



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

FASCIIOLOSE EM BOVINOS DE ENGORDA

CATARINA ADRIANO VAZ DE CARVALHO GOMES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutor George Thomas Stilwell

Dr. Dário Alexandre Nunes de Sá Guerreiro

ORIENTADOR

Dr. Dário Alexandre Nunes de Sá Guerreiro

CO-ORIENTADOR

Doutor George Thomas Stilwell

2012

LISBOA

---



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

FASCIULOSE EM BOVINOS DE ENGORDA

CATARINA ADRIANO VAZ DE CARVALHO GOMES

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutor George Thomas Stilwell

Dr. Dário Alexandre Nunes de Sá  
Guerreiro

ORIENTADOR

Dr. Dário Alexandre Nunes de Sá Guerreiro

CO-ORIENTADOR

Doutor George Thomas Stilwell

2012

LISBOA

---



*“Concedei-nos, Senhor, serenidade para aceitar as coisas que não podemos fazer,  
coragem para fazer as que podemos e sabedoria para as distinguir”  
Pensamento adaptado de Reinhold Niebuhr*

*Aos meus Pais, por tudo.*



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Dário Guerreiro, por me ter recebido, pela dedicação e gosto por ensinar e principalmente pelo amor contagiante que tem por esta profissão.

Ao Professor Doutor George Stilwell por me ter proporcionado este estágio, pela sua pedagogia e disponibilidade.

Ao Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, pelo incentivo e preocupação.

Ao Professor Doutor Telmo Nunes, por me guiar no mundo da estatística.

À Dra. Lídia Gomes, pelo apoio durante estes meses. Por me incentivar nos momentos mais desesperantes e fazer acreditar que até eu poderia parasitologista!

Aos colegas e amigos de laboratório, que tornam os dias monótonos de trabalho em convívios de amigos.

Ao Dr. Jaime Sanchís e à Dra. Cristiana Cazapal por me terem integrado na sua equipa e pela boa disposição.

À Ana por fazer com que as ações do ADS não fossem só trabalho e ao Sr. César por pacientemente me ensinar a arte de tirar sangue.

Ao Sr. Ismael Chula e ao seu filho Tiago Ribeiro, por toda a disponibilidade para a realização deste estudo.

À Prodivet-Zn em Portugal, por ter gentilmente cedido o fármaco Closamectin FF® para ser utilizado neste estudo.

A todos os produtores que tive o prazer de conhecer durante este estágio, pela confiança que depositaram em mim.

Ao Hugo e a Cláudia... Por fazerem parte do Grupinho Maravilha.

À Inês Moura, por ter sido mais que amiga numa cidade distante.

A todos os meus amigos da Turma D, por fazerem destes últimos 6 anos, os melhores da minha vida.

Aos meus amigos da Faculdade, que sempre tiveram um sorriso para mim.

À VETuna pela amizade e camaradagem.

Aos meus pais pela sua paciência, confiança e apoio incondicional.

À minha família por acreditar sempre em mim.

Ao Meu Miguel por estar a meu lado.

Aos meus amigos, por me ajudarem a não ser só estudante.

À família da Moita, pela companhia e amizade.

Um muito obrigado a todos os que me apoiaram ao longo destes anos.



## RESUMO

**Gomes, C. A. V. C.** 2012. *Fasciolose em Bovinos de Engorda*

A produção animal representa um papel crucial na economia de um país e é, por isso, muito importante garantir a sua rentabilização. Por vezes é descurada a importância de afeções como as parasitoses que têm grande influência na saúde e bem-estar animal.

Neste estudo foi avaliada a importância do tremátode *Fasciola hepatica* na engorda bovina, parasita hepático com ciclo heteroxeno, participando como hospedeiro intermediário o caracol *L. truncatula*. Este parasita causa lesões fibróticas no parênquima hepático levando à perda da sua função, diminuindo os níveis de produção e perdas diretas por reprovação do órgão em matadouro. Foi ainda objetivo deste estudo avaliar a importância da desparasitação contra esta parasitose num tipo de produção semi-intensivo e comparar a eficácia de dois princípios ativos – Closantel e Clorsulon.

Serviu de base para este estudo uma exploração de bovinos em regime semi-intensivo, localizada na região da Moita do Ribatejo, Portugal, considerada endémica de *F. hepatica*. Foram incluídos no estudo 19 bovinos machos com idades compreendidas entre os 9 e 25 meses aos quais se aplicou um único tratamento com os dois fármacos a ser testados. Foi recolhida uma amostra de fezes no dia da aplicação e duas amostras após tratamento com quinze dias de intervalo. Realizaram-se análises coprológicas: técnica de sedimentação simples e de McMaster Modificado; e análise serológica por ELISA indireto com uso da proteína recombinante APS. Foram inspecionados os dezanove fígados no momento do abate e uma amostra destes (n=5) analisada para deteção de fascíolas no seu parênquima.

Todas as amostras processadas com a técnica de sedimentação simples apresentaram resultados negativos. Por sua vez, com a técnica McMaster Modificado obtiveram-se 73,68% de resultados positivos na primeira amostra e uma diminuição para 31,58% na última amostra, obtendo-se uma Redução de Contagem de Ovos Fecais entre 90 e 95%. Na análise serológica obtiveram-se três resultados positivos. Quanto à inspeção dos fígados, 78,94% destes foram reprovados devido a fasciolose. Independentemente da eficácia do tratamento, o tempo que decorre desde a sua aplicação até ao abate não é suficiente para eliminar as lesões que são causa de reprovação a nível de matadouro. Assim, conclui-se que o mais importante é prevenir a infeção e não tratá-la, devendo por isso investir-se no controlo do ciclo do parasita com um bom manejo das pastagens e dos animais e utilizar a desparasitação apenas como auxílio na profilaxia.

**Palavras-chave:** Bovinos, *F. hepatica*, APS, Diagnóstico, Coprologia, Serologia.



## **ABSTRACT**

**Gomes, C. A. V. C.** 2012. *Fasciolosis in beef cattle*

Livestock production plays a major role in the economy of a country and is, therefore, very important to take the best of this production. The animals, especially those produced in extensive systems, are exposed to various epidemiological hazards, especially to parasites. Sometimes its importance is overlooked but it is well known that its presence affects the animals' welfare and health.

This study assessed the importance of the trematode *Fasciola hepatica* in cattle, a liver's parasite with a heteroxen cycle, in which the snail *L. truncatula* participates as an intermediate host. This parasite causes fibrotic lesions in the liver parenchyma leading to the loss of its function that causes a decreased level of production and direct losses by rejection of the organ in the abattoir. The goal of this study was to evaluate the importance of deworming against this parasite in a semi-intensive production and compare the effectiveness of two drugs – closantel and clorsulon.

This study was done in an semi-intensive cattle fattening farm, located in Moita do Ribatejo, Portugal. This is an endemic area of *F. hepatica*. Nineteen bulls, aged between 9 and 25 months, were included in this study, to which was applied a single treatment with the two drugs being tested. Was taken a sample of faeces at the day of application and two samples after treatment with fifteen days apart and submitted to the following coprologic analyses: simple sedimentation technique, modified McMaster technique. It was also performed a serological test: indirect ELISA using the recombinant protein, APS. The nineteen livers were inspected at the abattoir and a sample (n = 5) was collected for analysis and detection of flukes in the liver parenchyma.

All the samples processed with simple sedimentation technique were negative. With the Modified McMaster technique, were obtained 73.68% of positive samples to *F. hepatica* in the first sample that decreased to 31.58% in the last sample, with faecal egg count reduction values between 90 and 95%. The serology test showed three positive results. Concerning the inspection of the livers, 78.94% were rejected.

Regardless of the effectiveness of the treatment, the time from its application to the slaughter was not sufficient to eliminate the lesions that are the reason for rejections in the abattoir. We conclude that the most important action is to prevent infection and not to treat it, and farmers should therefore invest in the control of the parasite through good management of pastures and livestock, and only use deworming as a prophylaxis complement.

**Keywords:** Cattle, *F. hepatica*, APS, Diagnosis, Coprology, Serology



## ÍNDICE GERAL

Agradecimentos.....	iii
Resumo .....	v
Abstract .....	vii
Índice Geral .....	ix
Índice de Figuras .....	xiii
Índice de Gráficos.....	xiv
Índice de Tabelas .....	xv
Lista de Abreviaturas .....	xvii
1. Introdução.....	1
2. Descrição das atividades realizadas durante o Estágio Curricular .....	2
2.1 OPP.....	2
2.2 Clínica Ambulatória na região da Moita do Ribatejo.....	2
3. Fasciolose em Bovinos de Engorda.....	5
3.1 Introdução .....	5
3.2 Sistemas de Produção de Bovinos de Engorda .....	6
3.3 História .....	7
3.4 Taxonomia.....	8
3.5 Morfologia.....	8
3.6 Tegumento .....	9
3.6.1 Sistema digestivo .....	10
3.6.2 Sistema excretor.....	10
3.6.3 Sistema reprodutor .....	10
3.6.4 Sistema nervoso.....	11
3.7 Ciclo de Vida .....	11
3.7.1 Fase extramamífero.....	12
3.7.2 Fase intramamífero.....	14
3.8 Mecanismos de Patogenicidade .....	15
3.9 Hospedeiro Intermediário.....	16

3.9.1	Classificação .....	16
3.9.2	Ciclo de vida.....	16
3.9.3	Biótipo/Ecologia.....	17
3.9.4	Fatores que afetam o desenvolvimento do molusco .....	17
3.9.5	Suscetibilidade/Resistência .....	18
3.10	Fasciolose Bovina.....	19
3.10.1	Epidemiologia.....	19
3.10.2	Fisiopatologia .....	20
3.10.3	Relação Hospedeiro/Parasita .....	20
3.10.4	Diagnóstico clínico.....	23
3.10.5	Diagnóstico laboratorial .....	26
3.10.6	Achados de necrópsia .....	27
3.10.7	Diagnóstico coprológico.....	28
3.10.8	Diagnóstico serológico.....	30
3.10.8.1	Técnicas Serológicas.....	30
3.10.8.2	Antígenos.....	32
3.10.9	Diagnóstico diferencial.....	34
3.10.10	Tratamento .....	34
3.10.10.1	Princípios ativos mais utilizados.....	34
3.10.10.2	Estratégias de Tratamento.....	39
3.10.11	Resistência aos anti-helmínticos.....	41
3.10.12	Prevenção/Controlo .....	43
3.10.13	Vacinação.....	44
3.10.14	Importância económica.....	45
3.10.15	Situação em Portugal .....	46
3.11	Fasciolose Humana .....	46
3.12	Outros Tremátodes.....	47
3.12.1	<i>Dicrocoelium dendriticum</i> .....	47
3.12.2	<i>Calicophorum daubneyi</i> .....	47

4. Objetivos.....	49
5. Material e métodos .....	51
5.1 Caracterização dos animais e da exploração em estudo .....	51
5.2 Descrição do esquema de desparasitação .....	52
5.3 Colheita de Amostras .....	53
5.4 Processamento de Amostras.....	54
5.4.1 Análise Coprológica.....	54
5.4.2 Inspeção de fígados .....	55
5.4.3 Análise Serológica.....	55
5.5 Verificação de eficácia da desparasitação .....	56
5.6 Análise Estatística .....	57
6. Resultados e Discussão .....	59
6.1 Análise Coprológica – Técnica de sedimentação natural.....	59
6.2 Análise Coprológica – Técnica de McMaster .....	59
6.3 Análise Coprológica – Técnica de McMaster Modificado .....	59
6.4 Análise Coprológica – TRCOF.....	61
6.5 Inspeção dos fígados.....	62
6.6 Análise Serológica – Técnica de ELISA indireto .....	63
7. Conclusões.....	65
8. Perspetivas Futuras.....	66
9. Bibliografia.....	67
Anexos .....	79
A1 - Leituras de Placas de ELISA .....	79
A2 – Métodos Coprológicos .....	81
A3 - Protocolo da técnica de ELISA para deteção de anticorpos (ELISA indireto) ...	83



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Fasciola hepatica</i> , verme adulto.....	9
Figura 2 – Ovo de <i>Fasciola hepatica</i> .....	11
Figura 3 – Ciclo de vida de <i>Fasciola hepatica</i> .....	12
Figura 4 – <i>Lymnaea truncatula</i> .....	16
Figura 5 – Fasciolose Bovina – Edema submandibular.....	25
Figura 6 – Fígado de bovino apresentando calcificação distrófica dos ductos biliares	28
Figura 7 – Fígado de bovino reprovado em matadouro .....	28
Figura 8 – Mapa da Zona Metropolitana de Lisboa com destaque para a região da Moita do Ribatejo, e imagem de uma zona alagadiça pertencente à exploração em estudo.....	51
Figura 9 – Administração de Closamectin FF® .....	53
Figura 10 – Administração de Ivomec F® .....	53
Figura 11– Amostras de fezes .....	53
Figura 12 – Colheita de amostras de sangue.....	54
Figura 13 – À esquerda, copo de precipitação e solução detergente, à direita, câmaras de McMaster para observação.....	55
Figura 14 – Técnica de ELISA .....	56

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Espécies observadas durante o estágio .....	3
Gráfico 2 – Tipo de consulta prestada comparativamente a bovinos de carne e de leite .....	3
Gráfico 3 – Patologias mais observadas durante o estágio em bovinos de leite .....	4
Gráfico 4 – Patologias mais observadas durante o estágio em bovinos de carne .....	4
Gráfico 5 – Evolução da contagem de opg ao longo dos 21 dias .....	61

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Fasciolícidias mais comuns em Ruminantes).....	35
Tabela 2 – Divisão dos grupos de animais segundo o tratamento aplicado .....	52
Tabela 3 – Escala para a avaliação da eficácia de desparasitantes.....	56
Tabela 4 – Resumo dos dados obtidos pelas técnicas: McMaster Modificado, Serologia e Inspeção <i>post-mortem</i> .....	60
Tabela 5 – Valores de TRCOF segundo os grupos de idade .....	61
Tabela 6 – Valores de TRCOF segundo o princípio ativo utilizado.....	61



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADS.....	Agrupamento de Defesa Sanitária
Ac.....	Anticorpo
Ag.....	Antigénio
AH.....	Antihelmíntico
ATP.....	Adenosina Trifosfato
<i>C. daubneyi</i> .....	<i>Calicophorum daubneyi</i>
<i>CdES</i> .....	Proteína de excreção-secreção de <i>C. daubneyi</i>
<i>D. dendriticum</i> .....	<i>Dicrocoelium dendriticum</i>
<i>DdES</i> .....	Proteína de excreção-secreção de <i>D. dendriticum</i>
EITB.....	Enzyme-linked Immunoelctrotransfer Blot
ELISA.....	Enzime Linked Immunosorbent Assay
E/S.....	Excreção-secreção
<i>F. hepatica</i> .....	<i>Fasciola hepatica</i>
<i>FhAPS</i> .....	Proteína recombinante de <i>F. hepatica</i>
FMV.....	Faculdade de Medicina Veterinária
gl.....	graus de liberdade
HD.....	Hospedeiro Definitivo
HI.....	Hospedeiro Intermediário
Ig.....	Imunoglobulina
INF $\gamma$ .....	Interferão gama
<i>L. truncatula</i> .....	<i>Lymnaea truncatula</i>
Opg.....	Ovos por grama
OPP.....	Organização de Produtores Pecuários
PBS.....	Phosphate Buffered Saline
PCR.....	Polymerase Chain Reaction
Pi.....	pós-infeção
Pv.....	Peso Vivo
Rpm.....	Rotações por minuto
Th.....	Célula T <sub>helper</sub>
TRCOF.....	Teste de Redução da Contagem de Ovos Fecais
X <sup>2</sup> .....	Qui Quadrado



## **1. INTRODUÇÃO**

A preocupação pela saúde animal e o que esta implica na saúde pública é há muito uma prioridade na educação do Homem. No século XVII foi criado o primeiro tratado de helmintologia científica por Francesco Redi e desde então têm-se elaborado inúmeras pesquisas no sentido de melhor compreender o ciclo de vida destes parasitas e métodos para os controlar. Assistimos hoje a um grande desenvolvimento na área da farmacologia, especialmente no tratamento de doenças, mas no caso de parasitoses o principal interesse é prevenir o seu aparecimento. A profilaxia deve ser feita não só farmacologicamente, mas também através do manejo dos animais e das pastagens. Assim, é muito importante desenvolver estratégias de controlo das parasitoses que conjuguem estes dois métodos para que se possa obter a máxima rentabilidade de um animal.

Durante a realização do estágio curricular no âmbito do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária, tive a oportunidade de proceder a várias intervenções de profilaxia, especialmente em novilhos de engorda. No decorrer do estágio confrontei-me com a realidade de um produtor com um grave problema de fasciolose na sua manada de bovinos de engorda. Foi-me então proposto fazer um estudo de eficácia do controlo desta parasitose nessa área para tentar colmatar as perdas económicas que esta acarreta. O meu estágio teve, assim, duas componentes práticas: uma no campo e outra em laboratório. Nesta última tive oportunidade de experimentar novas técnicas para diagnóstico de fasciolose, não só técnicas coprológicas (Técnica de McMaster modificado), mas também a técnica imunológica de ELISA uma vez que tive o privilégio de integrar um grupo de trabalho de investigação da FMV/UTL em parceria com a Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela, onde foi utilizada a proteína APS, desenvolvida por esta faculdade, entre outras proteínas. Neste âmbito tive a honra de trabalhar com o Dr. Jaime Sanchís e com a Dra. Cristiana Cazapal, ambos a preparar o doutoramento naquela universidade e de, eu própria, realizar todas as técnicas envolvidas neste estudo.

Serve a presente dissertação de Mestrado para contribuir para o desenvolvimento das técnicas de pesquisa de fascíola e alertar para a necessidade de um manejo e controlo desta parasitose, com o objetivo de melhorar o aproveitamento económico dos efetivos bovinos e salvaguardar a Saúde Pública.

## **2. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O ESTÁGIO**

### **CURRICULAR**

No âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, foi realizado um estágio com a duração de 4 meses (aproximadamente 960 horas). Este estágio teve duas componentes veterinárias distintas: acompanhamento da equipa de saneamento de bovinos (de leite, carne e bravos) no Agrupamento de Defesa Sanitária (ADS) da Península de Setúbal, sendo que ADS é uma designação caída em desuso, tendo sido substituída por Organização de Produtores Pecuários (OPP), e clínica ambulatória na região da Moita. Ambas orientadas pelo Dr. Dário Guerreiro, veterinário executor da OPP e médico veterinário em regime liberal.

#### **2.1 OPP**

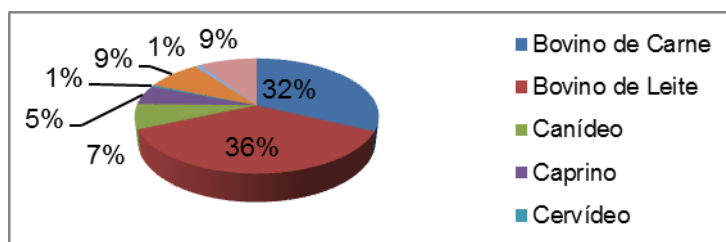
Tive oportunidade de acompanhar o programa oficial de erradicação de doenças infecciosas executadas por esta OPP na área dos grandes ruminantes. Esta atividade representa um importante ponto na epidemiovigilância de doenças como tuberculose, brucelose, leucose e peripneumonia contagiosa bovina. Segundo a portaria n.º 122/2003 de 5 de fevereiro, as OPP devem apresentar um plano sanitário anual onde constem as ações de profilaxia médica e sanitárias a executar pelas mesmas. Deve ser detalhado por espécie, de acordo com os planos de erradicação em vigor, baseado, nomeadamente, na classificação sanitária dos efetivos e regiões envolvidas.

No decorrer do estágio foram saneadas aproximadamente 4.500 cabeças, das quais colhi uma amostra de sangue em parceria com um auxiliar da OPP e foi realizado o teste de Tuberculinização intradérmico com contraste, sendo posteriormente verificada a reação aos antígenos injetados.

#### **2.2 Clínica Ambulatória na região da Moita do Ribatejo**

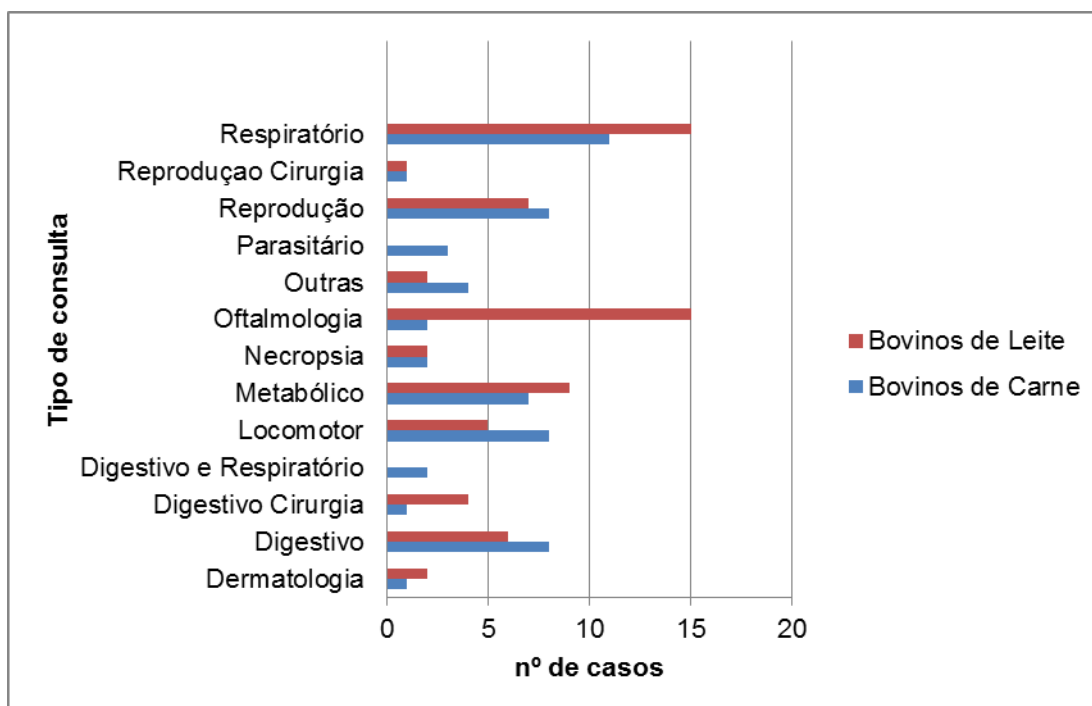
Durante o estágio acompanhei o Dr. Dário Guerreiro nos seus serviços veterinários e, tal como se pode verificar no gráfico 1, apesar da maioria do trabalho clínico se realizar em bovinos (68%), também acompanhei casos clínicos de pequenos ruminantes, equinos, animais de companhia e alguns animais silvestres, num total de 200 consultas. Na casuística apresentada, não foram contabilizadas as vacinações nem desparasitações realizadas em várias espécies.

**Gráfico 1 – Espécies observadas durante o estágio**



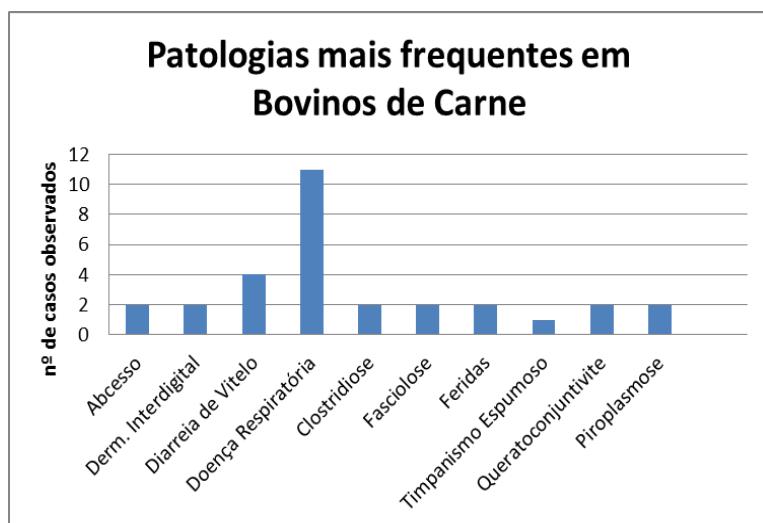
Uma vez que a maior percentagem de consultas foi a bovinos e é também a minha área de interesse, vou cingir a descrição dos serviços prestados e o tipo de patologia a esta espécie. Assim, podemos ver no gráfico 2 que há alguma discrepância no tipo de patologia que atinge os bovinos de leite e os bovinos de carne, apesar de a causa mais frequente para requisitar os serviços veterinários seja comum nas duas espécies – problemas respiratórios. Podemos verificar que os bovinos de leite têm mais patologias do foro metabólico enquanto os de carne têm mais problemas digestivos e locomotores.

**Gráfico 2 – Tipo de consulta prestada comparativamente a bovinos de carne e de leite**

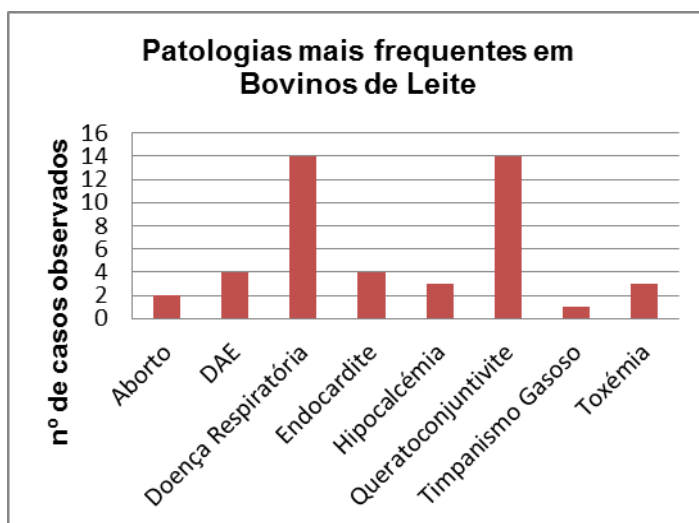


No que se refere às patologias mais frequentes podemos ver os gráficos 3 e 4.

**Gráfico 4 – Patologias mais observadas durante o estágio em bovinos de carne**



**Gráfico 3 – Patologias mais observadas durante o estágio em bovinos de leite**



No decorrer deste estágio tive oportunidade não só de aprofundar a área de medicina interna mas também auxiliei em 10 cirurgias. A mais frequente foi a correção de Deslocamento de Abomaso à Esquerda (40%) pela técnica de abomasopexia paralombar direita. Também tive oportunidade de acompanhar exames reprodutivos de 6 explorações de leite às quais eram realizadas visitas a cada 15 dias. Fizem-se também visitas esporádicas do foro reprodutivo a outras explorações. Quanto a explorações de bovinos de carne, a frequência de exames reprodutivos é menor, porém, há uma procura cada vez maior deste tipo de serviços por parte desta área de produção. Quanto ao controlo da fertilidade, foi efetuada sincronização de cios em 2 explorações, aplicando o método CIDR (Controlled Internal Drug Release). Pude também acompanhar o Dr. J. Pedro Canas Simões na realização de alguns exames andrológicos.

