	<i>Oesophagostomum radiatum</i>	Bovinos e búfalos	Intestino grosso	Mundial
	<i>Oesophagostomum columbianum</i>	Ruminantes selvagens, ovinos e caprinos		Mundial, mais importante em zonas tropicais e subtropicais
<i>Chabertia</i>	<i>Chabertia ovina</i>	Ovinos, caprinos e ocasionalmente cervídeos, bovinos e outros ruminantes	Intestino grosso	Mundial

Superfamília Ancylostomatoidea

<i>Bunostomum</i>	<i>Bunostomum phlebotomum</i>	Bovinos	Intestino delgado	Mundial
-------------------	-------------------------------	---------	-------------------	---------

Superfamília Rhabditoidea

<i>Strongyloides</i>	<i>Strongyloides papillosus</i>	Bovinos, ovinos, outros ruminantes e leporídeos	Intestino delgado	Mundial
----------------------	---------------------------------	---	-------------------	---------

Superfamília Ascaridoidea

<i>Toxocara</i>	<i>Toxocara vitulorum</i>	Bovinos, búfalos e raramente em ovinos e caprinos	Intestino delgado	África, Índia, Ásia e Europa
-----------------	---------------------------	---	-------------------	------------------------------

Superfamília Trichuroidea

<i>Capillaria</i>	<i>Capillaria bovis</i>	Bovinos, ovinos e caprinos	Intestino delgado	Mundial
-------------------	-------------------------	----------------------------	-------------------	---------

<i>Trichuris</i>	<i>Trichuris globulosa</i>	Bovinos, ocasionalmente ovinos, caprinos, camelídeos e outros ruminantes	Intestino grosso	Mundial
	<i>Trichuris discolor</i>	Bovinos, búfalos e ocasionalmente ovinos e caprinos		Europa, Ásia, E.U.A.

Os ciclos de vida dos nematodes gastrointestinais dos bovinos são todos muito semelhantes, com pequenas variações entre si. Têm uma fase interna, no hospedeiro e uma fase externa, no meio ambiente, principalmente nos bolos fecais, na pastagem ou no solo. Esta fase, não parasitária, também chamada de fase de vida livre, é segundo Herd (1985) enunciado em (Fiel, Fernández, Rodríguez, Fusé & Steffan, 2012) aquela em que é possível encontrar cerca de 90% da população total dos nemátodes, e como tal o seu conhecimento é de extrema importância para desenhar programas racionais e sustentáveis de controlo das infecções que naturalmente ocorrem nos bovinos (Fiel *et al.*, 2012).

O primeiro estágio larvar (L1) desenvolve-se no interior do ovo excretado nas fezes de animais parasitados. Ao fim de 1 ou 2 dias consoante as condições ambientais e características próprias da larva, produzem uma enzima que em conjunto com os seus próprios movimentos são responsáveis pela eclosão a partir do ovo (Taylor *et al.*, 2007). No exterior a L1 muda e transforma-se no segundo estágio larvar (L2). Ambas as larvas, L1 e L2, alimentam-se de bactérias existentes nas fezes, sendo que as condições de temperatura, humidade e de pH também influenciam o seu desenvolvimento. Em geral, ao fim de sensivelmente 1 a 2 semanas, dá-se uma nova muda e surgem as larvas L3 (Roeber, Jex & Gasser, 2013). As larvas L3 têm um aspecto um pouco mais desenvolvido, com esófago distinto e apresentando uma bainha como revestimento, que embora as impossibilite de se alimentarem, protege-as de condições ambientais adversas até que sejam ingeridas por um animal. Isto significa que estão dependentes de nutrientes armazenados em reservas adquiridas nos estádios anteriores. Para as L3 transmitirem a infecção têm de libertar-se da massa fecal, e para tal contam com

factores importantes como a chuva ou *pivots* de rega, os próprios animais, as máquinas agrícolas ou outro tipo de situação que permita distribuir as larvas para a erva envolvente (Williams, 1986). Após serem ingeridas por um animal, dão início à fase parasitária. Na zona do trato gastrointestinal a montante do local onde habitualmente vivem os adultos, as L3, sob influência de estímulos do hospedeiro, excretam um líquido que digere a bainha permitindo a saída da larva (Uriarte, Miro, Meana & Rojo-Vazquez, 1993). Ocorre então uma fase tecidular onde se dá nova muda para larva L4. Mais tarde já nos locais de predilecção do trato gastrointestinal, lúmen e/ou interior da mucosa do estômago e/ou intestinos, desenvolvem-se então as larvas L5 ainda imaturas, que amadurecem para adultos e após a cópula, produzem ovos que darão início a um novo ciclo de vida (Taylor *et al.*, 2007).

Particularidades:

No género *Dictyocaulus* associado a BP, as fêmeas adultas são ovovivíparas pelo que as larvas L1 aparecem nas fezes frescas, algo que não é muito comum nos nematodes gastrointestinais. A migração das larvas infectantes (L3) do bolo fecal para a pastagem é auxiliada por um fungo do género *Pilobus* existente nas fezes, o qual pode espalhar as larvas até 3 metros de distância. Após a sua ingestão, os parasitas alojam-se na mucosa intestinal e migram via linfática, através do ducto torácico e dos linfonodos mesentéricos ou através da corrente sanguínea até aos espaços alveolares (Bowman, 2009). Após alguma maturação nos bronquíolos, as larvas pulmonares adultas aparecem nos brônquios. Neste caso os estádios de vida livre utilizam os grânulos de comida existentes no interior dos intestinos como fonte de energia em vez de ingerirem bactérias.

No caso de *Nematodirus helvetianus*, o desenvolvimento até L3 ocorre no interior do ovo. Em oposição às outras espécies do mesmo género não necessita de grandes exigências a nível ambiental, possibilitando o aparecimento de várias gerações anualmente (Taylor *et al.*, 2007).

No caso de *Capillaria bovis*, a L1 infectante desenvolve-se no interior do ovo e a infecção ocorre através da ingestão do ovo embrionado atingindo a maturação sem existir qualquer fase migratória.

Strongyloides papillosus é um parasita único entre os nemátodes parasitários. Possui ambos os ciclos, parasitários e de vida livre. A fase parasitária é composta inteiramente por fêmeas que produzem ovos no intestino delgado por partenogénese. Após a eclosão dos ovos no ambiente, podem dar origem a machos e fêmeas de vida livre, no entanto sob determinadas circunstâncias as L3 podem tornar-se parasitárias e ocorrer infecção através da pele ou *per os* (Argüello & Campillo, 2002). A L3 migra posteriormente através da corrente sanguínea até aos pulmões e traqueia. Desenvolvendo-se a fêmea adulta no intestino delgado. Os vitelos podem infectar-se ao mamarem, uma vez que existe migração somática (Taylor *et al.*, 2007).

No caso de *Bunostomum phlebotomum* a infecção pela L3 pode ser oral ou transcutânea. Na primeira as larvas normalmente desenvolvem-se sem ocorrer qualquer migração. Quando a infecção é através da pele a larva migra para os pulmões e muda para L4 antes de voltar ao tracto gastrointestinal.

No caso de *Toxocara vitulorum*, o leite materno constitui a principal fonte de infecção, onde as larvas podem permanecer até cerca de um mês. Na infecção dos vitelos após ingestão do leite não existe migração tecidual e os ovos podem em pouco tempo ser eliminados nas fezes. Quando a ingestão de ovos ocorre em vitelos com mais de seis meses de idade raramente são detectados ovos, sendo que normalmente ocorrem migrações larvares tecidulares onde permanecem em dormência. Em fêmeas no período final da gestação, pode ocorrer a continuação do desenvolvimento larvar possibilitando novas infecções transmamárias (Taylor *et al.*, 2007).

Epidemiologia: A contaminação do meio ambiente com ovos parasitários está relacionada com a carga parasitária dos animais, o desenvolvimento e a sobrevivência das larvas L3 que dependem principalmente da temperatura ambiente, mas também das condições da mistura fecal (Bowman, 2009). A dessecação, a exposição à luz directa do Sol ou mesmo as baixas temperaturas, podem matar os ovos e as larvas que se encontram na mistura. Por cada larva infectante ingerida, somente um nematode adulto se desenvolve no hospedeiro e o desenvolvimento de ovos e larvas no meio ambiente é necessário para a continuidade das espécies (Williams, 1986). A temperatura óptima bem como a humidade para o desenvolvimento de ovo a larva infectante é muito variável entre espécies, bem como a resistência a condições adversas (Fiel *et al.*, 2012), o que faz com que cada género tenha características epidemiológicas muito distintas.

De modo semelhante a ocorrência de doença e a presença de sinais clínicos no hospedeiro são muito variáveis, interferindo geralmente com a ingestão de alimento, o funcionamento gastrointestinal e o metabolismo proteico (Fox, 1997), contribuindo para este facto não só as características próprias de cada parasita (género e espécie) e da carga parasitária existente, mas também os aspectos relacionados com a resistência do próprio hospedeiro, idade, genética, vitalidade, presença ou ausência de infecções concomitantes e da aquisição ou não de imunidade.

Existe ainda a possibilidade das L4 suspenderem temporariamente o seu desenvolvimento, mecanismo designado por hipobiose, sendo que as razões que o desencadeiam ainda não estão muito bem entendidas. No entanto após a ocorrência de determinado estímulo estas reiniciam

de novo o seu desenvolvimento, sendo este comportamento particularmente acentuado nos parasitas da ordem Strongylida (Bowman, 2009).

Os grupos de animais mais susceptíveis de desenvolver infecções elevadas são animais jovens ainda sem imunidade, animais imunitariamente comprometidos ou animais expostos a grande quantidade de larvas L3 no ambiente (Claerebout *et al.*, 1998).

Platelmintes

São seres de corpo achatado e hermafroditas, que incluem os cestodes e os trematodes.

Cestodes

Os cestodes não têm muita importância clínica em bovinos, à excepção dos pertencentes à famílias Taeniidae (por possuírem carácter zoonótico) e Anoplocephalidae (pelos seus aspectos patogénicos). São seres com aspecto de fita na forma adulta, sem canal alimentar. O corpo é segmentado, em proglótides hermafroditas, ou seja possuem um a dois pares de aparelhos reprodutores de ambos os sexos, os quais se abrem geralmente nos poros genitais da margem ou de ambas as margens laterais do proglótide. O cestode adulto é constituído por uma cabeça, ou escólex, na qual se encontram quatro ventosas em cada um dos lados podendo também alojar vários ganchos que ajudam a adesão do parasita. Caudalmente ao escólex encontra-se uma porção curta e não segmentada, o pescoço, sendo o restante constituído por proglótides, encadeados sequencialmente, formando o estróbilo. Os proglótides germinam desde a região do pescoço ao longo do estróbilo assim como o desenvolvimento sexual de cada um destes segmentos. Cada proglótide abre-se geralmente nos poros genitais de uma ou de ambas as margens laterais. A fertilização ocorre no proglótide ou entre proglótides e à medida que os segmentos vão amadurecendo a estrutura interna vai desaparecendo e os proglótides totalmente maduros ou gravídicos apenas apresentando remanescentes do útero ou encontram-se preenchidos com ovos. Os segmentos gravídicos são habitualmente libertados intactos a partir do estróbilo e eliminados para o exterior com as fezes. No exterior do corpo os ovos são libertados por desintegração do segmento ou são eliminados através do poro genital (Taylor *et al.*, 2007). A maior parte dos cestodes com importância veterinária pertencem à ordem Cyclophillidea e os que podem afectar os bovinos e têm interesse nesta dissertação estão representados na Tabela 3.

Tabela 3-Principais cestodes que parasitam os bovinos. Adaptado de Taylor *et al.*, (2007).

Género	Espécie	Hospedeiro	Localização	Distribuição
Família Taeniidae				
Taenia	<i>Taenia saginata</i> (larva Cysticercus bovis)	Bovinos, Búfalos	Músculo	Mundial
Família Anoplocephalidae				
<i>Moniezia</i>	<i>Moniezia benedeni</i> <i>Moniezia expansa</i>	Bovinos Ovinos, caprinos e ocasionalmente bovinos	Intestino delgado	Mundial

O ciclo de vida de *Moniezia* é indirecto, com um hospedeiro intermediário, e os adultos são encontrados no intestino delgado. Os proglótides maduros ou os ovos são eliminados para o exterior com as fezes. Na pastagem o ovo é ingerido por ácaros oribatídeos, que por acção dos sucos gástrico e intestinal, digerem o embrióforo e activam a oncosfera. Na cavidade corporal do ácaro após alguns meses desenvolve-se a larva cisticercóide e a infecção dos bovinos ocorre durante o pastoreio após ingestão de ácaros oribatídeos infectados (Taylor *et al.*, 2007).

Epidemiologia: É uma infecção comum em vitelos no seu primeiro ano de vida e menos frequente em animais mais velhos. A flutuação sazonal de infecção pode ser associada a períodos activos de ácaros oribatídeos que ocorrem durante o verão em regiões temperadas. As larvas cisticercóides sobrevivem ao inverno no interior dos ácaros oribatídeos (Taylor *et al.*, 2007).

Trematodes

Os trematodes pertencem à Ordem Digenea, que são aqueles que necessitam de hospedeiro intermediário para completar o seu ciclo de vida. São chamados de vermes, em inglês *flukes*, e ocorrem principalmente nos ductos biliares, trato digestivo e vasos sanguíneos. A maioria é achatada dorsoventralmente, possuem um tracto alimentar cego, ventosas para a sua adesão e, tal como os cestodes, são hermafroditas. Dependendo dos seus locais de infecção os ovos são eliminados pelo hospedeiro final, através da urina ou fezes, e os estádios larvares ocorrem num hospedeiro intermediário, um molusco. Em algumas espécies é necessário um segundo hospedeiro intermediário.

Existem muitas famílias na classe Trematoda no entanto apenas as famílias Fasciolidae, Dicrocoelidae, Paramphistomatidae e Schistosomatidae têm importância em medicina veterinária (Taylor *et al.*, 2007). Neste trabalho serão apenas abordadas as três primeiras (Tabela 4).

Estes trematodes são responsáveis por verminoses hepáticas e ruminais. A *Fasciola hepatica* é o trematode mais frequente nos ruminantes, afectando animais em pastoreio sobretudo

bovinos e ovinos, e ocasionalmente o Homem, sendo portanto um parasita com potencial zoonótico. No entanto, com a preocupação crescente em relação à detecção de *F. hepatica*, os elementos do género *Paramphistomum* passaram a ser detectados com muito mais frequência apesar, da paramfistomose bovina em termos clínicos não ser significativa (Rieu *et al.*, 2007).

Tabela 4- Principais trematodes que parasitam os bovinos. Adaptado de Taylor *et al.*, (2007); Eduardo, (1982); Rinaldi *et al.*, (2005); Silvestre, Sauve & Cabaret, (2000).

Género	Espécie	Hospedeiro	Localização	Distribuição
Família Fasciolidae				
<i>Fasciola</i>	<i>Fasciola hepatica</i> ¹	Bovinos, ovinos, caprinos, equinos, cervídeos, Homem e outros mamíferos ¹	Fígado ¹	Mundial ¹
	<i>Fasciola gigantica</i> ¹	Bovinos, ovinos, caprinos, suínos, camelídeos, cervídeos, búfalos e Homem		Europa, África, Ásia e E.U.A. ¹
<i>Fascioloides</i>	<i>Fascioloides magna</i> ¹	Bovinos, cervídeos, ovinos, caprinos, suínos e equídeos ¹	Fígado e ductos biliares ¹	Principamente no sudoeste, leste e centro Europeu. América do Norte, África do Sul e México ¹
Família Paramphistomatidae				
<i>Paramphistomum</i>	<i>Paramphistomum cervi</i> ¹	Bovinos, ovinos, caprinos, cervídeos, búfalos e antílopes ¹	Rúmen ¹	Mundial ¹
	<i>Calicophoron daubneyi</i> ²	Bovinos, ovinos, cervídeos, búfalos ³ e caprinos ⁴	Rúmen ^{1,3}	Europa, Ásia, Oceânia e África ³
Família Dicrocoeliidae				
<i>Dicrocoelium</i>	<i>Dicrocoelium dendriticum</i> ¹	Bovinos, ovinos, caprinos, cervídeos, ocasionalmente equídeos e suínos ¹	Fígado ¹	Um pouco por todo o mundo, principalmente na Europa ¹

¹(Taylor *et al.*, 2007), ²(Eduardo, 1982), ³(Rinaldi *et al.*, 2005), ⁴(Silvestre, Sauve & Cabaret, 2000).

Todos estes trematodes têm um ciclo de vida complexo que está dependente de um gastrópode aquático ou terrestre como hospedeiro intermediário. Os ovos eliminados nas fezes de um hospedeiro infectado, desenvolvem-se e eliminam miracídios ciliados móveis na pastagem (típicos das famílias Fasciolidae e Paramphistomatidae) ou são ingeridos com o miracídeo no seu interior (típico da família Dicrocoeliidae. Quando os miracídeos livres encontram um hospedeiro intermediário, penetram via tegumento e desenvolvem-se desde esporocisto até ao estágio de cercária, o qual é eliminado pelo gastrópode. Após adesão à vegetação a cercária enquista e forma a metacercária infectante, que pode ser ingerida quando o bovino pastoreia (Taylor *et al.*, 2007).

Particularidades:

No caso da *Fasciola* spp., quando a metacercária atinge o intestino do bovino migra através da sua parede, atravessa o peritoneu e penetra a cápsula hepática atingindo o fígado. Os vermes imaturos encontram-se no parênquima hepático, e após algum tempo deslocam-se para os ductos biliares e por vezes também para a vesícula biliar, até atingirem a maturidade.

No caso de *Paramphistomum* spp., os vermes imaturos fixam-se e alimentam-se na mucosa do duodeno, podem ser encontrados no íleon, jejuno e abomaso antes de se deslocarem para o rúmen (González-Warleta *et al.*, 2013).

No caso de *Dicrocoelium dendriticum*, existem dois hospedeiros intermediários, um gastrópode terrestre, que ingere o ovo e onde se produz a cercária. E um segundo, a formiga da espécie *Formica fusca*, que ingere a cercária que se desenvolve em metacercária no interior da sua cavidade corporal ou no sistema nervoso central, responsáveis por lesões que alteram o comportamento da formiga e aumentam a probabilidade de serem ingeridas pelos bovinos. Nos bovinos as metacercárias eclodem e os vermes imaturos migram através do ducto biliar principal e posteriormente através dos secundários, sem nunca ocorrer migração através do parênquima hepático (Taylor *et al.*, 2007).

Epidemiologia: Um dado importante é que um ovo de trematode pode originar milhares de adultos, ao contrário dos nemátodes em que um ovo dá apenas origem a um adulto. Este fenómeno deve-se ao facto de existir multiplicação assexuada no hospedeiro intermediário, havendo desenvolvimento de centenas ou milhares de novos indivíduos (esporocistos, rédias e cercarias) a partir de uma única forma larvar (miracídeo).

Todas as espécies estão dependentes da existência de hospedeiros intermediários. No caso dos gastrópodes aquáticos os seus habitats compreendem zonas alagadiças e lagos ou lagoas. É possível o estabelecimento de uma boa imunidade em animais adultos, pelo que os surtos normalmente ocorrem em animais jovens, no entanto os animais adultos constituem importantes reservatórios e contribuem com a eliminação de ovos para a infecção dos gastrópodes e persistência do ciclo.

No caso de *Dicrocoelium dendriticum*, existem dois importantes factores que contribuem para a persistência da doença: os seus ovos têm a capacidade de permanecerem muito tempo no ambiente e os hospedeiros intermediários são resistentes no ambiente (Taylor *et al.*, 2007).

3.2.1.2-Protozoários

Os protozoários pertencem ao Reino Protista, que engloba seres unicelulares com organelos típicos das células eucarióticas: núcleo, complexo de Golgi, lisossomas, retículo endoplasmático e mitocôndrias. Existem muitos protozoários com importância em medicina veterinária; particularmente no rumen, onde são seres comensais ou simbioses e com enorme significado na digestão da celulose, constituindo simultaneamente uma fonte proteica significativa para os ruminantes. Em geral os protozoários alimentam-se por pinocitose ou fagocitose. Os produtos metabólicos são eliminados por difusão através da sua membrana

celular. O estágio infectante de alguns protozoários é denominado de esporozoíto, enquanto o termo trofozoíto é dado ao estágio que ocorre já no interior do hospedeiro, que se alimenta e se desenvolve até se iniciar a divisão.

Na maioria dos protozoários a reprodução é assexuada, e caso seja exclusiva, não possibilita a partilha de material genético, estando a obtenção das variações necessárias à selecção natural dependentes de mutações.

No caso da classe Sporozoa ocorre reprodução assexuada por merogonia (esquizogonia). Nesta o trofozoíto aumenta de tamanho enquanto o núcleo se divide inúmeras vezes, dando origem a uma estrutura denominada meronte (esquizonte). Após amadurecer, cada núcleo adquire uma parte do citoplasma e deste modo o esquizonte encontra-se preenchido com um grande número de organismos alongados chamados de merozoítos. O meronte quando ruptura liberta vários merozoítos. No entanto, muitos protozoários no seu ciclo de vida possuem também uma fase de reprodução sexuada, a gametogonia, a qual pode ser seguida por uma fase de maturação de vida livre, a esporogonia.

Existem contudo, outros protozoários, pertencentes ao filo Apicomplexa e à ordem Eucoccidiorida, da qual fazem parte as famílias Eimeriidae e Cryptosporidiidae, que, dependendo do hospedeiro e do seu estado imunitário, podem causar maior ou menor impacto na saúde dos bovinos (Taylor *et al.*, 2007).

A criptosporidiose, por exemplo, é uma doença gastrointestinal muito frequente que afecta tanto animais como seres humanos em todo o mundo (Shahiduzzaman & Dauschies, 2012). Até à data foram detectadas 26 espécies de *Cryptosporidium*. A infecção é transmitida por oocistos e adquirida principalmente por via fecal-oral, sendo que em algumas circunstâncias a infecção pode ser respiratória após inalação ou aspiração (Shirley, Moonah & Kotloff, 2012). Actualmente a criptosporidiose nos bovinos é considerada uma das principais causas de diarreia neonatal em vitelos, com desidratação progressiva, atrasos de crescimento e possível morte (de Graaf, Vanopdenbosch, Ortega-Mora, Abbassi & Peeters, 1999). Pode ocorrer infecção em novilhas e animais adultos, mas nestes casos é normalmente assintomática (Santín, Trout & Fayer, 2008). Os bovinos podem ser infectados por 4 espécies: *Cryptosporidium parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. ryanae*. Segundo alguns autores, a prevalência de cada espécie varia com a idade dos animais (Ronald Fayer, 2010); outros associam-na não só com a idade, como também com a distribuição geográfica e as condições de manejo (Silverlås & Blanco-Penedo, 2013). Apesar disto a sua distinção é apenas possível morfológicamente, distinguindo entre oocistos de aspecto esférico e oocistos de maiores dimensões e com aspecto ovalado. Para realizar uma diferenciação e identificação mais correcta é recomendado basear-se na combinação de informação biológica (características

morfológicas, hospedeiro, localização e patogenia associada com o hospedeiro) e a genética (Jirků, Valigurová, Koudela, Křížek & Modrý, 2008).

A melhoria das pastagens e o aumento da densidade animal em pastoreio tornam a produção economicamente mais rentável, contudo podem surgir novos problemas de sanidade, como é o caso das coccidioses por *Eimeria* spp. (Romero, Sanabria, Travería, Di Paolo & Peralta, 2013). Os animais jovens, particularmente os vitelos das explorações leiteiras, que são alimentados artificialmente e vivem em condições intensivas com elevada densidade animal, são especialmente propensos a padecer desta doença parasitária (Sánchez, Romero & Founroge, 2008). Este tipo de doença provoca diarreia, por vezes hemorrágica, perda de peso e perdas económicas significativas. Actualmente estão identificadas 13 espécies que infectam os bovinos (Taylor *et al.*, 2007) e as que mais problemas causam são *Eimeria zuernii* e *Eimeria bovis* (Bangoura, Mundt, Schmäschke, Westphal & Dauschies, 2011; Romero *et al.*, 2013), que se localizam no intestino delgado e *E. alabamensis*, no cego e cólon (Taylor *et al.*, 2007).

O ciclo biológico destes protozoários pode ser dividido em três fases: esporulação ou esporogonia; infecção e merogonia (a fase da esquizogonia); e por último, a gametogonia e a formação de oocistos.

A primeira fase, a esporulação, consiste na emissão para o exterior de oocistos não esporulados; que em condições favoráveis de aeróbiose, temperatura próxima dos 27°C e com elevada humidade, permitem ao núcleo dividir-se por duas ocasiões e a massa protoplasmática inicial transformar-se em quatro corpos de forma cónica. Cada um destes corpos adquire uma forma arredondada originando o esporoblasto, enquanto noutras espécies o protoplasma remanescente forma o corpo residual do oocisto. Cada esporoblasto segrega uma parede com material retráctil pelo que começa a definir o chamado esporocisto, enquanto o protoplasma no seu interior se divide em duas partes em forma de banana que se chamam esporozoítos.

Em algumas espécies o protoplasma remanescente dentro do esporocisto forma o corpo residual do esporocisto, o que pode surgir como uma protuberância numa das pontas chamado Corpo de Stieda. O tempo necessário a todas estas transformações é variável com a temperatura, mas em condições óptimas varia entre 2 a 4 dias. Neste momento o oocisto encontra-se esporulado e é infectante, contendo quatro esporocistos com dois esporozoítos cada.

A segunda fase, a fase de infecção e merogonia, também conhecida como a fase de reprodução assexuada, inicia-se após a ingestão do oocisto, que através da acção mecânica ou do dióxido de carbono liberta os esporocistos e sob a acção da tripsina e da bÍlis libertam os

esporozoítos. Os esporozoítos penetram então nas células epiteliais passando a ser chamados de trofozoítos. Após alguns dias cada trofozoíto divide-se por fissão múltipla para formar um meronte (esquizonte), que por sua vez é constituído por muitos organismos nucleados alongados, os merozoítos. Após completar a divisão, o meronte amadurece e rotura libertando os merozoítos que invadem as células vizinhas. A merogonia pode ser repetida, e o número de gerações de merontes varia entre espécies.

A última fase, a fase de gametogonia e formação do oocisto, ou fase sexuada, inicia-se quando os merozoítos dão origem a gametócitos masculino e feminino. Os factores que desencadeiam a alteração entre merogonia e gametogonia, ainda não são bem conhecidos. Os macrogametócitos são estádios femininos ainda unicelulares, que aumentam de tamanho para preencher a célula parasitada. Distinguem-se dos trofozoítos ou dos merontes em desenvolvimento por possuírem um único núcleo de grandes dimensões. Os microgametócitos masculinos dividem-se repetidamente para formar os microgâmetas que são seres com um só núcleo e com órgãos de locomoção. Estes são libertados por ruptura da célula hospedeira e após penetrarem os macrogametas dão origem ao zigoto através da fusão de ambos os núcleos. Após a formação de uma parede quística à sua volta, o zigoto passa a denominar-se oocisto. Não há qualquer outro desenvolvimento até o oocisto não esporulado ser eliminado com as fezes (Taylor *et al.*, 2007).

Epidemiologia: *Cryptosporidium* spp. causam doença particularmente em indivíduos com o sistema imunitário comprometido, podendo ter efeitos devastadores. No entanto, em indivíduos saudáveis é uma doença autolimitante. O estado infectante da doença é composto pelos oocistos, os quais são muito resistentes no meio ambiente e após serem eliminados nas fezes dos animais infectados, podem infectar outros animais ou reinfectar o mesmo animal por contacto directo ou através de água e alimentos contaminados (Shahiduzzaman & Dauschies, 2012).

No caso das coccidioses por *Eimeria* spp. as características do surto variam com o grau de contaminação do ambiente, com a susceptibilidade individual (Taylor *et al.*, 2007) e também com situações de *stress* particularmente em animais com menos de um ano de idade. É também evidente que as condições ambientais favoráveis à esporulação, sobrevivência e distribuição dos oocistos, podem contribuir para que a prevalência da doença seja mais elevada (Sánchez *et al.*, 2008).

3.2.2- As consequências das alterações climáticas

É importante não esquecer que as alterações climáticas podem influenciar muito a distribuição e a epidemiologia parasitária actual. Uma vez que os parasitas preferem climas quentes e húmidos, na grande maioria das situações, o aumento da temperatura global poderá ser responsável por uma maior proliferação das populações parasitárias. Estas mudanças poderão igualmente favorecer a permanência das formas infectantes mais tempo no ambiente, modificar os padrões de distribuição parasitária facilitando o contacto entre hospedeiros e parasitas, inclusivamente com parasitas potencialmente mais patogénicos e estranhos a determinados locais provocando doenças mais graves porque os hospedeiros não possuem os recursos defensivos por não terem contactado previamente com estes parasitas.

Estes factores possuem uma grande importância actualmente, e segundo as previsões, a sua expressão no futuro será cada vez mais significativa, contribuindo não só para uma prevalência cada vez maior dos parasitas, mas também para uma maior gravidade das doenças por ele provocadas, sobretudo entre os animais que pastoreiam (Uriarte & Calvete, 2012).

3.2.2-Diagnóstico

Para um diagnóstico ser válido, os testes devem ser comparados com testes *gold standard*, que são os que fornecem evidência indubitável de que o animal se encontra infectado com parasitas. Testes deste tipo podem levar à detecção de ovos, larvas ou oocistos parasitários em amostras fecais ou a confirmação de doenças por examinação post-mortem. Os resultados destes testes são posteriormente comparados com possíveis testes de diagnóstico com o objectivo de determinar limiares de variáveis e assim garantir a máxima sensibilidade e especificidade de cada teste de diagnóstico (Sekiya, Zintl & Doherty, 2013).

O diagnóstico parasitário pode ser realizado mediante a observação dos sinais clínicos e em caso de dúvida ou na ausência de sinais clínicos, recorrendo a diversas técnicas de diagnóstico: a contagem de ovos ou oocistos por grama de fezes (OPG); a determinação dos níveis de gastrina ou de pepsinogénio no soro; medição dos níveis de anticorpos ou antigénios específicos parasitários; procura de larvas directamente nas fezes e a realização de esfregaços fecais. Os exames *post mortem* para a observação de parasitas adultos ou lesões nos animais, também podem fornecer informações muito úteis.

O diagnóstico correcto é então essencial para um controlo rápido e eficaz da doença, uma vez que nos pode dar informação da necessidade ou não de desparasitar, bem como qual o fármaco mais indicado para cada situação específica.

3.2.2.1-Diagnóstico *in vivo* dos Helminthes

Ovos por grama de fezes (OPG)

A contagem de OPG é o método de diagnóstico mais comum nas infecções por nemátodes gastrointestinais. É um método económico, de fácil execução, não requer material muito especializado, é facilmente praticável em qualquer laboratório de campo, necessitando apenas de um técnico familiarizado com o microscópio (Mejía *et al.*, 2011). Esta técnica permite estimar os níveis de contaminação com ovos de helmintes, avaliar a eficácia dos antihelmínticos (Nicholls & Obendorf, 1994), determinar o valor reprodutivo quando se pretende seleccionar para uma população resistente aos parasitas (Woolaston, 1992) e fornecer informações para orientar o tratamento e o controlo (Knox *et al.*, 2012). Contudo as contagens de ovos por grama não estão bem correlacionadas com o nível de infecção parasitária (Vercruysse & Claerebout, 2001), e também não permitem um diagnóstico parasitário específico entre parasitas com importância socioeconómica distinta. Exceptuando os ovos de *Nematodirus* spp., de *Strongyloides* spp. e *Trichuris* spp. no caso dos nematodes; os de *Fasciola hepatica* e *Paramphistomum* spp. nos trematodes, os de cestodes e os oocistos que possuem uma morfologia distinta, o diagnóstico diferencial entre os diferentes ovos ou entre oocistos pode ser muito complicado ao microscópio óptico (Zajac & Conboy, 2012).

Além disso as contagens de OPG apenas fornecem informação no período patente de infecção e não no pré-patente, carecendo também de informação sobre os machos ou larvas imaturas ou em hipobiose que podem estar presentes. Para além disso os resultados podem ser influenciados por variações na excreção de ovos pelos parasitas adultos (Villanúa, Pérez-Rodríguez, Gortázar, Höfle & Viñuela, 2006), por razões relacionadas com a sua idade, ou por características relacionadas com o hospedeiro, tais como imunidade, sexo e idade.

As contagens de OPG em bovinos são frequentemente reduzidas e requerem métodos de flutuação mais sensíveis que nos pequenos ruminantes (Mes *et al.*, 2001). São realizadas para identificar e avaliar o nível da infecção, contudo neste teste existem muitos falsos negativos com elevada variabilidade entre testes consecutivos e geralmente o nível de infecção é sub estimado (Gross, Ryan, & Ploeger, 1999; Agneessens, Claerebout, Dorny, Borgsteede & Vercruysse, 2000; Borgsteede, Tibben, Cornelissen, Agneessens & Gaasenbeek, 2000).

Coprocultura

A coprocultura consiste em incubar as amostras fecais contendo ovos de nemátodes permitindo que eclodam as L1 e se desenvolvam posteriormente para L2 e finalmente L3, as quais serão examinadas ao microscópio óptico e identificadas com base em critérios morfológicos e morfométricos (Roeber *et al.*, 2013).

Diversos estudos referem que as necessidades em termos ambientais e ecológicas, de temperatura e humidade relativa, para o desenvolvimento larvar adequado são variáveis consoante a espécie de nematode gastrointestinal, e desta forma determinado protocolo pode favorecer o crescimento de uma espécie sobre outras (Dobson, Barnes, Birclijin & Gill, 1992). Assim a coprocultura e posterior identificação não é um bom método para estimar as proporções exactas de cada espécie em animais com infecções mistas, sendo apenas indicador das espécies que estão presentes (Berrie, East, Bourne & Bremner, 1988). A variabilidade nos resultados das coproculturas pode ser atribuída a variações no meio de cultura tais como o nível de humidade, pH e oxigénio (Hubert & Kerboeuf, 1984). Além das diferenças anteriores a identificação das larvas é igualmente desafiante, baseando-se a diferenciação das larvas em critérios morfológicos e morfométricos, como a extensão da bainha da cauda, o tamanho do corpo, a forma da cabeça ou o número de células intestinais (Dikmans & Andrews, 1933; McMurtry, Donaghy, Vlassoff & Douch, 2000; van Wyk, Cabaret & Michael, 2004). Este método juntamente com a identificação das larvas que são encontradas em fezes frescas, são métodos ante-mortem mais facilmente acessíveis pelo parasitologista para identificação do género larvar que infecta os animais. O diagnóstico do género da larva L3 é muito importante para compreender a importância da infecção e poder conduzir a um tratamento anti-helmíntico eficaz, uma vez que existe uma grande variedade de patogenicidades entre os diferentes nematodes (van Wyk *et al.*, 2004).

Técnica de Baermann

O método de Baermann é a técnica coprológica mais usada no diagnóstico de infecções por parasitas traqueobrônquicos, nomeadamente *Dyctiocaulus viviparus* e nematodes de família Protostrongylidae; quando a técnica é correctamente efectuada é um diagnóstico bastante sensível após 3 a 4 semanas do estabelecimento da infecção (Eysker, 1997). Esta técnica é não invasiva e consiste na colocação de uma pequena quantidade de fezes num copo cónico com água tépida. Estes pormenores são importantes porque aproveitam o hidro e termotropismo das larvas, estimulando o seu movimento para o exterior da massa fecal, que por acção da gravidade, depositam-se e concentram-se no fundo do copo, onde posteriormente podem ser recolhidas e observadas ao microscópio óptico (Alho, Nabais & Madeira de Carvalho, 2013). A sensibilidade do teste depende da fecundidade das larvas e como estas são diluídas nas fezes depende também da quantidade de fezes que os animais produzem, que sabemos que pode variar com a idade dos animais. No entanto, nem todos os animais infectados excretam larvas e por isso é importante que o número de amostras recolhidas seja o maior possível, principalmente em animais adultos (Vercruyse & Claerebout, 2001).

Métodos imunológicos

Há dois tipos de testes imunológicos: os métodos directos que detectam o antigénio do parasita infectante, e os métodos indirectos que detectam a resposta imunitária do animal infectado.

Detecção imunológica directa

Os métodos imunológicos directos dão-nos informação directa da infecção e podem ser baseados na detecção de antigénios presentes na circulação e/ou nas secreções dos animais infectados. No entanto, estes testes não são fáceis de elaborar podendo mesmo ser muito desafiantes. Porque os extractos parasitários possuem uma composição complexa, com moléculas que são comuns em muitos parasitas, principalmente em nematodes, surgem frequentemente reacções cruzadas (Eysker & Ploeger, 2000). A possível presença de materiais do hospedeiro associados ao parasita representam outro desafio, ao dificultarem a purificação do antigénio e poderem assim interferir com a especificidade do ensaio diagnóstico. Outra limitação do diagnóstico imunológico é o estágio de desenvolvimento do parasita poder influenciar de alguma forma os seus resultados, pois durante o seu desenvolvimento os parasitas experimentam várias modificações bioquímicas, sendo diferente a composição antigénica dos estádios larvares dos adultos (Williams & Soulsby, 1970) o que pode alterar a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico.

O coproantigénio, é um diagnóstico imunológico que quantifica os antigénios parasitários excretados nas fezes do hospedeiro (Johnson, Behnke & Coles, 1996). Foi pensada para a detecção dos antigénios parasitários nas fezes do hospedeiro e para a detecção das infecções no período pré-patente. No entanto, apesar de em condições experimentais se ter revelado uma técnica promissora, foram reportadas pelos mesmos autores reacções cruzadas, perda de antigénios nas fezes e a existência de determinados componentes fecais que interferem com a reacção.

Métodos imunológicos indirectos

São frequentemente baseados na detecção de anticorpos antiparasitários ou respostas imunitárias mediadas por células dos hospedeiros infectados.

Existe uma grande variedade de métodos para o diagnóstico de infecções por nematodes, sendo a fixação de complemento, a hemaglutinação indirecta e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), os mais comuns. Principalmente frente ao nematode gastrointestinal *Ostertagia ostertagi* é considerado o método de diagnóstico com maior

utilidade em vacas leiteiras adultas (Vercruysse & Claerebout, 2001) pelo que nesta dissertação ser-lhe-á dedicada uma maior atenção.

Os anticorpos de *O. ostertagi* quando medidos no soro, leite individual ou no leite do tanque demonstraram uma correlação significativa entre si e negativa com a produção de leite (Kloosterman, Verhoeff, Ploeger & Lam, 1993), o que veio facilitar e expandir o uso desta técnica, pois a amostragem do leite do tanque é mais barata e de mais fácil execução (Charlier *et al.*, 2010).

Apesar da falta de padronização e de especificidade da maioria dos ELISAs usados, a maioria dos laboratórios usa como antígenos extractos de nematodes em bruto (Keus, Kloosterman, & Van den Brink, 1981). Enquanto uns testes usam títulos para demonstrar os níveis de anticorpos, outros usam densidades ópticas (OD).

Como já foi dito anteriormente, a resposta imunitária nas vacas à infecção pode ser medida tanto no soro sanguíneo como no leite, contudo os anticorpos aparecem primeiro no soro do que no leite e a concentração dos anticorpos no soro é cerca de 30 vezes superior à do leite (Butler, 1983). Os testes de ELISA tanto podem ser efectuados em amostras de leite individuais como do leite do tanque, contudo há diferenças significativas na interpretação dos resultados. O factor de manejo que mais afecta o nível de anticorpos no leite é o grau de acesso que os animais têm à pastagem (Charlier, Claerebout, Duchateau & Vercruysse, 2005a; Sanchez *et al.*, 2005; Forbes, Vercruysse & Charlier, 2008; Almería, Adelantado, Charlier, Claerebout & Bach, 2009; Vanderstichel, Dohoo, Sanchez, & Conboy, 2012). Ou seja, em situações em que não existe pastoreio os animais têm baixas concentrações de anticorpos, mas quando existe acesso às pastagens e mais tempo dispendido em pastoreio, as concentrações de anticorpos são mais elevadas. Vacadas em produção em regime extensivo e com menor densidade animal e menor número de animais em produção, possuem maiores níveis de anticorpos no leite (Forbes *et al.*, 2008; Almería *et al.*, 2009; Bennema *et al.*, 2010; Höglund *et al.*, 2010).

As respostas dos hospedeiros às infecções parasitárias são variáveis e os níveis de anticorpos no leite são influenciados pela produção leiteira, estação do ano, mamites, o número de partos da vaca, os dias em leite e a constituição genética (Kloosterman *et al.*, 1993; Sanchez *et al.*, 2004a), como tal os resultados em amostras colhidas em diferentes intervalos de tempo, podem apresentar uma grande variabilidade, que dependerá do número de partos, da quantidade de vacas em produção (efeito de diluição) e da quantidade relativa de leite produzida (Pritchard, 2001). Os factores climáticos, como a época de chuva, a temperatura e o índice vegetativo afectam os níveis de anticorpos no leite, contudo é evidente que num determinado biótopo o manejo tem maior influência do que os próprios factores ambientais

(Vanderstichel *et al.*, 2012). As amostras do tanque do leite são um *pool* de amostras e representam todos os animais em lactação que contribuem para o tanque. A desparasitação de todas as vacas na exploração ou apenas das vacas em produção no período do parto provoca uma diminuição na quantidade de anticorpos detectado por ELISA no tanque do leite (Vanderstichel *et al.*, 2012). Contudo nem todos os animais têm a mesma resposta.

Os resultados de ELISA no leite do tanque permitem determinar limiares que afectam a produtividade uma vez que fornecem indicações importantes de infecções subclínicas e o estado de infecção da manada (Charlier, Duchateau, Claerebout & Vercruyse, 2007). É no entanto importante referir, que um teste de ELISA negativo no leite do tanque não significa de forma imediata que os animais da exploração estão livres de determinada infecção parasitária. Como em qualquer teste de ELISA existe um limiar de concentração de anticorpos que devem ser alcançados antes de serem dados como positivos. Intuitivamente pode pensar-se que quanto menor for o valor de OD no tanque do leite, menor será o número de animais infectados que contribuem com anticorpos para o *pool* da amostra. Contudo correlacionar percentagens de animais infectados com o nível de OD no tanque do leite, a que se dá o nome de prevalência dentro da manada, deve ser feito de forma prudente (Sekiya *et al.*, 2013). O valor mínimo de prevalência na manada dá um limiar a partir do qual há um resultado positivo. Existem muitas formas de calcular a prevalência na manada, sendo a mais comum a que o faz através do cálculo da percentagem de animais seropositivos que contribuem para o *pool* e correlacionar este valor com o valor do tanque do leite aplicando análises de regressão linear (Reichel, Vanhoff & Baxter, 2005). Contudo a técnica efectuada no leite do tanque fornece uma ideia global da carga parasitária de toda a manada. A sua análise periódica (4 vezes por ano) pode demonstrar tendências e variações sazonais no estudo da doença, podendo constituir uma ferramenta muito útil, quer na medição da intensidade relativa como no estudo da prevalência de determinados parasitas na manada (Charlier *et al.*, 2007).

A detecção de anticorpos no soro é muito útil em estudos epidemiológicos quando o diagnóstico é realizado em animais individualmente, no entanto apresenta reduzida especificidade, principalmente em regiões endémicas (Doenhoff, Chiodini & Hamilton, 2004).

Tanto o ELISA do leite como do soro, apresentam os mesmos inconvenientes: existem atrasos entre o estabelecimento da infecção e a detecção dos anticorpos, e/ou um período de atraso entre a eliminação do parasita e a correspondente diminuição do título de anticorpos, que é influenciado pelo tratamento, re-infecção ou pela resposta imunitária do hospedeiro e eliminação do parasita (Sekiya *et al.*, 2013).

Muitos testes de ELISA têm sido desenvolvidos para quantificar as infecções por nematodes em bovinos e relacioná-las com perdas na produção leiteira através de resultados de ELISA individual (Sanchez *et al.*, 2002a; Sanchez, Dohoo, Markham, Leslie & Conboy, 2002b; Charlier *et al.*, 2010) ou do leite do tanque (Sithole, Dohoo, Markham & Sanchez, 2005a; Sithole, Dohoo, Leslie, *et al.*, 2005b; Charlier *et al.*, 2007). A técnica mais recente é através de um *kit* de ELISA comercial, Svanovir[®] disponível na Europa (Charlier *et al.*, 2005a; Forbes *et al.*, 2008; Almería *et al.*, 2009), que fornece resultados usualmente padronizados com amostras de controlo e descritos em rácios de densidade óptica (ODRs) de modo a reduzir as variações entre placas. Um estudo na Suécia revelou que a média de ODR era menor no tanque do leite que no soro sanguíneo, mas superior às amostras de leite de animais individuais (Blanco-Penedo, Höglund, Fall & Emanuelson, 2012). Um estudo na Normandia, também comprovou que os ODR no tanque do leite são superiores à média das amostras individuais de leite (Charlier *et al.*, 2007) provavelmente devido à contribuição para o leite do tanque de animais com títulos de anticorpos muito elevados, ou ainda a existência de possíveis reacções cruzadas com outros helmintes bovinos, nomeadamente *Cooperia oncophora* e *Fasciola hepatica* (Blanco-Penedo *et al.*, 2012).

O ELISA no tanque do leite pode ser uma ferramenta para o clínico de campo para um melhor programa de sanidade animal ou num contexto de investigação, constituindo também uma importante ferramenta de vigilância epidemiológica a nível regional e nacional, contudo os resultados devem ser interpretados dentro do contexto do manejo sanitário da manada, do padrão de produção leiteira e do ciclo de vida do parasita (Sekiya *et al.*, 2013).

Muitos testes imunológicos foram descritos para o diagnóstico de *D. viviparus*, tais como o teste de fixação de complemento (Cornwell, 1960), a hemaglutinação indirecta (Bokhout, Boon & Hendriks, 1979) e o teste ELISA (de Leeuw & Cornelissen, 1993). O diagnóstico de infecções por *D. viviparus*, através do teste de ELISA de uma amostra do tanque do leite, é uma ferramenta útil apenas se a manada se encontrar muito infectada ou em ocasiões de surtos moderados a severos. Num estudo realizado numa região endémica para parasitas pulmonares (Ploeger *et al.*, 2012), concluiu-se que era necessário que pelo menos 30% dos animais da manada estivessem infectados para que fossem detectados anticorpos no leite do tanque acima do nível de *cut-off*. Percebeu-se também que os resultados dos anticorpos no leite do tanque reflectiam a proporção de animais na manada que apresentavam sinais clínicos, tosse e aumento da frequência respiratória. Considera-se um teste útil na investigação de surtos de doença respiratória em animais adultos, mas que exige investigação futura para poder ser usado na prática clínica e por forma a detectar infecções moderadas e subclínicas, e constituir uma ferramenta na prevenção de doença (Sekiya *et al.*, 2013).

No caso de *Dictyocaulus viviparus* ainda não existem estudos que relacionem os diferentes tipos de manejo com os resultados de ELISA obtidos no leite do tanque. Existindo apenas um estudo na Suécia que revelou maior número de anticorpos no tanque do leite de uma exploração de produção biológica comparativamente a uma exploração convencional. O que distingue estes dois tipos de produção é o uso profilático de anti-helmínticos na exploração convencional e a sua proibição na exploração de produção biológica, sem ter sido avaliado o tempo passado na pastagem (Höglund *et al.*, 2010).

No caso do parasita *Fasciola hepatica*, vários tipos de ELISA foram desenvolvidos para detecção da infecção através do leite do tanque e do soro sanguíneo, possuindo em ambos os casos uma elevada sensibilidade e especificidade. Este teste constitui uma boa ferramenta para estudos de impacto económico através da relação dos seus resultados de ELISA com indicadores produtivos (Sekiya *et al.*, 2013).

Uma limitação do uso do leite do tanque é que a informação obtida é apenas das vacas em lactação, ignorando vitelos, novilhas e vacas no período seco.

Métodos bioquímicos

Os métodos bioquímicos possuem a desvantagem de necessitar de material mais sofisticado exigindo o envio das amostras para laboratórios centrais, tornando-os mais caros (Mejía *et al.*, 2011). São exemplos destes métodos a detecção de gastrina e de pepsinogénio.

Detecção de gastrina

A gastrina é uma hormona produzida pelas células G no estômago, que estimula as células parietais a excretar ácido clorídrico, a produzir pepsinogénio, a aumentar a motilidade do estômago e a circulação sanguínea neste órgão. A produção desta hormona é influenciada por diversos factores, tais como: a presença de nematodes estrogilídeos, a dieta, a lactação, presença de lesões abomasais e de outros parasitas. No entanto, num contexto experimental de vitelos livres de infecção provou-se ser necessária a inoculação de grandes doses de parasitas para induzir um aumento significativo da concentração sanguínea desta hormona (Berghen, Hilderson, Vercruysse & Dorny, 1993).

Detecção de pepsinogénio

O pepsinogénio é uma pró-enzima produzida pelas células principais do fundo gástrico, que necessita do ácido clorídrico para ser convertida na sua forma activa, a pepsina. Quando as glândulas gástricas se encontram parasitadas, a produção de ácido clorídrico fica comprometida e a mucosa gástrica é lesada. Este aumento do pH abomasal limita a conversão

do pepsinogénio na sua forma activa, que juntamente com as alterações da permeabilidade da mucosa gástrica são responsáveis por um excesso de pepsinogénio na corrente sanguínea (Taylor *et al.*, 2007). Em 1993, Berghen *et al.*, recomendaram a medição de pepsinogénio no soro como teste específico para a ostertagiose, apesar de se tratar de um teste laborioso e de reduzida padronização entre os diferentes laboratórios. Estudos mais recentes (Agneessens *et al.*, 2000; Borgsteede *et al.*, 2000), reforçaram a sua utilidade principalmente como forma de quantificação do nível de parasitismo em animais que pastam pela primeira vez, permitindo a distinção entre parasitoses subclínicas sem efeito na produção, das que afectam o crescimento médio diário de vitelos (Vercruyse & Claerebout, 2001). No entanto, em animais adultos a sua especificidade é menor (Agneessens *et al.*, 2000; Borgsteede *et al.*, 2000), pelo facto do nível de pepsinogénio ser influenciado por outro tipo de lesões da mucosa abomasal (Simpson, 2000) e possivelmente devido à existência de uma reacção de hipersensibilidade às larvas infectante L3, o que não significa que estas atinjam o estágio adulto. É possível, no entanto, sobrestimar a carga parasitária de nematodes adultos.

Métodos de diagnóstico através do Ácido desoxirribonucleico (ADN)

Os métodos convencionais de diagnóstico em parasitologia são pouco sensíveis e/ou específicos, sendo muitas vezes caros e laboriosos. No entanto, as tecnologias com ADN permitiram o desenvolvimento de métodos de diagnóstico que vieram colmatar os anteriores problemas, trazendo novos conhecimentos nas áreas de epidemiologia, biologia e ecologia parasitária, além das valiosas aplicações no diagnóstico, tratamento e controlo das doenças.

Os métodos de amplificação enzimática dos ácidos nucleicos, como o Polimerase Chain Reaction (PCR), podem ajudar a superar as limitações dos métodos tradicionais e ser muito úteis na identificação do parasita, detecção da infecção ou na análise de eventuais variações genéticas, cada vez mais relevantes devidas às crescentes resistências dos parasitas aos fármacos existentes (Gasser, 2006).

3.2.2.2-Diagnóstico *Post-mortem* dos Helmintes

Este tipo de diagnóstico é utilizado para determinar a intensidade de infecção do hospedeiro, sendo bastante útil em estudos epidemiológicos e de eficácia do tratamento antihelmíntico preconizado (Roeder *et al.*, 2013). Esta técnica compreende a abertura e a lavagem de partes do tubo digestivo e/ou pulmonar e o exame das amostras para se estimar a intensidade de infecção. Existem diversas técnicas para executar este tipo de exame, que variam em alguns aspectos como: a contagem de parasitas; a imersão ou não dos órgãos em água ou solução salina para obtenção das formas imaturas; na proporção de volume total examinado e/ou

número de alíquotas; comprimento da secção intestinal examinada e a dimensão do crivo utilizado nas lavagens para separação dos parasitas de outros fragmentos (Taylor *et al.*, 2007).

3.2.2.3-Diagnóstico dos protozoários

A observação ao microscópio óptico continua a ser o diagnóstico *gold standard* para a maioria das infecções por protozoários nos animais, no entanto a sua identificação específica requer uma pessoa experiente e qualificada.

A detecção de anticorpos ou antigénios específicos tem sido desenvolvida, mas geralmente carece de sensibilidade e de especificidade devida a uma relação muito próxima entre os diferentes protozoários. No caso dos protozoários gastrointestinais, o esfregaço fecal directo com ou sem coloração constitui a técnica mais simples. A grande limitação dos esfregaços é a sua falta de sensibilidade, quer devido ao reduzido tamanho dos oocistos, quer devida à sua fraca abundância, em determinadas amostras. No entanto a adição de corante pode aumentar esta sensibilidade (de Waal, 2012).

O diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. era feito inicialmente através da pesquisa de oocistos em cortes histológicos. Mais tarde, foram investigados diferentes métodos de coloração dos esfregaços fecais usando técnicas laboratoriais comuns e descobriu-se a vantagem das técnicas de acidificação rápida que permitiam diferenciar colorações distintas. A técnica de Ziehl-Neelsen foi a primeira técnica de coloração a ser utilizada e é baseada no princípio de que os oocistos podem ser corados com fucsina e reter o corante após o procedimento de descoloração com álcool. Posteriormente foram desenvolvidos outros métodos de coloração, apresentando todos baixa sensibilidade (de Waal, 2012), que é ainda influenciada pelo tempo e as condições de armazenamento das amostras (Kuhnert-Paul, Bangoura, Dittmar, Dauschies & Schmäscke, 2012).

O aparecimento da fluorescência associada aos anticorpos monoclonais dirigidos contra a parede dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. demonstrou aumentar a sensibilidade e especificidade dos métodos de coloração (Jex *et al.*, 2008). Os métodos para detecção de antigénios através da técnica de ELISA em amostras fecais foram também desenvolvidos e encontram-se disponíveis no mercado, contudo apresentam resultados variáveis e muitas vezes com sensibilidade inferior às técnicas microscópicas habitualmente realizadas (Johnston, Ballard, Beach, Causer & Wilkins, 2003).

Para além dos métodos de diagnóstico de infecção, existem outros que permitem a caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp., tais como o PCR e o *Fluorescent in situ Hybridization* (FISH) (Kader *et al.*, 2012), sendo no entanto técnicas muito laboriosas e caras pelo que não são praticáveis no diagnóstico de rotina.

No caso dos oocistos do género *Eimeria*, o diagnóstico baseia-se na sua identificação ao microscópio após concentração em meio de sal ou açúcar. A identificação da espécie é baseada em características morfológicas e morfométricas dos oocistos esporulados. No entanto é uma técnica que exige alguma experiência para a sua execução (de Waal, 2012). Foram desenvolvidos métodos de PCR para detectar *Eimeria* spp. (Haug, Thebo & Mattsson, 2007) ou inclusive para a sua caracterização (Woods *et al.*, 2000).

3.3-Tratamento, prevenção e controlo parasitário

O controlo parasitário é presentemente de grande importância económica, apesar das parasitoses clínicas serem cada vez menos frequentes e evidentes, pois é associada às parasitoses subclínicas a responsabilidade de não ser atingido o nível “ótimo” produtivo. Assim acredita-se que existe um acréscimo da produção após a eliminação destes parasitas e consequentemente a possibilidade de melhoria económica que advém destas novas receitas, sem nunca descurar a existência de outros aspectos que também afectam o nível produtivo.

Deste modo o baixo nível de infecção, associado à baixa sensibilidade da maioria das técnicas diagnósticas existentes, tem dificultado não só a determinação de um limiar a partir do qual se justifica o controlo parasitário, como também possibilita a investigação de muitas formas alternativas de controlo. Assim, o controlo parasitário constitui um desafio enorme e permanente em qualquer exploração, combinando conhecimentos e estratégias diversas que se estendem actualmente além da terapêutica farmacológica, que foi durante muitos anos a principal ou a única forma de controlo.

3.3.1-Controlo farmacológico

O controlo dos parasitas assenta tipicamente no controlo farmacológico, com excepção das explorações orgânicas. Em termos de classes principais existem poucos grupos de fármacos, embora com diferenças em inúmeros aspectos: espectro de actividade, duração e especificidade da actividade parasiticida, dosagens e recomendações, intervalos de segurança (IS) para o leite e carne (Tabela 5). Muitos dos compostos já são antigos e não se encontram protegidos por patentes, sendo permitidos no mercado muitos fármacos genéricos que incluem estes princípios activos mais comuns. Considera-se um medicamento veterinário genérico o “medicamento veterinário com a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias activas, a mesma forma farmacêutica e cuja bioequivalência com o medicamento veterinário de referência tenha sido demonstrada por estudos de bioequivalência apropriados” (Diário da República, 1.^a série — N.º 145 — 29 de Julho de 2008, artigo 3º, decreto de lei 148-2008),

deste modo muitas das vezes não são exigidos os resultados de “ensaios de segurança, e dos estudos de resíduos nem dos ensaios pré-clínicos ou clínicos” (Diário da República, 1.ª série — N.º 145 — 29 de Julho de 2008, artigo 8.º, decreto de lei 148-2008). Assim, a utilização de um medicamento veterinário genérico como substituto de medicamentos semelhantes deve ser feita com prudência, aplicando-se esta regra igualmente aos parasiticidas.

Tabela 5- Anti-helmínticos para bovinos. Adaptado de APIFARMA, (2013) e SIMPOSIUMVET.PT, (2014).

Princípio activo	Nome do medicamento	Espectro de actividade	Administração	IS (Carne, leite)	
Benzimidazóis	Albendazol ¹	Albendavet [®] 10% ¹	NGI, NP, Céstodes,	Oral ¹	Carne: 14 dias, leite: 4 dias ¹
		Valben [®] 2,5% ¹	fascíolas*, ¹		Carne: 12 dias, leite: 3 dias ¹
	Febendazol ¹	Panacur [®] 10% ¹	NGI, NP, Céstodes ¹	Oral/No alimento/bolus ¹	Carne e leite: 0 dias ¹
	Oxfendazol ¹	Systemex ^{®1}	NGI, NP, Céstodes (propriedades ovicidas) ¹	Oral/bolus ¹	Carne: 8 dias, leite: 60 horas ¹
Lactonas Macroclínicas	Doramectina ¹	Dectomax [®] pour on ¹	NGI, NP, Ectoparasitas ¹	Pour-on ¹	Não usar em vacas leiteiras Carne: 35 dias
		Dectomax [®] solução injectável a 1% ¹		Injecção s/c ¹	Não usar em vacas leiteiras ¹ Carne: 42 dias ¹
	Eprinomectina ¹	Eprinex ^{®1}	NGI, NP, Ectoparasitas ¹	Pour-on ¹	Carne: 15 dias, Leite: 0 dias ¹
Ivermectina ¹	Chanectin [®] 0,5% ¹	Virbamec [®] pour on ¹	NGI, NP, Ectoparasitas ¹	Pour-on ¹	Não usar em vacas leiteiras ¹ . Carne: 28 dias ¹
		Ecomectin [®] 0,5% ¹			Não usar em vacas leiteiras. Carne: 31 dias
	Ecomectin [®] 10mg/ml ¹		Injecção s/c ¹	Não usar em vacas leiteiras Carne: 42 dias	
	Ivertin [®] 10mg/ml ¹			Não usar em vacas leiteiras ¹	
	Ivomec [®] 10mg/ml ¹			Carne: 49 dias ¹	
	Maximec [®] 1%				
	Vectimax [®] 10mg/ml ¹	Virbamec ^{®1}			Carne: 21 dias, Leite: 28 dias ¹
Ivermectina+Clorsulon ^{1,2}	Clovertin Plus ^{®1}	Ivomec F ^{®1}	NGI, NP, Ectoparasitas,	Injecção s/c ^{1,2}	Não administrar a vacas leiteiras ^{1,2} . Carne: 66 dias ^{1,2}
		Virbamec F ^{®1}	Fascíola ^{1,2}		
		Alverin Plus ^{®1,2}			
Moxidectina ¹	Cydectin [®] 1% solução injectável ¹		NGI, NP, Ectoparasitas ¹	Injecção s/c ¹	Não usar o produto em vacas que produzam leite para o consumo humano ¹ . Carne: 65 dias ¹
		Cydectin [®] 0,5% solução pour on ¹		Pour on ¹	Não usar o produto em vacas que produzam leite para o consumo humano ¹ . Carne: 14 dias ¹
Outros/Fasciolícidias	Closantel ¹	Flukiver [®] 50 ¹	Fascíola, alguns NGIs, Hipoderma*, ¹	Injecção s/c ¹	Não usar em vacas leiteiras ¹ . Carne: 28 dias ¹
		Nitroxinil ¹	Dovenix ^{®1}	Fascíola, alguns NGIs ¹	Injecção s/c ¹
	Moxidectina+Triclabendazol ²	Cydectin Triclamox [®] pour on ²	Fascíola, alguns NGIs, NP ²	Pour on ²	Não usar em vacas leiteiras ² . Carne: 143 dias ²

IS: intervalo de segurança, NGI: nemátodes gastrointestinais, NP: nematodes pulmonares, *em dosagens mais elevadas que para as outras espécies.

¹APIFARMA (2013) e ²SIMPOSIUMVET.PT (2014)

Existem três aspectos muito importantes a ter em consideração quando se aplica um tratamento antihelmíntico em vacas adultas: o efeito imprevisível da resposta ao tratamento, o tempo do tratamento e o risco de se desenvolverem resistências aos antihelmínticos (Charlier, Höglund, von Samson-Himmelstjerna, Dorny & Vercruyse, 2009). Assim, e de acordo com estes aspectos, existem vários métodos de como estes produtos podem ser usados no tratamento e controlo dos parasitas, tais como: estratégico, tático, terapêutico e tratamento alvo de forma selectiva (em inglês, *targeted selective treatment*, TST).

Estratégico: São desenhados para aplicar doses terapêuticas de antihelmínticos quando os parasitas estão em maior quantidade nas pastagens contaminadas. A altura é definida com base na sazonalidade do ciclo do parasita, de acordo com o maneio dos animais e da pastagem, de acordo com o efeito geográfico e o tipo de produção. O plano deve ser então adequado em função das necessidades da região, do produtor e da operação (Corwin, 1997).

O tratamento dos animais é efectuado de acordo com a epidemiologia parasitária (Charlier *et al.*, 2009) e perfil do produto. Este tipo de tratamento é administrado antes dos animais exibirem sinais clínicos e, caso estejam infectados, quando a carga parasitária ainda é reduzida. Tratamentos deste tipo contrariam a elevada probabilidade da população parasitária crescer até níveis significativos. Apesar de parecer contra intuitivo desparasitar animais que não se encontram infectados de forma evidente, este tipo de abordagem consegue atingir um nível de controlo óptimo sem exigir muitas intervenções subsequentes. Constituem exemplos deste tipo, o controlo dos nematodes gastrointestinais, direccionado para os vitelos jovens que pastoreiam pela primeira vez (VPPV), em inglês *first season calves* (FSC), por serem os animais mais susceptíveis de desenvolver a doença; nas regiões onde existe um período de estabulação, os tratamentos devem ser efectuados no início da época de pastoreio, para prevenir a recirculação da infecção a partir das larvas que sobreviveram durante o inverno e se encontram na pastagem desde a época de pastoreio anterior (Charlier *et al.*, 2009).

Tático: É feita a monitorização da infecção, sendo administrado o tratamento somente quando se atingem determinados limiares. Embora o conhecimento epidemiológico permita orientar e escolher o melhor período para ser realizada a monitorização, esta abordagem não é tão eficaz como a anterior no controlo da população parasitária num período alargado de tempo. No entanto, é muito importante para um controlo parasitário integrado e no controlo das resistências aos antiparasitários. Pode também ser útil quando as condições geo-climáticas façam pressupor o recrudescimento do parasitismo devido à melhoria das condições para o seu desenvolvimento (por exemplo, após uma chuvada, a transmissão de EGI e de *Fasciola hepatica* está mais facilitada).

Terapêutico: Está relacionado com a abordagem tática, no entanto este tratamento é dirigido apenas a animais que apresentam sinais clínicos. Não são abordagens ideais uma vez que existem perdas económicas relacionadas com perdas produtivas nos animais, para além de os animais sofrerem ainda com os efeitos da doença clínica (Vercruyssen & Claerebout, 2001). No entanto, é uma prática cada vez mais frequente como consequência da redução do número de tratamentos por questões económicas ou em explorações de carácter biológico.

TST: É um tipo de tratamento direccionado apenas aos animais da exploração que são mais passíveis de poder melhorar com o tratamento e com níveis de OPG mais elevados (Jackson & Miller, 2006), permitindo a manutenção da população de refúgio, um uso racional dos antihelmínticos e prevenindo o aparecimento de resistências (ver adiante).

Como anteriormente foi referido os antihelmínticos são cada vez mais usados com o objectivo de melhorar os rendimentos e não como tratamento de animais clinicamente afectados (Vercruyssen & Claerebout, 2001). São poucos os antihelmínticos registados que podem ser usados em vacas leiteiras (Tabela 5), apesar dos números variarem entre os diferentes países. Em geral pertencem ao grupo das lactonas macrocíclicas, em formulações *pour-on* de eprinomectina e em alguns países, não em Portugal, também de moxidectina. São considerados fármacos de eleição porque além de não possuírem intervalo de segurança para o leite, combinam uma elevada eficácia e persistência no tempo. A farmacocinética e os perfis de resíduos no leite de eprinomectina foram estudados e o máximo de concentração plasmática é atingido 2 dias após a sua administração e somente 0,1% da dose total que é administrada é eliminada no leite, sendo cerca de 50 vezes inferior à concentração após administração por via subcutânea de fármacos do mesmo grupo, como a ivermectina ou moxidectina (Alvinerie, Sutra, Galtier & Mage, 1999).

Tanto a eprinomectina (Shoop *et al.*, 1996) como a moxidectina (Yazwinski, Tucker, Copeland, Yazwinski & Guerino, 1999) possuem uma elevada eficácia após a sua administração tópica. A eprinomectina revelou eficácia igual ou superior a 90% até 28 dias após o tratamento (Cramer *et al.*, 2000) e a moxidectina superior a 99% até 35 dias após a sua administração (Hubert, Kerboeuf, Cardinaud, Blond-Riou & Fournier, 1997). Apesar da eprinomectina após a sua administração subcutânea ter uma baixa distribuição no plasma/leite, está apenas disponível comercialmente como formulação tópica. Tem a vantagem de ser fácil de aplicar, mas a sua limitação é a sua elevada disponibilidade sistémica, em consequência dos animais possuírem o hábito frequente de se lamberem e deste modo os resíduos do fármaco no leite podem aumentar, mas geralmente não chegam a atingir o limite detectável (Imperiale, Sallovitz, Farias, Lifschitz & Lanusse, 2009). No entanto, de forma a evitar

subdosagens quando são efectuados tratamentos selectivos ou quando apenas alguns animais são tratados, devem-se separar os animais tratados dos não tratados.

A imprevisibilidade da resposta produtiva ao tratamento constitui um ponto crítico, que depende da intensidade da infecção, da susceptibilidade individual à infecção, da intensidade da resposta imunitária e do estado fisiológico do animal. Apesar destes parâmetros serem muito complicados de compreender, muitos estudos têm sido feitos para poderem ajudar o veterinário ou o produtor na hora de optar por um tratamento antihelmíntico (Charlier *et al.*, 2009). Estudos relacionados com a idade e o nível produtivo revelaram resultados inconsistentes. Por exemplo, demonstrou-se um aumento de produtividade após tratamento nas múltiparas (McPherson *et al.*, 2001), ou nas primíparas (Forbes, Huckle & Gibb, 2004), ou sem associação à idade (Nødtvedt *et al.*, 2002). Em relação ao nível de produção leiteira em resposta ao tratamento, foi demonstrado que as vacas de elevada produção tinham uma melhor resposta produtiva após o tratamento do que as baixas produtoras (Ploeger, Schoenmaker, Kloosterman & Borgsteede, 1989), ou não se encontrou qualquer relação (Nødtvedt *et al.*, 2002). Em relação ao melhor período de tratamento, concluiu-se também que os animais tratados a meio da lactação ou de forma estratégica ao longo do ano, em vez do habitual sistema de desparasitar no período da secagem ou no parto, apresentavam melhor resposta ao tratamento. Comparando o efeito nas vacas múltiparas e primíparas, as últimas tinham piores resultados (Sanchez, Dohoo, Carrier & DesCôteaux, 2004a).