Considero que este estágio contribuiu bastante para a minha formação profissional e pessoal e permitiu solidificar a opção de me dedicar à área clínica ao longo da minha vida profissional e de querer sempre procurar mais conhecimento, porque a Medicina Veterinária é uma área em constante adaptação.

### 3. FASCIULOSE EM BOVINOS DE ENGORDA

#### 3.1 Introdução

Parasitismo, que é talvez a relação interespecies mais especializada, implica fortes interações genéticas entre o parasita e o seu hospedeiro, o que leva a uma co-adaptação entre as duas espécies (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2001). Por definição é uma associação heterotípica negativa, com benefício praticamente unilateral, de carácter fisiológico (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 1999).

Com a industrialização, o homem potenciou a contaminação parasitária ao confinar um grande número de animais a um pequeno espaço, alterando as condições naturais em que estes se deveriam encontrar. Há, porém, muitas parasitoses, sendo uma delas a fasciolose que, ao ter um ciclo heteroxeno, necessita de um hospedeiro intermediário que dificilmente se estabelece num tipo de produção intensiva.

A fasciolose, designada vulgarmente por papo ou papeira, amarela ou fígado podre (Silva Leitão, 1978) é uma parasitose provocada pelo tremátode *Fasciola hepatica*, conhecida em termos vernáculos como “Grande dúvia do fígado”. São grandes tremátodes de forma foliácea, que parasitam canais biliares e intestino de mamíferos, portadores de uma cutícula espinhosa, responsável pela sua ação patogénica mecânica, e testículos e ovários muito ramificados, responsáveis pelo seu potencial biótico. O seu ciclo biológico é heteroxeno e pode ter como hospedeiros definitivos ovinos, bovinos, e menos frequentemente suínos, caprinos, equinos, leporídeos e Homem, entre outros.

Tem uma distribuição quase cosmopolita, ocorre sob a forma enzoótica em quase todo o mundo e é responsável pela chamada “anemia de inverno”. Em Portugal a espécie *Fasciola hepatica* distribui-se de Norte a Sul, predomina nas regiões pantanosas sujeitas a inundações periódicas (Vales do Minho, Mondego, Douro, Vouga, Tejo, Sado, Mira e outros) e nos microclimas do Alentejo, Beiras, Algarve (em zonas de regadio). A sua frequência depende da presença do hospedeiro intermediário – molusco gastrópode do género *Lymnaea*, dos quais existem no mundo cerca de 21 espécies (Corrêa, 1976). A espécie *Fasciola hepatica* não existe no Sudoeste Asiático, África Tropical, Canadá, sendo substituída por outras espécies.

Fasciolose é provavelmente a infeção helmíntica mais comum em gado bovino, com prevalências de 30 a 90%, principalmente em áreas tropicais (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2001). No mundo, aproximadamente 700 milhões de bovinos são expostos a este parasita, o que, segundo estudos efetuados na Suíça, pode levar a perdas de 52 milhões de euros anuais, o que corresponde a uma perda de cerca de 300€ por cada vaca infetada (Schweizer *et al.*, 2005).

Em Portugal, muitos milhares de fígados são reprovados todos os anos, por fasciolose (Conceição, 2001). Este órgão é especialmente suscetível a parasitoses devido à circulação porta que faz dele um órgão de filtração.

No controlo desta parasitose é imprescindível conhecer o grau de infestação do hospedeiro intermediário presente nas pastagens. É também importante perceber que tratar animais já muito atingidos não é economicamente viável porque, devido ao comprometimento hepático, não respondem bem à terapêutica. Além disso, a utilização das pastagens deve ser bem gerida, pois é pouco útil tratar animais que irão voltar para pastagens contaminadas (Silva Leitão, 1978).

O prejuízo associado a esta patologia não é apenas consequência da reprovação de vísceras em matadouro, mas também à diminuição do rendimento dos animais e ao aumento da suscetibilidade a outras doenças.

### **3.2 Sistemas de Produção de Bovinos de Engorda**

O objetivo primário dos sistemas de Produção Animal é converter produtos vegetais em produtos animais utilizáveis pelo Homem.

Os sistemas de produção podem dividir-se em extensivo, intensivo e semi-intensivo.

O sistema extensivo caracteriza-se pelo aproveitamento direto de recursos naturais, com pouca ou nenhuma suplementação, baixos encabeçamentos (n.º animais/unidade de superfície) e ausência de instalações ou instalações muito rudimentares, de abrigo noturno ou temporário. Os ritmos reprodutivos são baixos; as épocas de cobrição/parto alargadas ou inexistentes (pois o macho está sempre com as fêmeas); índices de fertilidade, fecundidade e prolificidade são igualmente baixos. Neste sistema de produção o crescimento é habitualmente descontínuo, pois está dependente da produção sazonal de erva. Os animais devem ser de raças bem adaptadas a estas condições. Assim, é um sistema de produção de baixos custos, porém com baixa produtividade.

No sistema intensivo são elaborados planos alimentares cuidados, com especial atenção para as fases mais exigentes; utilizam-se alimentos de boa qualidade (concentrados, silagens, fenos, pastagens semeadas, regadios); mas também se recorre à utilização intensiva de suplementações, nomeadamente de vitaminas e minerais. As instalações são tecnicamente complexas, de grande investimento, geralmente dimensionadas e concebidas para estabulação permanente que permitem encabeçamentos elevados. Os ritmos reprodutivos são elevados (intervalo entre partos mínimo); as épocas de parto concentradas (machos afastados das fêmeas – efeito macho); pratica-se inseminação artificial e métodos hormonais (sincronização deaios e de partos, estímulo da taxa de ovulação); por sua vez os índices de fertilidade, fecundidade e prolificidade são também elevados. Os animais são geneticamente muito trabalhados nas suas características produtivas. Este sistema é um sistema de produção com elevados custos, compensado por uma elevada produtividade.

Por sua vez, o sistema semi-intensivo é um sistema misto ou intermédio entre o extensivo e o intensivo, sendo que a intensificação pode estar mais ou menos acentuada conforme os objetivos do produtor.

Quanto aos segmentos de produção de bovinos de engorda, dividem-se em duas fases: Fase Mãe e Fase Filho. A Fase Mãe inclui as vacas adultas e os vitelos até ao desmame. É perfeitamente admissível que as futuras progenitoras, na Fase Mãe, estejam num sistema mais extensivo enquanto que na Fase Filho, que contempla o crescimento e engorda entre o desmame e o abate dos novilhos, é mais rentável que estes sejam criados em sistemas mais intensivos.

Entre as raças mais exploradas em Portugal a raça Limousine é a que tem maior rendimento verdadeiro da carcaça (69-71%), seguida da Charolesa (67,5-69%), Saller (64-65%), Holstein-Frísia (63%), Mertolenga (61,8%), Mirandesa (60,7%), Alentejana e Barrosã (59,5%) (Caldeira, 2009).

O efetivo mundial de bovinos tem vindo a aumentar desde 1961, sendo que o país com mais bovinos é o Brasil, seguido da Índia e China.

Em suma, a produção animal tem como objetivo obter o máximo rendimento de um animal com os menores custos. É impreterível que seja atingido um equilíbrio entre estes dois objetivos. O ponto essencial para ter o máximo rendimento de um animal é que este esteja saudável. Assim, é importante que se invista no controlo de possíveis doenças com planos de vacinação e desparasitação. Esta última é importante e requer um estudo prévio para conhecer quais as espécies de parasitas mais comuns em determinada região.

Uma vez que o meu estágio foi realizado na região da Moita e esta é um zona endémica de *Fasciola hepatica*, esta dissertação de mestrado vai centrar-se nesse tema, procurando averiguar quais as mais-valias para a produção animal obtidas através do controlo desta parasitose.

### **3.3 História**

A presença de *Fasciola hepatica* na vida do Homem remonta aos seus antepassados mais longínquos. Esta foi representada pelo Homem primitivo, em cavernas, associada a animais da espécie bovina. Também são conhecidas algumas representações deste parasita feitas pelos egípcios antigos (Taylor, 1965).

A primeira referência à fasciolose como doença remonta a 1200 no livro “Black Book of Chirk” (Andrews, 1999). Contudo a sua existência é anterior, pois segundo um estudo parasitológico de coprólitos no Jura, França, foram identificados ovos de *F. hepatica* em locais do neolítico (Bouchet *et al.*, 1996).

Jean de Brie refere em 1379 a doença “liver rot” em ovinos, mas não descreve o parasita nem o associa à doença (Heras, 1974).

A primeira descrição da *F. hepatica*, incluindo a figura deste verme, foi realizada pelo naturalista Francesco Redi, em 1684, e foi em sua homenagem que Filippi, em 1855, designou as formas larvares por “rédias” (Euzéby, 1971).

O helmintologista alemão David Weiland, em 1875, parece ter sido o primeiro a observar “sacos cercarianos” no gastrópode *Lymnaea truncatula*. Vinte anos mais tarde este foi identificado como hospedeiro intermediário da *F. hepatica* por Thomas e Leuckart (Andrews, 1999) e estes mostraram o ciclo de vida completo deste parasita, embora apenas em 1892, por Lutz, se conseguiu provar a infecção do hospedeiro definitivo por ingestão por metacercárias.

### 3.4 Taxonomia

Segundo Linneu (1758) (citado por Cordero del Campilho & Rojo Vázquez, 1999), *Fasciola hepatica* tem a seguinte classificação filogenética:

Reino Animalia

Subreino Metazoa

Filo Platyhelmintha

Classe Trematoda

Subclasse Digenea

Ordem Echinostomatida

Família Fasciolidae

Género *Fasciola*

Espécie *Fasciola hepatica*

*Fasciola gigantica* Ásia, África, Sul de Espanha - HI *Lymnaea natalensis*

*Fasciola magna* América do Norte, Canadá

*Fasciola buski* Extremo Oriente - HI *Planorbis* (parasita intestino delgado do porco e homem)

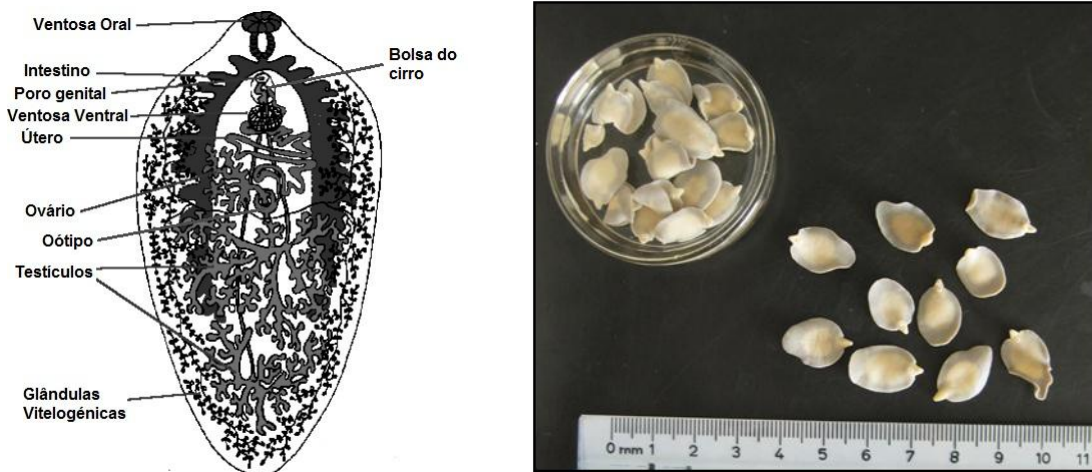
### 3.5 Morfologia

Linneu (1758) (citado por Cordero del Campilho & Rojo Vázquez, 1999) descreveu este parasita como um verme de forma foliácea, achatado dorsoventralmente e com simetria bilateral (figura 1). Sendo as suas dimensões aproximadamente 30mm de comprimento e 13mm de largura, em que o terço anterior é mais largo que o posterior e descreve um alargamento escapular denominado ombros. Apresenta um cone cefálico onde se localizam os órgãos de fixação - duas ventosas: ventosa oral e cavidade bucal, em posição anterior, e ventosa ventral, ou *acetabulum*, ao nível dos ombros.

É revestido por uma cutícula com espinhas projetadas para trás, de cor amarelo-acastanhada denominada tegumento.

A cavidade corporal é preenchida pelo parênquima, consistindo em fibras conjuntivas e células fixas ou livres de vários tipos, as quais estão rodeadas por fluidos corporais. As formas imaturas têm entre 1 a 2 mm e formato de lanceta (Urquhart *et al.*, 1998).

**Figura 1 – *Fasciola hepatica*, verme adulto (à esquerda imagem adaptada de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/images/fasciolastrucb.jpg>; à direita original)**



### 3.6 Tegumento

O tegumento tem uma espessura de 15 a 20 $\mu$ m, este é a superfície do parasita e é através deste que se realizam as trocas com o hospedeiro, sendo estas a absorção de nutrientes e a libertação de produtos de secreção/excreção.

Consiste numa camada sincicial de extensões citoplasmáticas de células cujos núcleos se localizam abaixo de uma lâmina basal descontínua (Fairweather, Threadgold & Hanna, 1999). O tegumento é uma camada metabolicamente ativa que está envolvida na absorção de nutrientes, osmorregulação e excreção, mas também confere proteção contra ações de defesa do hospedeiro. As suas secreções têm uma função digestiva e parecem estar envolvidas na defesa contra reações imunitárias por parte do hospedeiro.

O limite externo do tegumento é uma membrana plasmática provida de espinhas proteicas aguçadas.

A membrana celular mais interna do tegumento sincicial está ligada a protusões, em forma de dedo, das células do parênquima cujo corpo celular está situado sob as faixas musculares circular e longitudinal. Nestas células foram identificados diferentes tipos de corpos secretores. No parasita adulto foram identificados como sendo do tipo 1 e 2 e, um terceiro tipo, designado T0, foi identificado na adolescercária recém desenquistada, evoluindo para T1 logo que estas formas penetram no fígado do mamífero. O conteúdo

destes corpos secretores, uma vez libertado, parece servir como estímulo antigénico para o hospedeiro (Fairweather *et al.*, 1999).

O sistema muscular confere ao verme grande motilidade e grande variedade de movimentos, o que, juntamente com as espinhas superficiais, constitui um fator irritante para as mucosas do hospedeiro (Conceição, 2001).

### **3.6.1 Sistema digestivo**

O sistema digestivo deste parasita é rudimentar, sendo constituído por uma boca, faringe, esófago musculoso e intestino, que se divide em dois ramos cegos laterais. Estes são muito ramificados e estendem-se em direção posterior. O intestino é constituído por uma camada simples de células epiteliais ciliadas. Estas estão localizadas na lâmina basal e são contornadas por fibras musculares circulares e longitudinais. O intestino tem células com função de absorção e outras com função digestiva. Os produtos que não são absorvidos pelas células intestinais são periodicamente regurgitados (Fairweather *et al.*, 1999).

### **3.6.2 Sistema excretor**

Os órgãos excretores são do tipo protonefridial. O componente fundamental é a célula terminal que está embebida no parênquima do verme.

### **3.6.3 Sistema reprodutor**

*Fasciola hepatica* é um parasita hermafrodita. Faz geralmente cópula cruzada mas por vezes ocorre autofecundação produzindo descendência viável.

O aparelho reprodutor masculino é constituído por dois testículos ramificados preenchendo a porção central do corpo. Destes saem vasos eferentes que se unem na zona anterior e formam o vaso deferente, que alarga para formar a vesícula seminal, no interior da bolsa do cirro. No interior desta bolsa estão ainda as glândulas prostáticas e o cirro (pénis).

Por sua vez, o aparelho reprodutor feminino é constituído por um ovário único, situado à direita da linha média, anterior aos testículos e é ramificado. Segue-se um oviduto cuja porção proximal alargada em infundíbulo se denomina oótipo. O oótipo é rodeado por glândulas unicelulares - glândulas de Mehlis – e recebe através do ducto vitelino substâncias segregadas pelas glândulas vitelinas ou *vitellarium*, glândulas localizadas nas margens laterais do parasita. É no oótipo que se dá a composição do ovo e a formação da parede deste. O útero localiza-se anteriormente aos testículos, sai do oótipo e estende-se até ao poro genital feminino. O poro genital feminino abre-se no recetáculo seminal, perto da abertura do recetáculo seminal, abre-se no oviduto um outro canal – o canal de Laurer.

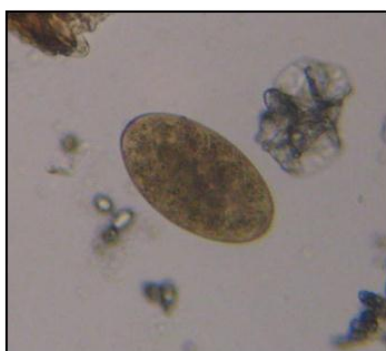
*Fasciola hepatica* apresenta um grande potencial biótico. Em infeções moderadas cada indivíduo elimina 3000- 3500 ovos/dia, sendo que o número de ovos eliminados pelas fezes pode chegar a 20.000/dia. No entanto, depende de fatores relacionados com o hospedeiro e com o parasita e varia consoante a hora do dia, as estações do ano, o grau de parasitismo,

duração da infecção, reinfeções e a alimentação (influencia o esvaziamento biliar). Independentemente destas variações são eliminados ovos durante todo o ano (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 1999).

É preciso ter especial atenção aos exames coprológicos negativos. Em casos avançados de infecção há acumulação de adultos na vesícula biliar impedindo a saída de bÍlis e de ovos.

Os ovos deste parasita são de grandes dimensões, 130-150µm por 63-90µm, têm forma elipsoide, uma cor castanho-dourado típica, são operculados e não embrionados (figura 2).

**Figura 2 – Ovo de *Fasciola hepatica* (ampliado 140x – Original)**



#### **3.6.4 Sistema nervoso**

Na *Fasciola hepatica* a integração dos estÍmulos tem lugar através de neurÓnios e células neurosecretoras que libertam mediadores para o espaço intercelular perto das células alvo ou Órgãos.

O sistema nervoso consiste em dois gÂnglios cerebrais com uma comissura de ligação no extremo anterior do verme, situados dos dois lados da faringe.

### **3.7 Ciclo de Vida**

O ciclo de vida da *Fasciola hepatica* (figura 3) é um ciclo heteroxeno, complexo, que pode ser dividido em duas fases: (1) desenvolvimento exÓgeno – reprodução assexuada, que é o perÍodo que decorre entre a saída do ovo para o exterior nas fezes e a reinfeção do mamÍfero. Dura 3 meses e nela participa o Hospedeiro Intermediário (HI) (gastrÓpodes anfÍbios dos géneros *Lymnaea*, *Bulinus* e *Physa*); (2) a fase intramamÍfero – reprodução sexuada, na qual decorre a migração e desenvolvimento da forma adulta nos canais biliares do Hospedeiro Definitivo (HD). Esta dura 2,5 meses.

Assim, torna-se um ciclo de vida muito longo (5,5 a 6 meses), com grandes perdas que são compensadas pelo hermafroditismo e intensa multiplicação das formas larvares em que de um só ovo são produzidas numerosas cercÁrias.

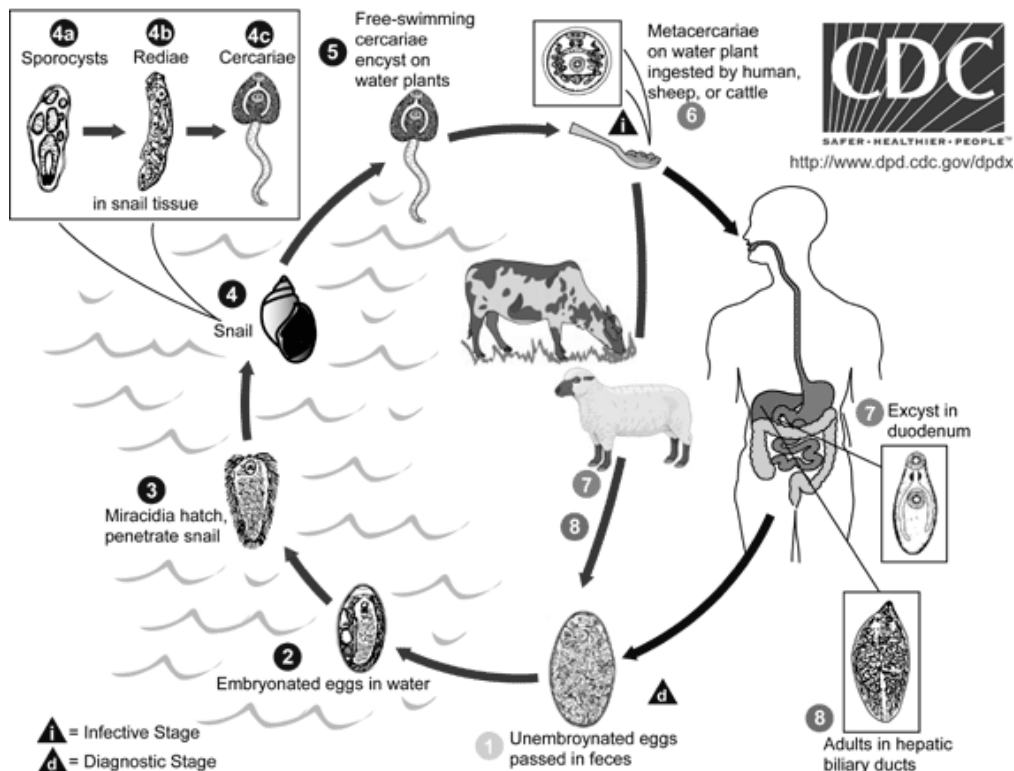
As condições ecolÓgicas necessÁrias ao desenvolvimento do seu ciclo são a humidade e oxigenação, sendo muito comum encontrar estes parasitas em toalhas de Água pouco

profundas. A temperatura ótima ao seu desenvolvimento são 22°C (que no nosso país corresponde às estações primavera e outono).

Quanto às condições desfavoráveis, podemos apontar verões muito quentes ou temperaturas muito baixas (<10°C).

Estas condições determinam não só a sobrevivência, bem como a duração dos estádios de desenvolvimento do parasita tanto no meio externo como no hospedeiro intermediário.

**Figura 3 – Ciclo de vida de *Fasciola hepatica***  
(<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Fascioliasis.htm>)



### 3.7.1 Fase extramamífero

Esta fase pode dividir-se em 5 etapas:

- expulsão dos ovos nas fezes pelo HD para o exterior;
- desenvolvimento e eclosão do miracídio a partir do ovo e sua penetração no HI, gastrópode do género *Lymnaea truncatula*;
- desenvolvimento e multiplicação dos esporocistos e sua evolução para rédias e por fim cercárias;
- emergência da cercária a partir do molusco e sua migração e enquistamento na vegetação, denominando-se metacercária;
- ingestão posterior das metacercárias pelos HD.

O desenvolvimento embrionário e pós embrionário é exógeno e assexuado sendo que, um miracídio pode dar origem a mais de 600 cercárias (Urquhart *et al.*, 1998).

## **Ovo**

Os ovos são expulsos juntamente com as fezes, não são segmentados nem embrionados. Este só se desenvolve se as condições geo-climáticas forem propícias. A temperatura ideal para o seu desenvolvimento é 10° a 30°C, mas podem resistir doze meses a 4 - 5°C, dois anos a temperaturas inferiores a 4°C e apenas 24 ou 12 dias a -15° e -40°C respetivamente. O pH ideal para o seu desenvolvimento é 7, mas variações entre 4,2 e 9,0 são toleradas. É necessário um ambiente aeróbio, o que requer desagregação da massa fecal e que o ovo fique coberto por uma película de água. Se estas condições se verificarem, desenvolve-se dentro do ovo uma larva móvel denominada miracídio.

## **Miracídio**

Embrião ciliado, de forma triangular, que abandona o ovo ao fim de 9 dias de incubação e procura o HI. Tem uma glândula apical com enzimas proteolíticas que permite a abertura do opérculo para que possa ser expulso do ovo. Possui grânulos de reserva que esgotam em 24 horas. Porém, para que este penetre o HI com sucesso tem de o encontrar nas primeiras três horas de vida (Urquhart *et al.*, 1998). De acordo com Neuhaus (1953), citado por Ollerenshaw (1959), é por fototropismo positivo e uma reação quimiotática, a uma distância máxima de 15cm, que permite ao miracídio detetar o caracol e penetrá-lo em qualquer ponto da sua superfície. Neste momento perde a sua cutícula ciliada, alcança os vasos linfáticos e sanguíneos e estabelece-se nas glândulas digestivas e aí evolui para esporocisto (Corrêa, 1976).

## **Esporocisto**

O crescimento do esporocisto ocorre no hepatopâncreas. Cada esporocisto consiste numa massa indiferenciada de células germinativas, com 1mm, que dá origem a esporocistos de segunda geração ou a cinco ou dez rédias.

## **Rédia**

Forma-se a partir das células germinais do esporocisto, alimenta-se ativamente dos tecidos do HI. Tem 1 a 3 mm. Quando as condições são adversas para o caracol, as rédias, em vez de produzirem diretamente cercárias, produzem rédias de segunda ou terceira geração (rédias-filhas) por pedogénese, para aumentar exponencialmente o número de cercárias e assim poder compensar a possível destruição de algumas delas pelas condições climáticas ou nutricionais desfavoráveis (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 1999). As suas migrações podem levar à morte do hospedeiro intermediário.

## **Cercária**

Com corpo semelhante ao adulto, mas apresenta uma cauda. Formam-se dentro das rédias e abandonam o HI quando maduras (após sete a oito semanas da infeção). Posteriormente,

fixam-se a superfícies firmes, geralmente plantas aquáticas da família do agrião, onde enquistam formando as metacercárias infetantes.

A libertação das cercárias está relacionada com o habitat e com comportamentos do hospedeiro definitivo, pois a sua emergência tem uma periodicidade diurna que coincide com o período de atividade do hospedeiro definitivo (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 1999).

### **Metacercária**

A cercária perde a cauda e enquista dando origem a metacercárias, com 0,2mm de diâmetro. Estas não se reproduzem e fixam-se através da ventosa ventral e mantêm-se enquistadas nas superfícies, geralmente de plantas aquáticas, constituindo a forma de resistência deste parasita. O invólucro protege-as da influência desfavorável do frio, calor, dessecação, bactérias, fungos e permite que elas sobrevivam no meio externo por longos períodos de tempo (até 12 meses) (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 1999). Esta é a forma infetante para o HD que se infeta ao ingerir a metacercária enquistada no seu alimento.