3.3.2-Não Farmacológico

Além do tratamento farmacológico existem outras soluções válidas para um controlo dos parasitas, principalmente dos helmintes, de forma mais sustentável. Estas soluções assentam em três princípios de acção: a) redução do contacto entre o hospedeiro e os estádios infectantes, b) estimulação da resposta imunitária e c) eliminação dos parasitas do hospedeiro (Hoste & Torres-Acosta, 2011).

a) Redução do contacto entre os hospedeiros e as formas infectantes

Pode ser conseguida através do maneio correcto da pastagem e do controlo biológico. Como vimos anteriormente através da contagem de anticorpos frente a *Ostertagia ostertagi* presentes no leite do tanque, existem muitos factores de maneio nas vacas leiteiras que contribuem para o grau de exposição aos parasitas. O maneio correcto da pastagem integra um conjunto de princípios higiénicos em sistema extensivo para controlar os parasitas metazoários. É importante no entanto referir, que todas estas estratégias devem ser aplicadas de acordo com a epidemiologia local e com as características de cada exploração. O

adiamento da altura de pastoreio, a ceifa das pastagens e a redução do tempo diário de pastoreio são exemplos de estratégias de manejo possíveis que podem ajudar a controlar e a reduzir a exposição dos animais aos nemátodes gastrointestinais.

O pastoreio conjunto de novilhas com as vacas secas ou com as vacas em produção pode ser benéfico, ao diminuir o grau de contaminação geral da pastagem por menor eliminação por parte das vacas em produção e das vacas secas. O pastoreio alternado de vacas adultas e vitelos há muito tempo que é usado como manejo das pastagens dispensando o uso de químicos no controlo dos NGI em animais jovens (Barger, 1997). De modo semelhante o pastoreio misto, assenta no princípio de que a maioria dos NGIs possui uma certa especificidade para o hospedeiro e quando diferentes espécies de ruminantes pastoreiam em conjunto cada espécie ajuda a reduzir a infectividade da pastagem para os hospedeiros naturais, ao consumirem ambos L3, isto sucede quer pastoreiem em simultâneo ou alternadamente (Mahieu & Aumont, 2009). Também a redução da carga animal constitui outra forma de diluir o risco parasitário, apesar de não ser linear a relação entre a densidade animal e a carga parasitária. Outro método pode ser a interferência da biologia e da viabilidade dos estádios não parasitários, através da adopção de um sistema de rotação das pastagens e deixando que o tempo actue sobre as formas de ovo a L3 (Hoste & Torres-Acosta, 2011), aproveitando sempre a disponibilidade e qualidade das pastagens.

De modo semelhante ao que é aplicado nas condições de estabulação, também é possível a aplicação de estratégias de desinfecção de natureza química, física ou biológica nas pastagens. Os químicos não têm tão bons resultados em estudos de campo como em laboratório, talvez devido a interações com a matéria orgânica. Mesmo assim os que podem ser utilizados são: cianamida de cálcio, ureia e hipoclorito de sódio (Garduño, Ortega, Hernández, García, & de Gives, 2010). A acção física do sol e da radiação UV também têm um efeito importante na descontaminação da pastagem e o corte da pastagem pode aumentar a exposição das L3, ovos e hospedeiros intermediários a estes factores.

A utilização de outros organismos com o objectivo de controlar os NGI é uma técnica de controlo integrado e sustentável que tem sido muito estudada (Larsen, 2000), sobretudo a que utiliza fungos nematófagos, com a capacidade de invadir e matar as larvas infectantes nas fezes. Estes estudos de controlo biológico têm o objectivo de encontrar e isolar um fungo com a capacidade de sobreviver à passagem no trato gastrointestinal, ser eliminado, colonizando as fezes e exercendo acção sobre as larvas infectantes L3 (Assis, Luns, Araújo, & Braga, 2012). Estudos com os fungos nematófagos demonstraram elevado potencial biológico para o fungo *Duddingtonia flagrans* contra várias espécies de nemátodes de vários hospedeiros (Larsen, 2000). Uma outra alternativa à utilização destes fungos para controlo biológico é a

administração oral de clamidosporos misturados com o alimento concentrado (Larsen, 2000), ou a administração de formulações de alginato de sódio contendo massas do micélio de fungos (Araújo *et al.*, 2004).

b) Estimulação da imunidade

Sabe-se que o comportamento de pastoreio e as condições ambientais provocam variações fenotípicas e genotípicas na forma como os animais toleram a infecção parasitária, ou seja na sua resiliência, e também originam em cada animal uma capacidade distinta para implementar uma resposta imunitária contra os parasitas, a resistência. As estratégias descritas têm como principal objectivo melhorar o resposta do hospedeiro contra as infecções por helmintes, através da selecção genética ou cruzamento de animais mais resistentes com animais mais susceptíveis e/ou através da manipulação nutricional (Hoste & Torres-Acosta, 2011).

A vacinação contra os helmintes é apenas possível para alguns parasitas, mas ainda existe muito por descobrir, no que concerne a várias espécies (W. D. Smith, 2008). Apesar do sucesso com a vacinação contra os cestodes (Lightowers *et al.*, 2003), existem ainda algumas barreiras no desenvolvimento de vacinas para alguns nematodes.

Mais uma vez será dada maior importância ao parasita *Ostertagia ostertagi*, pelas razões anteriormente enunciadas, e em relação ao desenvolvimento de uma vacina contra este parasita têm existido muitas dificuldades de ordem técnica, prática e económica, bem como o nível do seu conhecimento biológico que têm dificultado o desenvolvimento de uma vacina. Contudo, estudos recentes defendem que a obtenção de mais informação sobre a relação biológica entre o parasita e o hospedeiro pode ser a chave para o desenvolvimento de uma nova e melhor estratégia para o seu controlo (Rinaldi & Geldhof, 2012).

A selecção genética para as características de resistência aos NGI foi apresentada como uma ferramenta notável para um controlo parasitário sustentável, por ser barata, permanente e não exigir outros recursos ou custos adicionais (Waller & Thamsborg, 2004). Os resultados que se esperam dos benefícios da selecção são: desenvolvimento mais tardio das formas parasitárias no hospedeiro e diminuição da carga parasitária e da excreção de ovos (Hoste & Torres-Acosta, 2011). Assim, muito se tem estudado em modelos animais de laboratório na tentativa de identificar genes que codificam a resistência parasitária (Iraqi *et al.*, 2003). O objectivo tem sido identificar nos ruminantes a localização de genes semelhantes e desenvolver animais transgénicos, em que os genes responsáveis pela resistência são inseridos em animais com importância económica (Waller & Thamsborg, 2004). A selecção dos animais com base na sua resiliência foi também descrita (Albers *et al.*, 1987), contudo tem merecido menos atenção do que a selecção anterior, apesar de ser de grande importância os animais

consegurem manter uma performance adequada independentemente da carga parasitária ou das contagens de OPG de fezes. Este raciocínio em conjunto com a aplicação de TST e da análise de indicadores de performance pode ser uma mais-valia para a produtividade da exploração, uma vez que pode fornecer informação sobre os animais que devem ser refugados por serem pouco produtivos ou por necessitarem de tratamentos sucessivos (Hoste & Torres-Acosta, 2011).

Com base nos conhecimentos de patofisiologia dos NGIs no trato digestivo e de forma a melhorar a resistência e a resiliência dos animais a estes parasitas considerou-se o raciocínio oposto: suplementar a alimentação com nutrientes, sobretudo com proteínas por serem os que mais limitam a dieta (Coop & Kyriazakis, 1999). Assim, Van Houtert *et al.* (1997), citado por (Waller & Thamsborg, 2004) defenderam que a suplementação alimentar estratégica nos animais mais susceptíveis à infecção, jovens e fêmeas em lactação, pode ter benefícios a longo prazo.

c) Eliminação dos parasitas do hospedeiro, através de antihelmínticos não convencionais

As plantas ricas em metabolitos secundários constituem uma alternativa aos antihelmínticos, possuem a capacidade de modular a biologia dos nematodes parasitários e também de contrariar as suas consequências negativas nos hospedeiros (Rochfort, Parker & Dunshea, 2008). Os principais metabolitos são os taninos e as plantas ricas nesta substância têm a capacidade de contrariar a fixação de L3 no hospedeiro e simultaneamente reduzir a integridade dos nematodes adultos, a sua fecundidade e o seu desenvolvimento larvar (Hoste *et al.*, 2012). Possuem ainda a capacidade de se unirem à proteína da dieta reduzindo a proteína degradada no rúmen e aumentando a quantidade de proteína *by pass* no abomaso. Consequentemente há uma diminuição da necessidade de forragem adquirida na pastagem devido ao seu efeito nutracêutico (Andlauer & Fürst, 2002) e assim há menor ingestão de L3 e efeitos menos gravosos (Knox *et al.*, 2012).

3.3.3-Resistências aos antihelmínticos

A principal forma de controlo das parasitoses gastrointestinais nos últimos 50 anos tem sido através do uso de antihelmínticos, constituídos por moléculas pertencentes aos grupos de benzimidazóis, lactonas macrocíclicas, imidatiázóis/tetrahidropirimidinas (Hoste & Torres-Acosta, 2011). Contudo o seu uso indiscriminado conduziu, um pouco por todo o mundo, a resistências parasitárias a estes fármacos e a uma mudança das populações mais prevalentes nas pastagens, tornando o controlo parasitário com antihelmínticos mais limitado (Knox *et al.*, 2012).

Apesar de constituírem um problema há já algum tempo em pequenos ruminantes, a resistência aos antihelmínticos tem crescido também nos bovinos (Sutherland & Leathwick, 2011), constituindo uma consequência biológica natural e inevitável das estratégias assentes nos agentes químicos. O modo como se desenvolvem depende da magnitude da pressão exercida na população parasitária (Sutherland & Leathwick, 2011; Knox *et al.*, 2012). Assim, pensa-se que o desenvolvimento de resistências aos antihelmínticos nos bovinos foi mais lento porque o tratamento destes animais não foi tão intensivo e foi mais restringido às novilhas, deixando grande parte da população em refúgio¹ (Coles, 2002). Quanto maior for a dimensão desta população em refúgio, mais dificilmente se desenvolvem resistências. Fazem parte da população refúgio, os nematodes que se encontram nos animais que não são tratados quando se realiza um tratamento parcial na manada, estádios de parasitas no hospedeiro que não são afectados pelo tratamento (por exemplo em hipobiose) e estádios de vida livre no ambiente (Knox *et al.*, 2012).

Está comprovado que o factor que mais contribui para o aparecimento de resistências é o nível da população em refúgio na altura em que é efectuado o tratamento; e o seu maneo é fundamental para contrariar o aparecimento de resistências e manter a eficácia dos antihelmínticos por muito mais tempo. O ideal será manter níveis de população refúgio adequados que impeçam o aparecimento de resistências, mas que permitam atingir níveis de controlo parasitário e de produtividade aceitáveis (Knox *et al.*, 2012).

Outra estratégia é a adopção de TST, baseada na presença de parasitismo nos animais como sinais clínicos ou através de métodos de diagnóstico ou de indicadores de performance, possibilitando um uso óptimo dos antihelmínticos no que diz respeito ao número de tratamentos e mantendo a sua eficácia produtiva e antihelmíntica.

É importante transmitir aos produtores que a conservação da eficácia antihelmíntica vale a despesa da sua implementação, uma vez que além das vantagens a nível antiparasitário a adopção deste sistema pode ser benéfica no sistema produtivo pois permite a detecção precoce de eventuais doenças, a identificação dos animais mais parasitados e dos menos produtivos, permitindo a adopção de estratégias mais rentáveis para a exploração.

O TST constitui a melhor forma de controlar a população refúgio, melhorando a forma como os parasitas são controlados e preservando por mais tempo a eficácia dos tratamentos antihelmínticos (Knox *et al.*, 2012). Assim, a monitorização das infecções por NGIs é vantajosa quando são considerados os tratamentos dos animais adultos, seguindo o mesmo raciocínio, seria desejável a monitorização individual e somente tratar *a posteriori* e de modo selectivo. Contudo, a monitorização individual pressupõe custos acrescidos que devem ser

¹ A população em refúgio, é a população que não é seleccionada após a aplicação do fármaco.

avaliados em associação com os benefícios da sua aplicação. Alternativamente também se pode dirigir o tratamento de vacas adultas apenas aos animais mais expostos às larvas e que apresentem maior susceptibilidade ou reduzida produtividade (Waller, 2006).

Em determinados países como a Nova Zelândia e a Austrália, é prática comum recorrer-se a combinações de vários fármacos, para alargar o espectro antihelmíntico no controlo parasitário e contrariar o facto de muitos géneros de parasitas serem resistentes a mais do que uma família de antiparasitários (Sargison *et al.*, 2007). No entanto, as autoridades responsáveis pelo registo de produtos veterinários na U.E. e nos E.U.A., não são a favor da combinação de diferentes fármacos ou da sua utilização como medida preventiva (Geary *et al.*, 2012), apesar dos estudos em modelos e no campo demonstrarem que as combinações de fármacos diminuem o aparecimento de resistências, ao reduzirem o número de genótipos resistentes que sobrevivem ao tratamento. Para que isso suceda é necessário que os alelos que conferem a resistência a todas as classes de antiparasitários estejam presentes no mesmo parasita (Bartram, Leathwick, Taylor, Geurden & Maeder, 2012). As combinações são apropriadas quando as substâncias activas não possuem os mesmos mecanismos de resistências, sabido que os mecanismos das diferentes moléculas (benzimidazóis, tetrahidropirimidinas/ imidatiázóis e lactonas macrocíclicas) são distintos (Mottier & Prichard, 2008).

Uma outra forma de evitar o aparecimento de resistências é desenvolvendo novos fármacos antihelmínticos e melhorando a forma como são administrados os já existentes, possibilitando assim aumentar a sua eficácia (Fitzpatrick, 2013).

Estas resistências aos antiparasitários assim como o controlo parasitário sustentável podem ser avaliados efectuando testes de redução da contagem de ovos, em linguagem anglo-saxónica *fecal egg count reduction test* (FECRT) após o tratamento e em ensaios de desenvolvimento larvar e eclosão de ovos (Coles *et al.*, 1992). Contudo muitos destes métodos exigem tempo e os seus resultados têm reduzida sensibilidade e os testes limitada reprodutibilidade (Taylor, Hunt & Goodyear, 2002).

3.3.4-Tratamento e controlo dos protozoários

Cryptosporidium spp.

Devido à persistência no ambiente, ao seu tamanho reduzido e à elevada resistência aos desinfectantes comuns, este parasita é difícil de erradicar dos ambientes contaminados. Estas características associadas a um tratamento ainda muito pouco eficaz, fazem como que as estratégias para o seu controlo envolvam a redução da eliminação dos oocistos e da contaminação ambiental, bem como a diminuição da exposição dos animais aos mesmos. Isto

só será possível combinando uma terapêutica de suporte, tratamentos farmacológicos e técnicas de manejo e de higiene apropriadas.

A terapêutica de suporte consiste na administração de fluídos de acordo com o grau de desidratação: nutrientes de elevada qualidade, leite inteiro ou de substituição. Quando são administrados produtos orais com electrólitos e glucose, esta não deve ser a única fonte de energia por mais de vinte e quatro horas. Ou seja, o leite inteiro ou de substituição deve ser administrado pelo menos duas vezes ao dia e suplementado por electrólitos entre estas refeições, para repor as perdas de fluidos causados pela diarreia (Divers & Peek, 2008).

A paromomicina, é um antibiótico aminoglicosídeo, capaz de controlar infecções por *Cryptosporidium parvum* (Marshall & Flanigan, 1992), sendo que a sua administração profiláctica diminui a eliminação de oocistos e reduz o número de dias que vitelos infectados têm diarreia (Fayer & Ellis, 1993). Contudo após a retirada do fármaco os animais voltam a eliminar oocistos e a apresentar diarreia (Grinberg *et al.*, 2002). O lactato de halofuginona é um antiprotozoário especialmente usado para tratar espécies de *Eimeria*, tendo actividade criptosporidiostática nos estádios de esporozoíto e merozoíto (Jarvie *et al.*, 2005). É eficaz contra a criptosporidiose em vitelos, como foi comprovada em estudos na Europa (Villacorta, Peeters, Vanopdenbosch, Ares-Mazás & Theys, 1991; Naciri, Mancassola, Yvoré & Peeters, 1993; Lefay, Naciri, Poirier & Chermette, 2001; Martins, Sousa, Madeira de Carvalho, Bacellar & Cannas da Silva, 2007). Nestes estudos os vitelos foram tratados oralmente durante 7 dias, tendo os resultados sido consistentes neste período no que se refere à redução da excreção de oocistos bem como diminuição dos casos de diarreia, no entanto após a retirada do fármaco a eficácia na excreção de oocistos foi controversa, indicando que o fármaco pode prevenir a infecção do intestino pelos esporozoítos e pela recirculação dos merozoítos de primeira geração, mas não interrompe o ciclo da infecção (Shahiduzzaman & Dauschies, 2012). Constitui, apesar das suas limitações, um fármaco muito utilizado e com bons resultados em inúmeras vacarias.

O decoquinato é uma quinolona coccidiostática e o seu efeito foi estudado experimentalmente em vitelos (Redman & Fox, 1994), sugerindo ser protector durante os primeiros 21 dias após o parto. A halfuginona num tratamento de 7 dias reduziu significativamente o número de oocistos e também o número de animais que apresentavam diarreia (Martins *et al.*, 2007).

A azitromicina é um antibiótico macrólido, que também foi estudada e em tratamentos efectuados durante 7 dias em vitelos infectados naturalmente, também demonstrou diminuir a eliminação de oocistos, resultando em melhorias clínicas significativas (Elitok, Elitok & Pulat, 2005). No entanto, é muito cara e ainda não existe informação clara sobre a sua adequação a controlar criptosporidiose nos animais (Shahiduzzaman & Dauschies, 2012).

O carvão activado administrado por via oral em animais infectados experimentalmente com *Cryptosporidium parvum* demonstrou reduzir a excreção de oocistos e a diarreia (Watarai, Tana & Koiwa, 2008), sendo aconselhada a sua utilização no tratamento e prevenção da criptosporidiose em ruminantes quando administrado duas a três vezes por dia em suspensão no leite de substituição (Paraud *et al.*, 2011).

A imunoterapia passiva envolvendo concentrado de soro de bovino por via oral pode ser outra estratégia de controlo desta doença, uma vez que em vitelos infectados experimentalmente melhorou os sinais clínico e reduziu a eliminação de oocistos (Hunt *et al.*, 2002).

O maneo higiénico adequado pressupõe uma limpeza activa e desinfeção, sendo muito importante que o piso onde se encontram as instalações seja facilmente lavável e possua boa drenagem (Madeira de Carvalho, Martins, Sousa, Bacelar & Cannas da Silva, 2011). Os desinfectantes com formaldeído ou peróxido de hidrogénio possuem actividade contra o *Cryptosporidium* spp. (Castro-Hermida, Pors, Méndez-Hermida, Ares-Mazás & Chartier, 2006). A amónia 5%, e a formalina 10% apenas reduzem a infectividade do oocisto após 18h de contacto e à temperatura de 4°C (Campbell, Tzipori, Hutchison & Angus, 1982).

Dadas ainda as limitações das técnicas anunciadas anteriormente, é importante associar também estratégias de maneo que minimizem a exposição dos animais às formas infectantes do parasita, sobretudo em vitelos recém-nascidos. Deve-se ter especial atenção aos fómites e aos tratadores por poderem constituir veículos de transmissão da infecção. Deve-se tratar em primeiro lugar os animais saudáveis e só depois os doentes, procedendo também à separação destes animais em diferentes instalações (Madeira de Carvalho *et al.*, 2011). Estas medidas além de serem facilmente exequíveis podem ajudar a melhorar significativamente os resultados na recria.

Eimeria spp.

Tal como no caso anterior, é importante um bom maneo higiénico das instalações e um controlo da densidade animal em associação com controlo médico. Os desinfectantes para serem eficazes devem ser constituídos por cresol e devem actuar durante 2 horas (Dauguschies, Böse, Marx, Teich & Friedhoff, 2002) ou serem à base de amónio quaternário (Stilwell, 2013). A terapêutica é essencialmente útil em casos agudos, que apesar de ser limitada em termos curativos, por poderem existir já muitas lesões, é útil ao interferir com o ciclo do parasita. No entanto, num surto de doença, os animais afectados devem ser separados dos restantes, devendo ser administrado um tratamento paliativo com electrólitos, glucose e anti-diarreicos que pode ajudar a homeostasia dos vitelos e na sua sobrevivência (Dauguschies & Najdrowski, 2005). Os coccidiostáticos ou coccidiocidas devem ser usados apenas em

situações em que existe risco de exposição (Divers & Peek, 2008; Stilwell, 2013), como profilaxia e metafilaxia. Os fármacos a usar podem ser administrados na água ou no alimento e podem ser o decoquinato, amprolium, monensina e lasalocid. As sulfamidas injectáveis, se aplicadas no período pré-patente são mais eficazes, no entanto podem ter alguma utilidade caso sejam aplicadas de forma terapêutica e no combate de eventuais infecções secundárias ou nos casos em que os animais não se alimentam nem bebam convenientemente e deste modo não ingerem as doses devidas de medicamento (Divers & Peek, 2008). O toltrazuril é outro fármaco que pode ser útil no controlo da doença devendo ser administrado metafilaticamente uma vez que diminui a excreção de oocistos (Mundt, Bangoura, Mengel, Keidel & Dauschies, 2005). O decoquinato (Dauschies & Najdrowski, 2005) e a monensina (Watkins *et al.*, 1986) apesar de serem fármacos muito utilizados, exigem que sejam administrados durante um período de tempo prolongado, 30 e 28 dias respectivamente (Divers & Peek, 2008).

3.4-Impacto económico

Os parasitas, principalmente os helmintes, constituem em qualquer parte do mundo, um importante constrangimento em produção animal e actualmente o limiar de parasitismo que é aceitável nestes animais tem uma perspectiva económica (Corwin, 1997). Assim, este nível de parasitismo baseia-se exclusivamente no impacto económico dos parasitas, não constituindo a imunidade um aspecto importante. No entanto, devida à imprevisibilidade do estabelecimento da infecção a aceção deste limiar é muito complicada (Vercruyse & Claerebout, 2001). Os seus efeitos podem ser estimados relacionando os níveis de infecção com indicadores de performance produtiva (IPP), ou associando o uso de antihelmínticos a variações nas características de produção (Charlier *et al.*, 2009). Uma vez que o impacto destas infecções helmínticas é cada vez mais imperceptível e cada vez mais específico de cada exploração, é necessário que as acções destinadas a assegurar a saúde animal em cada produção tenham avaliações económicas mais precisas e específicas.

Para elaborar um plano antihelmíntico sustentável e adequado a cada exploração, é importante combinar as técnicas mais recentes de controlo parasitário com os IPP. Estes indicadores são muito comuns, porque são fáceis de determinar e podem facilmente dar uma apreciação global da performance técnica da vacaria, no entanto não medem os efeitos globais como esta performance é alcançada. Um bom exemplo que pode explicar este raciocínio, é produzir simplesmente com o objectivo de aumentar o volume total de leite, o que pode exigir um maior uso de antihelmínticos, mas de certeza exigirá também mais alimento concentrado ou

maior número de ordenhas, o que pode não se traduzir numa maior rentabilidade da vacaria. O impacto económico ou a necessidade de adoptar estratégias de controlo podem assim ser avaliadas e calculadas, com base nos IPP ou através de estudos de análise económica (van der Voort *et al.*, 2013).

3.4.1-Indicadores de performance produtiva (IPP)

Os IPP mais comuns nas vacas leiteiras são a produção leiteira e os índices reprodutivos e nas novilhas o ganho médio diário. Serão analisados estudos que relacionam os IPP com as infecções por Nemátodes Gastrointestinais (NGIs) e com enfoque sobretudo na produção de leite, por ser o tema de maior relevância neste estudo. Considera-se no entanto, de extrema importância, a realização de um estudo semelhante para os restantes tipos de parasitas, principalmente, trematodes e protozoários em animais jovens.

Efeito no ganho de peso e na carcaça

Em animais de pastoreio o aumento de peso é um indicador importante de um controlo adequado dos NGIs, principalmente nos FSC. Em adultos este efeito já não tem tanta importância (Charlier *et al.*, 2009). Um estudo recente na Suécia que testou diferentes estratégias de controlo parasitário em VPPV (Larsson, Uggla, Waller & Höglund, 2011) demonstrou que durante a primeira estação de pastoreio apesar de existirem diferentes níveis de infecção e conseqüentemente diferenças no ganho de peso, estas permaneceram até ao final da segunda estação de pastoreio. Um outro estudo ainda mais recente (Höglund, Dahlström, Sollenberg & Hessle, 2013) em VPPV sujeitos a diferentes tratamentos, 7 doses anuais de doramectina, TST ou sem qualquer tratamento, demonstrou que o tratamento frequente com AH possibilitou maiores GMD (variáveis entre 0,39-0,61 kg/dia), que os que sofreram TST (0,36-0,50 kg/dia) ou que não tiveram qualquer tratamento (0,23-0,42 kg/dia). Sabendo-se que o peso ao parto tem influência na primeira lactação (Zanton & Heinrichs, 2005), deduz-se que as infecções existentes nos primeiros dois anos de vida ao influenciar o crescimento de forma negativa vão do mesmo modo condicionar a quantidade de leite produzida (Charlier *et al.*, 2009). Seguindo ainda o mesmo raciocínio, estes animais necessitarão também de mais tempo até atingir o tamanho para a primeira cobrição o que pressupõe custos reprodutivos e relacionados com a produção leiteira (Charlier *et al.*, 2009).

Efeitos na produção de leite

Apesar das infecções nas vacas adultas serem essencialmente subclínicas, estão frequentemente associadas a decréscimos de produção leiteira (Vercruyse & Claerebout,

2001). Existem muitos estudos com diferentes metodologias, no entanto, praticamente todos, incidem em animais que têm acesso à pastagem, permitindo assim melhor avaliar e quantificar o impacto dos nemátodes gastrointestinais na produção de leite.

Existem estudos que consistem na a) indução de infecções experimentais, outros em b) ensaios clínicos que avaliam o efeito do tratamento antihelmíntico, e um terceiro tipo que investiga a c) relação entre os níveis de anticorpos específicos de *Ostertagia ostertagi* e a produção de leite.

- a) No caso das infecções experimentais, os resultados devem ser extrapolados com prudência pois as condições a que os animais estão submetidos são sempre diferentes da realidade e é muito difícil simular o padrão de infecção que existe na Natureza (Charlier *et al.*, 2009). Após indução de uma infecção experimental, Barger & Gibbs (1981) inocularam semanalmente cerca de 150 000 larvas infectantes em 6 animais e demonstraram que o grupo infectado produzia 2,16 kg/dia menos leite do que os animais não infectados.
- b) Os estudos sobre o efeito do tratamento antihelmíntico têm geralmente uma relação positiva na produção de leite, mas o seu efeito na produção é variável consoante o estudo e no mesmo estudo entre os diferentes grupos de animais (Charlier *et al.*, 2009). Gross *et al.*, (1999) compararam 87 estudos deste tipo. Os antihelmínticos utilizados eram pertencentes a diversos grupos incluindo organofosforados, benzimidazóis, imidazotiazóis e lactonas macrocíclicas. Os resultados demonstraram que em 80% dos estudos havia um aumento na produção leiteira após o tratamento antihelmíntico com uma média de 0,63 kg/vaca/dia. Estes estudos foram realizados em animais com acesso à pastagem demonstrando mais uma vez que são mais susceptíveis às infecções por nematodes gastrointestinais e aos seus efeitos na produção de leite. Em 1997, surgiu uma nova molécula, a eprinomectina, marcadamente vantajosa por não possuir qualquer IS para o leite. Praticamente todos os estudos realizados em diferentes países e segundo diferentes metodologias demonstraram um efeito positivo na capacidade desta molécula aumentar a produção de leite e de forma persistente durante o tempo em que decorreu cada estudo (Charlier *et al.*, 2009). Num estudo de meta análise (Sanchez *et al.*, 2004b) que analisou 75 estudos realizados entre 1972 e 2002 e comparou as diferenças de produção entre animais tratados e não tratados, conclui-se que houve uma melhoria média na produção de leite de 0,35kg/vaca/dia nos animais tratados. Demonstrou-se também

que a produção de leite é maior quando o tratamento é efectuado com endectocidas e em todos os animais da exploração. Existem contudo dois estudos, realizados em animais com o acesso limitado e/ou ausente ao exterior (Glenn, Baker, Franti & Ver Steeg, 1982; Sithole *et al.*, 2005b), situações muito semelhantes às condições de produção leiteira em regime intensivo em Portugal, nos quais não houve qualquer relação entre o tratamento e a produção de leite. Indicando que o tratamento nestas circunstâncias não é uma boa prática em termos económicos (Glenn *et al.*, 1982). Em relação à concentração de sólidos no leite o tratamento antihelmíntico parece não ter qualquer influência (Glenn *et al.*, 1982; Charlier *et al.*, 2009).

- c) Os estudos de terceiro tipo, que expressam a relação entre a contagem de anticorpos específicos de *Ostertagia ostertagi* em valores de ODR e o seu efeito na produção leiteira têm a vantagem de poderem ser realizados em maior escala. No entanto, não conseguem demonstrar uma relação causal na produção nem diferenciar a exposição da infecção (Charlier *et al.*, 2009). Como vimos anteriormente, os níveis de anticorpos no soro ou leite individual e no leite do tanque têm uma forte correlação com a produção leiteira. Este método permite quantificar as infecções por nematodes em bovinos, estimar o impacto que podem ter na produção leiteira e a consequente resposta na produção após ocorrer tratamento antihelmíntico (Forbes *et al.*, 2008; Vanderstichel *et al.*, 2013). Para se estimar a relação são utilizados métodos estatísticos de regressão linear controlando uma série de factores como, por exemplo, acesso à pastagem, dias em leite, número de lactações, contagens de células somáticas, raça e localização (Charlier *et al.*, 2009). Em vacarias em regime intensivo, com acesso ausente ou limitado à pastagem, os níveis de ODR são mais baixos comparativamente com os das vacarias onde os animais estão em extensivo ou em semi-intensivo e têm livre acesso à pastagem (Charlier *et al.*, 2005a; Sanchez *et al.*, 2005; Almería *et al.*, 2009). Um estudo, demonstrou que os animais com níveis elevados de ODR no leite do tanque após serem tratados com eprinomectina tinham uma melhoria da produção leiteira média de 2,87kg/dia/vaca, enquanto para baixos níveis de ODR não se verificou qualquer melhoria (Sanchez *et al.*, 2002a). Um outro estudo em vacarias em que os animais não possuíam acesso à pastagem ou este era limitado, tentou prever a resposta produtiva após um tratamento antihelmíntico e concluiu que este não afectou positivamente toda a população (Sanchez *et al.*, 2005).

Efeitos na performance reprodutiva

Foi demonstrado num estudo australiano com 430 bovinos de aptidão leiteira alimentadas predominantemente da pastagem, que animais tratados com ivermectina durante o período seco tinham um intervalo entre o parto e a concepção de 4,8 dias mais curtos (intervalo de confiança (IC), de 95%, ou seja entre 1,2 e 8,2 dias) em relação aos não tratados (Walsh, Younis & Morton, 1995). Num estudo canadiano com 549 animais também na pastagem ou com acesso a um pequeno parque com pasto, houve uma redução marginal significativa no intervalo entre o parto e a concepção de 9 dias entre os animais tratados com eprinomectina e os animais sem qualquer tratamento (Sanchez, Nødtvedt, Dohoo & DesCôteaux, 2002c). Neste mesmo estudo foram também medidos os níveis de anticorpos no leite frente a *Ostertagia ostertagi* e expressos em ODR entre os animais não tratados. Os que possuíam maiores ODR tinham menor probabilidade de concepção sugerindo que os níveis de infecção mais elevada tinham menor performance reprodutiva. Foram também encontradas menor número de cobrições (média 1,7) nos animais tratados com eprinomectina, em comparação com os animais não tratados (média 1,9); não tendo sido observado qualquer efeito no intervalo entre o parto e a primeira cobrição. Num outro estudo no Canadá não foi encontrado qualquer efeito benéfico na performance reprodutiva das vacas tratadas com eprinomectina após o parto (Sithole *et al.*, 2005a), mas desta vez as condições de produção em regime intensivo eram semelhantes às de Portugal, onde animais não têm acesso à pastagem ou este é muito limitado. Os parâmetros reprodutivos avaliados neste estudo foram: intervalo de tempo entre o parto e a concepção, intervalo entre o parto e o primeiro serviço e o número de inseminações por concepção (Sithole *et al.*, 2005a).

3.4.2-Análise económica

Quando se estuda o efeito de uma estratégia de controlo, o novo nível de infecção deve ser analisado, e caso seja possível, deve-se relacionar também com os IPP. Se existir relação, o seu potencial efeito na eficiência económica das explorações pode ser quantificado (van der Voort *et al.*, 2013) e deste modo a informação económica específica de cada exploração pode ser essencial para predizer convenientemente os efeitos económicos das medidas de controlo adoptadas (Charlier, Van der Voort, Hogeveen & Vercruyse, 2012a).

A situação económica de cada exploração varia consoante a sua produtividade, que está dependente de vários factores tais como: número de animais em produção, da quantidade de leite produzida, da quantidade de matérias-primas usadas para a produção de leite, da presença ou ausência de doenças, de diferenças de maneio e restrições regionais (Bennema *et al.*, 2010; Wilson, 2011). Estas diferenças na produção e nos factores produtivos geram

igualmente diferenças no impacto que as infecções helmínticas e o seu controlo têm na economia de cada exploração (van der Voort *et al.*, 2013).

Num ambiente socio-económico em constante evolução é cada vez mais importante encontrar medições económicas mais sofisticadas que avaliem as acções aplicadas na melhoria e salvaguarda da saúde dos animais de produção. Em geral os estudos económicos que avaliam os efeitos das infecções helmínticas ou das estratégias de controlo utilizadas baseiam-se em orçamentos e análises de custo benefício (Charlier *et al.*, 2012a). No entanto, perante infecções helmínticas tão subtis não se sabe se estas estratégias são suficientemente sensíveis e específicas para cada exploração, apesar do desenvolvimento de técnicas de diagnóstico parasitário cada vez mais apuradas contribuírem para cálculos económicos cada vez mais aperfeiçoados e permitirem estimar melhor o nível de infecção na exploração e, como vimos anteriormente, relacioná-lo com eventuais perdas de produção. Também as variações de resultados dos diferentes estudos que foram apresentados, demonstram uma vez mais que o impacto na produção e o grau de infecção são específicos de cada exploração.

A avaliação económica do impacto das infecções helmínticas para cada caso pode ser efectuada de duas formas:

- a) Através do cálculo dos custos, é calculado com base nos custos da aplicação das estratégias de controlo e no decréscimo de produção leiteira (Holzhauer, Schaik, Saatkamp & Ploeger, 2011).
- b) Através da análise de custo-benefício, que é considerada mais apropriada (Charlier, Levecke, Devleeschauwer, Vercruyssen & Hogeveen, 2012b), por não considerar as perdas de produção por completo, mas apenas a fracção que pode ser recuperada ou aumentada, posteriormente à aplicação das estratégias de controlo (Perry & Randolph, 1999). No entanto esta fracção possível de recuperar, nem sempre é fácil de avaliar e quantificar. Além disso olhar apenas para as estratégias de controlo pode ser uma desvantagem quando o seu efeito na rentabilidade de toda a exploração não é claro, sendo importante efectuar orçamentos da exploração para se aceder à sua rentabilidade. Os orçamentos exigem os dados de todos os *inputs* e *outputs*, bem como dos seus custos. Na ausência ou incompleta informação sobre todos os dados, consideram-se apenas os custos e as novas receitas geradas após a infecção ou a adopção das estratégias de controlo. Uma simplificação deste método é a análise marginal, onde apenas os novos custos variáveis e as novas receitas são considerados, contabilizando a adopção das estratégias de controlo, sendo apenas aplicável quando a

estratégia de controlo não afecta os custos fixos num determinado período curto de tempo (van der Voort *et al.*, 2013).

Recentemente foram desenvolvidas outras técnicas de análise económica na saúde animal, que medem a *performance*. Uma das técnicas muito utilizadas é através da análise de eficiência (Barnes, Rutherford, Langford & Haskell, 2011), medindo a quantidade de *outputs* possíveis de atingir com determinada quantidade de *inputs*, por outras palavras, mede o nível de ineficiência, através da comparação dos seus níveis actuais de *performance* com os níveis óptimos e potenciais de *performance*. Todo este cálculo é baseado na teoria da produção e nas explorações leiteiras a alimentação e os custos veterinários são considerados o principal *input* enquanto o leite é o principal *output*. A eficiência técnica orientada para a produção de *outputs*, reflecte a capacidade de uma exploração produzir o máximo de *outputs* utilizando uma determinada quantidade de *inputs*. Por outro lado uma eficiência técnica orientada para os *inputs*, reflecte a capacidade de usar uma quantidade mínima de *inputs* para se obter uma dada quantidade de *outputs* (van der Voort *et al.*, 2013). A eficiência alocativa dos custos reflecte a capacidade para se usar os *inputs*, minimizando sempre os custos das suas proporções, tendo em consideração os seus preços e a tecnologia utilizada. Assim, a eficiência técnica orientada para os *inputs* em conjunto com a eficiência alocativa dos custos, pode ser um útil indicador do valor da eficiência da exploração (Coelli, Rao, O'Donnell & Battese, 2005).

A função de produção é usada para um cálculo, apurado e específico para cada exploração, dos efeitos económicos das infecções helmínticas e permite explorar interacções entre as infecções helmínticas e/ou as estratégias de controlo e as *performances* produtivas. Determinadas explorações com uma conversão de *input-output* específica podem ser mais susceptíveis às infecções helmínticas do que outras explorações. De modo similar explorações que investem muito em medidas de controlo antihelmíntico, podem ter níveis de infecção mais baixos, no entanto podem não ser tão eficientes do ponto de vista económico.

Para as últimas explorações, uma vez que são pouco eficientes, as estratégias de controlo podem não ser o aspecto mais importante a considerar porque podem não trazer melhorias significativas na sua eficiência. Neste caso a relação entre *input* e *output* pode ser comparada com a das explorações mais eficientes, assim como os seus IPP e os indicadores económicos (IE), para encontrar as melhores estratégias possíveis e que melhor se ajustem à exploração em questão (van der Voort *et al.*, 2013).

3.4.3-Valor monetário

Como vimos, existem um conjunto de estudos que descrevem os efeitos das infecções helmínticas na *performance* dos animais, e também muitas formas de as analisar e quantificar do ponto de vista económico. No entanto estes cálculos podem ser complexos e laboriosos, acabando por não serem efectuados, optando-se por aplicar o tratamento sem fundamentação. No entanto, existem algumas ferramentas disponíveis na *internet*, como é o caso de ParaCalc[®] (Charlier *et al.*, 2012a), que fornecem estimativas específicas para cada exploração leiteira dos custos que estas infecções pressupõem. Baseia-se numa simples folha de cálculo onde as técnicas de diagnóstico de monitorização da infecção e a utilização de antihelmínticos são contabilizados como *inputs*. São utilizados valores padrão para descrever os efeitos da infecção na produção e o custo das perdas a elas associados podendo ser adaptados a cada caso em particular através da avaliação de características específicas de cada exploração. Quando aplicado em explorações belgas demonstrou-se que as infecções por NGI eram responsáveis por um custo médio de 46 €/vaca/ano.

Paracalc[®] constitui então uma ferramenta importante, que em associação da história completa da exploração, exame clínico dos animais, análise dos IPP e dos IE, podem ajudar na avaliação da importância das infecções helmínticas em cada exploração e na adopção de estratégias de controlo adaptadas para cada situação.

4-Trabalho Experimental

4.1-Objectivos

Este trabalho teve como objectivos:

- a) Estimar a prevalência de parasitas gastrointestinais, hepáticos e pulmonares em explorações bovinas leiteiras no Centro e Sul de Portugal em função do manejo;
- b) Avaliar o grau parasitário de cada exploração e as diferentes medidas terapêuticas e de manejo praticadas;
- c) Identificar quais as formas parasitárias existentes;
- d) Estimar a prevalência do protozoário *Cryptosporidium* sp. em vitelos;
- e) Cálculo de probabilidades de existência de parasitas em função de diversas variáveis de manejo, fase produtiva e presença ou ausência de tratamento.

4.2-Material e métodos

4.2.1-Characterização das explorações

Foram seleccionadas por conveniência dez explorações de bovinos leiteiros com diferentes tipos de manejo na região centro e sul do país, nos concelhos da Nazaré, Lourinhã, Sintra, Moita, Odemira e Elvas. Esta selecção foi baseada: no fácil acesso às mesmas durante as actividades desenvolvidas durante o estágio, na sua localização próxima ao laboratório onde foram efectuadas as análises e no tipo de manejo da exploração. Inicialmente o critério de manejo para a selecção das explorações baseou-se no facto dos animais se encontrarem estabulados em regime intensivo com ausência de pastoreio. No entanto, posteriormente decidiu-se incluir também explorações em regime semi-intensivo, onde os animais tivessem acesso à pastagem.

Todas as explorações incluídas neste estudo, produzem leite de bovino e o seu efectivo compreende raças reconhecidas por terem uma elevada aptidão para a produção de leite, nomeadamente Holstein-Friesian e alguns *crossbreedings* com a raça Montebeliarde e Vermelha Sueca. As explorações são de dimensão média a grande com efectivos médios de 172 vitelos (animais com idade inferior a 1 ano), 111 novilhas (animais com idade superior a um ano e antes do primeiro parto), 303 vacas em produção (vacas paridas e a produzir leite) e 43 vacas no período da secagem (animais geralmente com um período de gestação de cerca de sete meses e que não se encontram a produzir leite).

Relativamente à distribuição do manejo das explorações, sete das explorações caracterizavam-se por serem de regime intensivo em que os animais se encontram estabulados e a sua

alimentação é à base de silagem de milho misturada com outros compostos em *unifeed* ou *total mixed ration* (TMR) e ocorre na manjedoura, sendo variável consoante a fase produtiva dos animais, os preços das matérias-primas e entre cada exploração. As instalações nestas explorações também diferem entre si, pois seis possuem os seus animais em camas com cubículos e apenas uma possui os animais em cama livre de palha.

Nas explorações em regime semi-intensivo os animais encontram-se todo o ano em pastagem do tipo permanente, sendo em duas destas explorações complementada com *unifeed*, de composição variável consoante a fase produtiva do animal e os preços das matérias-primas. Na outra exploração, apenas os animais em produção são suplementados, com alimento composto, duas vezes por dia, durante o período de cada uma das ordenhas.

4.2.2- Caracterização da população

Em todas as explorações foram seleccionados por conveniência de acordo com a facilidade para contenção dos animais e mais fácil recolha das amostras pretendidas, 40 animais de diferentes faixas etárias ou fases produtivas, divididos da seguinte forma: vitelos, “cria da espécie bovina que esteja em aleitamento ou até aos 6 meses de idade” (n=10); novilhas, “animal da espécie bovina com mais de 6 e menos de 24 meses de idade e que ainda não tenha parido” (n=10); vacas em lactação, animais após o primeiro parto ou seguintes (n=10) (Diário da República, 1.ª série — N.º 111 — 9 de Junho de 2009, Portaria 638/2009 Capítulo 1, artigo 2º, alíneas a,c) e vacas no período de secagem (n=10). Os animais foram assim escolhidos para tentar compreender em que momento da fase produtiva da exploração existe maior influência parasitária e tentar relacioná-lo com diferenças existentes entre o manejo de cada grupo de animais. Globalmente a amostra distribuiu-se segundo o indicado na Tabela 6. No entanto, houve amostras que não foram possíveis de analisar, por não se encontrarem em condições devido a mau acondicionamento e/ou identificação. Os vitelos não possuem manejo diferenciado entre explorações, no que se refere ao acesso à pastagem, pelo que serão abordados em conjunto.

Tabela 6- Composição e distribuição da amostra de fezes colhidas em 10 vacarias.

Explorações	Vitelos (≤6meses)	Novilhas (>6meses<1º parto)	Secas (Paridas e sem prod. leiteira)	Lactação	Total
Intensivo	0	60	67	71	198
Semi-intensivo	0	40	30	30	100
Sem manejo diferenciado	82	0	0	0	82
Total	82	100	97	101	380

Em relação aos vitelos foi possível recolher informação relativa à sua idade e que se apresenta na Tabela 7.

Tabela 7- Distribuição relativa e absoluta das idades dos vitelos amostrados.

<3s	3 semanas - 2 meses	2 meses - 6 meses	Total
53	19	10	82
64,6%	23,2%	12,2%	100%

4.2.3-Characterização da amostra

As amostras foram obtidas nas explorações em regime intensivo entre os meses de dezembro de 2012 e março de 2013, e nas explorações de regime semi-intensivo nos dias 14 e 15 de abril de 2013. Estas datas foram escolhidas de acordo com a disponibilidade do autor e dos produtores.

As amostras foram obtidas directamente da ampola rectal dos animais, com luva de palpação rectal, à excepção dos vitelos em que as amostras foram colhidas em sacos de plástico após prévia estimulação do esfíncter anal com o dedo indicador. Nas situações em que não era possível a contenção dos animais, não era realizada a colheita das amostras fecais directamente do ânus, pelo que se aguardava até que os animais defecassem, sendo posteriormente recolhidas do solo aproveitando a parte das fezes mais superficial e menos contaminada com resíduos do solo. Após a colheita das amostras, a luva e os sacos de plástico eram invertidos, retirava-se o ar do seu interior e eram fechados com um nó. Posteriormente eram identificadas com o número de casa do animal a que correspondia a amostra utilizando caneta de tinta plástica. Os mesmos números de casa eram igualmente registados numa tabela, juntamente com informação relativa a cada animal, data do último parto, data de nascimento, data da última desparasitação e média de produção leiteira, quando era possível obter esta informação. As amostras eram posteriormente refrigeradas em mala térmica com placa de refrigeração ou quando necessário colocadas no frigorífico entre 3°C a 6°C até ao dia da análise laboratorial, não tendo sido ultrapassados os 5 dias nestas condições.

4.2.4-Análise Laboratorial

A análise laboratorial foi efectuada no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. A cada amostra foi atribuído um número de identificação para conveniência na análise e processamento de dados. Todas as amostras foram sujeitas a análises coprológicas: McMaster, Willis (Madeira de Carvalho, 2001) e Baermann (Alho *et al.*, 2013). Nas amostras de vitelos efectuaram-se também esfregaços fecais com a coloração de Ziehl-Neelsen modificado para pesquisa de *Cryptosporidium* spp.

(Madeira de Carvalho *et al.*, 2011). As amostras provenientes das três explorações de regime semi-intensivo foram ainda sujeitas às técnicas de Sedimentação simples (Madeira de Carvalho, 2001). Em duas destas explorações realizou-se ainda a técnica de McMaster modificado (Conceição, Durão, Costa & da Costa, 2002) num *pool* de amostras de cada dez animais para pesquisa de ovos de tremátodes.

Realizaram-se também coproculturas a partir de *pools* de amostras de 5 animais de cada grupo e de cada exploração (Madeira de Carvalho, 2001). Posteriormente procedeu-se à identificação dos géneros e espécie das L3 (Dikmans & Andrews, 1933; McMurtry *et al.*, 2000; van Wyk *et al.*, 2004).

Métode de Willis ou de flutuação

Esta técnica assenta no princípio de que o material parasitário presente nas fezes é menos denso que o fluido com o qual é emulsionado, permitindo assim a sua flutuação no topo do recipiente em que se encontram. Existem diversas substâncias que podem ser usadas como soluções de flutuação, cada uma com as suas vantagens e desvantagens e eficácia variável consoante o material parasitário existente. A solução utilizada, foi a solução saturada de glucose, que se obtém facilmente através da dissolução 200 a 300 g do vulgar açúcar de cozinha em 1 litro de água. Podia também ser utilizada a solução saturada de cloreto de sódio, o vulgar sal de cozinha. Apesar de ambas se encontrarem facilmente disponíveis e serem relativamente baratas, a solução saturada de glucose é preferível por não cristalizar com tanta facilidade, não distorsionar os ovos tão rapidamente e ter ainda a vantagem de ser mais eficaz para a flutuação de ovos de nematodes e cestodes de maior densidade (Zajac & Conboy, 2012). Esta técnica é usada com o objectivo de verificar se existem ou não ovos de nematodes, cestodes ou oocistos, sendo usada quando a finalidade do estudo é apenas efectuar um diagnóstico parasitológico qualitativo. Esta técnica apesar de não ser quantitativa, permite deduzir a intensidade da infecção expressando-se em ligeira ou leve, média, forte ou intensa. Sendo uma técnica qualitativa não é muito relevante a quantidade de fezes que são analisadas nem o volume de solução saturada, no entanto esta foi efectuada em simultâneo com a técnica que será apresentada a seguir aproveitando o seu protocolo (Madeira de Carvalho, 2001) (Anexo 1). Quando eram detectados ovos ou oocistos registava-se a sua presença, e identificavam-se como pertencentes a coccídeas (COC), strongilídeo gastro-intestinal (EGI), céstode ou mista, quando mais de um destes tipos de ovos se encontrava presentes.

Contagem de ovos por grama de fezes (OPG), através do método de McMaster

Esta técnica foi descrita pela primeira vez por Gordon & Whitlock (1939) para contagem de *Estrongilídeos* em ovinos e mais tarde modificada por Roberts & O'Sullivan (1950) para ser aplicada em bovinos. A técnica utilizada foi uma modificação destas duas (Madeira de Carvalho, 2001; Anexo 1). É um método quantitativo que, ao contrário do método anterior, exige a padronização, e assim a quantidade de fezes e o volume de solução saturada são muito importantes, sendo necessário proceder à sua mensuração. Permitem-nos através da seguinte fórmula matemática estimar a quantidade de ovos por grama de fezes (OPG).

$$OPG = N^{\circ} \text{ de ovos na câmara} \times \frac{(\text{volume de sol. saturada} + \text{quantidade de fezes}) / \text{quantidade de fezes}}{\text{volume da câmara}}$$

Teste de Baermann

Esta técnica foi utilizada para o diagnóstico de helmintoses pulmonares através do isolamento da larva L1 (Alho *et al.*, 2013; Anexo 2). A identificação é baseada na presença de características identificativas morfológicas, presença de grânulos de glicogénio no interior do seu aparelho digestivo e a presença de apêndice cefálico, e também comportamentais, movimentos ténues e discretos quando comparados a outros géneros de nematodes e a outros estádios de desenvolvimento (Zajac & Conboy, 2012; RCV/FAO, 2014a).

Esfregaços fecais

Técnica de Ziehl-Neelsen modificado foi descrita pela primeira vez por Henriksen & Pohlenz, (1980), como sendo uma técnica que permite pesquisar oocistos de *Cryptosporidium* spp. A técnica utilizada foi uma modificação da técnica anterior (Madeira de Carvalho *et al.*, 2011) que se baseia no princípio de que os oocistos podem ser corados com fucsina e reter o corante após o procedimento de descoloração com álcool (Anexo 3). A observação dos esfregaços para pesquisa dos oocistos foi efectuada ao microscópio óptico, com ocular de 10x e objectiva de 100x ou imersão. Consideraram-se como oocistos de *Cryptosporidium* spp., todas as estruturas esféricas ou sub-esféricas de cor rosa brilhante e com granulações ou esporozoítos com aspecto semelhante a uma banana no interior, e com dimensões que variaram entre 4,5 – 5,4 µm x 4,17 – 5,0 µm. Cada lâmina foi observada por um período sensivelmente de 15 minutos, nunca se efectuando um varrimento total de cada lâmina.

Sedimentação simples

É também baseada na diferença de densidades que existe entre o líquido de diluição, de densidade média, os elementos parasitários relativamente mais pesados e as partículas alimentares, geralmente mais ligeiras (Madeira de Carvalho, 2001). É uma técnica simples de executar e que exige apenas material rudimentar, mas requer algum tempo para que ocorra sedimentação. É a técnica utilizada para ovos densos e pesados dos tremátodos e também de alguns céstodos, nomeadamente anoplacéfádeos. Esta técnica foi realizada aproveitando o procedimento do Anexo 1 descrito e realizado em conjunto para as outras técnicas, McMaster e Flutuação (Madeira de Carvalho, 2001). Após um período de 12 a 24 horas de repouso e sedimentação, removeu-se o sobrenadante e pipetou-se o sedimento para uma lâmina, corou-se com uma a duas gotas de azul-de-metileno, colocou-se uma lamela e observou-se ao microscópio óptico em ampliação de 100x. Ao microscópio óptico procurou-se identificar ovos de coloração dourada sobre um fundo azul com alguma matéria vegetal.

Sedimentação por McMaster modificado

Este método foi descrito por Conceição *et al.* (2002), a qual modificou o método original (Gonzalez-Lanza, Manga-Gonzalez, Del-Pozo-Carnero & Hidalgo-Argüello, 1989), reduzindo os tempos de sedimentação e adicionando a solução detergente a 5%. Este método (Anexo 4), serve para detecção e contagem de ovos de *Fasciola hepatica* e outros tremátodos em OPG segundo a seguinte fórmula:

$$OPG = N^{\circ} \text{ ovos na câmara de McMaster} \times \frac{\text{volume de solução total/quantidade de fezes}}{\text{volume da câmara}}$$

Coprocultura e identificação das larvas L3

As coproculturas permitem identificar determinados grupos de parasitas cujos ovos são muito semelhantes no momento da postura, nomeadamente os nematodes da Ordem Strongylida, permitindo através da sua eclosão e desenvolvimento das L3 infectantes distinguir as diferentes espécies e géneros com base em características morfológicas e morfométricas da própria larva (Dikmans & Andrews, 1933; McMurtry *et al.*, 2000; van Wyk *et al.*, 2004), tornando este método de grande utilidade para o diagnóstico e que serve como complemento dos métodos anteriores. O tempo de passagem de ovo a L3 é variável consoante o género, no entanto procura-se através da coprocultura simular parâmetros ambientais que permitam a evolução em simultâneo de parasitas mais e menos precoces. A técnica utilizada é apresentada no Anexo 5.

Após a coprocultura e recolha das larvas L3, foi possível a identificação do género e por vezes até da espécie, com base em diversos trabalhos (Dikmans & Andrews, 1933; McMurtry *et al.*, 2000; van Wyk *et al.*, 2004) e da chave-dicotómica do Royal College of Veterinary Surgeons/Food and Agriculture Organization (RCV/FAO, 2014b) apresentada no Anexo 6.

Inquérito aos produtores

Foram realizados inquéritos aos produtores (Anexo 7) para obter mais informações sobre o manejo dos animais e mais facilmente interpretar os resultados das análises efectuadas.

Análise estatística

A estatística descritiva foi efectuada através do programa Microsoft Excel 2010[®].

Na análise estatística e para melhor interpretar os resultados foram calculadas pelo método de regressão logística as probabilidades das amostras terem ovos nos resultados dos testes de McMaster, de flutuação/Willis e na combinação de ambos os testes. Tendo sido atribuída uma variável binária com dois valores possíveis (presença de ovos “1” ou ausência de ovos “0”) aos resultados. Tendo sido utilizado o programa SAS[®] (Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC) Proc mixed para a obtenção destes resultados.

4.3-Resultados

Os resultados serão apresentados de acordo com a técnica efectuada e posteriormente em função das principais variáveis analisadas. Dentro de cada técnica tentar-se-á estabelecer relações e fazer diferenciações entre os diferentes tipos de animais e manejo da exploração de onde era proveniente a amostra analisada tendo sempre em consideração a informação que foi possível obter nas explorações junto dos produtores e através dos inquéritos.

4.3.1-Estatística descritiva

McMaster

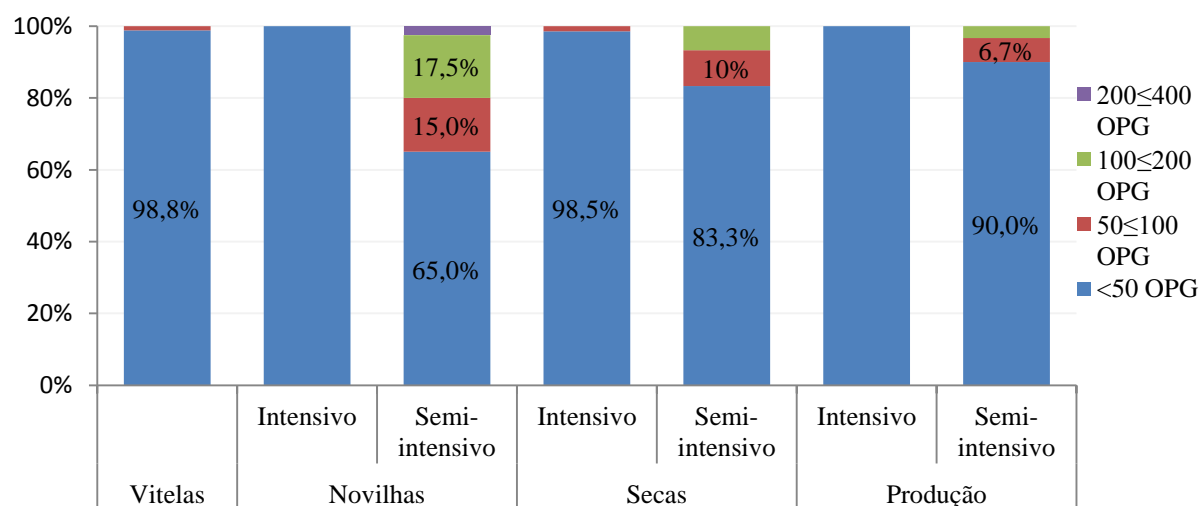
As contagens de OPG de fezes de parasitas Estrongilídeos gastrointestinais (EGIs) nos animais de explorações com manejo “Intensivo” foram inferiores aos animais de manejo “Semi-intensivo” (Tabela 8, Gráfico 1). Nos animais em explorações em regime “Semi-intensivo” os resultados variaram consoante a fase produtiva, “Novilhas”, “Secas” e “Produção”; tendo as contagens de OPG nas fezes dos animais em “regime semi-intensivo” sido mais elevadas nas “Novilhas”, intermédias nas vacas “Secas” e menores nas vacas em “Produção”. Os “Vitelos” apesar de serem filhos de vacas de manejo diferenciado, em

“Intensivo” e “Semi-intensivo”, possuem igual manejo, e foram contabilizados todos no mesmo grupo; apresentando também contagens baixas de OPG nas fezes, com valores semelhantes aos das “Novilhas”, vacas “Secas” e em “Lactação” de manejo “Intensivo”.

Tabela 8- Frequências absolutas do método de McMaster para contagem de EGIs.

Exploração/ animais	<50 OPG		50≤100 OPG		100≤200 OPG		200≤400 OPG		Total	
	Intensivo	Semi-intensivo	Intensivo	Semi-intensivo	Intensivo	Semi-intensivo	Intensivo	Semi-intensivo	Intensivo	Semi-intensivo
Vitelas	81		1		0		0		82	
Novilhas	60	26	0	6	0	7	0	1	60	40
Secas	66	25	1	3	0	2	0	0	67	30
Lactação	71	27	0	2	0	1	0	0	71	30
Total	356		13		10		1		380	

Gráfico 1- Distribuição relativa dos valores de EGIs da técnica de McMaster por cada grupo de animais.



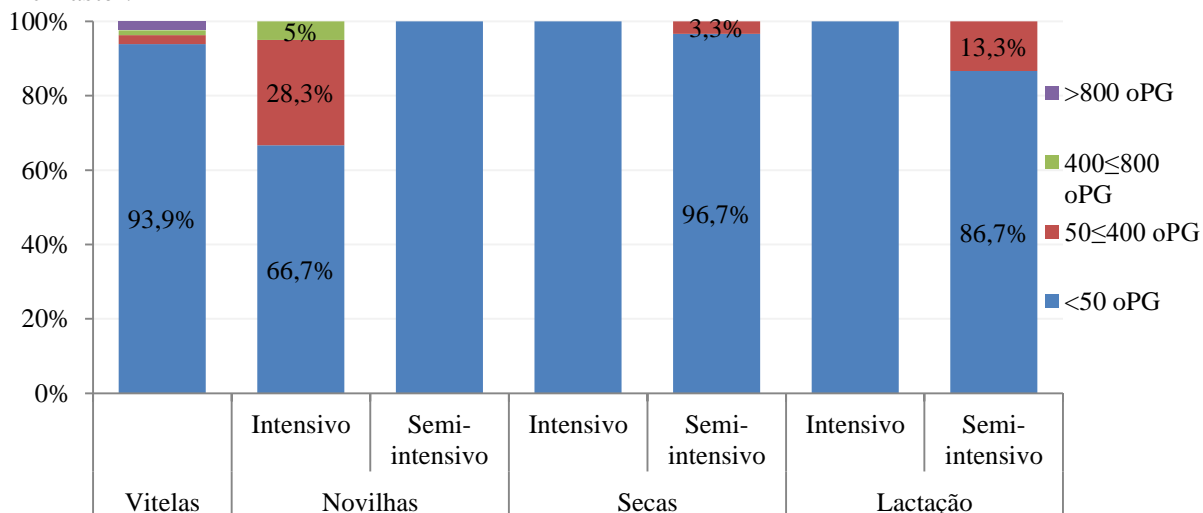
Os casos com contagens de oocistos por grama de fezes (oPG) mais elevados, ocorreram em “Vitelas” (Tabela 9, Gráfico 2). No entanto, foi nas “Novilhas” de manejo “Intensivo” que existiu mais frequentemente a presença de oPG de fezes, apesar de nestes casos as contagens não serem tão elevadas como nos casos anteriores.

Em relação ao regime “Semi-intensivo”, as contagens de oPG de fezes foram baixas nas “Novilhas” e nas vacas “Secas”, existindo no entanto algumas vacas em “Lactação” com contagens de oPG intermédias.

Tabela 9- Frequências absolutas do método de McMaster para contagem de coccídeas de *Eimeria* spp.

Exploração/ animais	<50 oPG		50≤400 oPG		400≤800 oPG		>800 oPG		Total	
	Intensivo	Semi-intensivo	Intensivo	Semi-intensivo	Intensivo	Semi-intensivo	Intensivo	Semi-intensivo	Intensivo	Semi-intensivo
Vitelas	77		2		1		2		82	
Novilhas	40	40	17	0	3	0	0	0	60	40
Secas	68	29	0	1	0	0	0	0	67	30
Lactação	71	26	0	4	0	0	0	0	71	30
Total	351		23		4		2		380	

Gráfico 2- Distribuição relativa dos valores de oocistos de Coccídeas obtidos através da técnica de McMaster.



Método de Willis ou de flutuação

O teste de Willis apresentou resultados muito variáveis entre os diferentes tipos de manejo “Intensivo” e “Semi-intensivo”, e entre os diferentes grupos de animais “Vitelas”, “Novilhas”, vacas “Secas” e vacas em “Lactação” (Tabela 10).

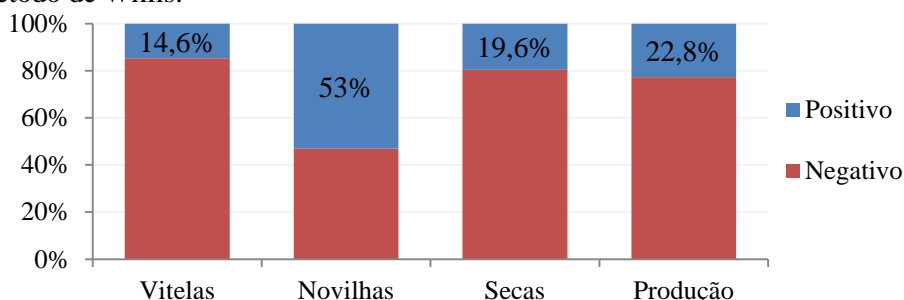
Tabela 10- Frequências absoluta dos resultados do método de Willis ou flutuação.

Tipo de exploração:	Negativa		Positiva		Total		EGI		Coccídea		Cestodes		Mista	
	Int.	Semi-intensivo	Int.	Semi-intensivo	Int.	Semi-intensivo	Int.	Semi-intensivo	Int.	Semi-intensivo	Int.	Semi-intensivo	Int.	Semi-intensivo
Vitelas	70		12		82		2		10		0		0	
Novilhas	33	14	27	26	60	40	4	25	24	2	0	0	1	1
Secas	61	17	6	13	67	30	3	11	3	3	0	0	0	1
Lactação	65	13	6	17	71	30	0	13	4	5	2	2	0	3
Total	273		107		380		58		51		4		6	

Apenas pouco mais de um quarto (28,2%) das amostras submetidas ao teste de Willis apresentaram ovos ou oocistos.

Em relação à presença de ovos e de oocistos, “Positivos”, em cada grupo de animais da mesma fase produtiva (Gráfico 3), esta foi notoriamente mais evidente nas “Novilhas”, seguida das vacas em “Lactação”, das “Secas” e por último das “Vitelas”.

Gráfico 3-Freqüência relativa de infecção parasitária entre os diferentes grupos de animais detectada através do método de Willis.



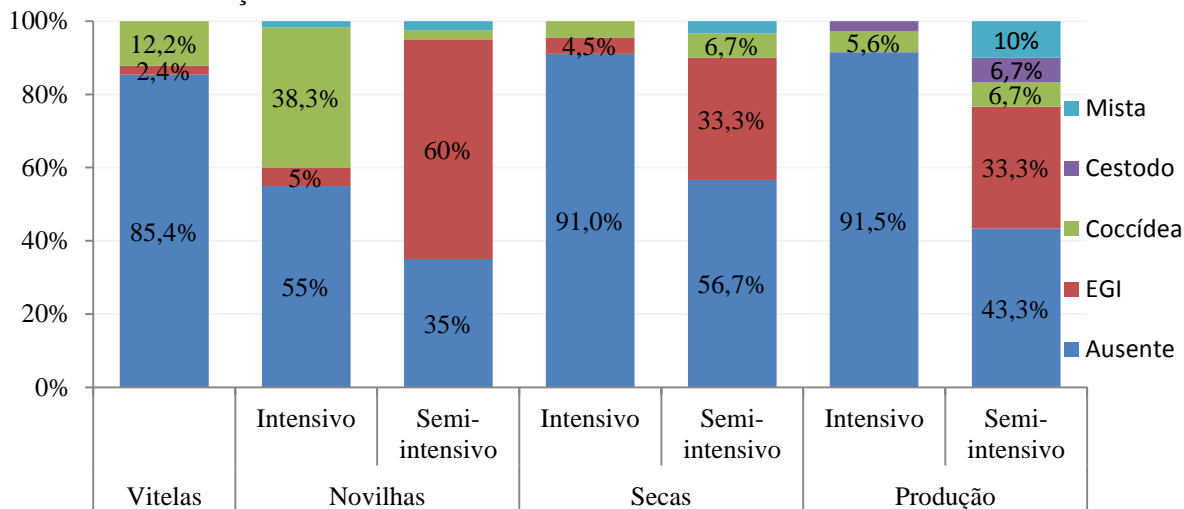
Foram detectados ovos de “cestodos” (Figura 1A), “EGI” (Figuras 1B e 1C), e oocistos de “coccídeas” e em determinadas ocasiões foi demonstrada infecção “mista” com oocistos e ovos de “EGI”.

Figura 1- Exemplos de ovos detectados através da técnica de Willis.. (Fotografias originais). A- *Moniezia benedeni* (Ampliação de 200x), B- EGI (Ampliação 100x), C- EGI (Ampliação de 200x)



A distribuição relativa dos testes de Willis foi muito variável. Através do (Gráfico 4) pode-se constatar que 12,2% das amostras correspondentes às “Vitelas” e 38,3% das amostras correspondentes às “Novilhas” de manejo “Intensivo” apresentaram coccídeas. As amostras correspondentes aos animais de manejo “Semi-intensivo”; “Novilhas”, “Secas” e vacas em “Lactação”; apresentaram uma elevada percentagem de ovos de EGI, principalmente as correspondentes às “Novilhas” com 60% destes ovos.

Gráfico 4- Distribuição relativa dos testes de Willis.



Técnica de Baermann

Não houve qualquer resultado positivo na realização desta técnica.

Sedimentação simples

Nesta técnica não foi detectado qualquer resultado positivo.

McMaster modificado

Os seis pools de amostras efectuados para pesquisa de ovos de trematodos apresentaram resultados variados (Tabela 11). Apenas numa das vacarias foram detectados ovos de *Paramphistomum* sp. (Figura 2), quer em vacas “Secas”, quer em vacas em “Lactação”. Os ovos detectados tinham um eixo maior médio de 132,5 μm e um eixo menor de 72,5 μm

Tabela 11-Frequência relativa dos resultados do teste de McMaster modificado em *pools* de dez amostras de duas vacarias em regime semi-intensivo.

Semi-intensivo	Novilhas	Secas	Lactação
Exploração A	0 OPG	21 OPG	29 OPG
Exploração B	0 OPG	0 OPG	0 OPG

Figura 2- Ovo de *Paramphistomum* sp. detectado através do método de McMaster Modificado. (Ampliação de 200x. Fotografia original).



Coprocultura

Apenas em 15% das coproculturas realizadas foi possível detectar larvas e proceder posteriormente à sua identificação. As larvas mais frequentemente detectadas neste teste (Gráfico 5), foram as pertencentes ao género *Ostertagia* (Figura 3A) correspondendo a 56,1% de todas as larvas recuperadas e identificadas, seguidas do género *Cooperia* (Figuras 3C e 3D) (28,3%), *Trichostrongylus* (Figura 3E) (11,8%), *Haemonchus* (Figura 3B) e *Oesophagostomum/Chabertia* com igual percentagem (1,7%) e por último o género *Strongyloides* (0,4%).