Nas superinfecções dos caracóis, os miracídios invasores têm pouca probabilidade de prosseguir o ciclo e as reinfeções não constituem uma preocupação porque os caracóis infetados geralmente morrem quando abandonados pelas cercárias (Corrêa, 1976).

Todo o ciclo está completo ao fim de 6 a 7 semanas, porém pode tardar mais se as condições climáticas forem desfavoráveis (Urquhart, *et al.*, 1998).

#### **3.7.2 Fase intramamífero**

Os hospedeiros definitivos são vertebrados, mais comumente mamíferos ruminantes como bovinos e ovinos, podendo também infetar outros ruminantes como os caprinos, zebus e búfalos e, embora com menor incidência, porcos, equinos e Homem. Alguns mamíferos selvagens são também alvo deste parasita, como a lebre, o coelho, cervídeos ou javali (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 1999), foi também descrita a infeção em aves (Vaughan, Charles & Boray, 1997). É possível, por vezes, que estes hospedeiros atuem como reservatórios de infeção.

O HD infeta-se ao ingerir metacercárias presentes na pastagem, embora também seja possível que ocorra em animais estabulados através de água contaminada, feno ou silagem mal produzida.

A fase intramamífero compreende três processos: (1) desenquistamento da metacercária, (2) migração transperitoneal da adolecercária até atingir o parênquima hepático e sua maturação em fascíola adulta nos canais biliares e vesícula biliar, e por fim, (3) postura de ovos.

No entanto, nem todas as metacercárias ingeridas conseguem alcançar o fígado e muitas perdem-se nas fezes ou em migrações intraorgânicas. Ocasionalmente podem ocorrer

localizações erráticas visto que as fascíolas imaturas podem atravessar o peritoneu ou passar à corrente sanguínea e serem transportadas a outros locais como pulmão, pâncreas, rim, coração, linfonodos, timo e alguns podem infectar o feto em animais gestantes (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 1999).

O desenquistamento compreende duas fases:

– Fase de ativação: nos ruminantes ocorre no rúmen devido a altas concentrações de CO<sub>2</sub>, ambiente redutor e temperatura de 37°C, enquanto nos não ruminantes a ativação pode ocorrer no estômago ou no intestino delgado (Heras, 1974).

– Fase de emergência: ocorre no intestino delgado, abaixo da abertura do ducto colédoco. Este fenómeno é desencadeado pela ação da bÍlis e pela ação de uma enzima do próprio parasita que lhe induz movimentos musculares (Andrews, 1999).

As jovens adolelescárias atravessam a parede intestinal, migram através da cavidade peritoneal durante as seguintes 24 horas, até atingirem o fígado e penetram através da capsula de Glisson às 90 horas pós infecção (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 1999). A maioria dos parasitas atinge este órgão após 4 a 6 dias da infecção e atingem os canais biliares após 5 a 6 semanas.

O período pré-patente é de 10 a 11 semanas, intervalo em que se dá a maturação da *F. hepatica* e esta inicia a postura de ovos, logo, o período mínimo para se completar um ciclo é 17 a 18 semanas (Urquhart *et al.*, 1998).

Quanto à nutrição, as formas adultas podem ser hematófagas (0,2ml sangue/dia) e histófagas (epitélio biliar, tecido inflamatório); as formas jovens são essencialmente histófagas, o que dificulta a eliminação pelo tratamento farmacológico.

A longevidade da *F. hepatica* em ovinos não tratados pode ser de anos, uma vez que não há evidências de que os ovinos fiquem naturalmente imunes a *F. hepatica*; em bovinos, é geralmente inferior a um ano (Mitchell, 2002).

### **3.8 Mecanismos de Patogenicidade**

Os mecanismos de patogenicidade estão divididos em diretos e indiretos. Os efeitos diretos são consequência da invasão, estabelecimento, alimentação e multiplicação no hospedeiro. Incluem a ingestão e destruição de tecidos e sangue, uma vez que são histófagos na fase imatura e hematófagos na fase adulta. Produzem irritação das superfícies epiteliais com as quais entra em contacto, devido ao seu tegumento espinhoso. Os efeitos indiretos estão associados às migrações que podem veicular outros agentes infecciosos, podem provocar obstrução do fluxo biliar e facilitar a multiplicação de agentes que em condições normais não provocariam doença (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 1999). A nível dos hepatócitos, as proteínas somáticas de *F. hepatica* alteram a permeabilidade da membrana e o metabolismo proteico, lipídico, dos carboidratos e mitocondrial (Wesolowska *et al.*, 2012).

Os indiretos têm, com frequência, uma maior influência na produtividade e bem-estar do hospedeiro e consistem nas respostas do hospedeiro às ações diretas.

### 3.9 Hospedeiro Intermediário

Apesar de diferentes espécies de *Lymnaea* poderem ser infetadas, a *L. truncatula* (figura 4) é a espécie de hospedeiro intermediário predominante na Europa (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2001). É um molusco anfíbio de ampla distribuição em todo o mundo. Em França, em 1998, foi descrita a presença de *F. hepatica* no género *Planorbis leucostoma*, apesar de este apenas poder ser parasitado por fasciola se simultaneamente estiver presente *Paramphistomum daubneyi* (Abrous *et al.*, 1998).

#### 3.9.1 Classificação

Segundo Cordero del Campillo e Rojo-Vázquez, 1999, *Lymnaea truncatula* tem a seguinte classificação filogenética:

Reino Animalia, Subreino Metazoa, Filo Mollusca, Classe *Gastropoda*, Subclasse *Pulmonata*, Ordem *Basommatophora*, Família *Lymnaeidae*, Género *Lymnaea* e Espécie preferencial na Europa é *Lymnaea truncatula*

<i>L. tomentosa</i>	Austrália, Nova Zelândia
<i>L. columella</i>	América do Norte, Austrália, Nova Zelândia
<i>L. bulimoides</i>	Sul dos Estados Unidos, Caribe
<i>L. humilis</i>	América do Norte
<i>L. viator</i>	América do Sul
<i>L. diaphena</i>	América do Sul

A família *Lymneidae* tem uma longa e controversa história sistemática e ainda hoje a definição de critério de classificação é um tema de estudo.

Figura 4 – *Lymnaea truncatula* (Original)



#### 3.9.2 Ciclo de vida

São hermafroditas, têm capacidade de autofecundação facultativa, mas a reprodução é geralmente por fecundação cruzada. Põem ovos na lama ou na água ao longo de todo o

ano. A quantidade de ovos depende, entre outros fatores, da temperatura e da disponibilidade de alimento. O maior índice de ovopostura verifica-se no mês de agosto e os mais bem alimentados têm maior taxa de postura. O período de incubação também varia com a temperatura e está descrito uma duração mínima de 11-12 dias a 21-30°C.

Uma vez nascidos, os caracóis começam logo a alimentar-se sozinhos, têm um desenvolvimento rápido e alcançam a maturidade aos 20 dias (Heras, 1974). Após alcançar o estado adulto, medem cerca de 6-8 mm.

### **3.9.3 Biótipo/Ecologia**

Estes moluscos têm uma distribuição geográfica muito ampla. Desenvolvem-se em habitats semiaquáticos, águas claras, paradas ou de pequena corrente, a baixas profundidades. Os seus habitats podem ser permanentes, como charcas, cursos de água, margens de lagoas, etc..., ou temporários, que podem ser constituídos por marcas de cascos, sulcos de rodas ou poças de água (Urquhart *et al.*, 1998). Estes últimos podem revelar-se locais bastante perigosos, uma vez que é onde se multiplicam exponencialmente, invadindo as pastagens, principalmente em anos húmidos e quando as condições hidrológicas da zona são favoráveis (inundações, alagamentos) (Crossland, 1976). Estudos sugerem que os caracóis normalmente permanecem no mesmo habitat durante o ano e que a sua dispersão pode ser consequência de movimentos ativos, transporte por flutuação ou por mamíferos e aves (Heppleston, 1972).

Podem encontrar-se em quase todo o tipo de solos, no entanto preferem terrenos argilosos, com dificuldades de drenagem e pH levemente ácido, sendo os níveis de pH excessivamente ácidos prejudiciais como ocorre em zonas pantanosas e áreas de musgo e um meio hídrico de movimento lento (Urquhart *et al.*, 1998). Heras (1974) refere ainda que existem plantas que só por si podem fazer suspeitar da presença de caracóis (agrião, juncos, ranúnculos, verónicas, festuca).

A temperatura ideal para o desenvolvimento é entre 15 a 22°C. Temperaturas constantes acima dos 21°C tornam-se desfavoráveis e abaixo dos 5°C o desenvolvimento é retardado (Urquhart *et al.*, 1998). Heppleston provou que o crescimento é mais rápido no verão, mas há uma grande mortalidade. Pelo contrário, no inverno, o crescimento é mais limitado, mas a mortalidade é muito baixa

Quanto à nutrição, na natureza, o húmus proveniente da decomposição das plantas constitui a sua principal fonte de alimento. Em ambiente laboratorial recorre-se a algas, sendo a de eleição a alga *Oscillatoria formosa* (Conceição, 2001), mas foi descrito que a *L. truncatula* pode digerir qualquer planta.

### **3.9.4 Fatores que afetam o desenvolvimento do molusco**

Os fatores mais importantes que influenciam o ciclo de vida da *L. truncatula* são a temperatura e a nutrição.

Estes podem resistir a grandes períodos de seca (estivação) e a baixas temperaturas (hibernação) ao penetrarem na lama profunda. Apesar de resistirem, o seu desenvolvimento é marcadamente mais lento ou interrompido durante estes períodos (Urquhart *et al.*, 1998). Quando as condições são desfavoráveis, os caracóis podem sobreviver, segundo Heras (1974), durante cinco anos em estivação.

A densidade populacional é um dos fatores que varia inversamente com o desenvolvimento e a fertilidade do molusco (Ollerenshaw, 1959). A alimentação tem um efeito direto sobre o crescimento do caracol e sobre o grau de parasitismo. Quanto melhor for o estado de nutrição dos moluscos e maiores as suas dimensões, maiores são as dimensões e os números das formas larvares no seu interior (Ollerenshaw, 1959). A idade dos caracóis também é fator importante para o parasitismo. Quanto mais jovem for o caracol, maior capacidade tem para atrair o miracídio (Andrews, 1999).

Sob condições ideais de temperatura, humidade e alimentação, em duas semanas, a infeção por *Fasciola hepatica* provoca alterações no hospedeiro.

### **3.9.5 Suscetibilidade/Resistência**

O HI de *F. hepatica* é por excelência a *L. truncatula*. No entanto a adaptação a outros moluscos pode ocorrer através de passagens por este. A não compatibilidade com outros limnídeos manifesta-se por resistência absoluta, resistência em função da idade, baixa suscetibilidade e alta mortalidade nos adultos. Um hospedeiro não apropriado, ainda que se deixe infetar, exerce um efeito supressivo no desenvolvimento do parasita. Rondelaud e Dreyfuss (1995) também demonstraram a importância do hospedeiro definitivo na capacidade de propagação da infeção por parte da *L. truncatula*. Estes autores verificaram que a percentagem de moluscos infetados com miracídios de ovos provenientes de coelho era menor comparativamente com os de origem bovina e ovina e a emissão de metacercárias era também significativamente inferior.

Segundo Boray (1969) (citado por Conceição, 2001) a *L. truncatula* pode ser infetada com *F. hepatica* de três origens diferentes, que continua a transmitir esta parasitose com êxito. No entanto, as outras espécies de *Lymnaea* não têm esta capacidade, apenas conseguem terminar o ciclo se a *F. hepatica* for originária do mesmo país.

Em Portugal, embora nas áreas de fasciolose animal possam ocorrer além de *L. truncatula* outras espécies de *Lymnaea* (*L. peregra*, *L. palustris*, *L. stagnalis*, *L. auriculária*) e *Physa acuta*, estudos demonstraram que apenas *L. truncatula* é suscetível e a única que se encontra parasitada na natureza, quer em Portugal, quer em Espanha (Conceição, 2001).

Está provado que o parasita exerce efeitos nefastos no seu hospedeiro intermediário, incluindo castração ou diminuição da fertilidade, aumento da mortalidade, destruição da glândula digestiva, alterações metabólicas (deslocação da energia da reprodução para o crescimento, induzindo gigantismo) e aumento da sensibilidade ao stress ambiental (Wilson

& Denison, 1980). Infecções experimentais revelam que o parasita induz elevada mortalidade em caracóis provenientes de populações com baixas prevalências naturais em comparação com aqueles provenientes de populações com prevalências elevadas. No entanto, outros estudos indicam a possibilidade de coadaptação entre hospedeiro e parasita (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2001).

### **3.10 Fasciolose Bovina**

Uma vez que este estudo se baseou na infecção de novilhos de engorda, em seguida vai ser dada especial atenção à Fasciolose Bovina.

#### **3.10.1 Epidemiologia**

A fasciolose tem uma grande importância veterinária e em Saúde Pública, visto poder infectar o Homem (antropozoonose). É endémica em muitas partes do mundo e em Portugal já alguns focos de infecção foram reportados e estudados em Humanos.

Uma vez que o ciclo de vida de *F. hepatica* é um ciclo heteroxeno e com formas livres, está muito dependente das condições ecológicas para o seu desenvolvimento. Assim, há três fatores principais que influenciam a produção de grandes quantidades de metacercárias necessárias aos surtos de fasciolose.

- Disponibilidade de habitats adequados aos moluscos - o desenvolvimento do caracol requer temperaturas de 15 – 25°C (primavera/verão) e necessita no mínimo 6 – 7 semanas para que haja emissão de cercárias (fim de verão/outono). Esta é a infecção mais comum e é denominada “infecção de verão”. Assim, o verão/outono é o período de máximo risco de infecção dos HD, pois este período coincide com o esgotamento dos pastos e o aproveitamento das zonas de regadio, onde há maior concentração de metacercárias. Porém, caracóis infetados em outubro do ano anterior, nos quais o desenvolvimento cessou durante o inverno, vão libertar as cercárias na primavera/verão. Esta infecção é denominada “infecção de inverno” (Urquhart, *et al.* 1998).
- Temperatura – Como foi referido há pouco, as temperaturas ideais estão entre 15 – 25 °C (sendo a temperatura ótima 22°C). Para que os caracóis se reproduzam e para que haja desenvolvimento de *F. hepatica* no seu interior, é necessária uma temperatura diurna/noturna média de 10°C ou mais, sendo o ideal 15°C. Toda a atividade cessa a menos de 5°C ou a mais de 30°C. Sendo que, este é também o intervalo ideal para desenvolvimento e eclosão dos ovos de *F. hepatica*.
- Níveis adequados de humidade e oxigenação, saturação do solo e pH – os moluscos intermediários encontram-se preferencialmente em toalhas de água pouco profundas, onde libertam as cercárias que enquistam em plantas aquáticas.

No que diz respeito aos períodos de maior risco de infecção, este seria na primavera, pois, apesar da eliminação de ovos ser ininterrupta ao longo do ano e de estes resistirem no

ambiente a temperaturas baixas, os mesmos acumulam-se nos pastos durante o inverno aguardando as condições termohidrográficas favoráveis ao seu desenvolvimento, > 15°C e HR 100%, isto é, na primavera.

Outro fator a considerar é o sistema de pastagem utilizado. Pastagens partilhadas com ovinos podem constituir uma fonte contínua de contaminação. Também os animais silvestres podem atuar como reservatório e serem responsáveis pela manutenção e disseminação da infeção na ausência de bovinos ou ovinos. E por fim, o sistema de transumância praticado nalgumas regiões também pode contribuir para disseminar a infeção.

Um fator que influencia a epidemiologia deste parasita é a aquisição de resistências pelos bovinos.

Quando é avaliada a prevalência de fasciolose segundo a idade, os dados indicam que animais com mais de dois anos de idade tiveram maior prevalência que animais mais novos. Isto pode dever-se à maior duração de exposição à infeção precocemente (Yildirim *et al.*, 2007). Quanto ao sexo, a maior parte dos estudos não encontra diferenças, porém, os que obtiveram, relatam uma maior incidência em fêmeas, pensa-se que pelo facto de estas serem selecionadas para reprodução enquanto que os machos são geralmente abatidos mais precocemente (Yildirim *et al.*, 2007). Em relação à raça, há também divergências de resultados de vários estudos, mas provavelmente a maior prevalência numa determinada raça pode coincidir com o tipo de alimentação (Yildirim *et al.*, 2007).

### **3.10.2 Fisiopatologia**

A fasciolose aguda é causada pela migração das formas imaturas de *F. hepatica* através do parênquima hepático. Os sinais clínicos ocorrem ao fim de 6 a 7 semanas após ingestão de metacercárias e nesta altura as formas migratórias têm uma grande ação mecânica sobre o fígado, provocando insuficiência hepática e hemorragia. Posteriormente evolui para fasciolose crónica, havendo uma resposta fibrótica por parte do fígado (Radostitis *et al.*, 2007).

### **3.10.3 Relação Hospedeiro/Parasita**

Consoante a espécie de hospedeiro definitivo, há uma variação considerável na suscetibilidade à infeção e nas respostas imunes contra o parasita. É sugerido que estas variações no sistema imunitário do hospedeiro resultariam de várias pressões seletivas, sendo esta hipótese apoiada por factos como: a morfologia dos parasitas adultos e ovos variar consoante o hospedeiro; a glutathione-S-transferase apresentar uma maior variabilidade em parasitas de bovinos do que nos parasitas de ovinos; o sucesso de infeções experimentais de caracóis ser marcadamente diferente entre miracídios obtidos de diferentes hospedeiros definitivos (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2001).

Pensa-se que os mecanismos subjacentes à diferença de suscetibilidade dos hospedeiros à infecção por *F. hepatica*, estão relacionados com a capacidade do hospedeiro desenvolver fibrose do fígado, de atrasar a migração através do parênquima hepático e pela extensão da resposta inflamatória do hospedeiro.

Os hospedeiros definitivos podem ser agrupados quanto a suscetibilidade face a esta parasitose em três grupos: os de baixo, médio e alto nível de resistência.

O primeiro grupo, de *baixo nível de resistência*, inclui os ovinos, caprinos, coelhos, entre outros. Estes são muito recetivos à infecção e não desenvolvem resistência à reinfeção. Isto porque apesar de haver uma reação tecidual não há produção de tecido fibroso, nem reação celular suficiente para imobilizar ou destruir o parasita. A prevalência de infecção na espécie ovina é superior a qualquer outra espécie de hospedeiro definitivo.

No segundo grupo, de *médio nível de resistência*, encontramos os bovinos, equinos, cervídeos, o Homem, entre outros. Estes por sua vez adquirem alguma resistência à reinfeção. A extensa fibrose hepática que se desenvolve em resposta à primoinfecção facilita a resistência pois dificulta a alimentação do parasita.

No terceiro e último grupo, de *alto nível de resistência*, encontramos o cão, o gato, o porco, o javali, entre outros. Nestes há uma eliminação das formas jovens durante a migração hepática e as formas adultas que se estabelecem encapsulam, não constituindo uma fonte de agressão para o hospedeiro.

A fasciolose bovina é uma doença economicamente importante que geralmente se torna crónica e subclínica em bovinos (Clery, Torgerson & Mulcahy, 1996). A cronicidade deve-se não só a fatores mecânicos devido à fibrose perilobular hepática mas também à calcificação dos canais biliares desenvolvida na primoinfecção. Também estão presentes fatores imunológicos humorais e celulares (Conceição, 2001).

As fascíolas ao longo do ciclo de vida intramamífero, produzem e libertam grandes quantidades de moléculas denominadas produtos de excreção/secreção (E/S) (Dixit, Dixit & Sharma, 2008). Durante a migração *in vivo* e cultura *in vitro*, os conteúdos do lúmen intestinal do parasita são regularmente regurgitados (Beckham *et al*, 2009). Nestes produtos estão incluídas as Catepsinas L, que correspondem a enzimas implicadas em ações como: a progressão do parasita pelo intestino e parênquima hepático por destruição das proteínas intersticiais da matriz como a fibronectina, laminina e colagénio; a aquisição de nutrientes por catabolização das proteínas do hospedeiro em péptidos absorvíveis (Dixit *et al.*, 2008); e na modulação do sistema imunitário do hospedeiro por clivagem das imunoglobulinas, redução da atividade dos linfócitos (Cancela *et al*, 2008), ativação da via alternativa dos macrófagos (Flynn & Mulcahy, 2008). Foi ainda demonstrado que a catepsina L é capaz de suprimir a resposta imunitária das células T<sub>helper</sub> tipo 1 (Th1) em animais de laboratório infetados, tornando-os mais suscetíveis a infeções bacterianas concomitantes.

Enquanto as catepsinas L são predominantes nas fases adultas, há indicação de que a principal protease segregada pelas fases juvenis é da classe das catepsinas B (Wilson *et al.*, 1998). A importância das catepsinas B está relacionada com a sobrevivência das formas juvenis, nomeadamente na invasão do hospedeiro através da parede intestinal. Estas enzimas têm atividade em ambientes ácidos (células gastrodérmicas do parasita) e neutros (tecidos/fluidos do hospedeiro) e são segregadas para os tecidos do hospedeiro nas primeiras cinco semanas de infeção. É sugerido que, ao contrário das catepsinas L, as catepsinas B são muito menos suscetíveis à inibição das cistatinas (proteínas inibidoras das proteases) do hospedeiro e também estas podem ser objeto de estudo para futuras terapêuticas ou vacinações (Beckham *et al.*, 2009). Os helmintes podem expressar cistatinas para regular a atividade das proteases do próprio parasita. Dentro de um curto espaço de tempo após o desenquistamento, a expressão das catepsinas é ativada para permitir a rápida penetração da parede intestinal do hospedeiro, por isso as cistatinas podem ser necessárias para proteger os jovens parasitas das suas próprias proteases. Estas cistatinas podem ter a função adicional de modulação do sistema imunitário, como a inibição da apresentação de antígenos, activação policlonal e indução da resposta Th2 (Khaznadji *et al.*, 2005).

Um outro constituinte dos E/S, a tioredoxina peroxidase, também parece ser capaz de subverter a resposta do hospedeiro, por recrutamento e ativação da via alternativa dos macrófagos (Donnelly *et al.*, 2005). Foi demonstrado que o aminoácido prolina é produzido pelos parasitas adultos e pode estar envolvido na indução da hiperplasia do epitélio dos ductos biliares (Wolf-Spengler e Isseroff, 1983). Estes produtos em contacto estreito com o sistema imunitário do hospedeiro, induzem uma resposta anticorpo específica, que pode ser utilizada no imunodiagnóstico precoce de infeções por *F. hepatica* (Jacquet, 2008).

A natureza da resposta imune desenvolvida contra *Fasciola hepatica* permanece desconhecida (Clery *et al.*, 1996). A supressão preferencial das células Th1 incluindo a produção de interferão gama (IFN $\gamma$ ) e a indução seletiva de células Th2 que produzem citocinas, de entre as quais IL-4 que está associada a secreção de IgG<sub>1</sub> e IgE, é uma resposta imune frequente na presença de infeções por helmintoses (O'Neill, 2000). Brown *et al.* (1994) identificaram células Th0 e Th2 em vacas infetadas cronicamente e não encontrou células Th1 (citado por Clery *et al.*, 1996). Ortiz *et al.*, em 2000, descreveram pequenas flutuações nos títulos de anticorpos de bovinos coincidentes com os períodos de maior e menor infeção.

Apesar de os eosinófilos se unirem a partes do tegumento do tremátode jovem, este último parece perder a camada superficial para escapar da lesão (Urquhart *et al.*, 1998), também há estudos que indicam que as fascíolas produzem enzimas capazes de clivar a ligação dos anticorpos à sua superfície.

Assim, ao suprimirem a resposta Th1, aumentam a suscetibilidade do hospedeiro definitivo a outras infeções, como é o caso da infeção por *Salmonella dublin* (Aitken *et al.*, 1978) e *Mycobacterium bovis*. Foi recentemente demonstrado que a infeção por *F. hepatica* pode comprometer a sensibilidade dos testes para o diagnóstico da tuberculose (Flynn *et al.*, 2007).

O número de parasitas adultos presentes varia com a idade, o sexo e imunidade do hospedeiro, a fecundidade do parasita e fases da infeção (Phiri *et al.*, 2006).

Chauvin, Bouvet e Boulard (1995) provaram que as migrações para os ductos biliares, numa segunda infeção, são mais rápidas.

Por sua vez, as lesões de migração criam um ambiente anaeróbio que predispõe ao aparecimento da “doença negra” (hepatite infecciosa necrótica) devido a infeção por *Clostridium novyi* que culmina numa toxémia mortal (Mitchell, 2002) e hemoglobinúria bacilar por *C. haemolyticum* (Kaplan, 2001).

Foi também descrita a possibilidade de fixação de complexos imunes nos glomérulos renais provocando uma glomerulonefrite (Marques, Scroferneker & Edelweiss, 2005).

#### **3.10.4 Diagnóstico clínico**

O diagnóstico clínico deve basear-se no quadro clínico, na ocorrência sazonal, nos tipos de clima prevalentes e na história prévia de fasciolose na exploração ou de identificação de habitats de caracóis (Urquhart *et al.*, 1998). Durante a procura de sinais clínicos na exploração, apesar de não serem sinais patognomónicos, devem ser suficientemente expressivos para que o veterinário possa diagnosticar a doença (Heras, 1974).

A sintomatologia é variável de acordo com a carga parasitária, com a fase de desenvolvimento parasitário e com a espécie de hospedeiro envolvido. O sinal mais comum é a “anemia de inverno” (caracterizada mais à frente), se bem que esta varia conforme as condições climáticas (Corrêa, 1976). Segundo Heras (1974) e Malone (2002), em bovinos, só há doença clínica quando a carga parasitária é superior a 200 fascíolas.

Podemos distinguir três formas clínicas de fasciolose: aguda, subaguda e crónica. Há ainda uma forma hiperaguda ou hipoplética, que ocorre nos ovinos. Esta passa despercebida e o animal é encontrado morto na posição típica de descanso com o focinho apoiado no chão (Heras, 1974).

O aparecimento destas formas clínicas está relacionado com a disponibilidade de metacercárias no pasto, número de metacercárias ingeridas e idade do HD.

##### *- Forma aguda*

Afeta especialmente ovinos (adultos e jovens) e caprinos, e menos frequentemente vitelos. Esta forma está associada à ingestão de grande número de metacercárias num curto período de tempo (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 1999). Admite-se que o maior grau de infeção dos ovinos se deva aos seus hábitos alimentares, uma vez que estes se

alimentam das porções mais baixas da vegetação, onde há maior concentração de metacercárias. Pelo contrário, os bovinos ingerem a porção mais alta das folhas o que os torna menos suscetíveis à contaminação por metacercárias (Corrêa, 1976).