Gráfico 5- Frequência absoluta dos gêneros de larvas detectados e identificados em todas as coproculturas.

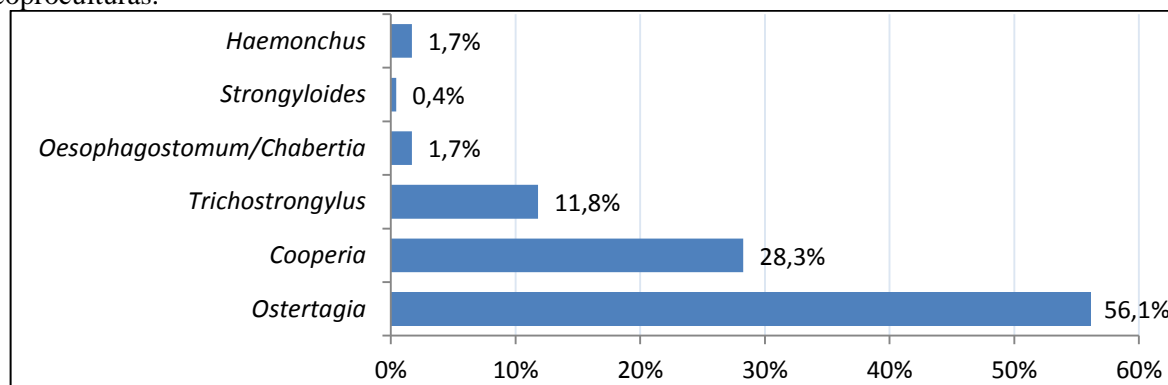
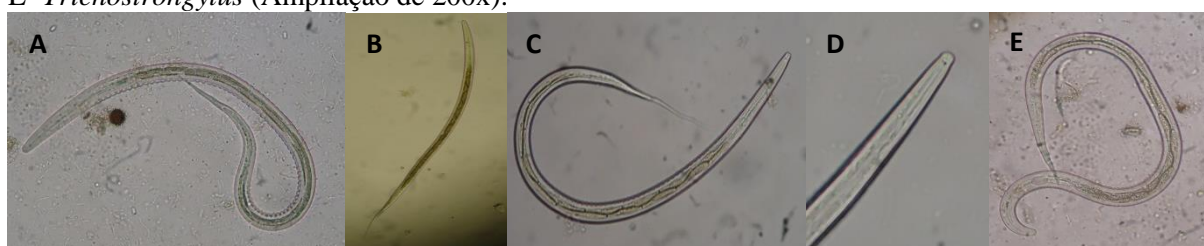


Figura 3- Larvas no estágio L3 detectadas após coprocultura. (Fotografias Originais) A- *Ostertagia* (Ampliação de 200x), B- *Haemonchus* (Ampliação de 100x), C e D- *Cooperia* (Ampliação de 200x), E- *Trichostrongylus* (Ampliação de 200x).



Esfregaços fecais

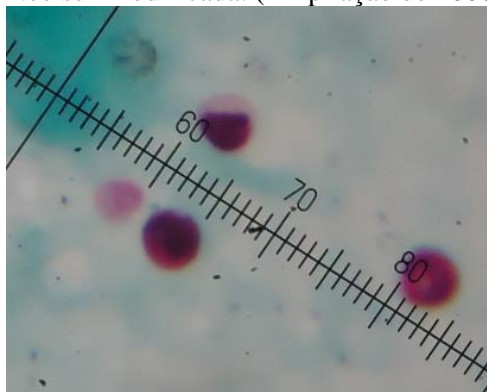
A presença de *Cryptosporidium* spp. (Positivo) (Figura 3) ou a sua ausência (Negativo) foi variável entre as amostras das diferentes vacarias (Tabela 12), tendo sido observadas 35 amostras positivas e 50 amostras negativas.

Tabela 12- Frequências absolutas dos resultados dos esfregaços fecais.

Vacarias	Positivo	Negativo	Total
1	0	5	5
2	6	4	10
3	2	8	10
4	2	3	5
5	3	7	10
6	5	2	7
7	7	3	10
8	3	4	7
9	3	7	10
10	4	4	8
Total	35	47	82

Em relação à frequência relativa, 42,68% das amostras pesquisadas para *Cryptosporidium* sp. foram positivas.

Figura 3- Oocistos de *Cryptosporidium* sp. detectados em esfregaço fecal corado pela técnica de Ziehl Neelsen modificada. (Ampliação de 1000x). (Fotografia original).



Tratamento

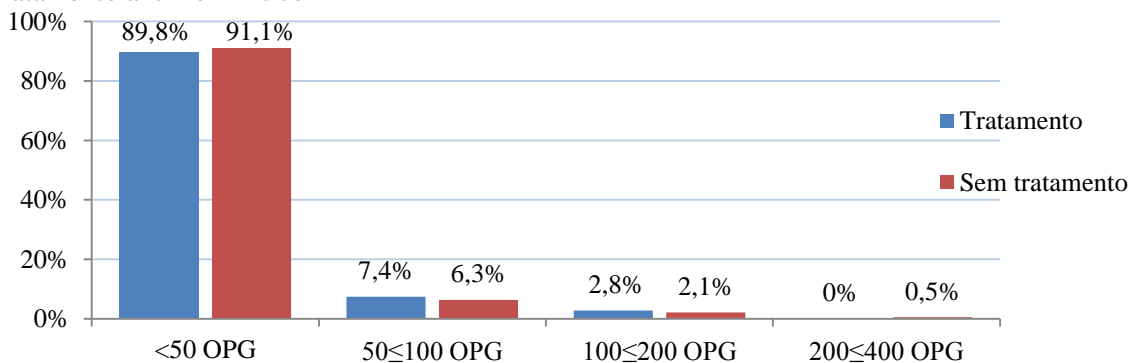
De acordo com os inquéritos, apenas 108 animais foram desparasitados, dos quais 53 foram animais provenientes de explorações de manejo intensivo e 45 de explorações com manejo semi-intensivo. Os anti-helmínticos administrados variaram na molécula e na altura em que foram administrados (Tabela 13).

Tabela 13- Anti-helmínticos administrados aos animais.

Fase produtiva	ivermectina e clorsulon (Alverin plus [®])	ivermectina e clorsulon (Closamectin I [®])	ivermectina (Ivomec [®])	ivermectina (Noramectin [®])	ivermectina (Noromectin [®])	Total
Novilhas	0	0	10	10	10	30
Dias desde o tratamento				31	>180	
Lactação	9	10	0	12	10	41
Dias desde o tratamento	263(+/-125,23)	>300		193,33(+/-94,13)	>120	
Secas	6	10	0	11	10	37
Dias desde tratamento	36,5(+/-28,9)	>300		15,7(+/-12,5)	<60	
Total	15	20	10	33	30	108

Associando a informação relativa dos animais tratados aos resultados do teste de McMaster, constatamos que ao nível da frequência relativa existem poucas diferenças entre animais tratados e não tratados (Gráfico 6).

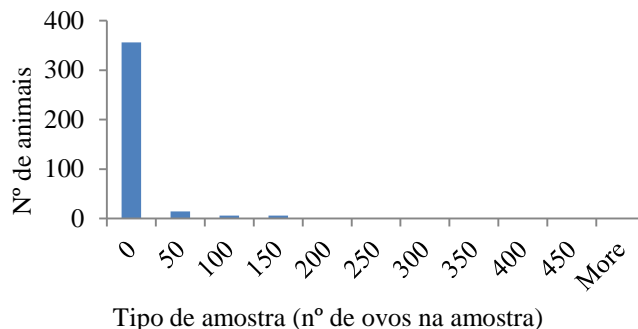
Gráfico 6- Frequência relativa dos resultados do teste de McMaster em animais tratados e sem tratamento anti-helmíntico



4.3.2- Análise estatística

A distribuição dos resultados dos testes quantitativos (McMaster) nas amostras apresentaram muitos “zeros” (<50 OPG) pelo que a distribuição dos resultados é não normal (*skewed*) e desta forma apresentam limitações para se analisarem discriminativamente (Gráfico 7).

Gráfico 7- Distribuição dos resultados de McMaster nas amostras analisadas



As probabilidades dos animais possuírem OPG de EGI em cada um dos testes efectuados ou num dos testes, foram calculadas para as diferentes variáveis: “tratamento” (Tabela 14), “tipo de exploração” (Tabela 15) e “fase produtiva” (Tabela 16) de forma única e “tratamento” e “tipo de exploração” combinadas (Tabela 17). Os resultados demonstram que geralmente é mais provável encontrar OPG de EGI através do método de Willis do que pelo método de McMaster, mas a combinação dos dois métodos pode aumentar a probabilidade de se detectar OPG na mesma amostra (Tabelas 14,15,16 e 17). Em relação ao tipo de exploração (Tabela 14, Gráfico 8), as probabilidades de detectar OPG são maiores nas explorações de manejo “semi-intensivo”, e por cada dois animais amostrados é provável conseguir-se detectar OPG. Em oposição é muito pouco provável detectar ovos nos animais em regime “intensivo” independentemente da dimensão da amostra.

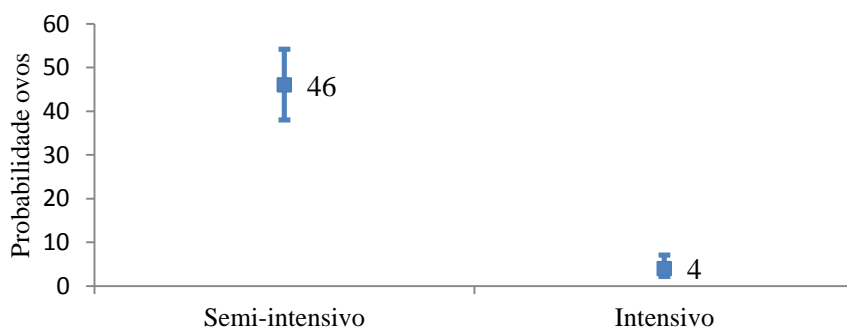
Tabela 14- Valores das probabilidades de detecção (e respectivos IC de 90%) de ovos de EGI em função do tipo de exploração nos testes de flutuação, de McMaster e em ambos.

Variável	Probabilidade de detectar ovos de EGI com McMaster		Probabilidade de detectar ovos de EGI com flutuação		Probabilidade de detectar ovos de EGI em pelo menos um dos métodos	
	Probabilidade	Intervalo de confiança 90%	Probabilidade	Intervalo de confiança 90%	Probabilidade	Intervalo de confiança 90%
Nada ¹	1.2	0.22-5.9	2.4	0.7-7.3	3.5	1.4-8.8
Semi-intensivo	24.0	17.7-31.7	46.0	38.0-54.2	49.0	10.9-57.2
Intensivo	1.0	0.3-3.2	4.0	2.2-7.1	4.5	2.6-7.7

¹ Maneio indiferenciado nos vitelos.

* Valores com diferenças entre as variáveis (verde).

Gráfico 8- Probabilidade de detectar ovos de EGI através do método de flutuação, segundo o tipo de exploração



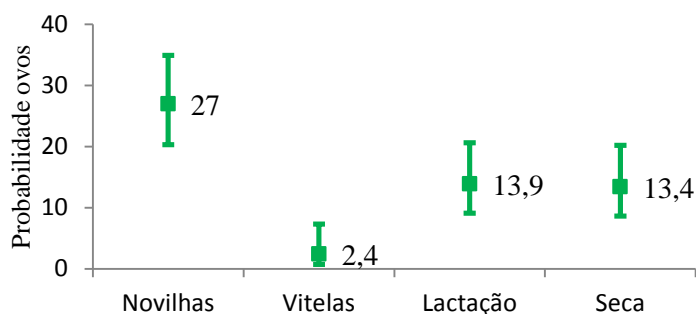
No que se refere à variável fase produtiva (Tabela 16, Gráfico 9), os “Vitelos” são o grupo que apresenta menor probabilidade de eliminar OPG, em seguida as vacas “secas” e as vacas em “produção” com semelhantes valores de probabilidade de apresentarem OPG, por último as “Novilhas” são o grupo que apresentam a maior probabilidade de encontrar OPG.

Tabela 15- Valores das probabilidades de detecção (e respectivos IC de 90%) de ovos de EGI em função da fase produtiva nos testes de flutuação, de McMaster e em ambos.

Variável	Probabilidade de detectar ovos de EGI com McMaster		Probabilidade de detectar ovos de EGI com flutuação		Probabilidade de detectar ovos de EGI em pelo menos um dos métodos	
	Probabilidade	Intervalo de confiança 90%	Probabilidade	Intervalo de confiança 90%	Probabilidade	Intervalo de confiança 90%
Novilhas	15.0	10.0-21.9	27.0	20.3-34.9	27.0	20.3-34.9
Vitelas	0.2	0.2-5.9	2.4	0.7-7.3	3.5	1.4-8.8
Lactação	5.0	2.4-10.0	13.9	9.1-20.6	15.8	10.7-22.8
Secas	6.2	3.2-11.7	13.4	8.6-20.2	15.5	10.3-22.5

*Valores com diferenças entre as variáveis (verde).

Gráfico 9- Probabilidade de detectar ovos de EGI pelo método de flutuação, segundo a fase produtiva dos animais

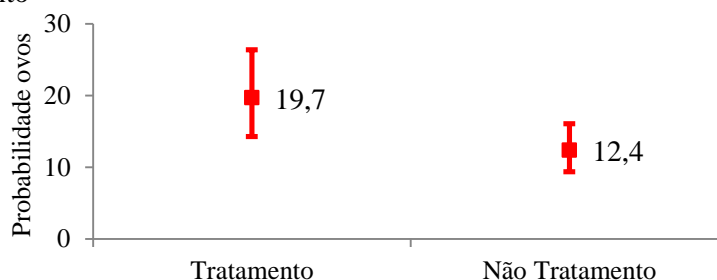


Em relação à variável tratamento analisada individualmente (Tabela 14, Gráfico 10) não influencia a probabilidade de detectar OPG nas amostras analisadas no geral.

Tabela 16- Valores das probabilidades de detecção (e respectivos IC de 90%) de ovos de EGI em função do tratamento nos testes de flutuação, de McMaster e em ambos

Variável	Probabilidade de detectar ovos de EGI com McMaster		Probabilidade de detectar ovos de EGI com flutuação		Probabilidade de detectar ovos de EGI em pelo menos um dos métodos	
	Probabilidade	Intervalo de confiança 90%	Probabilidade	Intervalo de confiança 90%	Probabilidade	Intervalo de confiança 90%
Sim	7.7	4.5-12.9	19.7	14.3-26.4	21.4	15.8-28.3
Não	6.8	4.6-9.8	12.4	9.4-16.1	13.6	10.4-17.4

Gráfico 10- Probabilidade de detectar ovos de EGI no método de flutuação, segundo a presença e a ausência de tratamento



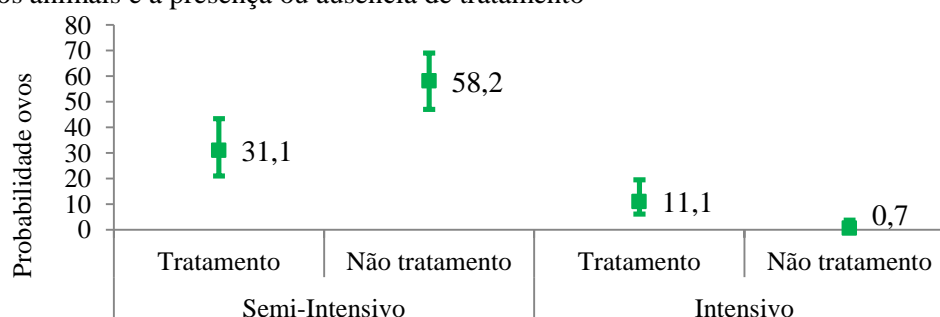
Em relação às variáveis tratamento e tipo de exploração quando combinadas existem diferenças entre elas (Tabela 17). Confirmando uma vez mais que os animais em semi-intensivo têm maior probabilidade de apresentar ovos e que nestes casos o tratamento interfere negativamente nestes valores. Ao contrário, no manejo semi-intensivo o tratamento tem um efeito positivo nas contagens de ovos (Gráfico 11).

Tabela 17- Valores das probabilidades de detecção (e respectivos IC de 90%) de ovos de EGI em função das variáveis tratamento e tipo de exploração nos testes de flutuação, de McMaster e em ambos.

Variáveis		Probabilidade de detectar ovos de EGI com McMaster		Probabilidade de detectar ovos de EGI com flutuação		Probabilidade de detectar ovos de EGI em pelo menos um dos métodos	
Tratamento	Tipo de exploração	Probabilidade	Intervalo de confiança 90%	Probabilidade	Intervalo de confiança 90%	Probabilidade	Intervalo de confiança 90%
Sim	Semi-intensivo	17.8	10.2-29.1	31.1	21.0-43.4	60.0	48.8-70.2
Não	Semi-intensivo	29.1	20.1-40.1	58.2	47.0-69.0	35.5	24.8-48.0
Sim	Intensivo	1.6	0.3-7.8	11.1	6.1-19.5	11.1	6.1-19.5
Não	Intensivo	0.7	0.1-3.8	0.7	0.1-3.8	1.5	0.5-4.6

*Valores com diferenças entre as variáveis (verde).

Gráfico 11- Probabilidade de detectar ovos de EGI através do método de flutuação, segundo a fase produtiva dos animais e a presença ou ausência de tratamento



4.5-Discussão

4.5.1-McMaster

Os resultados diferentes entre os animais em “semi-intensivo” e “intensivo” vêm comprovar a necessidade de existência de pastoreio para que o ciclo não parasitário dos EGI no meio ambiente possa ocorrer, e posteriormente, dar-se a infecção do animal por ingestão de L3 infectantes com a pastagem contaminada.

Relativamente aos “vitelos”, as contagens de OPG foram reduzidas em todos os animais porque a maioria (64,6%) tinha idade inferior ao período pré-patente médio das infecções por nematodes EGI (geralmente 3 semanas), exceptuando o género *Nematodirus*, e o género *Strongyloides* normalmente de uma e duas semanas respectivamente (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2007). Nos animais com idade superior à média dos períodos pré-patentes dos parasitas, a ausência de OPG detectáveis pode justificar-se pelas práticas de manejo que não favoreceram o desenvolvimento deste tipo de parasitas (alojados em *hutches* individualmente nas primeiras semanas e posteriormente em parques de pequena densidade animal sem qualquer acesso a áreas de pasto) ou porque nas infecções primárias os problemas são provocados por fases parasitárias imaturas que não atingiram ainda a maturidade sexual (Mañes & Vázquez, 2013). Em relação às restantes fases produtivas de regime “semi-intensivo” os resultados estão de acordo com o descrito na bibliografia: animais mais jovens são mais susceptíveis à infecção por EGI e à medida que vão contactando com o parasita os animais vão-se tornando mais resistentes reflectindo-se numa menor eliminação de OPG em vacas secas e em lactação quando comparadas com novilhas.

Em relação à técnica executada, é importante não esquecer a reduzida sensibilidade do teste e apesar dos resultados estarem de acordo com a bibliografia descrita, devem ser analisados de forma prudente, constituindo sempre uma aproximação da carga parasitária do animal. Existe ainda a possibilidade dos parasitas adultos serem apenas do sexo masculino, as larvas no interior do hospedeiro estarem em hipobiose ou enquistadas ou as formas parasitárias presentes serem ainda imaturas sexualmente (Mañes & Vázquez, 2013). Isso torna possível a existência de parasitas no interior do animal que não eliminam ovos e o valor de OPG detectado nas fezes corresponder a um valor subestimado da verdadeira carga parasitária do animal. Num estudo realizado em bovinos leiteiros em lactação sem acesso à pastagem (Glenn *et al.*, 1982) constatou-se que os resultados médios foram 2 OPG de fezes, que são resultados que nos indicam que seria necessário aumentar mais de 20 vezes o limite de detecção para detectar pelo menos um OPG e assim ser possível explicar os resultados com “<50 OPG” nos animais em regime “intensivo” e nos “vitelos”.

De acordo com os resultados existem apenas 6,3% de animais com OPG de fezes detectados no exame de McMaster, havendo então uma grande quantidade de animais em que a infecção não existe ou não foi detectada, por razões relacionadas com a sensibilidade da técnica ou pelos motivos explicados anteriormente. Além disso, e principalmente nas vacas em lactação e secas, os OPG podem estar diluídos no grande volume de fezes que estes animais constantemente eliminam e porque somente uma pequena porção (4g) de fezes é objecto de análise podem não ser detectados. No estudo de Perri *et al.* (2011) realizado na Argentina em animais em produção em regime de semi-intensivo com um limite de detecção cinco vezes superior ao do presente estudo, apenas 25% dos animais apresentaram infecção, com uma prevalência maior nos animais com maiores produções, demonstrando uma vez mais para a dificuldade de se detectar OPG nas fezes dos animais menos susceptíveis à infecção (regime intensivo). Sabe-se também, que *Ostertagia ostertagi* e outros strongilídeos gastrointestinais têm a capacidade de entrar em hipobiose, o que pode interferir nas contagens de OPG de fezes uma vez que nestas circunstâncias as larvas podem estar presentes no interior dos indivíduos sem evidência externa de elevadas contagens de ovos fecais (Gibbs, 1982).

Assim, conclui-se que o método de McMaster com limite de detecção de 50 OPG pode falhar frequentemente na detecção de contagens baixas e o valor de OPG não pode ser estimado (Levecke, De Wilde, Vandenhoute & Vercruysse, 2009). Neste sentido se as técnicas utilizadas possuíssem um maior limite de detecção, o método McMaster com um limite de detecção de 25 ou 33 OPG, FECPAK com um limite de detecção de 10 OPG (Demeler *et al.*, 2009) ou o FLOTAC com limite de detecção de 1 a 2 OPG (Cringoli, 2004), talvez a interpretação dos mesmos fosse um pouco diferente e mais facilmente se conseguiria aproximar do verdadeiro valor de OPG e conseqüentemente melhor seria a estimativa da infecção parasitária em cada animal.

No caso dos animais de regime “semi-intensivo” os resultados em determinadas situações com valores de OPG ≥ 50 evidenciam a importância do pastoreio, para que o ciclo parasitário ocorra e torne os animais mais susceptíveis à infecção parasitária.

Segundo Perri *et al.*, 2011 a contagem de OPG nas fezes de nematodes próximo do parto pode ser uma ferramenta muito útil para detectar os animais que devem ser tratados com anti-helmínticos com o objectivo de melhorar a produção leiteira. No presente estudo também se tentou investigar esta hipótese através dos animais nesta situação fisiológica (“secas”) quer em regime semi-intensivo como em regime intensivo. No entanto não foram detectadas quaisquer diferenças no número de OPG neste período comparando com os outros, embora também não se tenha estudado o mesmo animal em fazes produtivas distintas. A bibliografia contudo, defende que o aumento do número de OPG neste período pré-parto (*peri parturient*

rise, PPR) se deve às fortes alterações endócrinas que ocorrem neste período e que diminuem a imunidade do animal (Barger, 1993; Sordillo, Contreras & Aitken, 2009), permitindo aos parasitas proliferarem. Aqui provavelmente a utilização de uma outra técnica, por exemplo uma das apresentadas anteriormente, pudesse ser útil para testar esta hipótese, no entanto o trabalho Perri *et al.*, 2011 confirma a existência do PPR, mas não revela qual aumento médio de OPG neste período.

Existem outros factores além dos apresentados (pastoreio e fisiologia no pré-parto) que podem também ser responsáveis pelo aumento do valor de OPG nas fezes, relacionados com o próprio parasita ou com imunidade do hospedeiro, podendo de acordo com Mañes & Vázquez (2013), existir desinibição larvar com conseqüente maturação sexual em condições favoráveis ao parasita. Além da interpretação da condições do hospedeiro, é conveniente aliar os resultados deste teste aos resultados da coprocultura e interpretar ambos os testes em conjunto, pois a carga parasitária maior ou menor e os efeitos patogénicos dependem do género parasitário e do seu potencial biótico.

4.5.2-McMaster-Coccidiose (*Eimeria*)

No presente estudo através deste método a prevalência de oocistos nos animais amostrados foi de 7,6%. Este valor foi inferior à prevalência (10%) do estudo realizado em vitelos portugueses entre os 2 e os 50 dias de idade (Gomes, 2008) e às de um estudo na Holanda (16% vitelos, 43% novilhas e 16% vacas adultas) (Cornelissen *et al.*, 1995). No entanto, as prevalências estão dependentes da técnica utilizada e da própria sensibilidade da mesma, de factores de manejo de cada exploração (higiene, alimentação e densidade animal) e características próprias dos animais (aquisição de imunidade); por estas razões a comparação entre as prevalências destes estudos de forma superficial fornece muito pouca informação.

As contagens de oocistos nos animais não foram muito elevadas, com uma média de 263 (+/- 471) oPG de fezes entre os animais em que se detectou o parasita, talvez por as condições de manejo e as instalações não favorecerem a permanência dos oocistos no ambiente das explorações e conseqüentemente a posterior infecção dos animais. Os “vitelos” apesar de constituírem o grupo com maior predisposição para a infecção e para a presença de doença clínica (Taylor & Catchpole, 1994), não foi o grupo que apresentou as prevalências de infecção mais elevadas. Contudo, tal como no estudo de (Cornelissen *et al.*, 1995) estes animais apresentaram as contagens de oPG mais elevadas (um caso com 1350 e outro com 2250 oPG), aparentemente estes resultados pertenciam a vitelos com <21 dias de idade e com cerca 2,5 meses. A justificação para estes dois resultados parece ser distinta. No caso do vitelo mais novo pode ser por falta de imunidade: ao ter existido uma falha na transferência da

imunidade passiva, que segundo Stilwell (2013) se encontram dentro do período conferido pela imunidade colostrina e apesar de se saber que a imunidade humoral desempenha apenas um papel secundário na infecção por coccídeos, foi defendido que as células CD4⁺ e outras células linfóides importantes na imunidade celular podem ser transferidas através do colostro aos vitelos (Fiege, Klatte, Kollmann, Zahner & Bürger, 1992; Faber *et al.*, 2002) uma vez que segundo os mesmos autores a imunidade celular é essencial para impedir a infecção, inclusive na infecção primária e as imunoglobulinas colostrinas actuam de forma secundária. No caso do vitelo mais velho a razão para uma quantidade de oocistos tão elevada pode estar, segundo Joachim (2002) citado em (Dauguschies & Najdrowski, 2005), relacionada com uma quebra de imunidade por *stress*, por exemplo devido ao desmame ou a existência de outras infecções concomitantes (Bohrmann, 1991) que faz com que o ciclo das coccídias prossiga desencadeando a eliminação de oocistos. Contudo estes são casos pontuais e a razão para a baixa prevalência de infecção nos “vitelos” justifica-se pela correcta transferência de imunidade passiva através do colostro, pois vemos que 64,6% (n=53) destes animais se encontram no período abrangido pela imunidade colostrina (3 semanas). Segundo Cornelissen *et al.* (1995), o manejo praticado na criação dos vitelos pode ser a razão principal para estes resultados. As condições de alojamento individual nas primeiras semanas de vida e posteriormente em parques em grupos nunca muito numerosos, com padrões de higiene elevados que incluem a mudança frequente das camas, reduzem desta forma a ingestão de grande quantidade de oocistos e também a intensidade das infecções uma vez que estão directamente relacionadas com o número de oocistos existentes no ambiente e que são ingeridos pelos animais. Além disso uma reduzida infecção por oocistos induz imunidade (Cornelissen *et al.*, 1995). De acordo com este raciocínio podiam ter sido analisados outros factores de risco para a ocorrência da infecção. No entanto, como eram poucos casos, estas relações não foram alvo de estudo, apesar de existirem estudos que comprovam a relação entre a intensidade de infecção e a dimensão do grupo (Klockiewicz *et al.*, 2007; Lassen, Viltrop & Jarvis, 2009) e de se saber que a adopção de medidas de higiene apropriadas são desfavoráveis à sobrevivência de oocistos no ambiente sendo muito importante na redução da pressão de infecção no grupo (Dauguschies & Najdrowski, 2005).

Em relação ao grupo “Novilhas” foi o que apresentou maior prevalência, principalmente em explorações de manejo “intensivo”. Cornelissen *et al.* (1995) documentam elevadas prevalências neste grupo, contudo a sensibilidade da técnica utilizada no referido estudo foi de 10 oPG com uma eliminação média de 20 oPG entre estes animais, o que comparando com a prevalência de infecção de 20% no presente estudo e a menor sensibilidade do método significa que podem existir muitos casos subdiagnosticados. Apesar das contagens oPG entre

as “Novilhas” terem sido relativamente moderadas, na nossa opinião deve-se ter especial atenção às explorações onde a prevalência de infecção nestes animais foi maior uma vez que de acordo com a fisiopatologia da doença podem estar fortemente relacionadas com situações de manejo deficientes que podem facilmente ser alteradas. O autor notou que as “Novilhas” por não possuírem uma rotina diária de manejo constituíam o grupo mais nervoso e sabe-se que o *stress* pode ser um factor predisponente da doença em animais de diferentes idades (Fitzgerald, 1967), crê-se poder ser uma possível justificação para os resultados neste grupo de animais. Mesmo não tendo sido avaliados quaisquer parâmetros de *stress*, a prevalência mais alta deste parasita coincidiu com as explorações onde a colheita de amostras foi marcadamente mais complicada.

Os casos de infecção em regime “semi-intensivo” quatro casos em animais em “lactação” e um caso em vacas “secas” reflectem que a imunidade adquirida através do contacto com este parasita é possível mas não é absoluta e inclusive os animais mais velhos podem eliminar oocistos (Daugschies & Najdrowski, 2005), estando os resultados do presente estudo de acordo com os de Cornelissen *et al.* (1995), ao demonstrarem ambos a possibilidade de eliminação de oocistos em vacas de forma ligeira a moderada.

Uma limitação do estudo prende-se com a não detecção de sinais clínicos de coccidiose e das espécies que estavam presentes nos animais que eliminaram oocistos. Segundo Daugschies & Najdrowski (2005) o diagnóstico clínico de coccidiose é confirmado pela presença de sinais clínicos e de oocistos de espécies patogénicas, porque apenas o número de oocistos eliminados não reflecte o grau de doença clínica, sendo possível que animais saudáveis eliminem oocistos (espécies não patogénicas) e também o oposto, existirem animais que apresentem sinais clínicos de doença mas pelo facto da eliminação de oocistos ser transitória ou se encontrar ainda no período pré-patente não serem detectados oocistos no momento do teste coprológico (Holst & Svensson, 1994; Matjila & Penzhorn, 2002; Mañes & Vázquez, 2013). No entanto, quando o diagnóstico quantitativo é ≥ 5000 oPG a diferenciação dos oocistos não é necessário para confirmar o diagnóstico da doença.

Assim, o controlo desta doença e a baixa prevalência de infecção estão relacionadas sobretudo com aquisição de imunidade por exposição continuada aos oocistos (Daugschies & Najdrowski, 2005), e por práticas de manejo e higiene adequadas, que assegurem por um lado uma pressão de infecção equilibrada o suficiente para gerar a imunidade capaz de prevenir infecções e doenças subsequentes (Conlogue, Foreyt & Wescott, 1984) e por outro não excessivamente elevada que consiga quebrar a imunidade adquirida (Fitzgerald, 1967; Fiege *et al.*, 1992; Hooshmand-Rad, Svensson & Ugglå, 1994).

4.5.3-Willis ou Flutuação

Entre os dois testes McMaster e de Willis, para a detecção de EGI e Coc, existe uma correlação grande de 0.57 (Hopkins, Marshall, Batterham & Hanin, 2009). Assim os resultados para pesquisa de EGI e de COC através deste método são muito semelhantes aos revelados e analisados no teste de McMaster. Desta forma, não será efetuada uma análise à detecção destes ovos e oocistos através deste método, aproveitando-se no entanto para avaliar a técnica em si e somente os resultados que diferem dos enunciados anteriormente. A presente técnica, ao ser um método qualitativo, é simplista revelando a presença ou a ausência de infecção parasitária e permitindo a identificação do parasita. Apesar de não ser um método tão rigoroso permite-nos de forma mais simplista e rápida estimar a carga parasitária dos animais, tendo sido realizada em simultâneo para dar uma maior credibilidade aos resultados.

Importa referir que foram detectados através deste método ovos do céstodo *Moniezia benedeni* em animais em “lactação”, quer em “semi-intensivo” quer em “intensivo”. Embora necessitem de hospedeiros intermediários, estes são muito abundantes na erva, e isso possibilita que o ciclo ocorra com facilidade (Mañes & Vázquez, 2013) em ambos os tipos de produção. Esta presença pode ser justificada por duas razões: a) os tratamentos actualmente aplicados são ineficazes no controlo de cestodes; e b) a difícil detecção destes parasitas. Em relação à primeira, os fármacos habitualmente utilizados no controlo parasitário possuem espectro largo frente a ecto e endo parasitas, e para terem actividade contra os cestodes teriam de pertencer à classe dos benzimidazóis (ou ao grupo do praziquantel), que são muito raramente utilizados pelos sistemas de produção, apesar das vantagens que podem ter por não possuírem IS no leite, nomeadamente o febendazol. O segundo motivo relaciona-se com a própria epidemiologia do parasita, com forte sazonalidade dependente do ácaro e também da proporção de ovos existentes no ambiente, que aliada a uma vida média curta do parasita adulto, a um período patente curto (Mañes & Vázquez, 2013) e a sinais clínicos pouco específicos, faz com que a sua detecção seja invulgar. Uma vez que existe a capacidade dos animais adquirirem imunidade e se tornarem resistentes à infecção, estes resultados reflectem que a infecção está presente independentemente do tipo de manejo em quantidade suficiente para permitir a imunidade e não provocar prejuízos. No entanto deve continuar a ser vigiada porque em animais jovens pode provocar doença quando as infecções são intensas (Mañes & Vázquez, 2013).

Em relação aos resultados de “Mista” (quando infecções concomitantes de “EGI” e “COC” estão presentes), registou-se somente em seis animais, cinco dos quais em “semi-intensivo”. Apesar de serem poucos casos e estas infecções poderem estar relacionadas com uma quebra de imunidade provocada por “EGI” favorecendo o aparecimento de “COC” ou ao contrário,

estes resultados parecem mais ser justificados pelos ciclos parasitários e porque as condições que predispõem a infecção de cada um destes parasitas serem distintas e nas circunstâncias do nosso estudo raramente estiveram reunidas.