Os sinais característicos da forma aguda estão associados à hepatite traumática provocada pela migração das formas imaturas pelo parênquima hepático, sendo os sinais mais comuns: morte súbita na pré-patência (2 a 6 semanas pós-infecção) com perda de sangue e falência hepática; anemia hemorrágica aguda (normocítica, normocrômica); hipertermia, depressão, inapetência, perda de apetite, perda de condição corporal, icterícia, palidez das mucosas, taquipneia e dispneia de esforço por pneumonia secundária, dor abdominal, atonia ruminal, hepatomegalia e ascite.

#### *- Forma subaguda*

Tal como a forma aguda, a forma subaguda afeta ovinos (adultos e jovens) e caprinos, pois está associada à ingestão de grande número de metacercárias, mas neste caso a exposição faz-se durante um período de tempo suficientemente longo para não causar um processo agudo. Nesta fase a morte ocorre entre 10 a 20 semanas pós-infecção (p.i.).

Os sintomas são muito semelhantes à forma aguda, e a nível de necrópsia já se encontram algumas fascíolas adultas nos ductos biliares.

#### *- Forma Crónica*

Forma clínica mais frequente em bovinos, está associada à ingestão de pequeno número de metacercárias durante um período prolongado, permitindo reinfeções consecutivas, que, no caso dos bovinos, proporciona desenvolvimento de alguma resistência a estas reinfeções. Corresponde à presença de adultos nos ductos biliares que aí exercem ação hematófaga e alteram a arquitetura dos ductos biliares e do parênquima hepático, provocando cirrose biliar progressiva com distensão dos condutos biliares espessados, fibrosos ou mesmo calcificados.

Os sintomas clínicos são observados principalmente no final do inverno e início da primavera e caracterizam-se por anemia, hipoproteinemia (hipoalbuminemia); emagrecimento progressivo (a perda progressiva de condição corporal é mais visível em animais com alimentação pobre); perdas na produção de carne, leite (Mezo, 2011) e lã; diminuição da taxa de crescimento; constipação intestinal intensa durante a qual as fezes eliminadas são duras e quebradiças e por fim diarreicas; hepatomegalia com dor à palpação (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 1999) e edemas (figura 5). O edema é geralmente submandibular e conhecido vulgarmente como papo ou papeira. Inicialmente o edema aparece ao fim de cada dia, visto que os animais pastam muito tempo com a cabeça baixa. Durante a noite, com a cabeça mais elevada, o edema desaparece. Com a progressão da doença o edema torna-se mais acentuado e permanente. Aparece também edema abdominal (Silva Leitão, 1978). Embora outros autores refiram que o edema submandibular

e a ascite não são comuns e não há relatos de dor à palpação, nem hepatomegalia (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 1999).

**Figura 5 – Fasciolose Bovina – Edema submandibular (Original, Moita)**



A perda de peso é um sinal muito característico e a diminuição do extrato seco do leite é muito importante, uma vez que o fígado tem uma função ativa na síntese da gordura, da qual a *F. hepatica* altera o bom funcionamento (Heras, 1974). O intervalo entre partos pode aumentar em 4,5 dias (Charlier *et al.*, 2007).

A causa de anemia é desconhecida, embora haja algumas hipóteses que a expliquem. Uma defende que se deve à hemorragia hepática causada pela migração das formas imaturas, outra que alega que poderá derivar da alteração do metabolismo do ferro que estimula a eritropoiese e ainda outra que defende que é causada pela ação hematófaga dos adultos, embora alguns autores afirmem que a ação hematófaga, numa fase mais avançada da infeção, fica limitada pelo espessamento dos canais biliares. Põe-se também a hipótese da anemia se dever à libertação de uma toxina hemolítica segregada pelo parasita, ou dos altos níveis de prolina provocarem supressão da hematopoiese.

A hipoalbuminemia e hiperglobulinemia são as alterações das proteínas séricas associadas a fasciolose mais relevantes. Desenvolvem-se em duas fases: a primeira coincide com a migração das adolescercárias e caracteriza-se por uma leve hipoalbuminemia, provavelmente devido à diminuição da sua produção, aliada à expansão do volume plasmático, associada a uma hiperglobulinemia mais pronunciada, que provavelmente se deve ao desenvolvimento de uma resposta imunitária com produção de imunoglobolinas. A segunda fase coincide com a presença de adultos nos ductos biliares e associa-se a uma hipoalbuminemia, por perda da albumina para o intestino e redução progressiva da globulina. Assim, o aumento da síntese de albumina provavelmente desvia os aminoácidos disponíveis dos outros metabolismos proteicos (músculo, leite, lã). Isto justifica a diminuição de produtividade associada a esta parasitose (Mehlhorn, 2001).

A fasciolose crónica apresenta múltiplas modalidades e está dependente da resistência genética do animal parasitado e da virulência específica do tremátode (Silva Leitão, 1978).

Está provado que o gado bovino desenvolve resistência imunológica contra *F. hepatica*. Por sua vez, nos ovinos, esta resistência é menor ou mesmo inexistente. Quanto ao desenvolvimento parasitário, Dixon, 1964, demonstrou que as fascíolas crescem mais

rápido, mas com menor prolificidade nos ovinos do que nos bovinos (citado por Hurtrez-Boussès *et al.*, 2001).

Muitas vezes, nos bovinos, a fasciolose pode ser agravada com infecção por tricostrongilídeos gastrointestinais, sendo a *Ostertagia ostertagi* um dos helmintes de maior relevância clínica (Mitchell, 2002). Estas duas parasitoses quando presentes em simultâneo têm um efeito aditivo e não sinérgico (Charlier *et al.*, 2007).

Uma vez que o ciclo evolutivo deste tremátode e a sua prevalência dependem do clima, foram desenvolvidos sistemas de previsão baseados em dados meteorológicos que calculam a provável época e gravidade da doença (Urquhart *et al.*, 1998). A limitação destes sistemas de previsão é não haver um modelo de transmissão subjacente de todo o ciclo do parasita para construir o mapa, assim, efeitos cumulativos não são considerados (Knubben-schneizer, 2008).

Assim, o reconhecimento dos habitats dos caracóis, identificação dos sinais clínicos e, acima de tudo, análise dos exames laboratoriais, vão confirmar a presença deste parasita que pode permanecer clinicamente silencioso, mas economicamente dispendioso (Schweizer *et al.*, 2005).

### **3.10.5 Diagnóstico laboratorial**

A fasciolose, pela sua ação sobre o fígado e sistema circulatório causa várias alterações passíveis de serem medidas a nível laboratorial. No que refere à ação sobre o parênquima hepático e canalículos biliares, é de prever que haja alterações ao nível das enzimas hepáticas. As mais sensíveis são a glutamato-desidrogenase (GLDH) e a gama-glutamyltranspeptidase (GGT), e com efeito, na presença desta parasitose a GLDH é libertada quando há lesão das células parenquimatosas, tornando-se os níveis elevados nas primeiras semanas de infecção. Por outro lado, a GGT é libertada quando há lesão das células epiteliais que revestem os ductos biliares, mantendo os níveis elevados por um período de tempo mais longo (Urquhart *et al.*, 1998). Na ausência de outros dados, o aumento da atividade plasmática da GLDH ou da GGT indica fasciolose aguda e subaguda ou crónica, respetivamente (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 1999). Porém, também é possível observar alterações nas enzimas sorbitol desidrogenase (SDH) e gamma-glutamyl transpeptidase (OCT), que geralmente se encontram aumentadas.

A hipoproteinemia moderada, com hipoalbuminemia e aumento dos níveis das imunoglobulinas, assim como a anemia, a eosinofilia e a leucocitose são indicadores secundários não específicos. A ausência destes não pode excluir a presença de parasitas (Simsek *et al.*, 2006).

Globulinas alfa e beta são proteínas indicadoras de inflamação e encontram-se algumas vezes aumentadas. As gamaglobulinas são particularmente indicadoras de reação imunitária relacionada com a infecção parasitária, com a produção de imunoglobulinas específicas (IgG,

IgM), que são parcialmente protetoras e os seus valores aumentam logo nas primeiras semanas de infeção (Ortiz *et al.*, 2000).

A anemia é um indicador de cronicidade, mudando de normocítica para macrocítica no início da fase crónica, e a eritropoiese ferropénica, conseqüente da diminuição da síntese de hemoglobina pela falta de ferro, conduz ao desenvolvimento de microcitose e hipocromia numa fase mais avançada (Valero *et al.*, 2008).

A concentração de bilirrubina sérica e a contagem diferencial de leucócitos são bastante específicos desta parasitose e podem ser facilmente medidos e sem grandes custos associados (Mekroud, Chauvin & Rondelaud, 2007). A eosinofilia surge durante a migração intra-hepática das adolelescercárias e permanece quando os parasitas se tornam adultos.

A nível académico pode fazer-se recolha ecoguiada da bÍlis diretamente da vesícula biliar (Rapsch *et al.*, 2006) e também biÓpsia hepática por punção para diagnóstico histopatológico, esta última é apenas aplicada em ovinos (Scherer *et al.*, 1999).

### **3.10.6 Achados de necrópsia**

Atualmente ainda há muitos fÍgados reprovados a nível de matadouro (Conceição, 2001), especialmente de bovinos devido à ausência de sintomatologia nesta espécie. Porém, se a cirrose for circunscrita aos canais biliares pode fazer-se a limpeza da zona atingida e aprovar para consumo humano o resto da víscera (Veloso, 2012).

A sensibilidade dos técnicos dos matadouros para este tipo de patologia permite que haja um bom controlo desta parasitose a este nível, embora esta prática seja limitada na presença de infeções moderadas ou muito precoces. Cerca de um terço das infeções não são assinaladas no matadouro e o retorno da informação ao produtor não é assegurado

Na forma aguda as lesões mais frequentes são: hepatomegalia; superfície do fÍgado com trajetos hemorrágicos; parênquima hepático friável; rotura da cápsula de Glisson e hemoperitoneu; por vezes visualizam-se fascÍolas imaturas no parênquima. Também os linfonodos hepáticos estão alterados apresentando-se tumefactos e podem mesmo ser encontradas fascÍolas jovens no seu interior (Corrêa, 1976). Tal como, na presença de infeções maciças e repetidas, se pode desenvolver peritonite. O exame mais minucioso dos trajetos traçados pela *F. hepatica* revela que no interior do seu lúmen está por vezes preenchido por um exsudado amarelo-esverdeado, composto por infiltrados celulares primários ricos em ferro e porfirina, e onde muitas vezes se encontram formas imaturas ou até formas adultas (Phiri *et al.*, 2006).

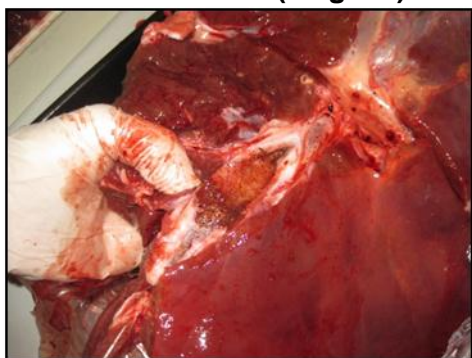
Na forma crónica, as lesões mais frequentes são:

*Alterações do parênquima hepático* (figura 7): cicatrização das lesões causadas pelas migrações; lesões inflamatórias induzidas pelos antigénios de superfície e secretados pelas formas imaturas; fibrose/esclerose do parênquima hepático - a fibrose é mais marcada no fÍgado dos bovinos; à incisão, contêm um número variável de parasitas adultos, que por

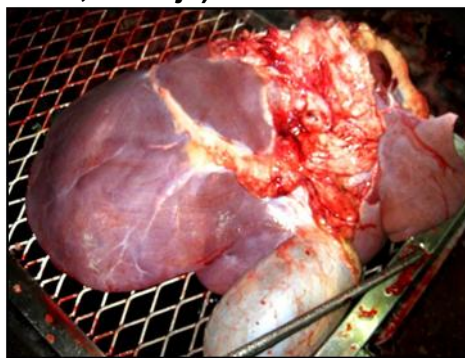
vezes não é proporcional à extensão das lesões. Estas lesões são mais acentuadas no lobo ventral do fígado, onde a migração parasitária máxima ocorre (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 1999). O tecido fibroso também é depositado no espaço porta. Por vezes as formas imaturas não conseguem alcançar os ductos biliares formando quistos fibrosos no parênquima hepático (Phiri *et al.*, 2006).

**Colangite hiperplásica:** hiperplasia do epitélio dos ductos biliares; infiltração de eosinófilos, linfócitos e macrófagos em resposta à presença de adultos que exercem uma ação traumática devido as suas espinhas do tegumento. A fasciolose leva também a predisposição para formação de cálculos (Corrêa, 1976). Nos bovinos é característica a calcificação distrófica dos ductos biliares (figura 6).

**Figura 6 – Fígado de bovino apresentando calcificação distrófica dos ductos biliares (Original)**



**Figura 7 – Fígado de bovino reprovado em matadouro (Original, Matadouro STEC, Montijo)**



A nível microscópico, as secções de fascíolas presentes nos ductos biliares e no parênquima hepático estão rodeadas por neutrófilos e os hepatócitos adjacentes com lesões degenerativas. Os ductos biliares menores apresentam uma severa descamação epitelial e os ductos maiores têm alterações hiperplásicas do epitélio e estão rodeados por fibrose difusa. Também podem ser observados alguns macrófagos e células de Kupffer com hemossiderose (Phiri *et al.*, 2006).

Quando há migrações ectópicas e as fascíolas se instalam nos pulmões, as lesões provocadas consistem em nódulos subpleurais nas porções periféricas do pulmão. O seu diâmetro varia entre um a vários cm e consistem em abscessos finamente encapsulados com conteúdo gelatinoso, purulento e acastanhado. O parasita morto ou vivo permanece nos detritos, é pequeno e difícil de encontrar (Stalker & Hayes, 2007).

### **3.10.7 Diagnóstico coprológico**

O diagnóstico de fasciolose, baseia-se usualmente na observação e contagem de ovos de fasciola nas fezes. Este é o método de diagnóstico *standard* para este tipo de infeção em bovinos. Estes testes são inúteis no período pré-patente da infeção, 8 a 10 semanas p.i., pois as fascíolas ainda estão em fase de migração e há uma relativa baixa eliminação de ovos, apesar de esta ser a fase mais patogénica para o hospedeiro, o que o torna um

método de baixa sensibilidade. A observação de ovos nas fezes é também dificultada se a carga parasitária for demasiado reduzida para ser detetada nas fezes (Happish & Boray, 1969; Arias *et al.*, 2006).

A presença de ovos nas fezes pode ser influenciada por vários fatores, incluindo a variabilidade de fertilidade do parasita, a sua idade, o volume de ingesta e a resistência do hospedeiro (Phiri *et al.*, 2006). Segundo Phiri *et al.* (2006), não há correlação entre a presença de fascíolas no fígado e presença de ovos nas fezes.

No caso dos tremátodes, como apenas os ovos são eliminados nas fezes, a observação destes macroscopicamente não é útil. Recorre-se então ao seu exame microscópico. Este pode ser exame direto, pela realização de um esfregaço fecal, que permite evidenciar ovos de tremátodes que se poderiam perder nas técnicas de concentração. A limitação desta técnica é o grau de infeção que, uma vez que se usa uma pequena amostra de fezes, tem de ser alto para que se obtenha um resultado positivo. Assim, resultados negativos são inconclusivos e tem de se recorrer a técnicas de concentração de ovos.

Dentro das técnicas de concentração de ovos podemos organizar dois grupos: técnicas de sedimentação e técnicas de flutuação. Sendo os ovos de *F. hepatica* pesados e densos, as técnicas de sedimentação são mais precisas e sensíveis que as técnicas de flutuação (Happish & Boray, 1969; Dorchies, 2006).

Os métodos de flutuação utilizam soluções de elevada densidade como o sulfato de zinco e o iodeto de mercúrio. Este último é atualmente limitado devido as características poluentes do mercúrio. Quanto ao sulfato de zinco, tem o inconveniente de poder deformar os ovos devido a fenómenos osmóticos. Assim, as técnicas de sedimentação são mais recomendadas.

Por vezes, sedimentação simples com água da torneira é suficiente, sendo um método simples e barato, mas bastante mais moroso que as outras técnicas (Dorchies, 2006). Esta técnica é especialmente útil para diagnóstico quantitativo, especialmente para pequenas infeções (Happish & Boray, 1969). Pode ser adicionado um corante de contraste ao sedimento (azul de metileno) que permite destacar a cor dourada dos ovos.

Para colmatar a falta de sensibilidade das técnicas de sedimentação podem ser usadas a filtração e a centrifugação para concentração de ovos.

Há estudos que demonstram que tem de haver um mínimo de 20 adultos nos canais biliares para que a eliminação de ovos seja detetada em contagem fecal. Assim, um resultado positivo é a prova definitiva de uma infeção ativa e de um foco de infeção (Dorchies, 2006) e deve-se proceder à desparasitação de todo o efetivo e não apenas do animal detetado.

Pode haver erros na identificação dos ovos presentes nas fezes, pois podem ter morfologia semelhante, como é o caso do parasita do rúmen, *Paramphistomum*, cujos ovos podem ser morfológicamente confundidos, embora pela cor seja facilmente distinguido, pois este

apresenta uma coloração branca e não dourada como os ovos de *F. hepatica* (Rapsch *et al.*, 2006), apresentando também uma forma mais longa e o seu interior mais desorganizado.

As técnicas coprológicas não variam consoante a estação do ano, ao contrário das técnicas serológicas (Charlier *et al.*, 2008).

Segundo Salimi-Bejestani *et al* (2005a) o método de sedimentação não é muito eficaz, sendo os métodos serológicos mais fidedignos que este.

### **3.10.8 Diagnóstico serológico**

Ao longo dos últimos 25 anos, desenvolveram-se várias técnicas de diagnóstico com alta sensibilidade e especificidade, sendo um exemplo as de diagnóstico serológico. Estas procuram colmatar as falhas nos métodos até agora descritos, tentando ser mais fiáveis e permitir um diagnóstico mais precoce.

Grande parte dos testes utilizados detetam anticorpos sanguíneos, mas também podem ser detetados antigénios, tanto no soro como nas fezes.

É preciso alguma precaução ao aplicar estas técnicas na realidade do dia-a-dia, pois a sua eficiência fica comprometida quando se trata de amostras colhidas fora do ambiente experimental (Rapsch *et al.*, 2006). Além disso, estas técnicas têm um carácter mais qualitativo que quantitativo, não permitindo determinar o grau de infeção (Charlier *et al.*, 2007).

#### **3.10.8.1 Técnicas Serológicas**

Para aumentar o sucesso de diagnóstico durante ambas as fases de pré-patência e de cronicidade da infeção, foram descritos vários métodos serológicos. A maioria deles utiliza a técnica de ELISA. Este tipo de imunodiagnóstico está a ganhar cada vez mais importância em medicina veterinária pela sua exequibilidade, preço e sensibilidade. Apesar de já estarem em desuso por serem mais dispendiosas ou menos fiáveis, são ainda utilizadas a técnica de Enzyme-linked Immunoelctrotransfer Blot (EITB), de hemaglutinação direta e indireta, de fixação do complemento, de imunofluorescência e de eletroforese.

As técnicas serológicas tornam-se uma mais-valia, quando comparadas às limitações das técnicas coprológicas, uma vez que estas permitem identificar a presença de infeção antes das técnicas coprológicas, permitindo que se apliquem tratamentos mais precocemente, mesmo antes do aparecimento de sinais clínicos, com a vantagem de as amostras de sangue utilizadas nestas técnicas poderem ser utilizadas para pesquisa de outros agentes e patologias (Dorchies, 2006).

Algumas destas técnicas assentam na deteção de anticorpos usando estratos somáticos ou produtos de excreção/secreção (ES) do parasita (Hillyer & Santiago, 1979).

Num estudo realizado em 2005a, Salimi-Bejestani *et al.* concluíram que é possível que a dose de metacercárias ingeridas possa afetar o desenvolvimento de uma resposta imunitária detetável serologicamente. Ainda assim, é de esperar que o serodiagnóstico detete uma

infecção mais rapidamente que a contagem fecal. Bossaert *et al* (2000), não encontraram relação entre o título de anticorpos e a carga parasitária.

Um diagnóstico positivo não indica necessariamente uma infecção atual mas sim uma história de exposição ao agente. Inclusive, os anticorpos podem persistir até 6 meses após tratamento com triclabendazol de vacas infetadas (Castro, Freyre & Hernández, 2000).

Há vários tipos de teste:

a) Testes serológicos para detecção de anticorpos no soro:

São os mais usados atualmente, recorrem a uma técnica de ELISA indireto, e podem utilizar antigénio somático f2 (Institut Pourqueir, Montpellier, France, 1985), antigénios de excreção/secreção (ES) em bruto ou sob a forma de frações purificadas/recombinantes. Uma das frações antigénicas mais ativas é a proteinase catépsina L1 das células do epitélio intestinal, que cliva imunoglobulinas e inibe a ação dos eosinófilos sobre os jovens parasitas.

Os anticorpos sanguíneos podem ser detetados 2 a 4 semanas após a infecção (Paz-Silva *et al.*, 2003) e podem persistir até 8 meses após tratamento efetivo (Chauvin, Moreau & Boulard, 1997). Quando utilizada a técnica de ELISA com APS (proteína de 2,9kDa de *F. hepatica*) após aplicação do tratamento, a resposta das IgG converte-se em valores negativos após 4 semanas (Paz-Silva *et al.*, 2005). Esta técnica tem 86% e 88% de sensibilidade e especificidade respetivamente (Arias, 2010).

A técnica f2-ELISA tem grande sensibilidade e especificidade, 95 e 98,2% respetivamente. Por sua vez, a técnica ES-ELISA, tem 98 e 96% respetivamente. Estas permitem detetar infeções precocemente e os resultados falsos positivos são limitados quando se utiliza antigénios purificados. Outro antigénio recombinante usado atualmente, designado rFh8, é uma proteína de ligação de cálcio presente nos antigénios ES dos parasitas adultos. Esta proteína é libertada nas fases de migração do parasita e pode estar relacionada com mecanismos de evasão do parasita. Frequentemente são encontradas IgG contra rFh8 nos animais parasitados com fasciola (Silva *et al.*, 2004).

b) Testes serológicos para detecção de anticorpos no leite do tanque de ordenha:

O método utilizado é o f2- ELISA (Molloy *et al.*, 2005). No entanto, para detetar a presença de *F. hepatica* a partir de amostras de leite, apesar de rápida e de baixo custo, não é tão fiável como a partir de amostras de soro, pois esta técnica tem 96% sensibilidade e 80% de especificidade (Salimi-Bejestani *et al.*, 2005b), uma vez que há diluição dos títulos de anticorpos e quando há um resultado positivo todo o efetivo é considerado positivo. Este facto pode ser colmatado utilizando amostras de leite individuais, e, neste caso, a sensibilidade das análises assemelha-se às obtidas através de soro (Mezo, 2011). Reichel *et al.*, em 2005, demonstraram que, através da primeira técnica, apenas eram detetadas as explorações com mais de 60% do efetivo infetado. Outro estudo levado a cabo por Salimi-

Bejestani *et al* (2005b), detetou explorações com apenas 25% do efetivo infetado. Por sua vez, Mezo (2011), demonstrou que o método de amostras individuais, quando analisadas 3 frações da mesma amostra, tem uma sensibilidade de 93,9%. Este autor afirma ainda que este é um método muito rápido, preciso e deteta explorações com apenas 12% das vacas infetadas.

c) Testes serológicos para deteção de antigénios no soro:

Estes permitem detetar a presença de parasitas vivos e pode ser detetado 6 dias após a infeção, e diminuem 10 semanas p.i. (Arias *et al.*, 2006) pois deteta a migração das formas imaturas. Duménigo e Mezo (1999) demonstraram que uma técnica de ELISA sandwich baseada num anticorpo monoclonal (ES 78), é um método sensível, específico e adequado para a deteção de *F. hepatica* não só no soro mas também nas fezes de animais e humanos com fasciolose ativa.

d) Testes serológicos para deteção de copro-antigénios:

É utilizado um método ultra sensível, que recorre a anticorpos monoclonais MM3, que reagem contra produtos de ES de *F. hepatica*. Permite detetar positividade 1-5 semanas p.i.. Após tratamento efetivo, os copro-antigénios desaparecem em 2 a 3 semanas, o que o torna um método mais rigoroso. É um método muito mais sensível que os descritos anteriormente, visto que deteta copro-antigénios de animais com cargas parasitárias muito reduzidas (uma a duas fascíolas adultas). Porém, a grande desvantagem deste método é o elevado custo (Mezo *et al.*, 2004). Foi utilizado na Bélgica, para comparação com outros métodos em investigações epidemiológicas, e a sensibilidade e especificidade deste teste foram respetivamente 94 e 93% (Charlier *et al.*, 2008).

### 3.10.8.2 Antigénios

A par das técnicas de diagnóstico usadas, é necessária a evolução dos antigénios usados. Cada vez mais se procura um antigénio com uma maior sensibilidade e especificidade para que as técnicas possam ser mais fiáveis e rigorosas.

O antigénio elaborado através do verme total (estratos somáticos) foi o primeiro a ser desenvolvido mas tem vindo a cair em desuso pois dá aso a muitas reações cruzadas, tornando os resultados pouco específicos (Conceição, 2001).

Atualmente o mais usado é o antigénio de Excreção/Secreção (ES) e tem origem quer na superfície do parasita quer em produtos secretados pelo seu aparelho digestivo.

O antigénio ES de *F. hepatica* usado nas técnicas de ELISA, eletroforese SDS-page e hemaglutinação, veio mostrar-se mais específico apesar da sua instabilidade e, por vezes, difícil reprodutibilidade de perfil de immunoblotting.

Por fracionamento do antigénio ES, surgiu a fração F2, designada como antigénio somático f2. São referidas por vários autores como promissoras no diagnóstico humano.

Outras proteínas como a proteinase catépsina parecem promissoras no que diz respeito à sua aplicação quer ao imunodiagnóstico quer à imunoprofilaxia.

*Antigénios de Excreção/Secreção (ES)*: são preparados a partir de parasitas adultos obtidos a partir de um fígado contaminado. Estes são incubados durante 24h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> em meio RPMI-1640. O meio é removido cada 3h e depois centrifugado e concentrado (Díaz *et al.*, 2006). A concentração proteica é estimada pelo método Warburg e Christian (1941) tendo albumina sérica bovina como *standard*, as amostras são retiradas em alíquotas e armazenadas a -20°C (Ortiz *et al.*, 2000).

*Antigénio de Superfície (SU)*: após preparar os antigénios ES, as fascíolas são mantidas num meio específico e agitados por 30 minutos para que libertem os seus antigénios de superfície. Os produtos de superfície sofrem diálise a 4°C durante a noite numa solução PBS. A solução final é centrifugada e a concentração proteica estimada, por fim são armazenados a -20°C (Ortiz *et al.*, 2000).

*Antigénios Somáticos (AS)*: Após extração dos produtos de superfície, as fascíolas são moídas em gelo seco e sofre um processo semelhante ao descrito anteriormente para os SU (Ortiz *et al.*, 2000).

*Proteínas Recombinantes (rAPS)*: Uma cadeia de ADN com o gene de interesse é incorporado num bacteriófago e é criada uma biblioteca de cADN. Posteriormente estes são inoculados numa bactéria *E.coli* recombinante que se vai multiplicar e produzir o gene de interesse em grandes quantidades. Por fim é realizada a extração e purificação da proteína recombinante e a este produto final dá-se o nome de 'antigénio unitário específico', que no caso de ser de *Fasciola hepatica* recebe a designação fhAPS. Este permite reduzir grandemente o problema de reações cruzadas com outros parasitas (Maria Sol Arias; Comunicação Pessoal, 2010).

A técnica de ELISA é especialmente usada para diagnóstico de rebanho, pois permite observação de vários soros em simultâneo. A técnica de ELISA indireta com APS, pode ser útil na avaliação da eficácia de tratamento em condições de campo (Paz-Silva *et al.*, 2005). Por sua vez, as outras técnicas podem tornar-se pouco sensíveis, pois podem detetar anticorpos até alguns meses após a infeção estar controlada.

O ideal é associar uma técnica que detete anticorpos e uma que detete antigénios e assim conseguir um diagnóstico mais fiável que a análise coprológica clássica (Sánchez-Andrade *et al.*, 2000).

Com a constante evolução na área de investigação, são agora também aplicadas técnicas biologia molecular (PCR, entre outras) que permitem detetar infeções no período de pré patência e realizar estudos epidemiológicos.

Charlier *et al* (2008) compararam as técnicas coprológicas com as serológicas (ELISA) e concluíram que estas últimas variam consoante a época do ano, pois a infeção na primavera

é mais antiga que a infecção no outono e os títulos de anticorpos presentes vão ser diferentes.

Em suma, não existe, atualmente, nenhum teste que possa ser considerado com sensibilidade de 100% e especificidade também de 100%. Rapsch *et al*, em 2006, compararam os quatro métodos de identificação de infecção mais utilizados e obtiveram as seguintes percentagens de sensibilidade: contagem fecal de ovos - 69,0%, determinação da presença de ovos na vesícula biliar – 93,4%, deteção de Ac por ELISA – 91,7% e inspeção de matadouro – 63,2%. Assim, a sensibilidade da técnica de contagem fecal de ovos é relativamente aceitável para casos crónicos, enquanto a técnica por ELISA não se torna mais acessível e prática corrente.

### **3.10.9 Diagnóstico diferencial**

A fasciolose aguda pode ser confundida com hemoncose, hepatite infecciosa necrótica, eperythrozoonose, anthrax e enterotoxémia.

Por sua vez a fasciolose crónica pode ser confundida com deficiências nutricionais pelo cobre e cobalto, outros parasitas internos incluindo os que provocam gastroenterites (como é o caso da ostertagiose nos bovinos) e com a paratuberculose. (Radostitis *et al.*, 2007).

### **3.10.10 Tratamento**

#### **3.10.10.1 Princípios ativos mais utilizados (tabela 1)**

Para um tremátode como *Fasciola hepatica*, há duas formas de entrada dos fármacos antihelmínticos: através do tegumento e por ingestão oral. A predominância de uma dessas formas depende da farmacocinética do princípio ativo utilizado.

Uma vez que as formas adultas são hematófagas, a forma mais fácil de lhes fazer chegar um fármaco é que este se ligue a proteínas plasmáticas e assim seja ingerido com o sangue.

Os fasciolicidas pertencem a cinco famílias químicas de acordo com a sua estrutura química e ação: fenóis halogenados (nitroxinil), salicilanilidas (closantel e oxiclozanida), as sulfonamidas (clorsulon), os benzimidazóis (triclabendazol, albendazol e netobimina) e os fenoxialcanos (dianfenetida).

Apenas três moléculas têm uma atividade simultaneamente adulticida e larvicida: nitroxinil, closantel e triclabendazol. Todas as outras têm uma atividade apenas adulticida exceto os fenoxialcanos que têm atividade apenas larvicida.

A escolha do fármaco depende do tipo de produção. Poucos fármacos podem ser usados em vacas em lactação sem que o seu leite tenha de ser rejeitado. Além disso, o alvo também deve ser considerado, ou seja, saber qual o estágio de evolução dos parasitas que queremos controlar. A documentação legal especifica se o produto é um adulticida (afetando apenas os parasitas com idades de oito ou mais semanas) ou larvicida (afetando apenas

adolescercárias ou larvas em migração com idade até seis semanas) ou efetiva contra todos os estádios do parasita.

**Tabela 1 – Fasciolicidas mais comuns em Ruminantes (Adaptado de Apifarma, 2011)**

Grupo químico	Princípio Ativo	Nome Comercial	Via de administração	Dose (mg/Kg)	Intervalo de Segurança (dias)	
					Leite	Carne
Fenóis halogenados	<i>Nitroxinil</i>	Dovenix®	Subcutânea	10	X	60
		Flukiver®	Subcutânea	5	X	28
Salicilanilidas	<i>Closantel</i>	Closamectin FF®*	Tópica	20	X	28
		Closamectin FF®*	Subcutânea	5	X	49
	<i>Oxiclosanida**</i>	Zanil®	Oral	10	72	28
Sulfonamidas	<i>Clorsulon</i>	Ivomec F®*	Subcutânea	2	X	66
		Bimectin Plus®*				
		Alverin Plus®				
Benzimidazóis	<i>Triclabendazol</i>	Fasinex 5-10%®	Oral	12	X	28
	<i>Albendazol</i>	Albendavet 10%®	Oral	10	4	14
		Valben 2.5%®	Oral	10	3	12
	<i>Netobimina**</i>	Hapasil 15%®	Oral	20	2	10

\* associado a Ivermectina

\*\* não comercializado em Portugal

### *Fenóis Halogenados*

Fenóis halogenados são bastante ativos contra parasitas adultos, mas apenas o nitroxinil mostra boa atividade, embora irregular, contra parasitas entre as 6 e 8 semanas de idade. Entre os mecanismos de ação deste grupo estão descritos a inibição de duas enzimas chave da via respiratória (malato desidrogenase, succino desidrogenase) e inibição da fosforilação oxidativa. Estes fenómenos impedem a formação de ATP e em menos de 3 horas provocam paralisia espástica no parasita. São também visíveis lesões vacuolares na cutícula após a administração de alguns compostos deste grupo e rutura do sistema

reprodutivo em 4 horas (Fairweather & Boray, 1999). O nitroxinil está disponível no mercado com o nome comercial Dovenix® e deve ser administrado via subcutânea na dose de 10 mg/Kg. Desaconselha-se a sua administração oral, visto que este é degradado a nível do rúmen.

O amolecimento das fezes e ligeira perda de apetite pode ser visto em alguns animais após o tratamento nas doses recomendadas.

A margem de segurança destes compostos não é tão alta como a de outros fasciolicidas. Doses elevadas podem provocar sintomas associados à inativação da fosforilação oxidativa, ou seja, hiperventilação, hipertermia, convulsões, taquicardia. Estes medicamentos não têm efeitos teratogénicos (Spinosa, Górnaiak & Bernardi, 2006).

Estes fármacos são eliminados rapidamente nas fezes e na urina.

### *Salicilanilidas*

As salicilanilidas têm ação adulticida e ação contra as formas imaturas a partir das 6 semanas, mas não são efetivas contra fases mais precoces, pois a sua ação é mais eficaz contra as formas que se encontram nos ductos biliares (Hanna *et al.*, 2006). Podem também ser usadas no controlo de nemátodes como *Haemonchus*. Têm uma ação semelhante aos fenóis halogenados anteriormente descritos, interferem na fosforilação oxidativa, diminuindo a síntese de ATP.

Foi proposta uma forma alternativa para a ação metabólica do closantel, nomeadamente na glicólise, com a acumulação de glucose 6-fosfato prévia à redução do ATP (Fairweather & Boray, 1999). O closantel tem como denominação comercial Flukiver 5%®, é administrado por via subcutânea na dose de 5mg/kg (Apifarma, 2011), ou Closamectin FF® quando associado a ivermectina. Este pode ser administrado topicamente (pour-on) na dose de 20mg/kg ou injetável na dose 5mg/kg (Apifarma, 2011).

Na aplicação tópica a concentração plasmática é menor, o que demonstra uma menor absorção a este nível. Existe também o perigo de animais não tratados, ao terem comportamentos de grooming, serem expostos a pequenas quantidades de princípio ativo e assim desenvolverem resistência. Foram feitos vários estudos com lactonas macrocíclicas (por exemplo ivermectina) que comprovam este fenómeno (Laffont *et al.*, 2001; Martin, Chambers & Hennessy, 2009).

A sua atividade contra os parasitas hematófagos está relacionada com a forte ligação à albumina plasmática e mantem-se ativo na circulação por 12 semanas. Em casos de sobredosagem, os sinais mais comuns são a dilatação da pupila, exoftalmia, anorexia, fraqueza e morte. Não foi relatado efeito carcinogénico, teratogénico ou embriotóxico. É eliminado nas fezes junto com a bÍlis e uma muito pequena percentagem é eliminada na urina.

Outro fármaco pertencente a este grupo é a oxiclozanida, não comercializada em Portugal, pode ser administrada por via oral na dose 13-16 mg/kg. Tem um efeito significativo contra os adultos, mas é ineficaz contra a maioria das formas imaturas. Também tem uma forte afinidade para a albumina plasmática, mas é metabolizado como um metabolito de glucuronida ativo e eliminado na bÍlis mais rapidamente. A oxiclozanida é o único fasciolicida que pode ser utilizado durante a lactação, uma vez que não tem intervalo de segurança (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 1999). Pode haver efeitos colaterais com doses superiores a 25mg/kg, por exemplo: depressão, diarreia, perda de peso e diminuição da produção de leite ou até mesmo efeitos neurotóxicos e morte.

### *Sulfonamidas*

Este grupo tem ação apenas sobre os parasitas adultos ou fascíolas imaturas a partir das 8 semanas. Pertence a este grupo o clorsulon, que tem um mecanismo de ação único. Este atua ao nível das enzimas glicolíticas 8-fosfoglicerato-quinase e fosfo-gliceromutase, inibindo-as, o que por sua vez bloqueia a glicólise, que é a principal via metabólica utilizada pelo parasita para a produção de energia. A redução dos níveis de ATP da fasciola é acompanhada por uma paralisia flácida progressiva (EMEA, 1999). O clorsulon é transportado pelos eritrócitos através da ligação à anidrase carbónica, tendo acesso ao parasita, por via oral, durante a ingestão de sangue. Provoca necrose das células digestivas do parasita e tem pouca ação sobre o seu tegumento, limitando-se esta à zona do cone cefálico (Fairweather & Boray, 1999), mas a origem da sua ação sobre este último é desconhecida, pois, grande parte do clorsulon é eliminado na urina e não na bÍlis. Assim, este efeito no tegumento pode ser um efeito secundário à ação no intestino do parasita (Meaney *et al.*, 2004). Comercialmente, os produtos mais utilizados que contêm clorsulon são Ivomec F®, Virbamec F® e Bimectin Plus® sendo portanto raramente administrado isoladamente, mas sim em combinação com ivermectina (Apifarma, 2011). Uma dose de 2 mg/Kg via subcutânea mostrou ser bastante efetiva contra adultos, podendo haver uma reação no local de administração. Pode também ser administrado por via oral.

Não foi revelado qualquer potencial teratogénico ou cancerígeno deste princípio ativo.

### *Benzimidazóis*

Os benzimidazóis mais comuns têm ação predominantemente nematocida e não têm grande ação fasciolicida. Apenas o albendazol, o triclabendazol e o luxabendazol têm ação fasciolicida. Atuam especificamente por fixação às  $\beta$ -tubulinas citoplasmáticas com consequente inibição da polimerização dos microtúbulos interferindo com o metabolismo mitocondrial e ainda afetam a síntese de proteínas. Estes compostos provocam perda das funções vitais de motilidade e alteração no sistema reprodutor do parasita (Fairweather & Boray, 1999). Têm efeito ovicida cerca de oito horas pós tratamento (Kassai, 1999).

Tanto o triclabendazol como o albendazol são metabolizados pelo hospedeiro em compostos sulfóxidos que são mais solúveis e parecem ser os principais responsáveis pela ação fasciolicida. A interação entre estes metabolitos e a albumina plasmática, para a qual têm uma certa afinidade, pode aumentar a disponibilidade dos princípios ativos para os parasitas hematófagos (Chambers *et al.*, 2010).

A netobimina é particularmente interessante porque, como é um sal iónico, tem boa solubilidade em água, o que promove flexibilidade nas suas administrações. Este grupo de químicos é, entre todos os antihelmínticos disponíveis, o menos tóxico (Taylor, 1992).

No entanto, alguns membros deste grupo têm demonstrado ser teratogénicos nos bovinos. A netobimina e o albendazol são exemplos e têm portanto limitações de utilização em animais gestantes (Taylor, 1992).

O triclabendazol tem como designação comercial Fasinex® e é administrado por via oral numa dose de 12,5 mg/Kg (Apifarma, 2011), mas em Portugal apenas está registado o seu uso em ovinos (Apifarma, 2011). Atualmente este princípio ativo já pode ser administrado por via injetável em bovinos, mas esta formulação não é comercializada em Portugal. Tem como nome comercial Triclamax®. Triclabendazol é o único antihelmíntico especificamente ativo contra *Fasciola hepatica* com duas semanas de idade, ou seja, contra todas as fases larvares migratórias intra parenquimatosas, bem como contra os adultos dentro dos ductos biliares (Fairweather & Boray, 1999). Este, ao contrário dos outros compostos deste grupo, não tem ação nematocida. Atualmente é usado com êxito contra fasciolose humana.

Taylor (1992) refere que o mecanismo de ação do triclabendazol sobre a *F. hepatica* não é conhecido e que não tem propriedades de ligação à tubulina, ao contrário dos outros membros deste grupo, devendo assim atuar por vias alternativas. Outros autores referem o contrário e sugerem uma ação semelhante aos restantes compostos do grupo (Brennan *et al.*, 2007).

Por sua vez o albendazol, de nome comercial Valben 2.5%®, é administrado por via oral numa dose maior que os outros princípios ativos, 10mg/kg (Apifarma, 2011). Este pode ser administrado como suspensão oral ou como aditivo alimentar (Craig, 1992).

É um anti-helmíntico efetivo contra os parasitas adultos com mais de doze semanas de idade, mas não é eficaz para formas imaturas num só tratamento. Apenas com duas aplicações se pode garantir uma boa proteção (Malone, 1982) e é ovicida, ao contrário do triclabendazol que não afeta a eclosão dos ovos de *F. hepatica* (Alvarez *et al.*, 2009).

O luxabendazol, também tem largo espectro de ação, pode ser usado na dose 10mg/Kg e mostra grande atividade para formas maduras e alguma para formas imaturas com mais de seis semanas.

A netobimina deixou de ser comercializada em Portugal para bovinos, mas existe no mercado a forma comercial para ovinos. A administração é feita via oral, dose de 20 mg/Kg

(Radostitis *et al.*, 2007) e é eficaz contra os parasitas adultos mas também tem alguma eficácia contra formas imaturas.

#### *Fenoxialcanos*

Estes fármacos foram recentemente descritos. Têm a sua ação limitada às formas mais jovens da fasciola, inclusive formas com apenas um dia de desenvolvimento. Porém a sua eficácia diminui progressivamente contra fascíolas maduras e adultas (Fairweather & Boray, 1999). Esta particularidade permite que estes fármacos sejam utilizados como profilaxia no controlo desta parasitose. Pertence a este grupo a dianfenetida, que é metabolizada no fígado e transformada numa amina com ação fasciolicida. A alta concentração no fígado deste metabolito explica a sua ação sobre formas imaturas, sendo que estas estão presentes no parênquima hepático o que dificulta a chegada de outros fármacos com distribuição sanguínea. O seu mecanismo de ação é ainda desconhecido (Fairweather & Boray, 1999)

#### *Hidrocarbonetos halogenados*

Os fármacos pertencentes a este grupo já estão caídos em desuso devido à sua toxicidade e baixa eficácia. São exemplos, o hexacloroetano que era o único princípio ativo permitido nos Estados Unidos em vacas leiteiras (Rendell, 1980) e o tetracloreto de carbono que foi durante muitos anos a droga de eleição em ovinos (Ollerenshaw, 1959).

O aparecimento de populações de *F. hepatica* resistentes a triclabendazol em vários continentes, com maior incidência na Austrália e Norte da Europa, motivou a procura e estudo de novos produtos fasciolicidas. Recentemente, fármacos usados contra a malária como as artemisininas sintéticas e o peróxido sintético - OZ78, mostraram resultados promissores contra fascíolas resistentes a triclabendazol a nível experimental em ratos (Keiser *et al.*, 2007), embora nas ovelhas não tenham revelado bons resultados (Duthaler, Smith & Keiser, 2010). Estas drogas peroxídicas têm um mecanismo de ação pouco conhecido, mas acredita-se que atuam no metabolismo dos parasitas, atuando por alquilação do grupo heme ou de proteínas, ou como inibidores das enzimas antioxidantes como a glutatona redutase e glutatona S-transferase (Becker *et al.*, 2004).

### **3.10.10.2 Estratégias de Tratamento**

Uma vez que a erradicação da *F. hepatica* é difícil, devem ser adotadas medidas de controlo no sentido de reduzir a sua prevalência.

Os objetivos de um tratamento antiparasitário são:

- a) Evitar reinfeção - não alimentar os animais com pastagens contaminadas com metacercárias;
- b) combater a infeção em causa sem esquecer infeções mistas concomitantes;

- c) auxiliar o doente com cuidados de higiene locais e de alimentação e ainda com medicação adjuvante.

Atualmente, parasitismo clínico é um sinal de mau manejo, uma vez que nas últimas décadas houve um grande desenvolvimento de fármacos anti-helmínticos e uma grande sensibilização do produtor para a utilização de tratamentos profiláticos e uma boa utilização das pastagens, prevendo um número mínimo de tratamentos e tendo como objetivo o mínimo de contaminação das pastagens por estes compostos. O desenvolvimento de tratamentos profiláticos requer um bom conhecimento do ciclo de vida do parasita alvo, baseado em estudos ecológicos e evolutivos (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2001). Um programa estratégico tem como objetivo utilizar doses terapêuticas nos momentos em que o parasita está mais disponível na pastagem (Crowin, 1997). O controlo da fasciolose tem de se basear em tratamentos estratégicos com drogas fasciolicidas. Uma vez que o seu ciclo de vida é longo, são vários os momentos em que podemos intervir com sucesso (Kaplan, 2001).

Os programas de controlo deste parasita baseiam-se no conhecimento dos fenómenos de transmissão no local em estudo. Deve ter-se em conta: (1) a idade e utilidade do animal; (2) a taxa de lotação; (3) estado nutricional; (4) stress ambiental e (5) infeções concomitantes com nemátodes gastrintestinais. Estes fatores têm um importante papel na determinação do estado imunitário e conseqüente risco de infeção e perdas económicas (Kaplan, 2001).

De uma forma geral, em zonas mediterrânicas, contando com as condições de cada local, se os animais estiverem sempre na pastagem, são propostos dois tratamentos preventivos anuais: o primeiro em agosto/setembro, que remove os parasitas adultos adquiridos em junho/julho e um segundo em março/maio, que elimina os sobreviventes ao primeiro tratamento e os adquiridos no inverno (Almeria, s.d.). O tratamento na primavera é mais paliativo, pois as formas de infeção são imaturas e a maior parte dos produtos não atua nesta fase (Kaplan, 2001).

Contudo, se os animais estiverem estabulados pelo menos oito semanas antes do primeiro tratamento, o que acontece nas regiões alpinas e nórdicas, e se neste usarmos um fasciolicida que atue também nas formas imaturas, será necessário apenas um tratamento (Kassai, 1999).

Se forem usados fármacos estritamente adulticidas, são recomendados dois tratamentos com um intervalo de oito a dez semanas.

O custo-benefício deste tipo de estratégias não pode ser avaliado no imediato, mas sim ao longo de vários anos (Crowin, 1997).

A eficácia dos fármacos anti-parasitários pode estar comprometida pelas lesões do parênquima hepático causadas por *F. hepatica*. Este efeito sobre a farmacocinética destas substâncias foi clara e recentemente demonstrado (Dorchies, 2006).

É importante haver um controlo das outras parasitoses gastrointestinais em conjunto com a fasciolose pois a sua ação pode ser sinérgica e há estudos que demonstram que o tratamento de apenas uma parasitose não reflete o aumento de produtividade esperado. É necessário ter também em consideração que os benefícios do tratamento da fasciolose não dependem apenas do método controlo mas de interações nutricionais e fisiológicas e de fatores geo-climáticos (Loyacano *et al.*, 2002).

Num trabalho realizado em França por Mage *et al* (2002) concluiu-se que durante dez anos a prevalência da infeção por *F. hepatica* em bovinos e conseqüentemente nos caracóis, não diminuiu efetivamente, o que pode ser devido ao facto de muitos criadores realizarem um único tratamento por ano.

Alguns autores afirmam que o tratamento eficaz com eliminação das formas adultas e imaturas e prevenção da re-infeção permite a regeneração do tecido hepático com aparência normal em dois anos (Owen, 1987).

Outra forma de controlo da fasciolose, a nível experimental, é a utilização do inibidor da proteína cinase (Ep475), que quando administrado intraperitonealmente a ovelhas, reduz o dano dos ductos biliares e conseqüentemente a libertação de AST e GGT, pois são inibidas as funções desta protease – facilitar a migração das fascíolas pelo parênquima hepático, eliminação de ovos e sua fertilidade, evasão do sistema imunitário e nutrição. Observa-se um subdesenvolvimento das estruturas reprodutivas e da morfologia do parasita (Alcala-Canto *et al.*, 2007).

Também podem ser usadas plantas com atividade anti-helmíntica contra *F. hepatica*: *Butea monosperma*, *Gynandropsis gynandra* (Mali & Mehta, 2008), *Albizia anthelmintica*, *Balanite aegyptiaca* (Koko, Galal & Khalid, 2000), *Lawsonia inermis* (Jeyathilakan *et al.*, 2012), *Albizia coriavera*, *Diospyrus scabra*, *Erythrina senegalensis*, *Lantana trifolia*, *Matteuccia orientalis*, *Trichilia emética* (Hussain, 2008).

### **3.10.11 Resistência aos anti-helmínticos**

Resistência é a capacidade de um parasita sobreviver a uma dose que em condições normais seria suficiente para o matar. As resistências aparecem em todas as espécies de parasita e hospedeiros, contra as mais diversas drogas e em diferentes áreas geográficas, o que nos leva a crer que seja um mecanismo com algumas características comuns.

A hipótese mais consensual é que esta resistência seja adquirida geneticamente e que estes genes estejam presentes no ADN cromossomal do parasita (Sangster, 2001). Há quatro fatores que determinam a velocidade do desenvolvimento à resistência: (1) número de parasitas não expostos ao fármaco, (2) a frequência com que o gene aparece nas populações não tratadas, (3) se o gene associado é dominante ou recessivo e (4) a aptidão biológica dos parasitas resistentes comparativamente aos suscetíveis (Coles, 2005).

Atualmente, para *F. hepatica* o aparecimento de resistências não é tão preocupante como este fenómeno em nemátodes. Ainda assim, assinalaram-se casos de resistência por todo o mundo, especialmente ao triclabendazol. Na Austrália em 1995, Irlanda e Escócia em 1998, País de Gales, Espanha (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2000) e Holanda (Moll *et al.*, 2000). Foram ainda descritos casos de resistência ao closantel e nitroxinil (Fairweather & Boray, 1999).

Não se espera que muito em breve novos fasciolicidas sejam desenvolvidos. Assim, devem adotar-se estratégias para retardar o desenvolvimento de resistências aos fármacos já existentes. O tratamento estratégico com anti-helmínticos, baseado no conhecimento da epidemiologia do local e um bom maneio, pode reduzir o nível de infeção e em conjunto com uma baixa frequência de tratamento podem prevenir o desenvolvimento de resistências. Para tal deve recorrer-se a testes de diagnóstico para saber qual a carga parasitária e se há necessidade de aplicar tratamento. No caso da fasciolose, o maneio é ainda mais complicado visto esta ter um ciclo indireto, o que torna mais difícil compreender o ponto em que se desenvolveram resistências.

O uso combinado de várias drogas, com diferentes métodos de ação, pode reduzir o risco de desenvolvimento de resistências (Sangster, 2001). É preciso ter atenção porque, pode por outro lado, dar azo a desenvolver múltiplas resistências. Por exemplo, triclabendazol associado com clorsulon ou luxabendazol, clorsulon associado a luxabendazol ou closantel, este último associado a triclabendazol. São várias as associações possíveis no combate da fasciolose que apresentam uma boa ação sinérgica, o que permite usar menores quantidades de um fármaco com a mesma ação final (Conceição, 2001).

Outras problemáticas associadas às desparasitações de efetivos são: a falta de rigor na dose (pois esta é estimada pelo peso médio do efetivo, mas há animais que não se enquadram nesta média e são desparasitados em doses inferiores ou superiores à recomendada) (Gaasenbeek *et al.*, 2001); a manutenção do equipamento é por vezes descuidada e, especialmente em material multidose, pode estar descalibrado; o uso incorreto de fármacos, ou fora de validade e protocolos de tratamento incorretos (Taylor, 2012).

Vários estudos demonstraram que é difícil haver uma reversão na suscetibilidade, ou seja, que um fármaco que criou resistências volte a ser eficaz passado um longo período sem ser utilizado. Assim, é importante não usar uma droga até à sua exaustão e impossibilitar o retorno da suscetibilidade por falta de genes “suscetíveis”.

Geralmente, só se suspeita que há um fenómeno de resistência quando há uma resposta clínica depois de um tratamento, mas nesta fase já ocorreu seleção dos parasitas para a resistência, ou seja, houve uma seleção de 50% dos alelos de resistência, o que torna 20% das fascíolas resistentes (Taylor, 2012). Para detetar o seu desenvolvimento precocemente, a técnica mais usada é o Teste de Redução da Contagem de Ovos Fecais (TRCOF), mas só testes genéticos poderão confirmar que se trata realmente de uma situação de resistência (Sangster, 2001).

Para evitar o aparecimento de resistência podemos ainda considerar o uso de raças de hospedeiros resistentes, adaptadas a estas parasitoses (que necessitem de menos tratamentos químicos de controlo), e manter os novos animais de quarentena para evitar que introduzam estirpes resistentes. Também se pode usar a diluição de estirpes resistentes introduzindo estirpes suscetíveis recorrendo ao uso de animais artificialmente infetados (Van Wyk, Bath & Malan, 1998; Coles, 2005; Borgsteede *et al.*, 2005).