4.5.4-Sedimentação simples

Não foi possível detectar qualquer ovo de tremátodo através desta técnica, embora seja a técnica de eleição utilizada em rotina de laboratório para a detecção destes parasitas. Uma possível justificação para estes resultados pode ser a ausência de infecção ou os ovos não estarem a ser eliminados no período em que foi efetuada a amostragem, uma vez que mesmo nos animais no período patente a eliminação de ovos pode ser intermitente (Taylor & Andrews, 2004). No entanto Gomes (2012) demonstrou que esta técnica pode ser pouco sensível para detectar ovos de tremátodes, existindo outras que conseguem demonstrar a presença de ovos destes parasitas inclusive em ocasiões em que pelo método de sedimentação simples não foi possível. O que nos faz indagar sobre a fiabilidade destes resultados negativos apesar de Rapsch *et al.* (2006) terem descrito uma sensibilidade de 69% através da utilização deste método.

4.5.4-McMaster modificado

Através deste método foi possível, tal como no estudo de Gomes, (2012), detectar ovos de tremátodes em amostras que previamente tinham sido negativas à pesquisa pelo método de sedimentação simples. Os ovos neste estudo foram identificados como pertencentes ao género *Paramphistomum*. Em Portugal existem relatos sobre a detecção destes parasitas nos matadouros e nas salas de desmancha e de limpeza das vísceras bovinas (Silva Leitão, 1983), no entanto não há relatos dos seus efeitos negativos na produção de leite. Estudos recentes noutros países revelam resultados e opiniões diversas: que defendem que o parasita pode estar associado a doenças gastrointestinais, a quebras de produção, perda de peso e diminuição da produção de leite (Spence, Fraser & Chang, 1996) e em determinadas ocasiões inclusivamente podem provocar a morte (Dorchies *et al.*, 2002). De acordo com um estudo epidemiológico recente em França a prevalência destas infecções em bovinos na Natureza passou de 5,9% em 1990 para 44,7% em 1999 (Christian Mage, Bourgne, Toullieu, Rondelaud & Dreyfuss, 2002), facto que nos deixa apreensivos pois situação semelhante poderá estar a ocorrer em Portugal.

Os animais detectados no presente estudo como infectados por este parasita, eram animais adultos, vacas secas e vacas em lactação que não tinham sido previamente desparasitados, provenientes de uma exploração em regime “semi-intensivo” em pastagem de regadio de tipo

permanente, condições que reúnem os factores que favorecem a sobrevivência do gastrópode (HI), sendo esta provavelmente a explicação para a detecção do parasita. No entanto, não foi procurado nem observado qualquer um destes seres vivos. Segundo Mañes & Vázquez (2013) esta parasitose, muitas vezes subdiagnosticada por ser provocada por formas imaturas não eliminadoras de ovos, é mais frequente em animais jovens (entre os 4 e 18 meses). No entanto, os ovos podem ser detectados em animais adultos do mesmo grupo (Radostits *et al.*, 2007), pelo que o autor considera prudente vigiar os animais jovens mais susceptíveis aos efeitos deste parasita, assim como os adultos por poderem servir como sentinelas. Em relação à outra exploração em que se realizou semelhante estudo não foram detectados quaisquer ovos deste tipo, apesar da localização e do maneio serem semelhantes, variando apenas no facto destes animais terem sido previamente desparasitados com ivermectina e closantel, que sabemos ser eficaz contra nematodes e *Fasciola hepatica*, mas aos quais o *Paramphistomum* sp. não é sensível, pelo que a ausência de ovos do último parasita não estará relacionada com o protocolo de desparasitação instituído.

Em relação ao diagnóstico, difícil em termos clínicos, a nível imunológico os resultados não são conclusivos, pelo que a detecção de ovos no exame coprológico permanece a única forma para diagnosticar paramfistomose em vida nos animais (Rieu *et al.*, 2007). Sendo no entanto, importante a distinção entre os ovos de *Fasciola hepatica* e de *Paramphistomum* spp., morfológicamente muito parecidos, com a diferença dos primeiros serem amarelados em vez de acinzentados (Silva Leitão, 1983; Mañes & Vázquez, 2013). De acordo com Rieu *et al.* (2007), este aspecto pode ser suficiente e faz com que raramente existam equívocos no diagnóstico em laboratórios de parasitologia veterinária, no entanto, no presente estudo e uma vez que não houve oportunidade para fazer diagnóstico comparativo optou-se por seguir as descrições indicadas pelos outros autores. Além da identificação do parasita também se determinou a carga parasitária de *Paramphistomum* spp. que, segundo (Rieu *et al.*, 2007), pode ser importante para prever o grau de lesão ruminal e também as possíveis perdas económicas. De acordo com Mage & Dorchies (1998) infecções ligeiras de 1 a 12 vermes ruminais por animal, originam contagens de OPG baixas entre 7 a 15; e infecções elevadas contendo entre 29 e 628 vermes digestivos por animal podem conduzir a contagens médias de OPG de 41,5. No presente estudo as contagens de OPG foram de 21 e 29 OPG, que embora sendo ligeiramente superiores às consideradas como ligeiras, são menores que as contagens médias dos casos provocados por infecções elevadas e embora não exista correlação entre as contagens de OPG e o número de parasitas adultos (Rieu *et al.*, 2007), estes resultados merecem atenção uma vez que a situação pode ser agravada se não for controlada. Outro aspecto a ter em conta é que os antiparasitários que normalmente são utilizados em bovinos

são os pertencentes aos grupos das lactonas macrocíclicas e dos benzimidazóis-carbamatos, os fármacos do primeiro grupo não exercem qualquer tipo de acção sobre os paranfistomas e os de segundo grupo (benzimidazóis) possuem actividade apenas contra os adultos (Mañes & Vázquez, 2013).

4.5.5-Baermann

Em Portugal continental não existe nenhum estudo de pesquisa de parasitas respiratórios em bovinos nem existem relatos da importância desta doença, no entanto no território espanhol estes parasitas apesar de não constituírem um problema grave podem causar problemas em animais jovens (Mañes & Vázquez, 2013), daí ter-se pensado no interesse de investigar os métodos e as técnicas de diagnóstico para instaurar as medidas terapêuticas e profiláticas mais adequadas quando necessárias.

Os resultados deste estudo não revelaram a presença de parasitas respiratórios através desta técnica, no entanto o estudo de (Ploeger *et al.*, 2012), realizado na Holanda em condições distintas do presente estudo, revelou, em média, contagens baixas de larvas em vacas em lactação (0,93 larvas em primíparas e 2,17 em múltiparas) quando se sabe que temperaturas amenas e a elevada precipitação mais frequentes no centro da Europa, favorecem a epidemiologia parasitária (Radostits *et al.*, 2007). Ploeger *et al.* (2012), concluíram que amostrando entre 5 e 10 animais numa exploração é expectável que não se detectem resultados positivos, principalmente quando a quantidade de animais afectados numa exploração é baixa, sendo inclusive muito provável que em explorações afectadas por um surto severo de parasitoses brônquicas, se encontrem animais que não eliminam parasitas ou sejam seronegativos (Wapenaar, Barkema, Eysker & O’Handley, 2007; Holzhauer *et al.*, 2011). No presente estudo foram colhidas amostras em aproximadamente 40 animais de cada exploração, independentemente da dimensão do seu efectivo o que pode ter contribuído também para não se terem detectado quaisquer larvas neste estudo. Sabe-se que existem vários factores que contribuem para a disseminação da infecção, como ácaros coprófagos, fungos e possivelmente outros hospedeiros (Taylor & Andrews, 2004) e que tanto o pastoreio em áreas contaminadas (no “semi-intensivo”) como a ingestão de camas muito contaminadas no (“intensivo”) podem permitir a ingestão de larvas (Divers & Peek, 2008). No entanto, este estudo e outros não apoiaram esta última hipótese e talvez o autor a tenha referido como uma possibilidade e não como algo que tenha sido já previamente demonstrado.

Em 1997 Eysker, demonstrou através de uma infecção experimental em vitelos que o método de Baermann em animais jovens pode ser útil na detecção de infecções patentes, principalmente entre as 5 e as 7 semanas após a infecção primária (Eysker, 1997). No entanto,

no presente estudo não foi possível confirmar esta ideia, pois a maioria dos “vitelos” possui menos de 3 semanas idade (período inferior ao período pré-patente da infecção). Se a amostra seleccionada neste grupo abrangesse uma faixa etária maior os resultados poderiam ter sido diferentes, contudo é importante considerar as limitações intrínsecas das comparações entre infecções experimentais e infecções naturais.

A amostragem aleatória no presente estudo também não parece constituir uma justificação para os resultados obtidos, uma vez que Ploeger *et al.* (2012) defendeu que as estratégias de análise selectiva para aumentar a possibilidade de detecção de larvas ou de animais seropositivos, através da selecção de animais imunitariamente imaturos e com maior predisposição para apresentarem infecção patente ou da amostragem dos animais com sinais clínicos evidentes, não garantem que o diagnóstico seja positivo.

A técnica de diagnóstico pelo método de Baermann para as situações do nosso estudo parece ter sido a indicada, pois segundo Ploeger *et al.* (2012), em infecções ligeiras com reduzido número de animais com tosse, o exame do soro ou das fezes individuais são as técnicas mais adequadas, em oposição a surtos moderados a graves ou em estudos a grande escala, nos quais o teste de ELISA no leite do tanque parece ser a técnica mais apropriada. Em relação à susceptibilidade à doença esta é maior em indivíduos que não contactaram previamente com um estímulo antigénico (Ploeger *et al.*, 2012; Mañes & Vázquez, 2013) e assim, entre os diferentes grupos etários a doença é mais frequente nos animais jovens (“vitelos” e “novilhas”) do que nos adultos (Taylor & Andrews, 2004; Ploeger *et al.*, 2012). A data de colheita das amostras neste estudo também pode ter influenciado os resultados, nomeadamente nos animais de regime “semi-intensivo”, em que a recolha ocorreu na primavera, enquanto a doença geralmente ocorre entre o final do verão e o outono (Taylor & Andrews, 2004). Em zonas temperadas e húmidas a infecção pode ocorrer também no inverno e os surtos de doença podem ocorrer em qualquer altura do ano (Mañes & Vázquez, 2013).

A justificação possível para a total negatividade no presente estudo é a ausência de infecção, no entanto segundo Michel & Mackenzie (1965) em ausência de estímulo antigénico os animais são susceptíveis à infecção e mesmo que a infecção seja prevenida ou eliminada nos animais jovens (“vitelos” e “novilhas”), se os adultos (“lactação” e “secas”) forem expostos podem vir a contrair a doença. Assim, os programas de controlo devem estimular e desenvolver imunidade suficiente que permita resistir a reinfecções em períodos subsquentes de pastoreio inclusive em situações em que é utilizado antihelmíntico como tratamento profiláctico (Ploeger, 2002). Situações em que se introduzem animais que não contactaram previamente com o parasita num grupo com animais portadores, os animais começam a excretar parasitas com várias consequências que dependem de vários factores: número de

“novilhas” que se juntam ao grupo, quantidade de larvas eliminadas, manejo da pastagem e do grau de imunidade das vacas adultas (Ploeger *et al.*, 2012).

Em países onde a doença é endémica, nomeadamente no Reino Unido, a doença foi controlada durante muitos anos com vacinações de L3 irradiadas. Mesmo após a vacinação, Mañes & Vázquez (2013) defendem a necessidade de um estímulo antigénico suficiente para a manutenção de um nível de protecção imunitária, mas que não seja exagerado evitando o contacto com as L3 que conduziria à doença. Assim o controlo deve ser baseado na interpretação de sinais clínicos de doença, em conjunto com conhecimentos epidemiológicos sobre o parasita que podem variar entre explorações e adaptar o controlo farmacológico e as práticas de manejo a todos estes conhecimentos, possibilitando que os animais mais susceptíveis adquiram alguma imunidade sem que desenvolvam a doença.

4.5.6-Coprocultura e identificação larvar

Os resultados da coprocultura apoiaram os resultados do Willis e de McMaster. Tendo sido detectadas apenas larvas nas coproculturas provenientes de animais de manejo “semi-intensivo” e que apresentavam contagens de OPG mais elevadas. No presente estudo assim como sucedeu no estudo de Ramos (2013) houve coproculturas de amostras que continham ovos detectados através dos métodos de McMaster e de Willis, nos quais posteriormente não foi possível recolher qualquer larva, possivelmente porque a contagem de OPG nas fezes foi reduzida e/ou porque os ovos presentes estavam inviáveis. Talvez seja esta também uma das razões para os nemátodes terem uma postura de ovos tão elevada. Em relação aos géneros identificados, foram ao encontro do que era esperado, reforçando que as infecções por nematodes gastrointestinais em bovinos são causadas predominantemente por géneros pertencentes à Superfamília Trichostrongyloidea e normalmente são mistas.

Em Portugal, não existiam até à data estudos avaliando coproculturas exclusivas de bovinos produtores de leite; no entanto existem alguns estudos desenvolvidos em Portugal em bovinos produtores de carne (Cardoso, 2010) e mais recentemente em bovinos de raça brava (Ramos, 2013). É interessante comparar o primeiro estudo com o nosso, porque se situou na mesma região onde foram colhidas as amostras dos animais em “semi-intensivo”. Cardoso (2010) identificou somente três géneros, *Ostertagia*, *Cooperia* e *Bunostomum*; comparativamente, o presente estudo identificou ainda mais três géneros, *Trichostrongylus*, *Haemonchus* e *Strongyloides*. As prevalências entre o presente estudo e o estudo em bovinos de aptidão de carne (Cardoso, 2010) foram muito distintas *Ostertagia* 56,1% e 20,8%, *Cooperia* 28,3% e 72,8%, e *Oesophagostomum* 1,7% e 6,4%, respectivamente. Estas diferenças podem ser explicadas através da epidemiologia parasitária uma vez que ambos os estudos incidiram em

épocas distintas do ano, primavera e verão respectivamente; as técnicas terem sido executadas por diferentes autores; mas sobretudo por a densidade animal nestes campos e o grau de reutilização das pastagens ser provavelmente maior nas vacas leiteiras.

O teste com base em características morfológicas possui limitações que estão relacionadas em maior ou menor grau com a experiência de quem as executa. Se por um lado existe um género que possui características identificativas que não deixam qualquer dúvida, *Cooperia*, (van Wyk *et al.*, 2004), por outro lado existem outros géneros, *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Haemonchus*, *Chabertia* e *Oesophagostomum*, que se diferenciam entre si através da comparação dos comprimentos da bainha da cauda e de outras características subtis, podendo ser por vezes muito complicada tanto a identificação como a distinção entre géneros, nomeadamente em ocasiões em que o parasitologista não possui experiência, quando as infecções são únicas ou quando as condições de cultura permitem a eclosão apenas de um único género. Inclusivamente van Wyk *et al.* (2004) afirmaram que as larvas maiores de *Haemonchus* spp. podem facilmente ser confundidas com as larvas mais pequenas de *Ostertagia ostertagi*, no entanto como as infecções por *Haemonchus placei* (bovinos) na Europa são muito raras e quando presentes nos bovinos segundo J. Cabaret (resultados não publicados) citado por (van Wyk *et al.*, 2004) são infecções leves por *Haemonchus contortus* provenientes dos ovinos, crê-se assim que a confusão entre estes dois géneros no presente estudo tenha sido muito pequena. Assim pode-se explicar a prevalência tão elevada de *Ostertagia* 56,1% e tão baixa de *Haemonchus* 1,7% quando comparando com os 21% de prevalência obtida para *Ostertagia* no estudo de (Cardoso, 2010). Em relação a *Cooperia* spp. a prevalência foi de 28,3% no presente estudo e de 73% no estudo de (Cardoso, 2010). A grande diferença pode ter a ver com uma maior imunidade adquirida por parte dos animais relativamente a este parasita, uma vez que segundo Vercruyse & Claerebout (1997) os animais na mesma estação de pastoreio adquirem mais rapidamente imunidade a *Cooperia* do que contra *Ostertagia*. Num outro estudo, Perri *et al.* (2011) detectaram que cerca de 92% das larvas identificadas eram de *Ostertagia*, e os restantes 8% de *Haemonchus*, demonstrando que as prevalências dos diferentes géneros nos diferentes estudos são muito variáveis, porque as características epidemiológicas de cada local são também muito diversas e assim, a comparação de resultados é difícil.

Como vimos as variações das condições de cultura favorecem o desenvolvimento de alguns géneros em detrimento de outros contribuindo muitas vezes para diferentes resultados entre estudos e apesar de ser uma técnica muito laboriosa e demorada continuam sendo rotineiramente usadas nos laboratórios (Lichtenfels, Hoberg & Zarlenga, 1997).

Em 2010, Cardoso estudou o método de medição de cada larva para confirmação do diagnóstico larvar e apesar de McMurtry *et al.* (2000) defenderem ser um método incapaz de ter em consideração as variabilidades das medidas por diversos factores, pode ser muito útil como complemento em casos dúbios. Na ausência de um método ideal, a combinação de todas as técnicas, juntamente com a aquisição de experiência por parte do parasitologista, podem ser fundamentais para um diagnóstico mais fácil e preciso de cada larva.

4.5.7-Esfregaços-*Cryptosporidium*

Os resultados do presente estudo demonstram que a infecção por *Cryptosporidium* sp. é muito comum nas explorações em que decorreu o estudo. Em 9 das 10 vacarias foi detectada a presença deste parasita demonstrando que é um parasita ubiqüitário entre as vacarias portuguesas. A prevalência entre os vitelos amostrados foi de 42,68%. Estes resultados não são muito diferentes dos obtidos na região de Aveiro por (Martins *et al.*, 2007) que encontrou este parasita em todas as explorações e em 74,8% dos vitelos pesquisados (n=183). Neste estudo amostraram vitelos com um limite de idade de 3 meses, enquanto no presente estudo houve uma procura preferencial por vitelos com menos de 3 semanas (n=46), apesar de incluir também alguns vitelos com idade compreendida entre as 3 semanas e os 6 meses (n=29). Estes têm uma menor probabilidade de eliminar oocistos por já terem adquirido imunidade após infecção neonatal e não terem já influência da imunidade materna (Mañes & Vázquez, 2013) explicando em parte as diferenças entre os dois estudos. Outra possível justificação para estes resultados é a intermitência de eliminação de oocistos fazendo com que os esfregaços negativos não signifiquem que os animais estejam livres de infecção (Chalmers & Katzer, 2013). No entanto, os nossos valores são semelhantes às prevalências encontradas noutros estudos realizados em Portugal que variaram entre 12-44% (Martins, 1997; Pereira da Fonseca, 2000; Pereira da Fonseca & Cannas da Silva, 2000). Estes resultados podem ser explicadas pelas más condições de higiene e de manejo verificadas nalgumas explorações em estudo e que incluem a ausência ou deficiência de lavagem e desinfecção de instalações por rotina, como aconselhado (Mohammed, Wade & Schaaf, 1999; Castro-Hermida, González-Losada & Ares-Mazás, 2002; Martins *et al.*, 2007). Outra possível justificação pode ser a contaminação da água de bebida com oocistos. Pereira da Fonseca (2000) revelou que 55% das amostras de água recolhidas nas vacarias de leite em Portugal apresentavam este protozoário. No presente estudo não foram efectuadas análises à água para confirmar uma eventual contaminação da mesma, no entanto constatou-se que em todas as vacarias a água destinada aos vitelos tinha origem num furo na própria exploração ou procedia de canais de rega, aumentando a possibilidade de ser esta a causa da contaminação.

Cryptosporidium sp. está presente frequentemente em vitelos com diarreia, podendo também estar presente em vitelos e entre a população adulta de forma assintomática contribuindo para a contaminação do ambiente e para a persistência da infecção na própria exploração (Ortolani & Castro Soares, 2003), tornando o manejo e o controlo da criptosporidiose muito complexo. Em 2000, Pereira da Fonseca & Cannas da Silva consideraram *Cryptosporidium* sp. como o maior agente enteropatogénico de vitelos em Portugal. Os problemas de sanidade animal juntamente com os graves prejuízos económicos que provoca na recria dos animais e o seu impacto na Saúde Pública, colocam esta doença como merecedora de atenção entre os veterinários que dão assistência às explorações. Em relação às práticas de controlo desta doença nas explorações estudadas não se conseguiu apurar a existência de qualquer tratamento profiláctico. Contudo sabe-se que quando efectuado a partir do primeiro dia de vida e durante 7 dias reduz a eliminação de oocistos e a intensidade da infecção. A constatação da melhoria na incidência de diarreia não é sempre possível pois esta pode ser provocada por outros agentes de forma única ou em simultâneo com o género *Cryptosporidium*, nomeadamente através de *Rotavirus*, *Coronavirus* e *E. coli* K99.

4.5.8-Análise dos valores de OPG de EGI

As frequências relativas foram convertidas em probabilidades para melhor se conseguirem tirar ilações, tendo sido posteriormente analisadas de forma única as variáveis: fase produtiva, tipo de manejo e tratamento.

Fase produtiva

De acordo com a bibliografia era esperado que os “vitelos” eliminassem valores de OPG mais elevados do que as “novilhas” e estes animais mais do que as vacas (“secas” e em “lactação”) (Stromberg & Gasbarre, 2006; Mañes & Vázquez, 2013). No entanto, no presente estudo só foi possível confirmar maior probabilidade de detectar OPG nas “Novilhas” do que nos animais adultos, “secas” e em “lactação”. No caso dos “vitelos” as probabilidades de encontrar OPG foram significativamente inferiores aos restantes animais, porque as condições de manejo específicas para este grupo não favorecem o estabelecimento da infecção, e caso ocorra, até serem detectados ovos nas fezes existe um período superior a 3 semanas desde a ingestão dos parasitas.

Os resultados do presente estudo confirmam, tal como Claerebout & Vercruysse (2000), que a contagem de OPG pode ser um bom método de diagnóstico em “novilhas”. Por apresentarem maior probabilidade de infecções subclínicas, o nível de parasitismo pode interferir na quantidade de alimento ingerido e na capacidade para o utilizar, traduzindo-se em menores

GMD que terão consequências na produção leiteira futura (Gibbs, 1982). Por outro lado, em animais adultos (“secas” e “lactação”) provavelmente devido à imunidade dos próprios animais, a sua fraca eliminação de ovos faz com que este método não pareça constituir um bom indicador do nível de infecção nestes animais (Gross *et al.*, 1999). No presente estudo os animais adultos, apresentaram contagens de OPG muito baixas, inclusive nas explorações em “semi-intensivo”, confirmando os resultados de outros estudos em animais adultos e com acesso à pastagem (Thomas & Rowlinson, 1981; Nødtvedt *et al.*, 2002), o que demonstra existir possivelmente nestas situações uma baixa correlação entre a carga parasitária e a contagem de OPG e provavelmente também na resposta produtiva nos animais adultos (Thomas & Rowlinson, 1981; Agneessens *et al.*, 2000; Borgsteede *et al.*, 2000). No entanto, Mejía *et al.* (2011) comprovaram que as vacas com contagens nulas ou <10 OPG produziam cerca de 10% mais leite do que as vacas com contagens de OPG positivas ≥ 10 OPG. Estes autores afirmam que a contagem de OPG no primeiro mês pós-parto pode ser uma ferramenta útil para estimar as perdas de produção de leite em vacas adultas em “lactação” com acesso à pastagem (Mejía *et al.*, 2011).

As diferenças entre as contagens de OPG nas vacas (“secas” e “lactação”) e nas “novilhas”, principalmente no “semi-intensivo”, são devidas a diferenças no estatuto imunitário, que é maior nos animais adultos. Em relação às diferenças entre as vacas “secas” e em “lactação”, existe informação contraditória. É defendido que existe um momento de 4 semanas de duração em que existe um aumento com intensidade variável dos valores OPG, afectando o período pré-parto (vacas “secas”) e do pós-parto (vacas em início de “lactação”) (Mañes & Vázquez, 2013). O aumento de OPG que ocorre nas vacas “secas” no momento próximo do parto, pode provavelmente ser explicado por alterações endócrinas (aumento dos níveis de prolactina, corticosteróides e hormonas adrenocorticotróficas) (Perri *et al.*, 2011; Mañes & Vázquez, 2013). Nas vacas no início da “lactação” as alterações metabólicas provocadas pelo balanço energético negativo (aumento do metabolismo lipídico e do stress oxidativo) influenciam de forma negativa a função imunitária (Sordillo *et al.*, 2009) traduzindo-se num período de maior susceptibilidade aos parasitas. No entanto, através do presente estudo não parece ser possível detectar grandes diferenças entre os dois grupos, uma vez que no caso das vacas “secas” a susceptibilidade à infecção se existiu pode ter sido contrariada com a desparasitação efectuada neste período e nas vacas “lactação” foram escolhidos animais aleatoriamente, deduzindo-se existirem poucos animais que se encontrariam no início da “lactação” e como tal no período de maior susceptibilidade à doença. No entanto, outra limitação para se poderem tirar conclusões é o limite de detecção do teste que por ser reduzido impossibilita a detecção de possíveis efeitos positivos da contagem e da detecção de

OPG, apesar de existirem autores que defendem que a elevação de OPG no pré-parto não ocorre na espécie bovina (Radostits *et al.*, 2007).

Segundo Mañes & Vázquez (2013) existe uma relação entre as infecções e reinfecções ao longo da vida produtiva dos animais e conseqüentemente é possível a aquisição de resistência. O desenvolvimento da imunidade afecta a dinâmica das infecções de várias formas: inibe o desenvolvimento das larvas no estágio L4, elimina as larvas L4 e direcciona-as para fora dos locais de predilecção do tracto gastrointestinal, colocando-as em locais mais adversos. O sistema imunitário do hospedeiro pode ser responsável pela diminuição do tamanho das fêmeas dos NGIs, bem como da sua fecundidade (traduzida por uma menor eliminação de ovos nas fezes) e pode ser capaz de alterar a proporção entre fêmeas e machos a favor destes últimos (Mañes & Vázquez, 2013) (aumento da taxa de mortalidade das fêmeas por aumentarem as suas necessidades metabólicas e ingerirem uma quantidade cada vez maior de compostos imunitários) (Radostits *et al.*, 2007; Mañes & Vázquez, 2013). Assim, a taxa de mortalidade nos nemátodes adultos em animais reinfectados aumenta com a imunidade (Mañes & Vázquez, 2013) explicando o facto de os animais jovens eliminarem mais OPG que os animais adultos.

Comprovou-se a existência de parasitas em algumas fases produtivas através do método de detecção de OPG e também do cálculo da probabilidade de apresentarem OPG, contudo para uma análise mais fácil dos resultados nos animais de diferentes grupos podiam ainda ter sido associados IPP para tornar o estudo um pouco mais preciso e conseguir avaliar melhor o impacto dos parasitas em cada fase produtiva. No caso das “novilhas” por ainda não produzirem leite poder-se-ia ter utilizado o GMD de peso; nas vacas “secas”, parâmetros reprodutivos (Mejía *et al.*, 2011), mas uma vez que já estão gestantes poderá não ser o melhor podendo para o autor ser mais útil a avaliação do peso da cria ao nascimento ou a produção leiteira no início da lactação seguinte; nas vacas em “lactação”, a produção leiteira pode ser um indicador muito útil (Mejía *et al.*, 2011). Contudo Perri *et al.* (2011) não demonstraram a existência de correlação entre a média de OPG durante toda a lactação e a produção total de leite, nem entre a média de OPG mensal e a produção média de leite mensal.

Em 1981, Smith & Gibbs estudaram o efeito dos parasitas em animais com idade semelhante ao grupo das “Novilhas” comparando três grupos: um não exposto a pastagens contaminadas, um exposto a pastagens contaminadas mas sem tratamento e um último grupo exposto a pastagem contaminada e submetidos mensalmente a tratamento antihelmintico. Este estudo revelou maior crescimento nos animais que não se encontravam expostos aos parasitas, depois nos animais tratados e expostos, e menor nos animais expostos mas não tratados, demonstrando que o tratamento pode ser útil no controlo dos parasitas, mas pode não ser

suficiente para impedir os efeitos negativos dos parasitas (Gibbs, 1982). De todos os modos, nas “novilhas”, por serem animais em franco crescimento e como vimos anteriormente com maior susceptibilidade sobretudo no manejo “semi-intensivo”, o “tratamento” poderá reduzir os efeitos negativos dos parasitas. No parto o tratamento pode ser benéfico na produção leiteira bem com na redução da contagem de OPG (Nødtvedt *et al.*, 2002; Perri *et al.*, 2011). Reinemeyer (1995) nas condições de manejo norte-americanas revelou que o tratamento antihelmíntico em adultos é de vantagem duvidosa. Os argumentos contra o tratamento dos animais adultos são a existência de poucas evidências, baixa carga parasitária quer através dos valores de OPG e em estudos no matadouro e o facto das parasitoses clínicas nestes animais serem raras. Além disso comparando os ganhos de produção após o tratamento com o seu custo pode não ser encontrada qualquer mais-valia e inclusive a resposta produtiva ao tratamento antihelmíntico ser muito variável entre os animais de uma exploração.

Tratamento

No presente estudo a probabilidade de detectar OPG de EGI nos animais que tinham sido submetidos a “tratamento” farmacológico antihelmíntico foi superior à dos animais que não tinham sido alvo de qualquer tratamento (“não tratamento”), embora sem significado estatístico. Este resultado pode parecer um contra-senso, no entanto pode ser explicado pela amostra ser constituída maioritariamente por animais de regime “intensivo”, nos quais os valores de OPG através do método de McMaster e do método de flutuação/Willis foram geralmente <50 OPG e “ausente” respectivamente, significando que não foram detectados ovos em qualquer um dos testes, existindo também a possibilidade de ter sido detectado um ou outro OPG nos animais que tinham um protocolo de desparasitação (“tratamento”) e apresentaram OPG (“≥50 OPG” e “presente”). Eventualmente pode também ter existido confusão e algum OPG ter sido erradamente diagnosticado contribuindo para estes resultados. Outras explicações possíveis para esta diferença de probabilidades que contraria a teoria, são o facto da carga parasitária ser tão pequena que o tratamento pode não ter a capacidade para afectar, assim como o limite de detecção do teste ao ser baixo, confere uma baixa sensibilidade e possivelmente os níveis de OPG na maior parte dos casos serem inferiores ao limite de detecção e contribuir para a distribuição não normal (*skewed*) com desvio à esquerda do eixo vertical dos resultados, com muitos animais apresentando contagens de OPG muito reduzidas (“<50 OPG”) e poucos a possuírem contagens de OPG elevadas (Dobson, Sangster, Besier, & Woodgate, 2009). Em 1982 Glenn *et al.*, demonstraram que o tratamento em animais sem acesso à pastagem é capaz de reduzir em média 1 OPG comparativamente à condição que o antecedia, permitindo deduzir que em situações em que a carga parasitária é

tão pequena, não vão existir diferenças entre os animais tratados e não tratados. Segundo o mesmo autor, a análise estatística para diferenciar animais tratados de não tratados não é conclusiva, tal como acontece no presente estudo, quer nos animais adultos, vacas “secas” e em “lactação” em “semi-intensivo”, quer nos animais em “intensivo”.

Em relação aos animais de manejo “semi-intensivo”, as probabilidades calculadas e com significado estatístico já confirmam a teoria de que os animais que foram tratados apresentaram menos probabilidades de detecção de OPG e provavelmente teriam contagens de OPG menores que os animais não tratados (“não tratamento”). A análise destes dados possui outro constrangimento que pode também contribuir para explicar os resultados, a diferença entre a classificação dos animais com “tratamento” e sem tratamento (“não tratamento”) foi baseada na presença e na ausência de tratamento respectivamente por um período por vezes superior a um ano, uma vez que geralmente quando os animais adultos são desparasitados esta ocorre no período seco; se por qualquer motivo a sua lactação é prolongada os animais ficam muito tempo sem serem novamente desparasitados, para além de se saber que o efeito do tratamento possui actividade limitada no tempo (variando normalmente entre os 14 e 35 dias conforme a molécula, a via de administração e o género parasitário) (Radostits *et al.*, 2007). Findando esse tempo os animais, principalmente os de manejo “semi-intensivo”, ficam novamente predispostos à infecção parasitária pelo que a distinção entre animais com e sem tratamento neste estudo em termos fisiológicos pode em muitos casos ter sido ambígua. Apesar disto parece existir uma possível influência do tratamento na contagem de OPG e talvez na performance produtiva do leite em animais com acesso à pastagem em determinada fase do seu ciclo de produção (“semi-intensivo”). Por outro lado, nos animais estabulados (“intensivo”) o “tratamento” antihelmíntico tem efeito significativo negativo na probabilidade de detecção de ovos. Estes resultados contrariam os resultados que ocorrem no “semi-intensivo” e o trabalho de Carrier (2001), de que o tratamento antihelmíntico nos animais em intensivo parece não ter qualquer efeito quer na contagem de OPG quer na produção de leite. No entanto, estes resultados podem ser devidos à sensibilidade da técnica bem como à possível má diferenciação entre animais tratados e não tratados, uma vez que esta informação foi recolhida através de inquéritos aos produtores. De acordo com outros autores, o tratamento antihelmíntico em animais que não têm qualquer acesso à pastagem não se justifica do ponto de vista económico (Glenn *et al.*, 1982; Sithole, Dohoo, Leslie, *et al.*, 2005; Divers & Peek, 2008).

Apesar de todas estas possíveis explicações a determinação do nível de infecção usando os OPG de fezes já anteriormente tinha sido considerada um método sem utilidade por não

demonstrar qualquer relação com o “tratamento” (Michel et al., 1982; O’ Farrell, Downey & Sherington, 1986).

No entanto, recentemente foi revisto o impacto do parasitismo através da análise da produção leiteira e conclui-se que os tratamentos antihelmínticos durante a lactação e não apenas durante o período seco, podem melhorar a produção leiteira diária em 1kg de leite, com variações em diferentes ensaios possivelmente devido a exposições larvares também diferentes (Charlier *et al.*, 2009). Assim é fundamental considerar se os animais têm ou não acesso à pastagem e qual a duração desse período (Mejía *et al.*, 2011) na hora de se decidir pelo tratamento ou não.

Maneio

Como vimos a probabilidade de serem detectados OPG em animais em “semi-intensivo” é significativamente maior do que nos animais em “intensivo”, uma vez que o número de helmintes tanto no hospedeiro como no ambiente é menor em condições de estabulação ou em situações em que não existe pastoreio (Douglas & Baker, 1968). Segundo Herd, Riedel, & Heider (1980) a transmissão da infecção parasitária por EGIs em animais estabulados é muito improvável sendo que as únicas formas parasitárias passíveis de serem detectadas neste tipo de manejo são as pertencentes à Superfamília Rhabditoidea, género *Strongyloides*, com importância clínica relativa em animais adultos. Assim se demonstra que a extrapolação dos resultados dos animais que têm acesso à pastagem ao sistema intensivo não é correcta (Glenn *et al.*, 1982), provando que a adopção de determinadas medidas de controlo parasitário deverá ser específica e dependente do manejo e das condições de cada exploração.