### **3.10.12 Prevenção/Controlo**

*F. hepatica* é um parasita de difícil erradicação, porque é difícil o controlo do seu ciclo nos pontos essenciais – ciclo extra-mamífero muito complexo e ciclo intra-mamífero de difícil acesso às formas imaturas, sobre as quais deveria ser feito o controlo para que sejam impedidas de se estabelecerem como adultos.

Os objetivos de um esquema de prevenção é a eliminação dos parasitas dos HD, diminuição das possibilidades de infeção e eliminação dos HI (caracóis).

O controlo deve combinar o uso AH com medidas higiénicas e controlo do pastoreio. Deve fazer-se os seguintes procedimentos:

1. Secagem e drenagem dos terrenos ou limitar o acesso a zonas suspeitas. O ideal seria abandonar as pastagens durante dois anos;
2. uso de moluscidas anualmente (primavera ou verão), com especial atenção ao impacto ambiental que estas substâncias podem ter;
3. introdução de predadores naturais dos moluscos;
4. desparasitação sistemática mesmo dos animais aparentemente não infetados;
5. quarentena dos animais adquiridos;
6. atenção ao fazer feno ou ensilagem de ervas parasitadas, pois as metacercárias enquistadas na vegetação só serão destruídas na fenação aos cinquenta dias e na ensilagem dos doze a sessenta dias;
7. água limpa em bebedouros;
8. bom armazenamento das fezes contaminadas durante dois meses, submeter a digestão anaeróbia ou aeróbia, secagem a altas temperaturas, etc...

Os moluscidas têm capacidade de destruir seletivamente os caracóis hospedeiros intermediários, mas devido aos riscos ambientais, custo dos produtos, à sua eficácia limitada, assim como à sua dificuldade de aplicação, estas substâncias são atualmente pouco utilizadas ou mesmo proibidas. Os produtos que são exclusivamente moluscidas como o pentaclorofenato de sódio, niclosamida e N-tritil-morfolína foram retirados do mercado. A cianamida de cálcio e o metaldeído tem alguma atividade moluscicida e é tóxica para formas livres, porém a sua utilização requer certas precauções (Fidalgo, 2007). O facto do molusco *L. truncatula* ser de típico habitat húmido, limita ainda mais o uso destes compostos, pois há um elevado risco de contaminação aquática.

É preciso ter também atenção aos animais silvestres que podem ser portadores desta parasitose (Armour, 1975).

### 3.10.13 Vacinação

O desenvolvimento de vacinas é um novo desafio no controlo da fasciolose, mas a variabilidade da resposta imune do hospedeiro é um sério problema ao seu desenvolvimento. Além de que, os antigénios suscetíveis de serem usados em vacinas são altamente polimórficos e apenas conferem proteção parcial.

Entre os candidatos para constituírem uma vacina, os que têm mais potencial são: protease cisteína (catepsina), hemoglobina parasitária, glutathione-S transferase, proteínas ligantes de ácidos gordos e leucina aminopeptidases (Hillyer, 2005).

A protease catepsina L (L1, L2 e L5), obtida por tecnologia recombinante, é um produto de excreção da *F. hepatica* que se crê ter um importante papel na degradação tecidual e migração parasitária. Este produto, além de aplicado em técnicas de ELISA, é também aplicado à indústria de vacinas, conferindo níveis de proteção de 72 a 79% em bovinos e ovinos respetivamente. A vacina também apresentou efeitos sobre a reprodução do parasita e a sua transmissão ao hospedeiro intermediário (Mitchell, 2002). Também a hemoglobina parasitária pode ser usada na vacinação. Esta é uma molécula que contém um grupo heme e está envolvida na respiração aeróbia das formas imaturas e em funções oxigénio dependentes nos parasitas adultos como a produção de ovos. Os ensaios revelaram que foi conseguida uma proteção de 72,4%.

Apesar das formas juvenis partilharem muitos antigénios com as formas adultas, a sua abundancia varia e também a resposta imunitária contra eles por parte do hospedeiro. Assim, uma vacina que estimule uma resposta do hospedeiro contra as fases mais precoces de *F. hepatica* irá reduzir a incidência de fasciolose aguda e consequentemente as perdas económicas por diminuição da produção (Hoyle *et al.*, 2003). Neste sentido, há um estudo que revela um nível de proteção elevada (83%) com aplicação de vacinas multivalentes, utilizando proteases típicas de fases juvenis do parasita e proteases mais comuns em fases adultas de *F. hepatica* (catepsina B e catepsina L5, respetivamente). O mecanismo de proteção induzido por estas não é conhecido, mas os autores sugerem que pode estar relacionado ou com a produção de anticorpos após vacinação, que neutralizam a atividade das proteases, ou com a ativação dos mecanismos celulares efetores, ou afetam diretamente o parasita (aquisição de nutrientes), ou a combinação destes (Jayaraj *et al.*, 2009). O adjuvante que é utilizado para distribuir a vacina é crítico na determinação da qualidade da resposta imunitária e desta forma, no nível de proteção alcançado (Morrison *et al.*, 1996).

Quanto a outras formas de imunização, já houve tentativas de imunizar bovinos com metacercárias atenuadas por raio-X verificando-se uma redução de infecção de 71% comparando com os não imunizados (Heras, 1974; Armour, 1975).

Apesar de já terem sido desenvolvidas vacinas experimentalmente eficazes, nenhuma está atualmente disponível no mercado.

#### **3.10.14 Importância económica**

Quando os animais se tornam clinicamente doentes devido a infecção parasitária, as perdas económicas são óbvias.

Apesar da manifestação clínica de doença ser rara nos bovinos, há vários estudos que demonstram que o parasitismo subclínico é também causa de importantes perdas económicas. Na Suíça, estas perdas podem ser na ordem dos 52 milhões de euros por ano (Schweizer *et al.*, 2005).

As perdas económicas podem ser diretas, pela morte e reprovação de fígados em matadouro, ou indiretas pela diminuição de produtividade dos animais, da qualidade do produto final, aumento da suscetibilidade a outras doenças, custos nos tratamentos AH, custos na Saúde Pública associados à parasitose e impacto no bem-estar animal. Apesar das perdas diretas serem mais facilmente mensuráveis, as perdas indiretas podem traduzir um maior impacto económico, isto porque há menores índices de conversão e de crescimento, o que leva a uma diminuição do peso final e maiores perdas na venda dos animais, baixa performance reprodutiva e diminuição na produção de leite, carne e lã (Madeira de Carvalho, Fonseca & Meireles, 2008). A influência da fasciolose no peso do animal é especialmente importante nas doze primeiras semanas de infecção pois é nesta fase que a sua ação é mais patogénica. A gravidade destas perdas depende não só do número de metacercárias ingeridas mas também da dieta disponível (Chik, Coverdale & Jackson, 1980).

É difícil quantificar estas perdas pois estão dependentes de fatores climáticos, interações fisiológicas, nutricionais e outras patologias associadas. Johnson (1991) refere que bovinos machos com peso médio de 232 kg, tratados com clorsulon, tinham um ganho médio de peso vivo de 0,76 kg/semana superior ao grupo controlo aos 196 dias. Por sua vez, Gennicot *et al.* (1991) referem que bovinos de carne infetados aos 365kg, tinham uma redução de ganho de 2,15 kg/semana. Também Armour, 1975, descreve que o controlo desta patologia se reflete em ganhos de produção até 9,5% e aumentos de 30kg em animais tratados. Há também estudos que não verificaram ganhos de peso significativos após o tratamento (Sanchís *et al.*, 2011), o que pode ser explicado pela boa alimentação destes animais, que compensa as perdas associadas à doença.

Há muito que se tenta provar que a fasciolose reduz a fertilidade. Vários artigos foram publicados neste sentido e várias teorias elaboradas. Schweizer *et al.*, em 2005, referiu que

vacas com fasciolose requeriam mais inseminações para haver concepção do que as vacas não afetadas. Estudos realizados por Fleming em 1986 (citado por Kaplan, 2001) demonstram que a infeção por fascíolas altera o catabolismo hepático do androgénio, outros, realizado por Birosauveur em 1994 (citado por Kaplan, 2001), demonstram que há uma diminuição acentuada do metabolismo hepático P-450-dependente da progesterona e testosterona. Também foi provado que há um atraso de 39 dias no aparecimento do primeiro estro nos animais infetados e que estas fêmeas têm valores significativamente maiores de estrogénio e menores de progesterona, provavelmente devido ao baixo desenvolvimento ou ausência de corpo lúteo (López-Díaz *et al.*, 1998).

Foram propostos limiares de infeção, valores a partir dos quais se considera que há perdas económicas – mais de 30 fascíolas adultas e prevalências de mais de 25% do efetivo (López-Díaz *et al.*, 1998).

### **3.10.15 Situação em Portugal**

São poucos os estudos realizados em Portugal e grande parte dizem respeito à prevalência de doença baseada em dados de matadouro. A seroprevalência de fasciolose não decresceu nos últimos dez anos (Arias *et al.*, 2011), apesar dos tratamentos específicos aplicados em grande parte das explorações. Podemos atribuir este facto às limitações nas técnicas de diagnóstico que levam a tratamentos mal direcionados, ou ao desconhecimento epidemiológico ao nível das regiões e das explorações ou até ao mau emprego de anti-helmínticos de acordo com o seu espectro de ação.

## **3.11 Fasciolose Humana**

Ainda que o âmbito desta dissertação seja fasciolose em bovinos, não se poderia deixar de referir a possível ocorrência desta patologia na espécie Humana.

A exposição do homem a este parasita é fácil e está especialmente relacionado com os seus hábitos alimentares. Se consumir vegetais não lavados (ex. agriões) ou beber água contaminada com metacercárias pode desenvolver esta doença, daí observarmos que é na população rural onde se verificam mais casos desta parasitose, pois está mais exposta. Um estudo realizado em 1997 sugere que pessoas que consumam pratos preparados com fígado cru de bovino contaminado com formas imaturas podem tornar-se infetados e desenvolver doença (Taira, Yashifuji & Boray, 1997).

De forma sumária, o quadro clínico em humanos, tal como no gado bovino, caracteriza-se por anemia, eosinofilia, leucocitose e, obviamente, manifestações hepatobiliares e gastro-entéricas.

### 3.12 Outros Tremátodes

Há muitos estudos sobre a família *Fasciolidae* (*Fasciola hepatica*), mas o mesmo não acontece para outras famílias de tremátodes como família *Dicrocoeliidae* (*Dicrocoelium dendriticum*), família *Paramphistomatidae* (*Calicophorum daubneyi*), família *Opisthorchiidae* e família *Schistosomatidae*.

#### 3.12.1 *Dicrocoelium dendriticum*

É uma infecção hepática menos conhecida apesar de frequente em mamíferos, geralmente ruminantes, característica de solos secos, calcários ou alcalinos, pois são propícios aos seus dois hospedeiros intermediários, o primeiro - um gastrópode terrestre dos géneros *Zebrina* (*Zebrina detrita*), *Helicella* (*Helicella neglecta*) e *Cionella* (*Cionella lubrica*) e o segundo - uma formiga do género *Formica* (*Formica fusca*, *F. rufa*, *F. pratensis*). As cercárias são imóveis e são dispersas pelo segundo HI.

Os adultos destes parasitas residem nos canalículos biliares e foram encontrados não só em ruminantes como também camelos, cavalos, porcos, coelhos, cães e até humanos (Arias *et al.*, 2012).

Apesar das condições geo-climáticas propícias à evolução do ciclo de vida deste parasita não ser semelhante à de *F. hepatica*, uma vez que sobrevivem a condições extremas, há eliminação de ovos durante todo o ano das duas espécies de parasitas, havendo vários relatos de infecções mistas no hospedeiro definitivo (Arias *et al.*, 2011).

*Dicrocoelium dendriticum* penetra nos finos ramos dos ductos biliares causando dilatação e inflamação dos mesmos (angiocolite). Macroscopicamente apresentam-se como cordões brancos típicos de angiocolite mas menos numerosos, mais curtos e mais finos que na fasciolose (Corrêa, 1976). Os adultos não são hematófagos, alimentando-se de células epiteliais descamadas e mucina da hipersecreção.

Os seus ovos são mais pequenos que os de *F. hepatica* (36x30 µm), forma elipsoide, de coloração castanho-escuro, embrionados no momento da postura e opérculo pouco visível.

É preciso atenção a estes parasitas, pois podem ter graves consequências em áreas onde não haja fármacos registados para o seu controlo e a sua absorção é mais difícil, uma vez que não são parasitas hematófagos como *F. hepatica* (Dorchies, 2006).

De entre os diferentes fármacos que têm ação contra este parasita, destacamos os benzimidazóis e praziquantel.

#### 3.12.2 *Calicophorum daubneyi*

Este parasita é da família *Paramphistomatidae*, é um tremátode gástrico que afeta especialmente pequenos ruminantes. As fases imaturas do parasita são responsáveis pela patologia severa e podem mesmo levar à morte do hospedeiro em infecções graves, pois ao estarem aderentes à parede do intestino delgado causam grandes inflamações,

caracterizadas por uma infiltração local de macrófagos e de linfócitos na lâmina própria e no tecido intersticial da lâmina de Brunner (Díaz *et al.*, 2006).

A digestão e absorção ficam comprometidas resultando em diarreia, anorexia, anemia e fraqueza, o que leva a perda de peso e diminuição da produção de leite (Díaz *et al.*, 2006).

O ciclo de vida é semelhante ao de *F. hepatica*, também tem como hospedeiro intermediário o gastrópode do género *Lymnaea truncatula* (Díaz *et al.*, 2006). Assim, é muito comum haver infecções mistas tanto nos gastrópodes como nos mamíferos hospedeiros definitivos. Tal como na fasciolose, os períodos de alto risco para esta parasitose são períodos de elevada pluviosidade, o que ocorre em Portugal em maio/junho e novembro/dezembro.

Os ovos são muito similares aos de *Fasciola hepatica*, operculados, mas de coloração branca e não amarelo dourado.

Anti-helmínticos que demonstram eficácia contra este parasita são os seguintes: oxiclosanida, levamisol e niclosamida.

#### **4. OBJETIVOS**

Esta dissertação de Mestrado teve como primeiro objetivo verificar a utilidade de desparasitação e o momento em que esta é feita no controlo a fasciolose, e posteriormente comparar a eficácia de desparasitação de dois princípios ativos, Closantel e Clorsulon, utilizados frequentemente no tratamento e prevenção de fasciolose em bovinos naturalmente parasitados com *F. hepatica*.

A nível laboratorial, foram realizadas técnicas de deteção de ovos por métodos qualitativos e quantitativos, assim como a realização de uma técnica serológica baseada na metodologia ELISA, para acompanhamentos dos níveis de infeção pré e pós desparasitação.



## 5. MATERIAL E MÉTODOS

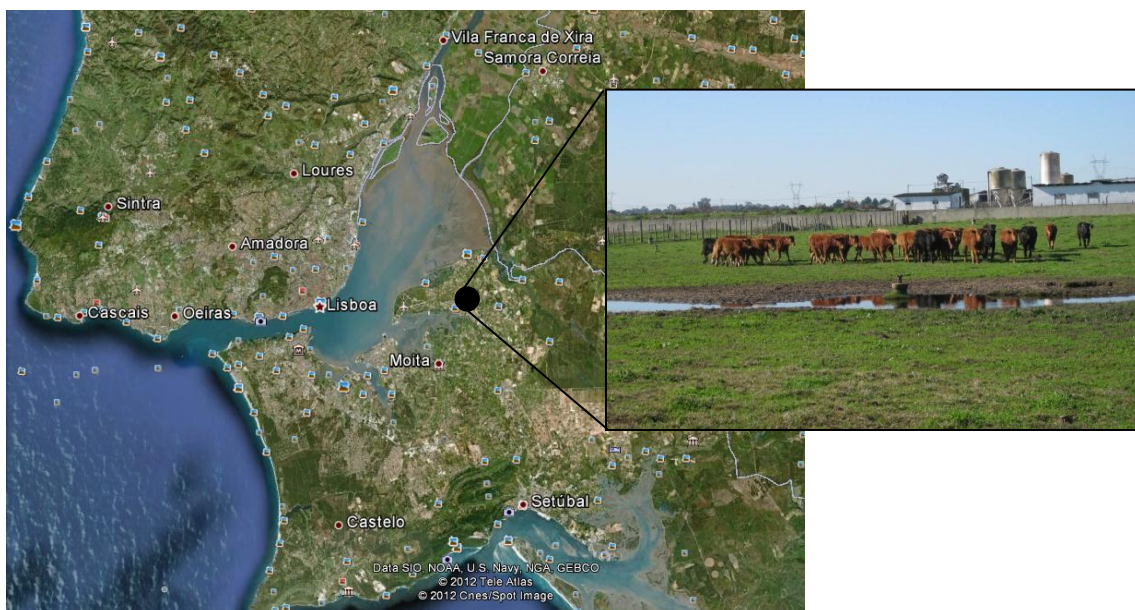
### 5.1 Caracterização dos animais e da exploração em estudo

Uma exploração na região da Moita serviu de base para este estudo (figura 8), pois está situada numa zona considerada endémica para fasciolose devido às suas condições geoclimáticas.

Esta exploração classifica-se em regime semi-intensivo, com 4 hectares de pasto permanente. Nesta são criados 19 animais de raças limousine, charolês, brava e cruzada. Os animais são adquiridos de outras explorações dessa mesma região ou da região do Alentejo, com sete meses de vida. Nos primeiros meses na exploração, têm acesso a uma zona ribeirinha e com diversas zonas alagadiças (naturais ou artificiais) e pastagem propícia ao desenvolvimento do gastrópode *Lymnaea truncatula*. Não é efetuada rotação de pastagens por falta de área. Aos doze meses, os novilhos são recolhidos e permanecem estabulados até ao abate (geralmente com, aproximadamente, 20 meses de idade e 400Kg de carcaça) , alimentando-se de concentrado e feno. O seu manejo é idêntico e portanto, assume-se que todos os animais foram expostos ao mesmo risco de infeção.

No que diz respeito ao plano de desparasitação praticado, os animais são desparasitados no dia de chegada (aos sete meses), a meio da sua estadia (aos dez meses) e quando são estabulados (aos doze meses).

**Figura 8 – Mapa da Zona Metropolitana de Lisboa com destaque para a região da Moita do Ribatejo, e imagem de uma zona alagadiça pertencente à exploração em estudo (Adaptado de Google Maps)**



## 5.2 Descrição do esquema de desparasitação

Nesta exploração sempre houve um elevado grau de contaminação dos novilhos por *F. hepatica*. No ano anterior a este estudo (2011), 58,3% dos fígados foram reprovados devido a lesões associadas a esta infeção (dados cedidos pelo Matadouro STEC, Montijo). Este facto foi determinante para que todos os animais da exploração fossem utilizados neste estudo. Os 19 animais foram separados em dois grupos, de acordo com as idades: Grupo A com média de 18,25 meses (16-25 meses) e peso médio de 347,43Kg (304-429kg), que já tinham sido desparasitados duas vezes na exploração e Grupo B com média de 10,81 meses (9-13 meses) e peso médio de 269kg (223-312kg). No Grupo A, com oito animais, organizaram-se aleatoriamente dois subgrupos com quatro animais cada, o Grupo AC foi tratado com Closantel+Ivermectina (Closamectin FF®) (figura 9) numa dose de 1ml/10kg de peso vivo (pv) aplicado na linha do dorso e o Grupo AI, tratado com Clorsulon+Ivermectina (Ivomec F®) (figura 10), injeção subcutânea na tábua do pescoço na dose de 1ml/50kgpv. No Grupo B, com onze animais, dividiram-se também aleatoriamente em três grupos: ao Grupo BC, com quatro animais, aplicou-se Closantel+Ivermectina (Closamectin FF®) por unção contínua no dorso na dose de 1ml/10kgpv, ao Grupo BB, também com quatro animais, aplicou-se Clorsulon+Ivermectina (Bimectin Plus®) injeção subcutânea na tábua do pescoço a uma dose de 1ml/50kgpv, e por fim ao Grupo BFP, com três animais, aplicou-se Closantel (Flukiver®) 1 ml/10kgpv em associação com Ivermectina (Paramectin®) ambos por injeção subcutânea na tábua do pescoço, o tratamento aplicado a este último grupo era o método de desparasitação utilizado até à data nessa exploração. Não foi usado um grupo controlo sem tratamento para minimizar o risco de aparecimento de sintomatologia associada a fasciolose visto se tratar de uma exploração comercial. A divisão dos grupos pelo diferentes tratamentos encontra-se resumida na tabela 2.

**Tabela 2 – Divisão dos grupos de animais segundo o tratamento aplicado**

Grupo	Nº de animais	Fármaco			Via de administração
		Nome Comercial	Princípio Ativo	Dose	
AC	4	Closamectin FF®	Closantel+Ivermectina	1ml/10kg	Pour-on
AI	4	Ivomec F®	Clorsulon+Ivermectina	1ml/50kg	Subcutânea
BC	4	Closamectin FF®	Closantel+Ivermectina	1 ml/10kg	Pour-on
BB	4	Bimectin®	Clorsulon+Ivermectina	1ml/50kg	Subcutânea
BFP	3	Flukiver® e Paramectin®	Closantel+Ivermectina	1 ml/10kg	Subcutânea
<b>Total</b>	<b>19</b>				

**Figura 9 – Administração de Closamectin FF® (Original)**



**Figura 10 – Administração de Ivomec F® (Original)**



Os fármacos utilizados no tratamento foram adquiridos pelo produtor, exceto o Closamectin FF® que foi oferecido pelo representante em Portugal – Prodivet-Zn.

### **5.3 Colheita de Amostras**

Foram realizadas colheitas de fezes e de sangue individualmente a todos os animais em estudo.

Para as colheitas de fezes procedeu-se à recolha de 3 amostras de cada animal, sendo a primeira no dia 0 (dia de administração do desparasitante – 30 de Outubro de 2011), e as outras ao 15<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias.

Estas amostras foram colhidas diretamente da ampola retal com recurso a luvas de palpação que foram posteriormente invertidas e transformadas em meio de transporte (figura 11), tendo sido imediatamente acondicionadas numa arca térmica a 4°C, sem fixadores e posteriormente analisadas, num período máximo de 24h após a colheita.

**Figura 11– Amostras de fezes (Original)**



Quanto às amostras de sangue, foram colhidas aproximadamente 2 ml de sangue por animal para tubos sem anticoagulante, a partir da veia coccígea (figura 12), e imediatamente acondicionadas a 4°C. Posteriormente, procedeu-se à centrifugação durante 10 min a 3,500 rpm e o soro foi armazenado a -20°C para posterior observação usando uma técnica de ELISA. Estas amostras foram colhidas quatro meses, dia 7 de Março de 2012, após a última colheita das fezes.

**Figura 12 – Colheita de amostras de sangue**



No matadouro da Stec, no Montijo, onde estes animais foram abatidos, foram recolhidas informações sobre todos os fígados. O animal foi acompanhado na cadeia de abate com especial atenção à inspeção de fígados, tendo sido efetuada a recolha de alguns que haviam sido reprovados, para posterior análise no laboratório da faculdade para confirmar, ou não, a presença de fascíolas nos canalículos biliares e vesícula biliar. Relativamente a esta, o seu conteúdo foi retirado para um copo de decantação e após repouso de 24h, o sobrenadante foi retirado e o depósito armazenado a 4°C para posterior observação.

## **5.4 Processamento de Amostras**

### **5.4.1 Análise Coprológica**

Métodos qualitativos:

- Método de sedimentação natural (para pesquisa de ovos de tremátodes e os restantes céstodes).

Métodos quantitativos:

- Contagem de ovos em Câmara de McMaster (Madeira de Carvalho *et al.*, 2008).
- Método de McMaster Modificado: Este método foi primeiramente desenvolvido por Urquhart em 1996 e foi depois adaptado noutra investigação efetuada em Portugal sobre Fasciiose Bovina (Conceição *et al.*, 2002). Esta adaptação teve por base alterar o tempo de sedimentação e adicionar solução detergente, enquanto se visualizam e identificam os ovos no fundo da camara de McMaster (figura 13). A descrição detalhada do método é apresentada no anexo A2.

**Figura 13 – À esquerda, copo de precipitação e solução detergente, à direita, câmaras de McMaster para observação (Original)**



#### **5.4.2 Inspeção de fígados**

Como já foi referido anteriormente, os fígados reprovados foram observados macroscopicamente tendo-se averiguado da existência de lesões típicas de fasciolose: hepatomegalia; superfície do fígado com trajetos hemorrágicos; parênquima hepático friável; rotura da cápsula de Glisson; cicatrização das lesões causadas pelas migrações; fibrose/esclerose do parênquima hepático; por vezes, quando o técnico de inspeção procede ao corte do lobo ventral, podem visualizar-se fascíolas imaturas ou maduras no parênquima. Alguns desses fígados foram recolhidos para observação minuciosa por cortes perpendiculares de aproximadamente um centímetro do parênquima hepático. As fascíolas encontradas foram recolhidas e armazenadas em álcool a 70%.

#### **5.4.3 Análise Serológica**

Foi utilizada uma técnica de ELISA indireto (figura 14) (Paz-Silva *et al.*, 2005). Foram realizados testes para deteção de IgG contra três distintos trematódes. Isto permite excluir a possibilidade de interações na deteção dos anticorpos, pois, como explicado anteriormente, os antigénios, ainda que purificados, podem sempre gerar falsos positivos. Assim, foi utilizada proteína recombinante de *F. hepatica* (rfhAPS) e antigénios de excreção/secreção obtidos a partir de trematódes *D. dendriticum* adultos (DdES) e *C. daubneyi* também adultos (CdES). Esta técnica é apresentada de forma mais detalhada no anexo A3.

**Figura 14 – Técnica de ELISA (Original)**



### **5.5 Verificação de eficácia da desparasitação**

A eficácia de um tratamento representa a redução de excreção de ovos nos vários momentos de recolha de amostras e esta é avaliada pelo Teste de Redução da Contagem de Ovos nas Fezes (TRCOF) de acordo com o referido por Foreyt (1988) e Coles *et al.* (1992) em que a percentagem de redução nas contagens é calculada pela fórmula:

$$\text{Eficácia \%} = \frac{\text{média dos ovos no grupo controlo} - \text{média dos ovos no grupo tratado}}{\text{media dos ovos no grupo controlo}}$$

Porém, para tremátodes, esta fórmula não está standardizada pois há poucos fasciolicidas capazes de eliminar as formas imaturas. Assim, estas irão eliminar ovos quando a infeção já deveria estar controlada. Também a eliminação intermitente de ovos pelos adultos torna difícil a deteção de ovos nas fezes. No entanto, como também não há nenhum teste *in vitro* que demonstre resistências, nem há conhecimento da base molecular da resistência dos tremátodes aos fasciolicidas, o TRCOF continua a ser utilizado apesar das suas limitações (Coles *et al.*, 2006). Nesta fórmula por nós utilizada cada animal de cada grupo foi controlo de si próprio no dia 0 e a eficácia foi verificada quando comparada com a contagem de OPG nos dias 15 e 21 pós desparasitação.