4.5-Conclusões

Através do presente estudo foi possível fazer uma revisão geral sobre os principais parasitas internos, gastrointestinais e respiratórios que podem atingir os bovinos em explorações leiteiras na região centro e sul de Portugal continental. Nos métodos quantitativos, 93,7% e 92,4% dos animais apresentaram menos de 50 OPG ou oPG para EGI e *Eimeria* spp., respectivamente; demonstrando que a prevalência destes parasitas é relativamente baixa. Nas técnicas qualitativas, foram identificadas 15,3% de infecções por EGI, 13,4% por *Eimeria* spp., 1% por céstodes e 1,6% foi mista (EGI e *Eimeria* spp.), reforçando uma vez mais os resultados anteriores. Os EGI foram identificados predominantemente em explorações semi-intensivas e *Eimeria* spp. em explorações intensivas. O protozoário *Cryptosporidium* sp. foi detectado em 9 explorações e em 42,7% das amostras. Permitindo perceber que à excepção dos animais em “semi-intensivo”, das “Novilhas” em intensivo e dos “vitelos” de qualquer exploração, todos os outros animais têm uma relação mais ou menos de equilíbrio com os parasitas que os afectam. Nos animais referidos, na generalidade das vezes, este equilíbrio não é tão facilmente alcançado e depende de diversos factores, da aquisição de imunidade, presença ou ausência de tratamento e de práticas de manejo, que variam do maior ou menor grau de acesso à pastagem e também das condições ambientais.

É importante perceber que qualquer fase produtiva pode ser afectada pelos parasitas e apesar de muitas das vezes só se pensar nas vacas paridas por serem as que produzem leite, há que lembrar que as vitelas da recria são as futuras novilhas e as novilhas e as vacas na secagem são as futuras vacas em lactação, e algo que condicione a recria ou uma fase do ciclo anterior à lactação irá sem dúvida alguma comprometer negativamente esta produção.

Como constatámos a carga parasitário hoje em dia é de tal ordem reduzida que são muito raras as parasitoses clínicas, raras as parasitoses subclínicas e muito comuns as parasitoses económicas. A diferença entre estes dois últimos termos é pequena, mas muitas vezes atinge-se um grau de parasitismo que nem os exames complementares de diagnóstico o conseguem detectar, passando a tratar-se de um grau de parasitismo possivelmente só quantificável quando analisados os indicadores de performance produtiva e lhes for atribuído um valor monetário. Assim, num contexto económico onde cada vez mais o sucesso de uma exploração está no grau de precisão da sua produção, o controlo dos parasitas ainda continua a ser visto como algo que pode explicar o sucesso de uma exploração. No entanto, frequentemente parece não existir hipótese de fazer esta diferença e sendo os parasitas seres ubiqüitários os médicos veterinários com os conhecimentos de parasitologia, biologia, epidemiologia, clínica devem evitar más práticas que possam comprometer o futuro do controlo parasitário.

Assim de acordo com o presente estudo verificamos a importância dos EGIs como parasitas internos dos bovinos leiteiros nas novilhas em semi-intensivo e com destaque para o género *Ostertagia*. Os protozoários assumem também um papel importante, em particular *Eimeria* spp. nas novilhas em intensivo e *Cryptosporidium* sp. nos vitelos. Os resultados reafirmam uma vez mais a importância de um diagnóstico parasitológico prévio ao controlo anti-parasitário, que adequa os fármacos aos agentes mais prevalentes e a grupos de animais que de acordo com o seu tipo de manejo e a sua fase produtiva a sua administração em termos económicos se justifique.

Voltando à premissa inicial do qual partiu o presente trabalho a “Parasitologia é um mundo” entre hospedeiros e parasitas, talvez fosse útil a revisão deste conceito e fosse pertinente acrescentar-se um terceiro elemento, definindo assim a parasitologia como um mundo que engloba hospedeiro, parasita e recursos financeiros, no qual o médico veterinário assume um papel imprescindível na ligação entre todos.

5-Bibliografia

- Agneessens, J., Claerebout, E., Dorny, P., Borgsteede, F. H. & Vercruyse, J. (2000). Nematode parasitism in adult dairy cows in Belgium. *Veterinary Parasitology*, 90(1–2), 83–92.
- Albers, G. A. A., Gray, G. D., Piper, L. R., Barker, J. S. F., Jambre, L. F. L. & Barger, I. A. (1987). The genetics of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* infection in young merino sheep. *International Journal for Parasitology*, 17(7), 1355–1363.
- Alho, A. M., Nabais, J. & Madeira de Carvalho, L. (2013). A importância da Técnica de Baermann na clínica de pequenos animais. *Clínica Animal*, (3), 28–31.
- Almería, S., Adelantado, C., Charlier, J., Claerebout, E. & Bach, A. (2009). Ostertagia ostertagi antibodies in milk samples: Relationships with herd management and milk production parameters in two Mediterranean production systems of Spain. *Research in Veterinary Science*, 87(3), 416–420.
- Alvinerie, M., Sutra, J. F., Galtier, P. & Mage, C. (1999). Pharmacokinetics of eprinomectin in plasma and milk following topical administration to lactating dairy cattle. *Research in Veterinary Science*, 67(3), 229–232.
- Andlauer, W. & Fürst, P. (2002). Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International*, 35(2–3), 171–176.
- APIFARMA. (2013, November 24). Simposium Veterinário Apifarma. *Apifarma Associação Portuguesa da Indústria farmacêutica*. Retrieved November 24, 2013, from <http://www.apifarma.pt/simposiumvet/Paginas/Pesquisaavancada.aspx>
- APROLEP. (2012, August 24). Carta Aberta sobre o risco de extinção da produção de Leite em Portugal. *Associação dos produtores de leite de Portugal*. Retrieved August 2, 2013, from <http://aprolep.wordpress.com/2012/08/24/carta-aberta-sobre-o-risco-de-extincao-da-producao-de-leite-em-portugal/>
- Araújo, J. V. de, Guimarães, M. P., Campos, A. K., Sá, N. C. de, Sarti, P. & Assis, R. C. L. (2004). Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. *Ciência Rural*, 34(2), 457–463.
- Argüello, M. R. H., & Campillo, M. C. del. (2002). Estrongiloidosis. In *Parasitologia Veterinaria* (3^a ed., pp. 234–237). Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Assis, R. C. L., Luns, F. D., Araújo, J. V. & Braga, F. R. (2012). Biological control of trichostrongyles in beef cattle by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. *Experimental Parasitology*, 132(3), 373–377.
- Bangoura, B., Mundt, H. C., Schmäschke, R., Westphal, B. & Dauschies, A. (2011). Prevalence of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in German Cattle Herds and Factors Influencing Oocyst Excretion. *Parasitology Research*, 109(1), 129–138.
- Barger, I. A. (1993). Influence of sex and reproductive status on susceptibility of ruminants to nematode parasitism. *International Journal for Parasitology*, 23(4), 463–469.

- Barger, I. A. (1997). Control by management. *Veterinary Parasitology*, 72(3–4), 493–506.
- Barger, I. A. & Gibbs, H. C. (1981). Milk production of cows infected experimentally with trichostrongylid parasites. *Veterinary Parasitology*, 9(1), 69–73.
- Barnes, A. P., Rutherford, K. M. D., Langford, F. M. & Haskell, M. J. (2011). The effect of lameness prevalence on technical efficiency at the dairy farm level: An adjusted data envelopment analysis approach. *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5449–5457.
- Bartram, D. J., Leathwick, D. M., Taylor, M. A., Geurden, T., & Maeder, S. J. (2012). The role of combination anthelmintic formulations in the sustainable control of sheep nematodes. *Veterinary Parasitology*, 186(3–4), 151–158.
- Bennema, S. C., Vercruyse, J., Morgan, E., Stafford, K., Höglund, J., Demeler, J. & Charlier, J. (2010). Epidemiology and risk factors for exposure to gastrointestinal nematodes in dairy herds in northwestern Europe. *Veterinary Parasitology*, 173(3–4), 247–254.
- Berghen, P., Hilderson, H., Vercruyse, J. & Dorny, P. (1993). Evaluation of pepsinogen, gastrin and antibody response in diagnosing ostertagiasis. *Veterinary Parasitology*, 46(1–4), 175–195.
- Blanco-Penedo, I., Höglund, J., Fall, N. & Emanuelson, U. (2012). Exposure to pasture borne nematodes affects individual milk yield in Swedish dairy herds. *Veterinary Parasitology*, 188(1–2), 93–98.
- Bohrmann, R. (1991). Treatment with toltrazuril in a natural outbreak of coccidiosis in calves. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 98(9), 343–345.
- Bokhout, B. A., Boon, J. H. & Hendriks, J. (1979). Operational diagnostics of lungworm infections in cattle. Preliminary investigation into the usefulness of the indirect haemagglutination. *Tijdschrift Voor Diergeneeskunde*, 104(20), suppl 4:195–203.
- Borgsteede, F. H. M., Tibben, J., Cornelissen, J. B. W. J., Agneessens, J. & Gaasenbeek, C. P. H. (2000). Nematode parasites of adult dairy cattle in the Netherlands. *Veterinary Parasitology*, 89(4), 287–296.
- Bowman, D. D. (2009). *Georgis' Parasitology for Veterinarians* (9^a ed.). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Butler, J. E. (1983). Bovine immunoglobulins: An augmented review. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 4(1–2), 43–152.
- Campbell, I., Tzipori, A. S., Hutchison, G. & Angus, K. W. (1982). Effect of disinfectants on survival of cryptosporidium oocysts. *Veterinary Record*, 111(18), 414–415.
- Cardoso, J. M. (2010, April 26). *Contribuição para o estudo do parasitismo gastrointestinal e hepático em bovinos de carne em regime extensivo no Concelho de Odemira* (Tese de Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

- Carrier, J. (2001). *Effect of an Eprinomectin Treatment at Fall Housing on Production and Reproduction of Dairy Cattle*. (Mestrado). Faculte de Medicine Veterinaire de l'Universite de Montreal, Montreal.
- Castro-Hermida, J. A., González-Losada, Y. A. & Ares-Mazás, E. (2002). Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, *106*(1), 1–10.
- Castro-Hermida, J. A., Pors, I., Méndez-Hermida, F., Ares-Mazás, E. & Chartier, C. (2006). Evaluation of two commercial disinfectants on the viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *The Veterinary Journal*, *171*(2), 340–345.
- Charlier, J., Claerebout, E., Duchateau, L. & Vercruyse, J. (2005). A survey to determine relationships between bulk tank milk antibodies against *Ostertagia ostertagi* and milk production parameters. *Veterinary Parasitology*, *129*(1–2), 67–75.
- Charlier, J., Claerebout, E., Mûelenaere, E. D. & Vercruyse, J. (2005). Associations between dairy herd management factors and bulk tank milk antibody levels against *Ostertagia ostertagi*. *Veterinary Parasitology*, *133*(1), 91–100.
- Charlier, J., Duchateau, L., Claerebout, E. & Vercruyse, J. (2007). Predicting milk-production responses after an autumn treatment of pastured dairy herds with eprinomectin. *Veterinary Parasitology*, *143*(3–4), 322–328.
- Charlier, J., Höglund, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Dorny, P. & Vercruyse, J. (2009). Gastrointestinal nematode infections in adult dairy cattle: Impact on production, diagnosis and control. *Veterinary Parasitology*, *164*(1), 70–79.
- Charlier, J., Levecke, B., Devleeschauwer, B., Vercruyse, J. & Hogeveen, H. (2012). The economic effects of whole-herd versus selective anthelmintic treatment strategies in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *95*(6), 2977–2987.
- Charlier, J., Van der Voort, M., Hogeveen, H. & Vercruyse, J. (2012). ParaCalc®—A novel tool to evaluate the economic importance of worm infections on the dairy farm. *Veterinary Parasitology*, *184*(2–4), 204–211.
- Charlier, J., Vercruyse, J., Smith, J., Vanderstichel, R., Stryhn, H., Claerebout, E. & Dohoo, I. (2010). Evaluation of anti-*Ostertagia ostertagi* antibodies in individual milk samples as decision parameter for selective anthelmintic treatment in dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, *93*(2–3), 147–152.
- Claerebout, E., Dorny, P., Vercruyse, J., Agneessens, J. & Demeulenaere, D. (1998). Effects of preventive anthelmintic treatment on acquired resistance to gastrointestinal nematodes in naturally infected cattle. *Veterinary Parasitology*, *76*(4), 287–303.
- Claerebout, E. & Vercruyse, J. (2000). The immune response and the evaluation of acquired immunity against gastrointestinal nematodes in cattle: a review. *Parasitology*, *120* Suppl, S25–42.
- Coelli, T. J., Rao, D. S. P., O'Donnell, C. J. & Battese, G. E. (2005). *An Introduction to Efficiency and Productivity Analysis*. Springer.

- Coles, G. C. (2002). Cattle nematodes resistant to anthelmintics: why so few cases? *Veterinary Research*, 33(5), 481–489.
- Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H. M., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A. & Waller, P. J. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44(1–2), 35–44.
- Conceição, M. A. P., Durão, R. M., Costa, I. H. & da Costa, J. M. C. (2002). Evaluation of a simple sedimentation method (modified McMaster) for diagnosis of bovine fascioliosis. *Veterinary Parasitology*, 105(4), 337–343.
- Conlogue, G., Foreyt, W. J. & Wescott, R. B. (1984). Bovine coccidiosis: protective effects of low-level infection and coccidiostat treatments in calves. *American Journal of Veterinary Research*, 45(5), 863–866.
- Coop, R. L. & Kyriazakis, I. (1999). Nutrition–parasite interaction. *Veterinary Parasitology*, 84(3–4), 187–204.
- Cornelissen, A. W. C. A., Verstegen, R., van den Brand, H., Perie, N. M., Eysker, M., Lam, T. J. G. M. & Pijpers, A. (1995). An observational study of *Eimeria* species in housed cattle on Dutch dairy farms. *Veterinary Parasitology*, 56(1–3), 7–16.
- Cornwell, R. L. (1960). The Complement Fixing Antibody Response of Calves to *Dictyocaulus Viviparus*: I. Exposure to Natural And Experimental Infection. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 70, 482–493.
- Corwin, R. M. (1997). Economics of gastrointestinal parasitism of cattle. *Veterinary Parasitology*, 72(3–4), 451–460.
- Cramer, L. G., Pitt, S. R., Rehbein, S., Gogolewski, R. P., Kunkle, B. N., Langholff, W. K., Maciel, A. E. (2000). Persistent efficacy of topical eprinomectin against nematode parasites in cattle. *Parasitology Research*, 86(11), 944–946.
- Cringoli G. (2004). Coprological diagnosis: what's new? *Parassitologia*, 46(1-2), 137–139.
- Dauguschies, A., Böse, R., Marx, J., Teich, K. & Friedhoff, K. (2002). Development and application of a standardized assay for chemical disinfection of coccidia oocysts. *Veterinary Parasitology*, 103(4), 299–308.
- Dauguschies, A., & Najdrowski, M. (2005). Eimeriosis in Cattle: Current Understanding. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 52(10), 417–427.
- Decreto-Lei nº148-2008 de 29 de Julho. *Diário da República nº 145/2008 - 1ª série*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa. Capítulo I, artigo 3º, alínea bc.
- Decreto-Lei nº148-2008 de 29 de Julho. *Diário da República nº 145/2008 - 1ª série*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa. Capítulo I, artigo 8º, 1.

- De Graaf, D. C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L. M., Abbassi, H., & Peeters, J. E. (1999). A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *International Journal for Parasitology*, 29(8), 1269–1287.
- De Leeuw, W. A., & Cornelissen, J. B. W. J. (1993). Comparison of three enzyme immunoassays for diagnosis of *Dictyocaulus viviparus* infection. *Veterinary Parasitology*, 49(2–4), 229–241.
- De Waal, T. (2012). Advances in diagnosis of protozoan diseases. *Veterinary Parasitology*, 189(1), 65–74.
- Demeler, J., Van Zeveren, A. M. J., Kleinschmidt, N., Vercruyssen, J., Höglund, J., Koopmann, R., von Samson-Himmelstjerna, G. (2009). Monitoring the efficacy of ivermectin and albendazole against gastro intestinal nematodes of cattle in Northern Europe. *Veterinary Parasitology*, 160(1–2), 109–115.
- Dikmans, G., & Andrews, J. S. (1933). A Comparative Morphological Study of the Infective Larvae of the Common Nematodes Parasitic in the Alimentary Tract of Sheep. *Transactions of the American Microscopical Society*, 52(1), 1.
- Divers, T. J., & Peek, S. F. (2008). *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle* (2nd ed.). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Dobson, R. J., Barnes, E. H., Birclijin, S. D., & Gill, J. H. (1992). The survival of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in faecal culture as a source of bias in apportioning egg counts to worm species. *International Journal for Parasitology*, 22(7), 1005–1008.
- Dobson, R. J., Sangster, N. C., Besier, R. B., & Woodgate, R. G. (2009). Geometric means provide a biased efficacy result when conducting a faecal egg count reduction test (FECRT). *Veterinary Parasitology*, 161(1–2), 162–167.
- Doenhoff, M. J., Chiodini, P. L., & Hamilton, J. V. (2004). Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? *Trends in Parasitology*, 20(1), 35–39.
- Dorchies, P., Lacroux, C., Navetat, H., Rizet, C., Guéneau, E., Bisson, B., & Ferté, H. (2002). Trois cas d'une nouvelle entité pathologique: la paramphistomose larvaire chez les bovins. *BULLETIN-GTV*, (13), 17–20.
- Douglas, J. R., & Baker, N. F. (1968). Chemotherapy of Animal Parasites. *Annual Review of Pharmacology*, 8(1), 213–228.
- Eduardo, S. L. (1982). The taxonomy of the family Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring in ruminants. I. General considerations. *Systematic Parasitology*, 4(1), 7–57.
- Elitok, B., Elitok, Ö. M., & Pulat, H. (2005). Efficacy of Azithromycin Dihydrate in Treatment of Cryptosporidiosis in Naturally Infected Dairy Calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(4), 590–593.

- Eysker, M. (1997). The sensitivity of the Baermann method for the diagnosis of primary *Dictyocaulus viviparus* infections in calves. *Veterinary Parasitology*, 69(1–2), 89–93.
- Eysker, M., & Ploeger, H. W. (2000). Value of present diagnostic methods for gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Parasitology*, 120(07), 109–119.
- Faber, J.-E., Kollmann, D., Heise, A., Bauer, C., Failing, K., Bürger, H.-J., & Zahner, H. (2002). Eimeria infections in cows in the periparturient phase and their calves: oocyst excretion and levels of specific serum and colostrum antibodies. *Veterinary Parasitology*, 104(1), 1–17.
- Fayer, R. (2010). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, 124(1), 90–97.
- Fayer, R., & Ellis, W. (1993). Paromomycin is effective as prophylaxis for cryptosporidiosis in dairy calves. *The Journal of Parasitology*, 79(5), 771–774.
- Fiege, N., Klatte, D., Kollmann, D., Zahner, H., & Bürger, H.-J. (1992). Eimeria bovis in cattle: colostral transfer of antibodies and immune response to experimental infections. *Parasitology Research*, 78(1), 32–38.
- 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(1–2), 217–226.
- Fitzgerald, P. R. (1967). Results of continuous low-level inoculations with Eimeria bovis in calves. *American Journal of Veterinary Research*, 28(124), 659–665.
- Fitzpatrick, J. L. (2013). Global food security: The impact of veterinary parasites and parasitologists. *Veterinary Parasitology*, 195(3–4), 233–248.
- Forbes, A. B., Huckle, C. A., & Gibb, M. J. (2004). Impact of eprinomectin on grazing behaviour and performance in dairy cattle with sub-clinical gastrointestinal nematode infections under continuous stocking management. *Veterinary Parasitology*, 125(3–4), 353–364.
- Forbes, A. B., J. Verduyck, & Charlier, J. (2008). A survey of the exposure to *Ostertagia ostertagi* in dairy cow herds in Europe through the measurement of antibodies in milk samples from the bulk tank. *Veterinary Parasitology*, 157(1–2), 100–107.
- Fox, M. T. (1997). Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. *Veterinary Parasitology*, 72(3–4), 285–308.
- Garduño, R., Ortega, J., Hernández, G., García, J., & de Gives, P. (2010). The effect of sodium hypochlorite and a citric extract on the reduction of anthelmintic-resistant gastrointestinal nematodes in hair sheep. *Técnica Pecuaria En México*, 48(2), 179–187.
- Gasser, R. B. (2006). Molecular tools—advances, opportunities and prospects. *Veterinary Parasitology*, 136(2), 69–89.

- Geary, T. G., Hosking, B. C., Skuce, P. J., von Samson-Himmelstjerna, G., Maeder, S., Holdsworth, P., Vercruyse, J. (2012). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) Guideline: Anthelmintic combination products targeting nematode infections of ruminants and horses. *Veterinary Parasitology*, 190(1–2), 306–316.
- Gibbs, H. C. (1982). Gastrointestinal Nematodiasis in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 65(11), 2182–2188.
- Glenn, J. S., Baker, N. F., Franti, C. E., & Ver Steeg, J. D. (1982). Anthelmintic Treatment of Nonpastured Dairy Cows in California. *Journal of Dairy Science*, 65(10), 2006–2010.
- Gomes, C. A. V. de C. (2012). *Fasciolose em bovinos de engorda* (Tese de Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Gomes, M. J. S. da S. (2008). *Coccidioses em vitelos na região de Montemor-o-Velho* (Tese de Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Gonzalez-Lanza, C., Manga-Gonzalez, Y., Del-Pozo-Carnero, P., & Hidalgo-Argüello, R. (1989). Dynamics of elimination of the eggs of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in the faeces of cattle in the Porma Basin, Spain. *Veterinary Parasitology*, 34(1–2), 35–43.
- González-Warleta, M., Lladosa, S., Castro-Hermida, J. A., Martínez-Ibeas, A. M., Conesa, D., Muñoz, F., Mezo, M. (2013). Bovine paramphistomosis in Galicia (Spain): Prevalence, intensity, aetiology and geospatial distribution of the infection. *Veterinary Parasitology*, 191(3–4), 252–263.
- Gordon, H. M., & Whitlock, H. V. (1939). A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research*, 12, 50–52.
- Grinberg, A., Markovics, A., Galindez, J., Lopez-Villalobos, N., Kosak, A., & Tranquillo, V. M. (2002). Controlling the onset of natural cryptosporidiosis in calves with paromomycin sulphate. *Veterinary Record*, 151(20), 606–608.
- Gross, S. J., Ryan, W. G., & Ploeger, H. W. (1999). Anthelmintic treatment of dairy cows and its effect on milk production. *Veterinary Record*, 144(21), 581–587.
- Haug, A., Thebo, P., & Mattsson, J. G. (2007). A simplified protocol for molecular identification of *Eimeria* species in field samples. *Veterinary Parasitology*, 146(1–2), 35–45.
- Henriksen, S. A., & Pohlenz, J. F. (1980). Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 22(3-4), 594–596.
- Herd, R. P., Riedel, R. M., & Heider, L. E. (1980). Identification and epidemiologic significance of nematodes in a dairy barn. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 176(12), 1370–1372.
- Höglund, J., Dahlström, F., Engström, A., Hessle, A., Jakubek, E.-B., Schnieder, T., Sollenberg, S. (2010). Antibodies to major pasture borne helminth infections in bulk-

tank milk samples from organic and nearby conventional dairy herds in south-central Sweden. *Veterinary Parasitology*, 171(3–4), 293–299.

- Höglund, J., Dahlström, F., Sollenberg, S., & Hessle, A. (2013). Weight gain-based targeted selective treatments (TST) of gastrointestinal nematodes in first-season grazing cattle. *Veterinary Parasitology*.
- Holst, H., & Svensson, C. (1994). Changes in the blood composition of calves during experimental and natural infections with *Eimeria alabamensis*. *Research in Veterinary Science*, 57(3), 377–383.
- Holzhauer, M., Schaik, G. van, Saatkamp, H. W., & Ploeger, H. W. (2011). Lungworm outbreaks in adult dairy cows: estimating economic losses and lessons to be learned. *Veterinary Record*, 169(19), 494–494.
- Hooshmand-Rad, P., Svensson, C., & Ugglå, A. (1994). Experimental *Eimeria alabamensis* infection in calves. *Veterinary Parasitology*, 53(1–2), 23–32.
- Hopkins, W. G., Marshall, S. W., Batterham, A. M., & Hanin, J. (2009). Progressive statistics for studies in sports medicine and exercise science. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 41(1), 3–12.
- Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., Sandoval-Castro, C. A. (2012). Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary Parasitology*, 186(1–2), 18–27.
- Hoste, H., & Torres-Acosta, J. F. J. (2011). Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. *Veterinary Parasitology*, 180(1–2), 144–154.
- Hubert, J., & Kerboeuf, D. (1984). A new method for culture of larvae used in diagnosis of ruminant gastrointestinal strongylosis: comparison with fecal cultures. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 48(1), 63–71.
- Hubert, J., Kerboeuf, D., Cardinaud, B., Blond-Riou, F., & Fournier, R. (1997). Persistent efficacy of topical moxidectin against *Dictyocaulus viviparus* and *Ostertagia ostertagi*. *Veterinary Parasitology*, 68(1–2), 187–190.
- Hunt, E., Fu, Q., Armstrong, M. U., Rennix, D. K., Webster, D. W., Galanko, J. A., Rhoads, J. M. (2002). Oral Bovine Serum Concentrate Improves Cryptosporidial Enteritis in Calves. *Pediatric Research*, 51(3), 370–376.
- Imperiale, F., Sallovitz, J., Farias, C., Lifschitz, A., & Lanusse, C. (2009). Licking induced changes to the pattern of moxidectin milk elimination after topical treatment in dairy cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32(6), 534–540.
- INE. (2013). *Estatísticas Agrícolas 2012*. Instituto Nacional de Estadística, I. P.
- Iraqi, F. A., Behnke, J. M., Menge, D. M., Lowe, A. M., Teale, A. J., Gibson, J. P., Wakelin, D. R. (2003). Chromosomal regions controlling resistance to gastro-intestinal nematode infections in mice. *Mammalian Genome*, 14(3), 184–191.

- Jackson, F., & Miller, J. (2006). Alternative approaches to control—Quo vadit? *Veterinary Parasitology*, *139*(4), 371–384.
- Jarvie, B. D., Trotz-Williams, L. A., McKnight, D. R., Leslie, K. E., Wallace, M. M., Todd, C. G., Peregrine, A. S. (2005). Effect of Halofuginone Lactate on the Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and Growth of Neonatal Dairy Calves. *Journal of Dairy Science*, *88*(5), 1801–1806.
- Jex, A. R., Pangasa, A., Campbell, B. E., Whipp, M., Hogg, G., Sinclair, M. I., Gasser, R. B. (2008). Classification of *Cryptosporidium* Species from Patients with Sporadic Cryptosporidiosis by Use of Sequence-Based Multilocus Analysis following Mutation Scanning. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(7), 2252–2262.
- Jirků, M., Valigurová, A., Koudela, B., Křížek, J., & Modrý, D. (2008). New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitologica*, *(55)*, 81–94.
- Johnson, M. ., Behnke, J. ., & Coles, G. (1996). Detection of gastrointestinal nematodes by a coproantigen capture ELISA. *Research in Veterinary Science*, *60*(1), 7–12.
- Johnston, S. P., Ballard, M. M., Beach, M. J., Causer, L., & Wilkins, P. P. (2003). Evaluation of Three Commercial Assays for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* Organisms in Fecal Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(2), 623–626.
- Kader, N. M. A. E., Blanco, M.-A., Ali-Tammam, M., Ghaffar, A. E. R. B. A. E., Osman, A., Sheikh, N. E., Fuentes, I. de. (2012). Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* in human patients in Cairo, Egypt. *Parasitology Research*, *110*(1), 161–166.
- Keus, A., Kloosterman, A., & Van den Brink, R. (1981). Detection of antibodies to *Cooperia* ssp. and *Ostertagia* ssp. in calves with the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Veterinary Parasitology*, *8*(3), 229–236.
- Klockiewicz, M., Kaba, J., Tomczuk, K., Janecka, E., Sadzikowski, A. B., Rypuła, K., Małecki-Tepicht, J. (2007). The Epidemiology of Calf Coccidiosis (*Eimeria* spp.) in Poland. *Parasitology Research*, *101*(1), 121–128.
- Kloosterman, A., Verhoeff, J., Ploeger, H. W., & Lam, T. J. G. M. (1993). Antibodies against nematodes in serum, milk and bulk milk samples as possible estimators of infection in dairy cows. *Veterinary Parasitology*, *47*(3–4), 267–278.
- Knox, M. R., Besier, R. B., Le Jambre, L. F., Kaplan, R. M., Torres-Acosta, J. F. J., Miller, J., & Sutherland, I. (2012). Novel approaches for the control of helminth parasites of livestock VI: Summary of discussions and conclusions. *Veterinary Parasitology*, *186*(1–2), 143–149.
- Kuhnert-Paul, Y., Bangoura, B., Dittmar, K., Dauschies, A., & Schmäschke, R. (2012). Cryptosporidiosis: comparison of three diagnostic methods and effects of storage temperature on detectability of cryptosporidia in cattle faeces - Springer. *Parasitology Research*. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s00436-011-2813-6/fulltext.html>

- Larsen, M. (2000). Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology*, 120(07), 121–131.
- Larsson, A., Uggla, A., Waller, P. J., & Höglund, J. (2011). Performance of second-season grazing cattle following different levels of parasite control in their first grazing season. *Veterinary Parasitology*, 175(1–2), 135–140.
- Lassen, B., Viltrop, A., & Jarvis, T. (2009). Herd factors influencing oocyst production of *Eimeria* and *Cryptosporidium* in Estonian dairy cattle. *Parasitology Research*, 105(5), 1211–1222.
- Lefay, D., Naciri, M., Poirier, P., & Chermette, R. (2001). Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in suckling calves. *Veterinary Record*, 148(4), 108–112.
- Levecke, B., De Wilde, N., Vandenhoute, E., & Vercruyssen, J. (2009). Field Validity and Feasibility of Four Techniques for the Detection of *Trichuris* in Simians: A Model for Monitoring Drug Efficacy in Public Health? *PLoS Negl Trop Dis*, 3(1), e366.
- Lichtenfels, J. R., Hoberg, E. P., & Zarlenga, D. S. (1997). Systematics of gastrointestinal nematodes of domestic ruminants: advances between 1992 and 1995 and proposals for future research. *Veterinary Parasitology*, 72(3–4), 225–245.
- Lightowers, M. ., Colebrook, A. ., Gauci, C. ., Gauci, S. ., Kyngdon, C. ., Monkhouse, J., Sato, C. (2003). Vaccination against cestode parasites: anti-helminth vaccines that work and why. *Veterinary Parasitology*, 115(2), 83–123.
- Madeira de Carvalho, L. (2001). *Epidemiologia e controlo da estrogilidose em diferentes sistemas de produção equina em Portugal* (Tese de doutoramento). Faculdade de Medicina Veterinária Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Madeira de Carvalho, L. M., Martins, S., Sousa, S., Bacelar, J., & Cannas da Silva, J. (2011). *Cryptosporidium* spp. główny czynnik wywołujący biegunki u cieląt. Epidemiologia i kontrola przy użyciu mlecza halofuginonu w Portugalii. *Lecznica Dużych Zwierząt. Ogólnopolski Kwartalnik dla Lekarzy Weterynarii* 6(2).
- Mage, C., Bourgne, H., Toullieu, J.-M., Rondelaud, D., & Dreyfuss, G. (2002). *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. *Veterinary Research*, 33(5), 439–447.
- Mage, C., & Dorchies, P. (1998). Paramphistomose des bovins: etude des relations coproscopie-populations parasitaires. *Revue de médecine vétérinaire*, 149(10), 927–929.
- Mahieu, M., & Aumont, G. (2009). Effects of sheep and cattle alternate grazing on sheep parasitism and production. *Tropical Animal Health and Production*, 41(2), 229–239.
- Mañes, A. M., & Vázquez, F. A. R. (2002). Tricostrogilidosis y otras nematodosis. In *PARASITOLOGIA VETERINARIA* (3^a ed., pp. 237–253). Madrid: McGraw-Hill Interamericana.

- Mañes, A. M., & Vázquez, F. A. R. (2013). *60 Q&A sobre parasitología bovina Libro de preguntas y respuestas* (1^a ed.). Zaragoza: Servet.
- Marshall, R. J., & Flanigan, T. P. (1992). Paromomycin Inhibits Cryptosporidium Infection of a Human Enterocyte Cell Line. *Journal of Infectious Diseases*, *165*(4), 772–774.
- Martins, S. I. (1997). *Contribution for the knowledge of epidemiology of cattle Cryptosporidiosis in Barcelos county. Comparison of diagnostic techniques* (Tese de Mestrado). Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa.
- Martins, S., Sousa, S., Madeira de Carvalho, L. M., Bacellar, J., & Cannas da Silva, J. (2007). Prevalence of Cryptosporidium parvum Infection in Northwest Portugal Dairy Calves and Efficacy of Halofuginone Lactate on the Prevention of Cryptosporidiosis. *Cattle Practice*, *15*(2), 152–156.
- Matjila, P. T., & Penzhorn, B. L. (2002). Occurrence and diversity of bovine coccidia at three localities in South Africa. *Veterinary Parasitology*, *104*(2), 93–102.
- McMurtry, L. W., Donaghy, M. J., Vlassoff, A., & Douch, P. G. C. (2000). Distinguishing morphological features of the third larval stage of ovine Trichostrongylus spp. *Veterinary Parasitology*, *90*(1–2), 73–81.
- McPherson, W., Gogolewski, R., Slacek, B., Familton, A., Gross, S., Maciel, A., & Ryan, W. (2001). Effect of a peri-parturient eprinomectin treatment of dairy cows on milk production. *New Zealand Veterinary Journal*, *49*(3), 106–110.
- Mejía, M. E., Perri, A. F., Licoff, N., Miglierina, M. M., Cseh, S., Ornstein, A. M., Lacau-Mengido, I. M. (2011). Comparison of three methods for gastrointestinal nematode diagnosis determination in grazing dairy cattle in relation to milk production. *Veterinary Parasitology*, *183*(1–2), 174–177.
- Mes, T. H. M., Ploeger, H. W., Terlouw, M., Kooyman, F. N. J., Van Der Ploeg, M. P. J., & Eysker, M. (2001). A novel method for the isolation of gastro-intestinal nematode eggs that allows automated analysis of digital images of egg preparations and high throughput screening. *Parasitology*, *123*(03), 309–314.
- Michel, J. F., & Mackenzie, A. (1965). Duration of the acquired resistance of calves to infection with Dictyocaulus viviparus. *Research in Veterinary Science*, *6*, 344–395.
- Michel, J. F., Richards, M., Altman, J. F., Mulholland, J. R., Gould, C. M., & Armour, J. (1982). Effect of anthelmintic treatment on the milk yield of dairy cows in England, Scotland and Wales. *Veterinary Record*, *111*(24), 546–550.
- Mohammed, H. O., Wade, S. E., & Schaaf, S. (1999). Risk factors associated with Cryptosporidium parvum infection in dairy cattle in southeastern New York State. *Veterinary Parasitology*, *83*(1), 1–13.
- Monis, P. . (1999). Invited review The importance of systematics in parasitological research. *International Journal for Parasitology*, *29*(3), 381–388.