Para a avaliação da eficácia dos desparasitantes, foi usada a escala adaptada de Coles *et al.* (1992) e Craven *et al.* (1998), descrita na tabela 3.

**Tabela 3 – Escala para a avaliação da eficácia de desparasitantes**

TRCOF (%)	Grau de eficácia
< 90	Resistência
90 – 95	Duvidosa
> 95	Eficaz

## 5.6 Análise Estatística

A análise estatística dos dados gerados foi efetuada de forma descritiva, gráfica e inferencial, recorrendo a medidas de tendência central e de dispersão, gráficos diversos e testes estatísticos. Para o efeito, foram utilizados os softwares Microsoft Excel 2010® e R, versão 2.9.0 (disponível em: [www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

Na análise estatística inferencial foi usado o teste não paramétrico Qui Quadrado ( $\chi^2$ ). É um teste de hipóteses que se destina a encontrar um valor da dispersão para duas variáveis nominais, e avaliar a associação existente entre variáveis qualitativas.

Nos testes estatísticos realizados consideraram-se estatisticamente significativos efeitos com valor de p igual ou inferior a 0,05.



## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 Análise Coprológica – Técnica de sedimentação natural**

Nenhuma amostra apresentou resultado positivo a esta técnica, o que não era espectável visto ser a técnica mais sensível utilizada no quotidiano do laboratório da FMV para ovos de tremátodes. Primeiramente podemos pensar que estamos perante cargas parasitárias muito baixas. Porém, na literatura é referida uma sensibilidade de 69% (Rapsch *et al.*, 2006) para este teste, o que nos dá alguma margem para questionar se se trata da dimensão da carga parasitária ou da sensibilidade do teste. Está também descrito que é difícil visualizar os ovos de fasciola neste tipo de técnica, pois os ovos podem ficar retidos nos resíduos fecais. Assim, sugere-se a realização de uma adaptação desta técnica; o exemplo utilizado neste trabalho foi a Técnica de McMaster Modificado desenvolvida por Conceição *et al.*, em 2002, descrita anteriormente de forma sucinta, e mais pormenorizadamente no anexo A2.

### **6.2 Análise Coprológica – Técnica de McMaster**

Todas as amostras após observação da camara de McMaster revelaram presença de menos de 50 opg. Apesar desta técnica ter algumas limitações, está descrita como meio de deteção de inúmeros tipo de ovos, incluindo ovos de *F. hepatica*. A ausência de ovos revela uma baixa carga parasitária, mas não a ausência de contaminação (Madeira de Carvalho *et al.*, 2008). E, uma vez que a presença de apenas uma fasciola adulta causa danos hepáticos suficientes para reprovação a nível de matadouro, é importante utilizar técnicas mais sensíveis; assim, realizou-se a Técnica de McMaster Modificado, referida no tópico seguinte.

### **6.3 Análise Coprológica – Técnica de McMaster Modificado**

Após a utilização desta técnica, foram identificados e contabilizados os ovos de fasciola em várias amostras, e calculados os opg através da técnica anteriormente descrita. Apenas com a utilização desta técnica foram visualizados ovos de *F. hepatica*, o que revela a sua grande utilidade na pesquisa destes ovos. A sensibilidade analítica deste método, segundo Conceição *et al.* (2002), é de 33% sempre que o número de opg seja inferior a 1,5 e 100% para valores de opg mais elevados. Houve 73,68% (14/19) de análises positivas no dia 0, 38,89% (7/19) no dia 15 e 31,58% (6/19) no dia 21. Dos animais desparasitados com closantel, 82% (9/11) das amostras foram positivas no dia 0, 45% (5/11) no dia 15 e 36% (4/11) no dia 21, observando-se assim um decréscimo da percentagem de positivos ao longo do tempo, o que indica que a aplicação de desparasitante teve efeito. Quanto aos animais desparasitados com clorsulon, 62% (5/8) das amostras foram positivas no dia 0, 25% (2/8) no dia 15 e 25% (2/8) no dia 21, neste caso verifica-se que não houve diminuição da percentagem de amostras positivas do dia 15 para o dia 21 porém pode registar-se a

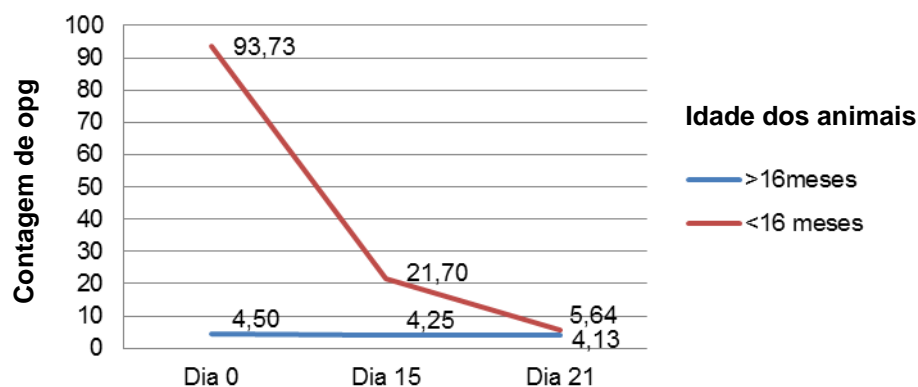
diminuição do dia 0 para o dia 15 que revela algum efeito deste princípio ativo. Porém, apenas recorrendo á TRCOF poderemos verificar a eficácia dos princípios ativos. Os dados obtidos apresentam-se discriminados na tabela 4.

**Tabela 4 – Resumo dos dados obtidos pelas técnicas: McMaster Modificado, Serologia e Inspeção *post-mortem***

Animal	Idade	Princípio Ativo	McMaster Modificado			Serologia com APS	Inspeção <i>post-mortem</i>
			Dia 0	Dia 15	Dia 21		
PT 1675	>16 meses	Closantel	pos	pos	pos	neg	Reprovado
PT 2951		Closantel	neg	neg	neg	neg	Aprovado
PT 6131		Closantel	pos	pos	pos	neg	Reprovado
PT 6297		Closantel	neg	neg	neg	neg	Reprovado
PT 3261		Clorsulon	pos	neg	neg	neg	Reprovado
PT 3305		Clorsulon	pos	pos	pos	neg	Reprovado
PT 5395		Clorsulon	pos	neg	neg	pos	Reprovado
PT 5512		Clorsulon	pos	neg	neg	neg	Reprovado
PT 2697	<16 meses	Closantel	pos	pos	neg	neg	Aprovado
PT 2716		Closantel	pos	na	neg	neg	Aprovado
PT 2700		Closantel	pos	pos	pos	neg	Reprovado
PT 2712		Closantel	pos	neg	neg	pos	Reprovado
PT 2713		Clorsulon	neg	neg	neg	na	Reprovado
PT 2709		Clorsulon	neg	neg	neg	neg	Reprovado
PT 2706		Clorsulon	pos	pos	pos	na	Reprovado
PT 2710		Clorsulon	neg	neg	neg	na	Aprovado
PT 3822		Closantel	pos	neg	neg	na	Reprovado
PT 2696		Closantel	pos	neg	neg	pos	Reprovado
PT 2701		Closantel	pos	pos	pos	na	Reprovado

Quanto à idade, não se verificaram diferenças significativas ( $X^2=0.2242$ ,  $gl=1$ ,  $p= 0.636$  para  $p<0,05$ ) entre as cargas parasitárias nos dois grupos, mas pode-se observar no gráfico 5 que o grupo dos animais mais jovens teve valores de opg mais elevados do que os mais velhos. Este facto pode dever-se à presença de resistência por parte dos mais velhos, pois já foram expostos durante mais tempo à infeção (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2001). Outro ponto que suporta estes dados é o facto de os mais novos ainda não terem sido desparasitados enquanto que os mais velhos já tinham sido objeto da terceira administração de desparasitante.

**Gráfico 5 – Evolução da contagem de opg ao longo dos 21 dias**



Quanto à formulação utilizada – tópica ou injetável – o desenho experimental não permitiu chegar a nenhuma conclusão, mas seria de esperar que a aplicação tópica fosse desvantajosa pois depende das condições climáticas (chuva pode diluir o produto) e dos comportamentos naturais dos animais – coçar, grooming (Laffont *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2009), mas em regime extensivo, em que o manejo dos animais é mais difícil, este tipo de aplicação poderia ser uma mais-valia.

#### 6.4 Análise Coprológica – TRCOF

Quanto aos valores do TRCOF, úteis para determinar a eficácia de um tratamento, foram calculados a partir do número de opg obtido através da técnica de McMaster Modificado e estão apresentados nas tabelas 4 e 5.

**Tabela 5 – Valores de TRCOF segundo os grupos de idade**

	Dia 15	Dia 21
>16meses	5,56 %	8,33%
<16meses	76,85%	93,99%

**Tabela 6 – Valores de TRCOF segundo o princípio ativo utilizado**

	Dia 15	Dia 21
Closantel	74,85%	92,15%
Clorsulon	65,57%	73,77%

Apesar das limitações da técnica e da reduzida dimensão da amostra, podemos observar que o tratamento para os animais mais jovens apresentou maior eficácia (apesar de o grau de eficácia ser duvidoso TRCOF – 90-95%) do que para os animais mais velhos (que pelo valor de TRCOF – <90%, se pode supor apresentavam fascíolas resistentes). Isto deve-se provavelmente ao facto de o grupo de bovinos mais velhos já ter sido tratado duas vezes em

intervalos curtos, o que pode ter levado ao desenvolvimento de resistência aos produtos usados por parte dos parasitas.

Por sua vez, o closantel apresentou um grau de eficácia duvidoso (TRCOF = 92,25%), enquanto que o clorsulon mostra possível resistência (TRCOF = 73,77%). A diferença não é significativa mas poderia ser justificada pelo facto de o closantel eliminar as formas mais precoces dificultando o aparecimento de resistências. No entanto, esta diferença não era de esperar atendendo ao facto de que o princípio ativo usado anteriormente era o closantel, o qual devia ter gerado mais resistências, mas uma vez que a dimensão da amostra é reduzida, estes dados não devem ser considerados como definitivos, pois estes não são estatisticamente significativos.

### **6.5 Inspeção dos fígados**

Houve 78,94% (15/19) de fígados reprovados e 21,06% (4/19) aprovados. Destes quatro fígados aprovados apenas dois tiveram análise fecal negativa nas três amostras, o que nos leva a crer que não foram infetados pelo parasita em todo este intervalo, ou porque não ingeriram metacercárias da pastagem ou ainda porque conseguiram limitar a sua infeção nos estágios primordiais. Os outros dois fígados aprovados apresentaram análise fecal positiva nas duas primeiras leituras. Estes pertenciam ao grupo dos animais mais jovens, o que nos pode levar a pensar que, apesar de apresentarem ovos, não apresentarem lesões, se trata de uma infeção insuficiente para criar lesões ou que pode ter havido uma recuperação das lesões por parte do hospedeiro. O facto de apresentarem todos serologia negativa confirma que não havia uma infeção ativa no momento da recolha dos soros. Dos quinze fígados reprovados, três apresentaram coprologia negativa nas três leituras de fezes, o que, segundo Conceição *et al.* (2002), podem ser falsos negativos se a carga parasitária for menor que 1,5 opg, pois, neste caso, a sensibilidade do teste diminui de 100 para 30%. Podemos também estar perante animais que já tenham controlado os parasitas adultos, mas que, no momento do abate, ainda não tinham recuperado as lesões hepáticas.

Baseando-nos na última amostra de fezes recolhida, todos os fígados com testes coprológicos positivos (6/19), tal como esperado, foram reprovados. Mas, apenas quatro dos treze negativos foram aprovados (os quatro referidos anteriormente). O que mais uma vez corrobora a afirmação de que a sensibilidade da análise coprológica é baixa para pequenas cargas parasitárias. Por outro lado, tal como referido anteriormente, podemos estar perante uma limitação de resolução das lesões por parte do hospedeiro, que, segundo a bibliografia, pode demorar 2 anos (Owen, 1987), ou seja, apesar de reprovados por presença de lesões, estes fígados já não apresentavam fascíolas nos seus canalículos.

Ao comparar estes resultados com a serologia, em 71,58% dos animais, não se detetou presença de *Ac* contra fascíola, apesar de não ser uma diferença estatisticamente significativa ( $X^2=1.0413$ ,  $gl=1$ ,  $p=0.308$  para  $p<0,05$ ), está de acordo com a afirmação

anterior que diz que será mais provável que já não estejam presentes fascíolas nestes animais.

Quanto ao princípio ativo, os dados não são estatisticamente significativos ( $X^2=0.6081$ ,  $gl=1$ ,  $p=0.4355$  para  $p<0,05$ ), mas pode-se referir que 27,3% (3/11) dos fígados tratados com closantel foram aprovados comparando com 12,5% (1/8) também aprovados dos tratados com clorsulon. O que pode ser explicado pela ação sobre as fascíolas mais jovens por parte do closantel o que permite uma recuperação mais rápida do fígado pois é diminuído o estímulo antigénico mais precocemente comparativamente ao clorsulon (Hanna *et al.*, 2006). Relativamente à inspeção no laboratório da faculdade, só foi possível recolher cinco fígados dos dezanove totais. Dessa reduzida amostra, apenas um fígado apresentou fascíolas adultas nos canalículos e ovos na bÍlis; outro apresentou apenas ovos na bÍlis, sendo estes dois pertencentes ao grupo dos bovinos mais velhos. Isto pode ser explicado pelo facto de o tratamento ter sido aplicado há menos tempo (apenas 43 dias antes da recolha) e ainda não terem sido eliminadas todas as fascíolas presentes, o que coincide com a bibliografia que relata que este fenómeno pode demorar mais de dois meses (Hanna *et al.*, 2006).

As perdas associadas a esta parasitose são de vários níveis como já se referiu, mas a mais direta e mais preocupante para o produtor é a reprovação do fígado em matadouro. Estas perdas têm de ser inferidas indiretamente pois quando se vende uma carcaça. O preço base inclui músculo, osso, patas e vísceras. Contactos realizados com o Matadouro do Montijo forneceram o seguinte valor médio, no período deste estudo, 2,5€/kg de fígado. Os gastos associados a desparasitação, tendo em conta o Ivomec F (fasciolicida de eleição por parte dos médicos veterinários entrevistados), podem rondar os 6-7€ num novilho com peso médio de 400kg. Assim, pode compensar usar antiparasitários como profilaxia, mas apenas se acompanhado de um bom maneio.

## **6.6 Análise Serológica – Técnica de ELISA indireto**

No total de soros examinados, 78,51% (11/14) foram negativos e 21,43% (3/14) positivos (ver anexo A1). Segundo a literatura, ao fim de quatro semanas, os soros já não deveriam apresentar IgG anti-*Fasciola hepatica* (Paz-Silva *et al.*, 2005). Esta percentagem de positivos pode estar relacionada com a especificidade que para este teste é de 88% (Arias, 2010), ou seja, há 12% dos casos que são dados como positivos e são negativos. Porém, os fígados destes foram reprovados o que afasta esta hipótese. Quando observada a coprologia destes animais, no dia 0 eram positivos e ficaram negativos nas duas últimas leituras; assim, levar-nos-ia a afastar a hipótese de ter havido falha na resposta ao tratamento ou reinfeção, apesar de termos de ter em conta a sensibilidade da técnica coprológica. A hipótese mais provável é ter havido interferência na deteção dos Ac contra fascíola com deteção de Ac contra outros tremátodes como *Calicophorum*, que podem originar falsos positivos (Arias, 2012). Ao comparar as placas de ELISA das três diferentes

proteínas, dois destes indivíduos apresentam altos títulos de Ac em todas as leituras, o que apoia a afirmação anterior, o poder tratar-se de um falso positivo. Porém, ao apresentarem simultaneamente títulos altos de Ac contra *D. dendriticum* pode indicar que houve hemólise da amostra pois é raro haver infecções mistas deste parasita com *F. hepatica* ou *C. daubneyi* (Arias, 2012). Não se podendo deixar de referir que um dos três animais apenas foi positivo a fhAPS, neste caso seria aceite a hipótese de o teste coprológico ter sido falso negativo e ter havido uma falha no tratamento ou reinfeção, pois ainda havia estímulo antigénico.

Quanto à percentagem de negativos, apenas 27,3% (3/11) foram aprovados. Neste caso podemos invocar a sensibilidade do teste que é de 86% (Arias, 2010) ou seja, há 14% de probabilidade de um valor dar negativo e ser positivo, o que não parece ser o caso uma vez que foram observados três dos fígados reprovados e já não apresentavam fascíolas nos seus canalículos biliares. Observando simultaneamente a análise coprológica destes animais, serologicamente negativos mas reprovados, 54,5% (6/11) apresentaram coprologia positiva na primeira análise e apenas quatro deles se mantiveram positivos até à última análise. Assim, a hipótese mais provável é que, apesar de não haver desenvolvimento de resposta imunitária pois as fascíolas já não estão presentes, as lesões não são resolvidas e os fígados são reprovados. Porém, esses quatro animais que apresentavam ovos nas fezes na última análise coprológica, deixam duas hipóteses, uma vez que os soros foram recolhidos quatro meses após a última recolha de fezes: o tratamento pode ter sido eficaz e eliminado as fascíolas fazendo com que o estímulo antigénico desaparecesse, o que, como referido anteriormente, ocorre em 4 semanas, ou podemos estar perante falsos negativos, que é justificado pelos 86% de sensibilidade do teste.

Não houve diferença estatisticamente significativa ( $X^2=0.0094$ ,  $gl=1$ ,  $p=0.9227$  para  $p<0,05$ ) entre o princípio ativo utilizado e a presença de IgG contra fascíola. Mas pode referir-se que dos 3 animais positivos na serologia, os dois tratados com closantel foram positivos nas 3 leituras de ELISA o que, tal como dito anteriormente, indica possível hemólise da amostra. Quanto ao animal tratado com clorsulon, apenas foi positivo a leitura de APS, o que pode indicar uma falha no tratamento ou reinfeção, ou pode-se tratar de um falso positivo e o fígado ter sido reprovado por falta de capacidade de resolver as lesões. Porém a dimensão da amostra é demasiado reduzida para se poder tirar alguma conclusão.

## 7. CONCLUSÕES

Os trabalhos experimentais realizados no âmbito desta dissertação permitiram concluir que, mais importante do que o princípio ativo utilizado, é o manejo das pastagens e o controlo do ciclo extra-mamífero.

Pois, tal como se verificou, 78,94% dos fígados destes animais foram reprovados devido a lesões de fasciolose, porém, 78,57% das análises serológicas foram negativas. Assim, apesar de o tratamento ser eficaz, as lesões hepáticas não são solucionadas em tempo suficiente para que os fígados, uma vez contaminados, sejam aprovados. É importante primeiramente evitar a contaminação e encarar a desparasitação como profilaxia e não como tratamento. Ou seja, se estamos a investir numa desparasitação, mas as pastagens permanecem contaminadas, é muito difícil que se consiga controlar a fasciolose apenas com fármacos, mesmo com aqueles que eliminam as formas precoces.

As perdas por diminuição do rendimento da carcaça são relativas, pois há autores que afirmam que se houver uma boa alimentação, estas perdas não são significativas. Infelizmente, por limitações práticas, não foi possível efetuar este tipo de controlo neste estudo.

A nível laboratorial, durante a realização do presente estudo, verificou-se a falta de sensibilidade e especificidade da técnica de sedimentação natural comparativamente à técnica de McMaster Modificado, já que foi esta última que permitiu identificar quais os animais infetados com *F. hepatica*. Assim, apesar de morosa, seria interessante implementar esta técnica no quotidiano do laboratório para pesquisa de ovos de *F. hepatica* em fezes de bovino.

A prova de ELISA também se mostrou bastante sensível e coerente com os dados esperados. Mas uma vez que esta é um técnica mais dispendiosa e de difícil execução comparativamente às técnicas coprológicas, é compreensível que seja menos utilizada visto a técnica de McMaster Modificado ter demonstrado boa sensibilidade.

Por fim, confirmou-se que, para infeções crónicas, o exame pós-morte é o mais fiável para pesquisa de prevalência dessa parasitose, mas uma vez que este método nem sempre é possível, este trabalho permitiu perceber que as outras técnicas apesar das suas limitações podem dar uma indicação do grau de infeção de uma população.

## 8. PERSPETIVAS FUTURAS

Num trabalho futuro seria interessante aumentar o tamanho da amostra, aumentando o número de explorações e de animais envolvidos, de modo a que esta fosse mais representativa da realidade da região da Moita considerada para este estudo. Com estas duas medidas estaria aberto o caminho para a determinação da prevalência de Fasciolose nesta área.

Neste trabalho, foram utilizados para desparasitação dos animais, os princípios ativos closantel e clorsulon. Contudo, Martínez-Moreno *et al* (1997) referem que animais tratados com triclabendazol apresentaram melhores resultados, pois este atua sobre as formas imaturas, o que permite um menor número de aplicações e maior eficácia do tratamento. Deste modo, seria interessante avaliar a eficácia clínica e vantagem económica do uso de triclabendazol nos animais desta região comparativamente ao closantel e clorsulon, para posteriormente se considerar a sua utilização na prática clínica. A grande limitação da utilização deste princípio ativo é a sua formulação – suspensão oral – o que dificulta muito o manejo de bovinos. Mas atualmente em alguns países da Europa já existe formulação injetável para bovinos, que se espera que brevemente possa ficar disponível no nosso país.

Quanto ao caso concreto da exploração em estudo, o mais importante seria tratar os terrenos, fazer uma rotatividade de dois anos, em que, durante este período, metade das pastagens fica inutilizada, permitindo assim interromper o ciclo de desenvolvimento deste parasita, conjugando com uma possível eliminação do hospedeiro intermediário através das técnicas antes referidas, apesar de estas não terem uma fácil aplicação prática. Quanto ao tratamento, como dito anteriormente, o princípio ativo pode não ser o mais importante se associado a um bom manejo. Inicialmente aconselharíamos a utilização do closantel por apresentar maior eficácia nas formas imaturas. Atendendo ao facto de a diferença entre formulação injetável ou tópica não ser muito relevante, a sua escolha pode ser deixada ao critério do produtor sendo a segunda mais prática mas economicamente menos viável.

No que se refere ao número de intervenções desparasitantes, as três intervenções que são atualmente efetuadas, podem protelar o aparecimento de resistências. Assim, seria mais aconselhável reduzir o número de intervenções para duas, uma ao entrar na exploração e outra três meses depois, para controlar as várias fases de evolução do parasita.

Para melhor eficácia nos resultados é importante acompanhar o controlo desta parasitose através de testes coprológicos e se possível, testes serológicos.

Apesar de este estudo ter sido realizado com base numa amostra reduzida, os resultados obtidos alertaram para a importância que poderá ter o estudo desta parasitose a nível nacional.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- Abrous, M., Rondelaud, D., Dreyfuss, G. & Cabaret, J. (1998). Unusual transmission of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, by *Lymnaea glabra* or *Planorbis leucostoma* in France. *The Journal of Parasitology*, 84(6), 1257-1259.
- Aitken, M., Jones, P., Hall, G., Hughes, D. & Collis, K. (1978). Effects of experimental *Salmonella dublin* infection in cattle given *Fasciola hepatica* thirteen weeks previously. *Journal of Comparative Pathology*, 88, 75-84.
- Alcala-Canto, Y., Ibarra-Velarde, F., Sumano-Lopez, H., Gracia-Mora, J. & Alberti-Navarro, A. (2007). "Effect of a cysteine protease inhibitor on *Fasciola hepatica* (liver fluke) fecundity, egg viability, parasite burden, and size in experimentally infected sheep." *Parasitology Research*, 100, 461-465.
- Almeiria, S., Dorchie, P., Fazendeiro, M.I., Genchi, C., Habela Martinez, M.A., Hoglund, J., et al. (s.d.). Boas Práticas de Parasitologia. Merial.
- Alvarez, L., Moreno, G., Moreno, L., Ceballos, L., Shaw, L., Fairweather, I. & Lanusse, C. (2009). Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on *Fasciola hepatica* eggs. *Veterinary Parasitology*, 164, 211-216.
- Álvarez-Sánchez, M., Mainar-Jaime, R., Pérez-García, J. & Rojo-Vásquez, F. (2000). Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Veterinary Record*, 159, 424-425.
- Andrews, S. (1999). The life cycle of *Fasciola hepatica*. In J.P. Dalton (Ed.), *Fasciolosis* (pp.1-29). Grã-Bretanha: CABI Publishing.
- Apifarma. (2011). *Simposium Veterinário Apifarma*. <http://www.apifarma.pt/simposiumvet/Paginas/default.aspx> (acedido em 22 de Maio de 2012).
- Arias, M., Hillyer, G., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J., Pedreira, J., Lomba, C., et al. (2006). A 2.9 kDa *Fasciola hepatica*-recombinant protein based ELISA test for the detection of current-ovine fasciolosis trickle infected. *Veterinary Parasitology*, 137, 67-73.
- Arias, M., Piñeiro, P., Hillyer, G.V., Suárez, J.L., Francisco, I., Cortiñas, F.J., et al. (2010). An approach of the laboratory to the field: assessment of the influence of cattle management on the seroprevalence of fascioliasis by using polyclonal- and recombinant-based ELISAs. *Journal of Parasitology*, 96(3), 626-631
- Arias, M., Lomba, C., Dacal, V., Vazqu es, J., Pedreira, J., Francisco, I., et al. (2011). Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and north-west Spain. *Veterinary Record*, 168, 408.
- Arias, M., Martínez-Carrasco, C., León-Vizcaíno, L., Paz-Silva, A., Diez-Baños, P., Morrondo, P., et al. (2012). Detection of antibodies in wild ruminants to evaluate exposure to liver trematodes. *Journal of Parasitology*, 20, 12.
- Armour, J. (1975). The epidemiology and control of bovine fascioliasis. *Veterinary Record*, 96, 198-201.