- Mottier, M. de L., & Prichard, R. K. (2008). Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. *Pharmacogenetics and Genomics*, (18), 129–140.
- Mundt, H.-C., Bangoura, B., Mengel, H., Keidel, J., & Dauschies, A. (2005). Control of clinical coccidiosis of calves due to *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* with toltrazuril under field conditions. *Parasitology Research*, 97(1), S134–S142.
- Naciri, M., Mancassola, R., Yvoré, P., & Peeters, J. E. (1993). The effect of halofuginone lactate on experimental *Cryptosporidium parvum* infections in calves. *Veterinary Parasitology*, 45(3–4), 199–207.
- Nicholls, J., & Obendorf, D. L. (1994). Application of a composite faecal egg count procedure in diagnostic parasitology. *Veterinary Parasitology*, 52(3–4), 337–342.
- Nødtvedt, A., Dohoo, I., Sanchez, J., Conboy, G., DesCôteaux, L., & Keefe, G. (2002). Increase in milk yield following eprinomectin treatment at calving in pastured dairy cattle. *Veterinary Parasitology*, 105(3), 191–206.
- O' Farrell, K., Downey, N. E., & Sherington, J. (1986). The effect of anthelmintic treatment at calving on the subsequent milk-production characteristics of dairy cows. *Irish Veterinary Journal*, 40(7-8), 116–123.
- Ortolani, E. L., & Castro Soares, P. (2003). Aspectos epidemiológicos de la criptosporidiosis en becerros de rebaños lecheros. *Parasitología Latinoamericana*, 58(3-4), 122–127.
- Paraud, C., Pors, I., Journal, J. P., Besnier, P., Reisdorffer, L., & Chartier, C. (2011). Control of cryptosporidiosis in neonatal goat kids: Efficacy of a product containing activated charcoal and wood vinegar liquid (Obioneck®) in field conditions. *Veterinary Parasitology*, 180(3–4), 354–357.
- Pereira da Fonseca, I. M. S. (2000). *Contribution for the study of Animal Cryptosporidiosis in Portugal: Genetic characterization of Cryptosporidium parvum isolates of bovine origin. (In Portuguese)* (Tese de doutoramento). Faculdade de Medicina Veterinária Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Pereira da Fonseca, I. M. S., & Cannas da Silva, J. (2000). Bovine Cryptosporidiosis: Epidemiological study in Portugal. *XXI World Congress of Buiatria, Punta Del Este, Uruguay, 4th-8th Decembe*, 3.
- Perri, A. F., Mejía, M. E., Licoff, N., Lazaro, L., Miglierina, M., Ornstein, A., Lacau-Mengido, I. M. (2011). Gastrointestinal parasites presence during the peripartum decreases total milk production in grazing dairy Holstein cows. *Veterinary Parasitology*, 178(3–4), 311–318.
- Perry, B. ., & Randolph, T. (1999). Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals. *Veterinary Parasitology*, 84(3–4), 145–168.
- Ploeger, H. W. (2002). *Dictyocaulus viviparus*: re-emerging or never been away? *Trends in Parasitology*, 18(8), 329–332.

- Ploeger, H. W., & Holzhauer, M. (2012). Failure to eradicate the lungworm *Dictyocaulus viviparus* on dairy farms by a single mass-treatment before turnout. *Veterinary Parasitology*, *185*(2–4), 335–338.
- Ploeger, H. W., Schoenmaker, G. J. W., Kloosterman, A., & Borgsteede, F. H. M. (1989). Effect of anthelmintic treatment of dairy cattle on milk production related to some parameters estimating nematode infection. *Veterinary Parasitology*, *34*(3), 239–253.
- Ploeger, H. W., Verbeek, P. C., Dekkers, C. W. H., Strube, C., Van Engelen, E., Uiterwijk, M., Holzhauer, M. (2012). The value of a bulk-tank milk ELISA and individual serological and faecal examination for diagnosing (sub)clinical *Dictyocaulus viviparus* infection in dairy cows. *Veterinary Parasitology*, *184*(2–4), 168–179.
- Portaria 638/2009 de 9 de Junho. *Diário da República n°111/2009 – 1ª série*. Lisboa. Capítulo I, artigo 2º, alíneas a),c) e e).
- Pritchard, G. (2001). Milk antibody testing in cattle. *In Practice*, *23*(9), 542–549.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (2007). Diseases associated with helminth parasites. In *Veterinary Medicine* (10^a ed., pp. 1541–1554). China: Saunders Elsevier.
- Ramos, J. C. dos S. (2013). *Avaliação das parasitoses gastrointestinais em bovinos de raça brava durante a primavera e verão* (Tese de Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Rapsch, C., Schweizer, G., Grimm, F., Kohler, L., Bauer, C., Deplazes, P., Torgerson, P. R. (2006). Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *International Journal for Parasitology*, *36*(10-11), 1153–1158.
- RCV/FAO. (2014a, January 29). Cattle lungworm larvae: *Dictyocaulus*. *The RCV/FAO Guide to Veterinary Diagnostic Parasitology*. Retrieved January 29, 2014, from http://www.rvc.ac.uk/review/parasitology/RuminantL3/ID_Overview.htm
- RCV/FAO. (2014b, January 29). Ruminant L3: Identification key. *The RCV/FAO Guide to Veterinary Diagnostic Parasitology*. Retrieved January 29, 2014, from http://www.rvc.ac.uk/review/parasitology/RuminantL3/ID_Overview.htm
- Redman, D. R., & Fox, J. E. (1994). The effect of varying levels of DECCOX on experimental *Cryptosporidia* infections in Holstein bull calves. *American Association of Bovine Practitioners. Convention, (no. 26th) p. 157-159*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=1996/US/US96239.xml;US9558671>
- Reichel, M. P., Vanhoff, K., & Baxter, B. (2005). Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay performed in milk for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in cattle. *Veterinary Parasitology*, *129*(1–2), 61–66.
- Reinemeyer, C. R. (1995). Should you deworm your clients' dairy cattle? *Veterinary Medicine*, *90*(5), 496, 498–502.

- Rieu, E., Recca, A., Bénet, J. J., Saana, M., Dorchies, P., & Guillot, J. (2007). Reliability of coprological diagnosis of *Paramphistomum* sp. infection in cows. *Veterinary Parasitology*, *146*(3–4), 249–253.
- Rinaldi, L., Perugini, A. G., Capuano, F., Fenizia, D., Musella, V., Veneziano, V., & Cringoli, G. (2005). Characterization of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA of *Calicophoron daubneyi* from various hosts and locations in southern Italy. *Veterinary Parasitology*, *131*(3–4), 247–253.
- Rinaldi, M., & Geldhof, P. (2012). Immunologically based control strategies for ostertagiosis in cattle: where do we stand? *Parasite Immunology*, *34*(5), 254–264.
- Roberts, F., & O’Sullivan, P. (1950). Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, *1*(1), 99–102.
- Rochfort, S., Parker, A. J., & Dunshea, F. R. (2008). Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*, *69*(2), 299–322.
- Roeber, F., Jex, A. R., & Gasser, R. B. (2013). Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. *Biotechnology Advances*.
- Romero, J., Sanabria, R., Travería, G., Di Paolo, L., & Peralta, L. (2013). Metaphylactic effect of Diclazuril 0.25% in suckling beef calves, during a coccidiosis outbreak in extensive farming. *Veterinary Parasitology*, *193*(1–3), 277–280.
- Sanchez, J., Dohoo, I., Markham, F., Leslie, K., & Conboy, G. (2002). Evaluation of the repeatability of a crude adult indirect *Ostertagia ostertagi* ELISA and methods of expressing test results. *Veterinary Parasitology*, *109*(1–2), 75–90.
- Sanchez, J., Dohoo, I., Carrier, J., & DesCôteaux, L. (2004). A meta-analysis of the milk-production response after anthelmintic treatment in naturally infected adult dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, *63*(3–4), 237–256.
- Sanchez, J., Dohoo, I., Leslie, K., Keefe, G., Markham, F., & Sithole, F. (2005). The use of an indirect *Ostertagia ostertagi* ELISA to predict milk production response after anthelmintic treatment in confined and semi-confined dairy herds. *Veterinary Parasitology*, *130*(1–2), 115–124.
- Sanchez, J., Dohoo, I., Nødtvedt, A., Keefe, G., Markham, F., Leslie, K., Campbell, J. (2002). A longitudinal study of gastrointestinal parasites in Canadian dairy farms: The value of an indirect *Ostertagia ostertagi* ELISA as a monitoring tool. *Veterinary Parasitology*, *107*(3), 209–226.
- Sanchez, J., Markham, F., Dohoo, I., Sheppard, J., Keefe, G., & Leslie, K. (2004). Milk antibodies against *Ostertagia ostertagi*: relationships with milk IgG and production parameters in lactating dairy cattle. *Veterinary Parasitology*, *120*(4), 319–330.
- Sanchez, J., Nødtvedt, A., Dohoo, I., & DesCôteaux, L. (2002). The effect of eprinomectin treatment at calving on reproduction parameters in adult dairy cows in Canada. *Preventive Veterinary Medicine*, *56*(2), 165–177.

- Sánchez, R. O., Romero, J. R., & Founroge, R. D. (2008). Dynamics of *Eimeria* oocyst excretion in dairy calves in the Province of Buenos Aires (Argentina), during their first 2 months of age. *Veterinary Parasitology*, *151*(2–4), 133–138.
- Santín, M., Trout, J. M., & Fayer, R. (2008). A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology*, *155*(1–2), 15–23.
- Sargison, N. D., Jackson, F., Bartley, D. J., Wilson, D. J., Stenhouse, L. J., & Penny, C. D. (2007). Observations on the emergence of multiple anthelmintic resistance in sheep flocks in the south-east of Scotland. *Veterinary Parasitology*, *145*(1–2), 65–76.
- Sekiya, M., Zintl, A., & Doherty, M. (2013). Bulk milk ELISA and the diagnosis of parasite infections in dairy herds: a review. *Irish Veterinary Journal*, *66*(1), 14.
- Shahiduzzaman, M., & Dauschies, A. (2012). Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. *Veterinary Parasitology*, *188*(3–4), 203–214.
- Shirley, D.-A. T., Moonah, S. N., & Kotloff, K. L. (2012). Burden of disease from cryptosporidiosis: *Current Opinion in Infectious Diseases*, *25*(5), 555–563.
- Shoop, W. L., Egerton, J. R., Eary, C. H., Haines, H. W., Michael, B. F., Mrozik, H., ... Turner, M. J. (1996). Eprinomectin: A novel avermectin for use as a topical endectocide for cattle. *International Journal for Parasitology*, *26*(11), 1237–1242.
- Silva Leitão. (1983). *Parasitoses do bovinos em Portugal e seu combate*. Mem Martins: Publicações Europa-América.
- Silverlås, C., & Blanco-Penedo, I. (2013). *Cryptosporidium* spp. in calves and cows from organic and conventional dairy herds. *Epidemiology & Infection*, *141*(03), 529–539.
- Silvestre, A., Sauve, C., & Cabaret, J. (2000). Caprine Paramphistomum daubneyi (Trematoda) infection in Europe. *Veterinary Record*, *146*(23), 674–675.
- SIMPOSIUMVET.PT. (2014, July 1). Medicamentos veterinários. *Associação dos produtores de leite de Portugal*. Retrieved August 2, 2013, from <http://www.simposiumvet.pt/Especialidades/EspecialidadeSearch>
- Simpson, H. V. (2000). Pathophysiology of Abomasal Parasitism: Is the Host or Parasite Responsible? *The Veterinary Journal*, *160*(3), 177–191.
- Sithole, F., Dohoo, I., Leslie, K., DesCôteaux, L., Godden, S., Campbell, J., Sanchez, J. (2005). Effect of Eprinomectin Treatment at Calving on Milk Production in Dairy Herds with Limited Outdoor Exposure. *Journal of Dairy Science*, *88*(3), 929–937.
- Sithole, F., Dohoo, I., Markham, F., & Sanchez, J. (2005). Assessing the agreement between *Ostertagia ostertagi* ELISA tests performed using the crude adult antigen and the adult and larval stage 4 excretory/secretory antigens. *Veterinary Parasitology*, *134*(1–2), 147–152.
- Smith, S. B., & Gibbs, H. C. (1981). Effects of naturally acquired mixed helminth parasitism in yearling dairy calves. *American Journal of Veterinary Research*, *42*(6), 1064–1072.

- Smith, W. D. (2008). Recent vaccine related studies with economically important gastrointestinal nematode parasites of ruminants. *Tropical Biomedicine*, 25, 50–55.
- Sorci, G., & Garnier, S. (2008). Parasitism. In S. E. Jørgensen & B. D. Fath (Eds.), *Encyclopedia of Ecology* (pp. 2645–2650). Oxford: Academic Press. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080454054008144>
- Sordillo, L. M., Contreras, G. A., & Aitken, S. L. (2009). Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Animal Health Research Reviews*, 10(01), 53–63.
- Spence, S., Fraser, G., & Chang, S. (1996). Responses in milk production to the control of gastrointestinal nematode and paramphistome parasites in dairy cattle. *Australian Veterinary Journal*, 74(6), 456–459.
- Stilwell, G. (2013). *Clínica de Bovinos*. Lisboa: Edição especial para a Bayer.
- Stromberg, B. E., & Gasbarre, L. C. (2006). Gastrointestinal Nematode Control Programs with an Emphasis on Cattle. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 22(3), 543–565.
- Sutherland, I. A., & Leathwick, D. M. (2011). Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? *Trends in Parasitology*, 27(4), 176–181.
- Taylor, M. A., & Catchpole, J. (1994). Coccidiosis of domestic ruminants. *Applied Parasitology*, 35(2), 73–86.
- Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2007). *Veterinary Parasitology* (3^a ed.). Oxford UK: Blackwell publishing.
- Taylor, M. A., Hunt, K. R., & Goodyear, K. L. (2002). Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology*, 103(3), 183–194.
- Taylor, S. M., & Andrews, A. H. (2004). Endoparasites. In *Bovine medicine diseases and husbandry of cattle* (2^a ed., pp. 267–284). Oxford UK: Blackwell Science.
- Thomas, R. J., & Rowlinson, P. (1981). An Evaluation of Anthelmintic Treatment in a Dairy Herd. In P. Nansen, R. J. Jørgensen, & E. J. L. Soulsby (Eds.), *Epidemiology and Control of Nematodiasis in Cattle* (pp. 101–116). Springer Netherlands. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-8311-3_11
- Uriarte, J., & Calvete, C. (2012). El cambio climático modifica la epidemiología de los nematodos gastrointestinales. *Portal Veterinária Albeitar*, 44, 6–8.
- Uriarte, J., Miro, G., Meana, A., & Rojo-Vazquez, F. A. (1993, March). Biología y Epidemiología. *Ovis Aula Veterinaria*, (25), 21–37.
- Van der Voort, M., Charlier, J., Lauwers, L., Vercruyssen, J., Van Huylenbroeck, G., & Van Meensel, J. (2013). Conceptual framework for analysing farm-specific economic effects of helminth infections in ruminants and control strategies. *Preventive Veterinary Medicine*, 109(3–4), 228–235.

- Van Wyk, J. ., Cabaret, J., & Michael, L. (2004). Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. *Veterinary Parasitology*, *119*(4), 277–306.
- Vanderstichel, R., Dohoo, I., Sanchez, J., & Conboy, G. (2012). Effects of farm management practices and environmental factors on bulk tank milk antibodies against gastrointestinal nematodes in dairy farms across Canada. *Preventive Veterinary Medicine*, *104*(1–2), 53–64.
- Vanderstichel, R., Dohoo, I., Sanchez, J., Sithole, F., Keefe, G., & Stryhn, H. (2013). Predicting the effect of anthelmintic treatment on milk production of dairy cattle in Canada using an *Ostertagia ostertagi* ELISA from individual milk samples. *Preventive Veterinary Medicine*, *111*(1–2), 63–75.
- Vercruyse, J., & Claerebout, E. (1997). Immunity development against *Ostertagia ostertagi* and other gastrointestinal nematodes in cattle. *Veterinary Parasitology*, *72*(3–4), 309–326.
- Vercruyse, J., & Claerebout, E. (2001). Treatment vs non-treatment of helminth infections in cattle: defining the threshold. *Veterinary Parasitology*, *98*(1–3), 195–214.
- Vicente, F. S., & Martín, F. S. (2002). Nematodos. In *Parasitologia Veterinaria* (3^a ed., pp. 113–123). Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Villacorta, I., Peeters, J. E., Vanopdenbosch, E., Ares-Mazás, E., & Theys, H. (1991). Efficacy of halofuginone lactate against *Cryptosporidium parvum* in calves. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *35*(2), 283–287.
- Villanúa, D., Pérez-Rodríguez, L., Gortázar, C., Höfle, U., & Viñuela, J. (2006). Avoiding bias in parasite excretion estimates: the effect of sampling time and type of faeces. *Parasitology*, *133*(02), 251.
- Waller, P. J. (2006). From discovery to development: Current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. *Veterinary Parasitology*, *139*(1–3), 1–14.
- Waller, P. J., & Thamsborg, S. M. (2004). Nematode control in “green” ruminant production systems. *Trends in Parasitology*, *20*(10), 493–497.
- Walsh, T., Younis, P., & Morton, J. (1995). The effect of ivermectin treatment of late pregnant dairy cows in south-west Victoria on subsequent milk production and reproductive performance. *Australian Veterinary Journal*, *72*(6), 201–207.
- Wapenaar, W., Barkema, H. W., Eysker, M., & O’Handley, R. M. (2007). An outbreak of dictyocaulosis in lactating cows on a dairy farm. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *231*(11), 1715–1718.
- Watarai, S., Tana, & Koiwa, M. (2008). Feeding Activated Charcoal from Bark Containing Wood Vinegar Liquid (Nekka-Rich) Is Effective as Treatment for Cryptosporidiosis in Calves. *Journal of Dairy Science*, *91*(4), 1458–1463.

- Watkins, L. E., Wray, M. I., Basson, R. P., Feller, D. L., Olson, R. D., Fitzgerald, P. R., Davis, G. W. (1986). The prophylactic effects of monensin fed to cattle inoculated with coccidia oocysts. *Agri-Practice*, v. 7(6) p. 18-20. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=1987/US/US87100.xml;US8738010>
- Williams, J. C. (1986). Epidemiologic Patterns of Nematodiasis in Cattle. *The Veterinary Clinics of North America*, 2(2), 235–246.
- Williams, J. F., & Soulsby, E. J. L. (1970). Antigenic analysis of developmental stages of *Ascaris scum* I. comparison of eggs, larvae and adults. *Experimental Parasitology*, 27(1), 150–162.
- Wilson, P. (2011). Decomposing variation in dairy profitability: the impact of output, inputs, prices, labour and management. *The Journal of Agricultural Science*, 149(04), 507–517.
- Wimmer, B., Craig, B. ., Pilkington, J. ., & Pemberton, J. (2004). Non-invasive assessment of parasitic nematode species diversity in wild Soay sheep using molecular markers. *International Journal for Parasitology*, 34(5), 625–631.
- Woods, W. ., Whithear, K. ., Richards, D. ., Anderson, G. ., Jorgensen, W. ., & Gasser, R. . (2000). Single-strand restriction fragment length polymorphism analysis of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) for six species of *Eimeria* from chickens in Australia. *International Journal for Parasitology*, 30(9), 1019–1023.
- Woolaston, R. R. (1992). Selection of Merino sheep for increased and decreased resistance to *Haemonchus contortus*: Peri-parturient effects on faecal egg counts. *International Journal for Parasitology*, 22(7), 947–953.
- Yazwinski, T. A., Tucker, C., Copeland, S., Yazwinski, T., & Guerino, F. (1999). Dose confirmation of moxidectin pour-on against natural nematode infections in lactating dairy cows. *Veterinary Parasitology*, 86(4), 223–228.
- Zajac, A. M., & Conboy, G. A. (2012). *Veterinary clinical parasitology* (8^a ed.). West Sussex: Wiley-Blackwell.
- Zanton, G. I., & Heinrichs, A. J. (2005). Meta-Analysis to Assess Effect of Prepubertal Average Daily Gain of Holstein Heifers on First-Lactation Production*. *Journal of Dairy Science*, 88(11), 3860–3867.

6-Anexos

A1- Contagens de ovos fecais (OPG) através do método de McMaster, técnica de flutuação e de sedimentação (Madeira de Carvalho, 2001).

Material utilizado:

- Amostra de fezes,
- Luvas de látex,
- Sacos de plástico e luvas de palpação rectal,
- Tubos de ensaio,
- Suporte para tubos de ensaio,
- Câmara de McMaster,
- Copo graduado de 100 ml,
- Goblet de 100 ml,
- Copos de plástico de café,
- Copos de plástico altos,
- Passador de rede,
- Vareta de vidro,
- Lâminas,
- Lamelas,
- Colher,
- Balança ou seringa de 20 ml,
- Solução saturada de açúcar 25 % (250 g de açúcar para 1 l de água),
- Microscópio óptico.

Exclusivo da técnica de sedimentação simples

- Pipeta de Pasteur,
- Azul-de-metileno.

Técnica:

Esta técnica, utilizada em conformidade com o protocolo existente no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária, associa numa execução única e contínua, técnicas qualitativas e quantitativas (Flutuação, McMaster e Sedimentação), diminuindo o período de análise e a quantidade de amostra necessária. Assim existe um procedimento comum para as três técnicas e outros exclusivos de cada técnica que serão apresentados em seguida:

- Medir 56 ml de solução saturada num copo graduado.
- Pesar 4 g de fezes numa balança ou recolher 4 ml de fezes com uma seringa.
- Num copo graduado, adicionar solução saturada até perfazer um volume de 56 ml.

- Homogeneizar bem com uma vareta de vidro as fezes na solução saturada.
- Filtrar com a ajuda de um funil para um goblet.

Contagem de ovos fecais em câmara de McMaster:

- Preencher a câmara de McMaster (ambas as células) com a solução, deixar repousar 3 minutos e observar ao microscópico óptico (M.O.). A contagem dos ovos é efectuada na totalidade nas duas células, multiplicando-se o número de ovos por 50 para obter o número de ovos por grama de fezes (OPG). O limiar de detecção é 50 OPG.

Técnica de flutuação:

- Encher um tubo de ensaio, com o restante da diluição das fezes, até formar um menisco convexo e colocar de imediato uma lamela a tapá-lo.
- Esperar cerca de 15 minutos, tempo necessário para que os ovos menos denso flutuem na solução saturada e contactem com a lamela.
- Retirar a lamela, colocá-la numa lâmina e observar ao M.O.

Técnica de sedimentação simples:

- O restante que se encontra no tubo de ensaio deverá ser deixado a repousar até formar sedimento.
- Após esse período rejeita-se o sobrenadante, deixando apenas o sedimento dentro do tubo de ensaio.
- Retira-se com uma pipeta de Pasteur várias gotas de sedimento para uma lâmina, colocam-se uma a duas gotas azul-de-metileno cobre-se com uma lamela.
- Observa-se ao M.O. com uma ampliação de 100 X e procura-se identificar por ovos elípticos alongados de coloração doirada sobre um fundo azul.

A2- Método de Baermann (Alho *et al.*, 2013).

Material utilizado:

- Amostra de fezes,
- Gazes,
- Clips,
- Colher,
- Copos,
- Pipeta de Pasteur,
- Lâmina,
- Lamela,
- Água,
- Microscópio óptico.

Técnica:

- Encher os copos com água da torneira preferencialmente tépida.
- Colocar em meia gaze dobrada ao meio, uma colher com cerca de 10 g de fezes, preferencialmente frescas.
- Envolver as fezes com a gaze.
- Com um clip prender a gaze na borda do copo, por forma a ter as fezes cobertas com água e sem contactarem com o fundo.
- Deixar repousar por 24 horas.
- Recolher o sedimento com pipeta de Pasteur e colocá-lo entre lâmina e lamela.
- Observar ao microscópio em objectiva de 5x ou de 10x e pesquisar parasitas traqueobrônquicos.

A3- Técnica de Ziehl-Neelsen modificada (Martins *et al.*, 2007).

Material utilizado:

- Amostra de fezes,
- Vareta de vidro,
- Lâmina,
- Pipeta de Pasteur,
- Metanol,
- Óleo de imersão,
- Fucsina,
- Álcool clorídrico a 1%,
- Verde malaquite,
- Microscópio óptico,
- Água.

Técnica:

- Mergulhar uma das extremidades da vareta de vidro na amostra fecal.
- Rolar a vareta de vidro sobre uma lâmina por forma a fazer um esfregaço com uma camada fina de fezes.
- Deixar a lâmina de vidro a secar ao ar durante umas horas.
- Fixar o esfregaço fecal já bem seco, com metanol, durante 1 minuto.
- Cobrir a lâmina com fucsina básica fenicada durante 10 minutos.
- Lavar com água corrente da torneira.
- Descorar com álcool clorídrico a 1% até à eliminação total do corante em excesso.
- Lavar com água da torneira.

- Cobrir a lâmina com verde malaquite a 0,4% durante 30 segundos.
- Lavar novamente com água da torneira.
- Deixar secar à temperatura ambiente e observar ao M.O.
- A pesquisa de *Cryptosporidium* spp. ao M.O. é efectuada com a objectiva de 100x ou imersão e uma ampliação total de 1000x.

A4- Método de sedimentação pelo McMaster modificado (Conceição *et al.*, 2002).

Material utilizado:

- Amostra de fezes,
- Espátula,
- Colher,
- Balança,
- Detergente da loiça,
- Vareta de vidro,
- Goblet de 50 ml,
- Medidor de 100 ml,
- Gazes,
- Copo de boca larga de 1000 ml,
- Câmaras de McMaster,
- Microscópio óptico.

Técnica:

- Pesar 10 g de amostra de fezes.
- Colocar as 10 g num frasco de plástico ou vidro de 100 ml de capacidade e de boca larga.
- Juntar 60ml de solução detergente a 5%.
- Homogeneizar até que o material fecal se desagregue e forme uma suspensão.
- Filtrar a suspensão fecal através de um crivo de rede de cozinha e duas camadas de gaze, recolhendo o filtrado para um copo cónico de sedimentação de 1000 ml de capacidade, enchendo-o depois com água da torneira até perfazer os 1000 ml.
- Deixar sedimentar por 10 minutos e decantar.
- Repor a quantidade de 1000 ml novamente com água da torneira e deixar sedimentar por mais 10 minutos; esta operação deve se repetida mais 3 a 4 vezes ou até que o sobrenadante esteja límpido.
- Após a última lavagem passa-se o sedimento para um goblet graduado e repõe-se o contudo até 50 ml.

- Observar em câmara de McMaster ao microscópio óptico, com objetiva 10x e efetuar a contagem dos ovos de *Fasciola hepatica* ou outros elementos tremátodes que possam aparecer em 4 câmaras, ter o cuidado de observar e focar o fundo da câmara pois tratam-se de ovos pesados que sedimentam.
- Considera-se que, se não for observado pelo menos um ovo nessas 4 câmaras, a operação terá de ser efectuada em 8 para perfazer 5ml, volume que nos permite aumentar a sensibilidade do método até 1OPG.

A5- Coprocultura e identificação das larvas L3 (Madeira de Carvalho, 2001).

Material utilizado:

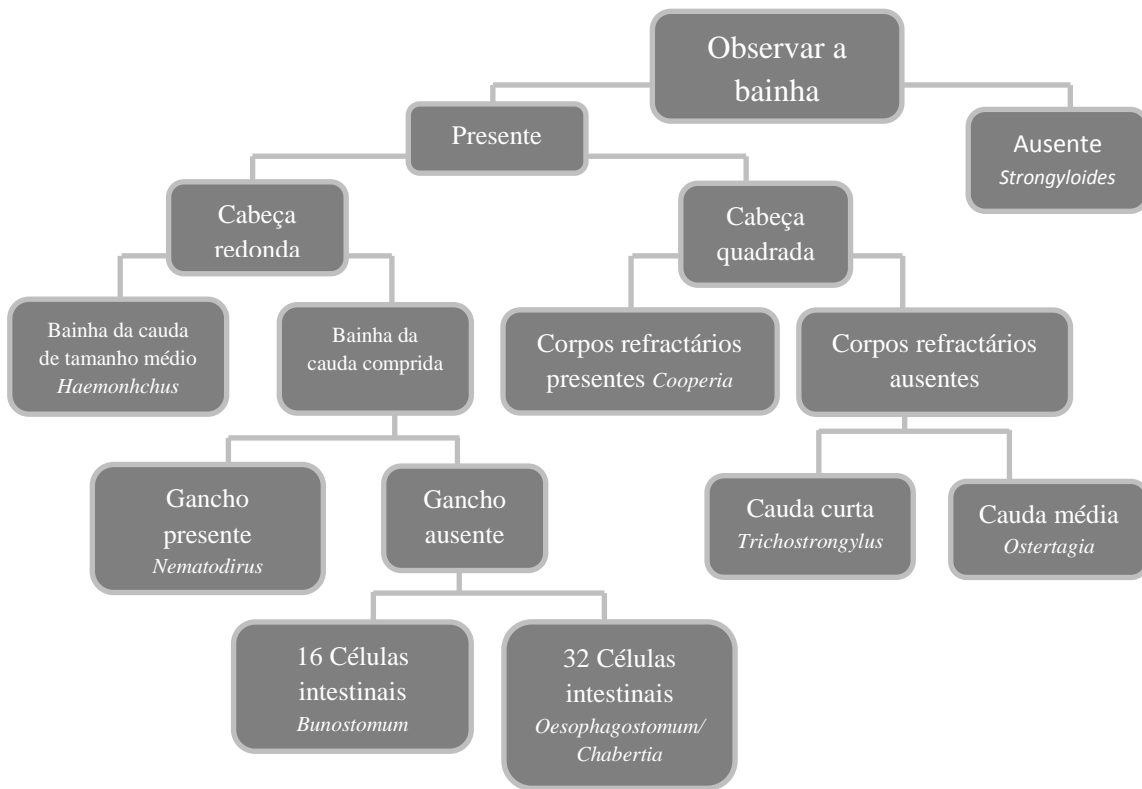
- Amostra de fezes,
- Colher,
- Espátula,
- Copo de plástico,
- Papel de alumínio,
- Vareta de vidro,
- Água,
- Tabuleiro alto,
- Estufa,
- Caneta de tinta plástica,
- Estilete,
- Placa de petri,
- Tubo de ensaio,
- Papel Parafilm[®],
- Suporte de tubos de ensaio.

Técnica:

- Pesar entre 60 a 100 g de fezes num copo de plástico limpo.
- Com uma vareta de vidro fazer um furo na amostra para aumentar a exposição da amostra ao ar e ao oxigénio.
- Identificar o copo e registar no mesmo o peso da amostra e a data de entrada na estufa.
- Cobrir o copo com papel de alumínio e com um estilete furar várias vezes o papel, para permitir a entrada de ar na amostra.
- Colocar o copo na vertical num tabuleiro alto e enchê-lo com um a dois centímetros de altura com água.
- Colocar na estufa durante 14 dias à temperatura de 21-24 °C com uma humidade relativa de 70-80 %.
- Após este período retirar o copo da estufa enchê-lo com água até ao topo, colocar uma placa de petri por cima e inverter todo o conteúdo.
- Preencher a placa de petri com 1,5-3 ml de água e colocá-la num plano ligeiramente inclinado por um período de 24 horas.
- Após este período recolher todo o líquido que se encontra na placa de petri para um tubo de ensaio através de um funil.
- Cobrir os tubo de ensaio com papel com Parafilm[®] e proceder à sua identificação.

- Colocar os tubos de ensaio no suporte de tubos de ensaio e armazená-los em refrigeração a 4-5 °C permitindo a conservação e a sedimentação das L3.
- A concentração das larvas ocorre naturalmente por sedimentação natural ou então é possível através da sua centrifugação a 1500 rpm durante 3 minutos.
- Pipetar o sedimento para uma lâmina, colocar uma lamela e proceder à pesquisa e identificação de larvas L3 ao M.O.

A6- Identificação das larvas L3 (RCV/FAO, 2014b).



A7- Inquérito aos produtores

Inquérito

Este inquérito insere-se num estudo de mestrado integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. É anónimo e pretende ser breve, servindo apenas como complemento à informação das análises parasitárias efectuadas anteriormente. Pedindo-se que as respostas sejam as mais directas e claras possíveis. Agradecendo desde já o tempo despendido no preenchimento deste inquérito e colaboração neste estudo.

Número de animais:

Nº de Vitelos

<1 mês _____ 1 mês < 6 meses _____ 6 meses < 1 ano _____

Nº de Novilhas

1 ano < 2 anos _____

Nº de vacas em Produção

Nº de vacas Secas

Protocolo de desparasitação:

Presente _____ Ausente _____

Se presente:

Qual o fármaco utilizado? _____ Injectável/ Pour-on _____

Quando é habitualmente utilizado? _____

Se ausente:

Porque não desparasitam? _____

Maneio

Tipo de alimentação:

Pastagem (Sim/Não)? _____

Se pastoreio presente:

Tipo de pastagem? _____

Pastoreio em parcelas (Sim/Não)? _____

Quais os animais em pastoreio (Novilhas/secas/produção)? _____

Os animais em pastoreio estão divididos em grupos (Sim/Não)? _____

Como estão divididos os grupos?_____

Qual o encabeçamento da exploração ou quantos animais tem por ha?

Existe regadio ou algum pivot?_____

Suplemento alimentar (Sim/Não)?_____

Com quê (concentrado/unifeed/ambos)?_____ Quantas vezes por dia?_____ Em que momentos do dia?_____

Se pastoreio ausente:

Unifeed:_____ Qual a composição?_____

Animais em grupos ou parques (Sim/Não)?_____

Como são organizados os grupos ou parques? Mesma idades e/ou fases produtivas_____

Vitelos

Instalações?_____

Desinfecção das instalações (presente/ausente)?_____

Qual o produto?_____

Água do leite de substituição dos vitelos (Furo, poço/água da rede)?_____

Tratamento dos vitelos com diarreia (Sim/Não)?_____

Qual o tratamento geralmente aplicado?_____