- Becker, K., Tilley L., Vennerstrom, J., Roberts, D., Rogerson, S. & Ginesburg, H. (2004). Oxidative stress in malaria parasite- infected erythrocytes: host- parasite interactions. *International Journal of Parasitology*, 34, 163-189.
- Beckham, S.A, Piedrafita, D., Phillips, C.I., Samarawickrema, N., Law, R.H.P., Smooker, P.M., *et al.* (2009). A major cathepsin B protease from the liver fluke *Fasciola hepatica* has atypical active site features and a potential role in the digestive tract of newly excysted juvenile parasites. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41, 1601-1612.
- Borgsteede, F., Moll, L., Vellema, P. & Gaasenbeek, C. (2005). Lack of reversion in triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Veterinary Record*, 156, 350-351.
- Bossaert, K., Farnir, F., Leclipteux, T., Protz, M., Lonneux, J. & Losson, B. (2000). Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections in calves with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 87, 103-123.
- Bouchet, F., Pétrequin, P., Paicheler, J. & Dommelier, S. (1996). First paleoparasitologic approach of the neolithic site in Chalain (Jura, France). *Bulletin de la societe de Pathologie Exotique*, 88, 265-268.
- Brennan, G., Fairweather, I., Trudgett, A., Hoey, E., McCoy, McConville, M., *et al.* (2007). Understanding triclabendazole resistance. *Experimental and Molecular Pathology*, 82, 104-109.
- Caldeira, R. (2009). Produção de Bovinos de Carne. *Apostamentos das Aulas Teóricas de Produção Animal*. FMV-UTL.
- Cancela, M., Acosta, D., Rinaldi, G., Silva, E., Durán, R., Roche, L., Zaha, A.; Carmona, C. & Tort, J.F. (2008). A distinctive repertoire of cathepsins is expressed by juvenile invasive *Fasciola hepatica*. *Biochimie*, 90, 1461-1475.
- Castro, E., Freyre, A. & Hernández, Z. (2000). Serological responses of cattle after treatment and during natural re-infection with *Fasciola hepatica*, as measured with a dot-ELISA system. *Veterinary Parasitology*, 90, 201-208.
- Chambers, E., Hoey, E., Trudgett, A., Fairweather, I. & Timson, D. (2010). Binding of serum albumin to the anthelmintic drugs albendazole, triclabendazole and their sulphoxides. *Veterinary Parasitology*, 171, 172-175.
- Charlier, J., Duchateau, L., Claerebout, E., Williams, D. & Vercruyssen, J. (2007). Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody levels in bulk-tank milk samples and production parameters in dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 78, 57-66.
- Charlier, J., Meulemeester, L., Claerebout, E., Williams, D. & Vercruyssen, J. (2008). Qualitative and quantitative evaluation of coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. *Veterinary Parasitology*, 153, 44-51.

- Chauvin, A., Bouvet, G. & Boulard, C. (1995). Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. *Internacional Journal of Parasitology*, 25, 1227-1241.
- Chauvin, A., Moreau, E. & Boulard, C. (1997). Diagnostic de la fasciolose bovine par sérologie de mélange. Interprétation en conditions de terrain. *Veterinary Research*, 28, 37-43.
- Chik, B., Coverdale, O. & Jackson, A.. (1980). Production effects of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in beef cattle. *Australian Veterinary Journal*, 56, 588-591.
- Clery, D., Torgerson, P. & Mulcahy, G. (1996). Immune responses of cronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*." *Veterinary Parasitology*, 62, 71-82.
- Coles, G., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., 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, 35-44
- Coles, G. (2005). Anthelmintic resistance – looking to the future: a UK perspective. *Research in Veterinary Science*, 78, 99-108.
- Coles, G., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., *et al.* (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 136, 167-185.
- Conceição, M. (2001). *Fasciolose Bovina: Aspectos de diagnóstico e modelos de avaliação de risco - novas abordagens*. Lisboa: FMV-UTL.
- Conceição, M., Durão, R., Costa, I. & Costa, J. (2002). Evaluation of a simple sedimentation method (modified McMaster) for diagnosis of bovine fascioliosis. *Veterinary Parasitology*, 105, 337-343.
- Cordero del Campillo, M. & Rojo Vázquez, F. (1999). *Parasitología Veterinaria* (1st ed). Madrid: McGraw-Hill.
- Corrêa, O.(1976). *Doenças Parasitárias dos animais domésticos* (3rd ed.). Porto Alegre: Sulina.
- Craig, T.M. (1992). Efficacy of two formulations of albendazole against liver flukes in cattle. *American Journal of Veterinary Reserach*, 53, 1170-1171.
- Craven, J., Bjørn, H., Henriksen, S.A., Nansen, P., Larsen, M. & Lendal, S. (1998). Survey of anthelmintic resistance on Danish horse farms, using 5 different methods of calculating faecal egg count reduction. *Equine Veterinary Journal*, 30(4), 289-293.
- Crossland, N. O. (1976). The effect of the molluscicide N-tritylmorpholine on transmission of *Fasciola hepatica*. *The Veterinary Record*, 98, 45-48.

- Crowin, R.M. (1997). Economics of gastrointestinal parasitism of cattle. *Veterinary Parasitology*, 72, 451-460.
- Díaz, P., Lomba, C., Pedreira, J., Arias, M., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., *et al.* (2006). Analysis of the IgG antibody response against *Paramphistomidae* trematoda in naturally infected cattle. *Veterinary Parasitology*, 140, 281-288.
- Dixit, A.K., Dixit, P. & Sharma, R. L. (2008). Immunodiagnostic/protective role of Cathepsin L cysteine proteinases secreted by *Fasciola* species. *Veterinary Parasitology*, 154, 177-184.
- Donnelly, S., O'Neill, S.M., Sekiya, M., Mulcahy, G. & Dalton, J.P. (2005). Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infection and Immunity*, 73, 166-173
- Dorchies, P.H. (2006). Flukes: Old parasites but new emergence. *XXIV World Buiatrics Congress*. Nice.
- Duménigo, B.E. & Mezo, M. (1999). Monoclonal antibody sandwich immunoassay detection of coproantigen to evaluate the efficacy of treatment in natural ovine fasciolosis. *Research in Veterinary Science*, 66, 165-167.
- Duthaler, U., Smith T.A. & Keiser, J. (2010). In vivo and in vitro sensitivity of *Fasciola hepatica* to triclabendazole combined with artesunate, artemether, or OZ78. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4596-4604.
- EMA. (1999). Committee for veterinary medicinal products - Clorsulon. *The European Agency for the Evaluation of Medical Products*. Acedido em Mai. 21, 2012, disponível em:  
[http://www.emea.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits\\_-\\_Report/2009/11/WC500012626.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500012626.pdf).
- Euzéby, J. (1971). *Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leurs incidences sur la pathologie humaine*. Paris: Vigot Frères Éditeurs.
- Fairweather, I., Threadgold, L.T. & Hanna, R.E.B. (1999). Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host." In J.P. Dalton (Ed.), *Fasciolosis* (pp. 47-111). Grã-Bretanha: CABI Publishing.
- Fairweather, I. & Boray, J.C. (1999). Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance and its Management. *The Veterinary Journal*, 158, 81-112.
- Fidalgo, A.A.C. (2007). Avaliação dos custos diretos da fasciolose Bovina no concelho de Vagos. *Dissertação de MSPV*. Lisboa: FMV-UTL
- Foreyt, W.J. (1988). Efficacy of a fenbendazole-triclabendazole combination against *Fasciola hepatica* and gastrointestinal nematodes in sheep. *Veterinary Parasitology*, 26, 265-271

- Flynn, R. J., Mannion, C., Golden, O., Hacariz, O. & Mulcahy, G. (2007) Experimental *Fasciola hepatica* infection alters responses to tests used for diagnosis of bovine tuberculosis. *Infection and Immunity*, 75, 1373-1381.
- Flynn, R.J. & Mulcahy, G. (2008). Possible role for toll-like receptors in interaction of *Fasciola hepatica* excretory/secretory products with bovine macrophages. *Infection and Immunity*, 76, 678-684.
- Gaasenbeek, C.P.H., Moll, L., Cornelissen, J.B.W.J., Vellema, P. & Borgsteede, F.H.M. (2001). An experimental study on triclabendazol resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 95, 37-43.
- Genicot, B., Mouligneau, F., Lekeux, P. (1991). Economic and production consequences of liver fluke disease in double-muscled fattening cattle. *Journal of Veterinary Medicine B*, 38, 203-208
- Hanna, R.E.B., Cromie, L., Taylor, S. M. & Couper, A. (2006). The effect of a parenteral ivermectin/closantel injection on the growth and reproductive development of early immature *Fasciola hepatica* in cattle. *Veterinary Parasitology*, 142, 78-90.
- Happish, F.A. & Boray, J.C. (1969, July). "Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis." *Australian Veterinary Journal*, 45, 326-328.
- Heppleston, P.B. (1972). Life history and population fluctuations of *Lymnaea truncatula* (müll), the snail vector of fascioliasis. *Journal of Applied Ecology*, 9, 235-248.
- Heras, F.T. (1974). *Fasciolosis hepatica de los rumiantes*. Valladolid: Sever-Cuesta.
- Hillyer, G.V. & Santiago, N. (1979). Use of immunologic techniques to detect chemotherapeutic success in infections with *Fasciola hepatica*. II. The enzyme linked immunosorbent assay in infected rats and rabbits. *Journal of Parasitology*, 65, 680-684.
- Hillyer, G.V. (2005). *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *Journal of Helminthology*, 79, 241-247.
- Hodasi, J.K.M. (1976). The effects of low temperature on *Lymnaea truncatula*. *Parasitology Research*, 48, 281-286.
- Hoyle, D.V., Dalton, J.P., Chase-Topping, M. & Taylor, D.W. (2003). Pre-exposure of cattle to drug-abbreviated *Fasciola hepatica* infections: the effect upon subsequent challenge infection and the early immune response. *Veterinary Parasitology*, 111, 65-82.
- Hurtrez-Boussès, S., Meunier, C., Durand, P. & Renaud, F. (2001). Dynamics of host-parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Microbes and Infection*, 841-849.
- Hussain, A. (2008). Evaluation of anthelmintic activity of some ethnobotanicals. *Tese de Doutorado - Department of Parasitology Faculty of Veterinary Science, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan*.

- Jacquet, P. (2008). La fasciolose à *Fasciola hepatica*: physiopathologie, dépistage et prévention. *Le nouveau Practicien Vétérinaire*, 43-51.
- Jayaraj, R., Piedrafita, D., Dynon, K., Grams, R., Spithill, T.W. & Smooker, P.M. (2009). Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Veterinary Parasitology*, 160, 230-236.
- Jeyathilakan, N., Murali, K., Anandaraj, A. & Abdul Basith, S. (2012). In vitro evaluation of anthelmintic property of ethno-veterinary plant extracts against the liver fluke *Fasciola gigantica*. *Journal of Parasitological Diseases*, 36(1), 26–30.
- Johnson, E. G. (1991). Effects of liver flukes on feedlot performance. *Agri-Practice*, 12, 33-36.
- Kaplan, R. M. (2001). *Fasciola hepatica*: A Review of the Economic Impact in Cattle and Considerations for Control. *Veterinary Therapeutics* 2, n.1, 40-48.
- Kassai, T. (1999). *Veterinary Helminthology* (1st ed.) Gran Bretanha: Butterworth-Heinemann.
- Keiser, J., Utzinger, J., Vennert, J. L., Dong, Y., Brennan, G. & Fairweather, I. (2007). Activity of artemether and OZ78 against triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101, 1219-1222.
- Khaznadji, E., Collins, P., Dalton, J.P., Bigot, Y. & Moire, N. (2005). A new multi-domain member of the cystatin superfamily expressed by *Fasciola hepatica*. *International Journal for Parasitology*, 35, 1115–1125.
- Knubben-schneizer, G. (2008). An interactive map to assess the potential spread of *Lymnaea truncatula* and the free-living stages of *Fasciola hepatica* in Switzerland." *WBC 2012*. Lisboa, 154, 242–249.
- Koko, W.S., Galal, M. & Khalid, H.S. (2000). Fasciolicidal efficacy of *Albizia anthelmintica* and *Balanites aegyptiaca* compared with albendazole. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 247-252.
- Laffont, C.M., Alvinerie, M., Bousquet-Mélou, A. & Toutain, P.L. (2001). Licking behaviour and environmental contamination arising from pour-on ivermectin for cattle. *International Journal for Parasitology*, 31, 1687–1692.
- López-Díaz, M.C., Carro, M.C., Cardóniga, C., Díez-Baños, P. & Mezo, M. (1998). Puberty and serum concentrations of ovarian steroids during prepuberal period in Friesian heifers artificially infected with *Fasciola hepatica*. *Theriogenology*, 50, 587-593.
- Loyacano, A.F., Skogerboe, T.L., Williams, J.C., DeRosa, A.A., Gurie, J.A. & Shostrom, V.K. (2001, May). Effects of parenteral administration of doramectin or a combination of ivermectin and clorsulon on control of gastrointestinal nematode and liver fluke infections and on growth performance in cattle. *JAVMA* 218, 9, 1465-1468.
- Loyacano, A.F., Williams, J.C., Gurie, J. & DeRosa, A.A. (2002). Effect of gastrointestinal nematode and liver fluke infections on weight gain and reproductive performance of beef heifer. *Veterinary Parasitology*, 227-234.

- Madeira de Carvalho, L.M., Fonseca, I.M.S.P. & Meireles, J.A.F.S. (2008). *Unidades curriculares de parasitologia I e II, folhas de apoio às aulas práticas*. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- 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, 439-447.
- Mali, R.G. & Mehta, A.A. (2008). A review on anthelmintic plants. *Natural Product Radiance*, 7(5), 466-475.
- Malone, J.B. (1982). Efficacy of albendazole for treatment of naturally acquired *Fasciola hepatica* in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 43, 879-881.
- Malone, J.B. (2002). Liver flukes in ruminants. In B.P. Smith, *Large animal internal medicine: diseases of horses, cattle, sheep and goats* (pp. 805-808). USA: Mosby.
- Marques, S.T., Scroferneker, M.L. & Edelweiss, M.I. (2005). Kidney pathology in cattle naturally infected by *Fasciola hepatica*." *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 60, 23-26.
- Martin, P.J., Chambers, M. & Hennessy, D.R. (2009). Efficacy against *Fasciola hepatica* and the pharmacokinetics of triclabendazole administered by oral and topical routes. *Australian Veterinary Journal*, 87, 200-203.
- Martínez-Moreno, A., Jiménez, V., Martínez-Cruz, M.S., Martínez-Moreno, F.J., Becerra, C. & Hernández, S. (1997). Triclabendazole treatment in experimental goat fasciolosis: anthelmintic efficacy and influence in antibody response and pathophysiology of the disease. *Veterinary Parasitology*, 68, 57-67.
- Meaney, M., Fairweather, I., Brennan, G.P. & Forbes, H.B. (2004). Transmission electron microscope study of the ultrastructural changes induced in the tegument and gut of *Fasciola hepatica* following in vivo drug treatment with clorsulon. *Parasitology Research*, 92, 232-241.
- Mehlhorn, H. (2001). *Encyclopedia Reference of Parasitology. Diseases, treatment, therapy* (2nd ed.). Germany: Springer.
- Mekroud, A., Chauvin, A. & Rondelaud D. (2007). Variations of biological indicators as highly presumptive markers for fasciolosis in experimentally-infected sheep. *Médecine Vétérinaire*, 158, 437-441.
- Mezo, M., González-Warleta, M., Carro, C. & Ubeira, F.M. (2004). An ultrasensitive capture ELISA for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3). *Journal of Parasitology*, 90(4), 845-852.
- Mezo, M. (2011). Association between anti-F. hepatica antibody levels in milk and production losses in dairy cows. *Veterinary Parasitology*, 180, 237-242.
- Mitchell, G. (2002) Update on fasciolosis in cattle and sheep. *In Practice*, 378-385.

- Moll, L., Gaasenbeek, C.P.H., Vellema, P. & Borgsteede, F.H.M. (2000). Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, 91, 153-158.
- Molloy, J.B., Anderson, G. R., Fletcher, T. I., Landmann, J. & Knight, B.C. (2005). Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies anti *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in cattle, sheep and buffaloes in Australia. *Veterinary Parasitology*, 207-212.
- Morrison, C.A., Colin, T., Sexton, J.L., Bowen, F., Wicker, J., Friedel, T. & Spithill, T. W. (1996). Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine*, 14, 1603-1612.
- Ollerenshaw, C.B. (1959, Dec). The Ecology of the Liver Fluke (*Fasciola hepatica*). *The Veterinary Record*, 71(45), 957-963.
- O'Neill, S.M. (2000). *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunology*, 22, 147-155.
- Ortiz, P.L., Claxton, J.R., Clarkson, M.J., McGarry, J. & Williams, D.J.L. (2000). The specificity of antibody responses in cattle naturally exposed to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 93, 121-134.
- Owen, I.L. (1987). A field trial with triclabendazole for the control of fasciolosis. *Australian Veterinary Journal*, 64, 59-61.
- Paz-Silva, A, Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Pedreira, J., Arias, M., López, C., *et al.* (2003). Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. *Parasitology Research*, 91, 328-331.
- Paz-Silva, A, Hillyer, G.V., Sánchez-Andrade, R., Rodríguez-Medina, J.R., Arias, M., Morrondo, P. & Díez-Baños, P. (2005). Isolation, identification and expression of a *Fasciola hepatica* cDNA encoding a 2.9-kDa recombinant protein for the diagnosis of ovine fasciolosis. *Parasitology Research*, 95, 129-135.
- Phiri, A.M., Phiri, I.K., Sikasunge, C.S., Chembensofu, M. & Monrad, J. (2006). Comparative fluke burden and pathology in condemned and non-condemned cattle livers from selected abattoirs in Zambia. *Journal of Veterinary Research*, 73, 275-281.
- Radostitis, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. & Constable, P.D. (2007). *Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats* (10th ed.). Espanha: Elsevier.
- Rapsch, C, Schweizer, G., Grimm, F., Kohler, L., Bauer, C., Deplazes, P., *et al.* (2006) Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *International Journal of Parasitology*, 36, 1153-1158.

- 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, 61-66.
- Rendell, W.F. (1980). Effects of hexachloroetano on the milk yields of dairy cows in North Florida infected with *Fasciola hepatica*. *American Journal of Veterinary Research*, 41, 262-263.
- Rondelaud, D. & Dreyfuss, G. (1995). *Fasciola hepatica*: the influence of the definitive host on the characteristics of infection in the snail *Lymnaea truncatula*. *Parasite*, 2, 275-280.
- Salimi-Bejestani, M.R., McGarry, J.W., Felstead, S., Ortiz, P., Akca, A. & Williams, D.J.L. (2005a). Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluations against a commercially available test. *Veterinary Science*, 78, 177-181.
- Salimi-Bejestani, M.R., Daniel, R.G., Felstead, S.M., Cripps, P.J., Mahmood, H. & Williams, D.J.L. (2005b). Prevalence of *Fasciola hepatica* in dairy herds in England and Wales measured with an ELISA applied to bulk-tank milk. *Veterinary Record*, 156, 729-731.
- Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Suárez, J., Panadero, R., Díez-Baños, P. & Morondo, P. (2000). Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, 93, 39-46.
- Sanchís, J., Venzal, J. M., Invernizzi, F., Maldini, G. & Félix, M.L. (2011). *Efectos del tratamiento periódico con triclabendazole en vacunos sobre la ganancia de peso y lesiones hepáticas en frigorífico.*
- Sangster, N.C. (2001) Managing parasiticide resistance. *Veterinary Parasitology*, 98, 89-109.
- Scherer, P.O., Pile, E.A., Serra-Freire, N.M. & Schäffer, G.V. (1999). Uso da técnica de punção-biópsia para o diagnóstico histopatológico da fasciolose ovina." *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*.
- Schweizer, G., Braun, U., Deplazes, P. & Torgerson, P.R. (2005). Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Veterinary Record*, 157, 188-193.
- Silva Leitão, J.L. (1978). *Prática do combate às parasitoses dos animais em Portugal – (Vol. I, II e IV)*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Silva, E, Castro, A., Lopes, A., Rodrigues, A., Dias, C., Conceição, A., et al. (2004). A recombinant antigen recognized by *Fasciola hepatica* - infected hosts. *Journal of Parasitology*, 90, 746-751.
- Simsek, S., Köroglu, E., Ütük, A.E. & Altay, K. (2006). Use of Indirect Excretory/Secretory Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ES-ELISA) for the Diagnosis of Natural *Fasciola hepatica* Infection in Eosinophilic and Non-Eosinophilic Cattle from Eastern Turkey." *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30, 411-415.

- Spinosa, H.S., Górnjak, S.L. & Bernardi, M.M. (2006). *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária* (4th ed). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Stalker, M.G. & Hayes, M.A. (2007). Liver and biliar system. In M.G. Maxie, *Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals*. Edinburgo: Elsevier Saunders.
- Taira, N., Yashifuji, H. & Boray, J.C. (1997). Zoonotic Potential of infection with *Fasciola spp.* by consumption of freshly prepared raw liver containing immature flukes." *International Journal of Parasitology*, 27, 775-779.
- Taylor, S. (1965). *La fascioliasis y el distoma hepatico*. Rome: FAO.
- Taylor, M. (1992). Anthelmintics. In A.H. Andrews, R.W. Blowey, H. Boyd e R.G. Eddy, *Bovine Medicine. Diseases and husbandry of cattle* (pp. 815-826). Gran Bretanha: Blackwell.
- Taylor, M. (2012). Practical guidelines promoting sustainable control of helminth parasites for sheep and cattle - the UK experience. *XXVII WBC*. Lisboa, 102-105.
- Urquhart, G.M., Armour J., Duncan, J.L., Dunn, A.M. & Jennings, F.W. (1998). *Parasitologia Veterinária* (2nd ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Valero, M.A, Gironès, N., García-Bodelóna, M.A., Periago, M.V., Chico-Calero, I., Khoubbanea, M., *et al.* (2008) Anaemia in advanced chronic fasciolosis. *Acta Tropica*, 108, 35-43.
- Van Wyk, J.A, Bath, G.F. & Malan, F.S. (1998). The need for alternative methods to control nematode parasites of ruminant livestock in South Africa. *World Animal Review*, 91(2), 30-33.
- Vaughan, J.L., Charles, J.A. & Boray, J.C. (1997). *Fasciola hepatica* infectation in farmed emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Australian Veterinary Journal*, 75, 811-813.
- Veloso, M.G. (2012) Inspeção post-mortem. *Apontamentos de Aulas Teóricas de Inspeção Sanitária I*. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Warburg, O. & Christian, W. (1941). Isolierung und kristallisation des garungsferuents enolase. *Biochemische Zeitschrift*, 310, 384–399.
- Wesolowska, A., Gajewska, A., Smaga-Kozłowska, K., Kotomski, G. & Wedrychowicz, H. (2012). Effect of *Fasciola hepatica* proteins on the functioning of rat hepatocytes." *Parasiotology Research*, 110, 395-402.
- Wilson, R.A. & Denison, J. (1980). The parasitic castration and gigantism of *Lymnaea truncatula* infected with larval stages of *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*, 61, 109-119.
- Wilson, L.R., Good, R.T., Panaccio, M., Wijffels, G.L., Sandeman, R.M. & Spithill, T.W. (1998). *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B

protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. *Experimental Parasitology*, 88, 85–94.

Wolf-Spengler, M.L. & Isseroff, H. (1983). Fascioliasis: bile duct collagen induced by proline from the worm. *Journal of Parasitology*, 69, 290-294.

Wood, I.B., Amaral, N.K., Bairden, K., Duncan J.L., Kassai, T., Malone, J. B., *et al.* (1995). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*, 58, 181-213.

Yildirim, A., Ica, A., Duzlu, O. & Inci, A. (2007). Prevalence and risk factors associated with *Fasciola hepatica* in cattle from Kayseri province, Turkey. *Reveu Médecine Vétérinaire*, 158, 613-617.



## ANEXOS

### A1 - Leituras de Placas de ELISA

Leitura realizada **com um** espectrofotómetro com um filtro de 450 nm

**Tabela A1 – Informações base das placas de ELISA**

	1	2	3	4	5
A	B	Controlo Positivo	Controlo Positivo	PT 5395	PT 2700
B	R	Controlo Negativo	Controlo Negativo	PT 5396	PT 2701
C	A	PT 1675	PT 6297	PT 5512	PT 2712
D	N	PT 1676	PT 6298	PT 5513	PT 2713
E	C	PT 2951	PT 3261	PT 2697	PT 2709
F	O	PT 2952	PT 3262	PT 2698	PT 2710
G	S	PT 6131	PT 3305	PT 2716	PT 2696
H	*	PT 6132	PT 3306	PT 2717	PT 2697

**Tabela A2 – Leituras da placa de ELISA com FhAPS**

	1	2	3	4	5
A	0,054	0,496	0,478	0,492	0,306
B	0,063	0,159	0,177	0,535	0,319
C	0,047	0,280	0,355	0,210	0,965
D	0,050	0,289	0,351	0,239	0,997
E	0,048	0,252	0,311	0,194	0,351
F	0,049	0,251	0,332	0,193	0,334
G	0,049	0,183	0,218	0,227	0,682
H	0,045	0,190	0,251	0,237	0,691

**Tabela A3 - Leituras da placa de ELISA com DdES**

	1	2	3	4	5
A	0,055	0,403	0,411	0,224	0,210
B	0,067	0,119	0,138	0,234	0,311
C	0,061	0,287	0,193	0,266	0,786
D	0,075	0,194	0,285	0,233	0,795
E	0,093	0,235	0,251	0,251	0,375
F	0,084	0,269	0,228	0,214	0,232
G	0,077	0,218	0,176	0,245	0,570
H	0,057	0,185	0,232	0,257	0,527

**Tabela A4 - Leituras da placa de ELISA com CdES**

	1	2	3	4	5
A	0,056	0,431	0,318	0,203	0,253
B	0,052	0,257	0,214	0,223	0,280
C	0,051	0,209	0,205	0,188	0,639
D	0,054	0,249	0,211	0,179	0,629
E	0,051	0,193	0,202	0,175	0,311
F	0,054	0,207	0,217	0,208	0,321
G	0,068	0,167	0,229	0,231	0,539
H	0,056	0,165	0,278	0,230	0,586

## A2 – Métodos Coprológicos

### **Métodos Qualitativos:**

- Método de sedimentação natural (para pesquisa de ovos de tremátodes e os restantes céstodes): aproveita o sedimento resultante da técnica de Willis. Para o efeito, decanta-se o sobrenadante e cora-se o sedimento com Azul-de-metileno, que irá corar os detritos de um tom azulado, o que contrasta com os ovos, nos quais o corante não consegue penetrar e que mantêm a sua cor castanha ou dourada. No caso desta técnica, há a necessidade de aumentar o campo de pesquisa em comparação com a flutuação. Por este motivo, é depositada uma maior quantidade de solução corada numa lâmina e utiliza-se uma lamela de maiores dimensões (23 x 50 mm) para a observação ao microscópio.

### **Métodos quantitativos**

- Contagem de ovos em Câmara de McMaster (Madeira de Carvalho *et al.*, 2008): utiliza-se 2 g de fezes diluídos em 28 ml de solução saturada de açúcar a 25%. Após homogeneizar e filtrar com um passador de cozinha, preenchem-se os dois compartimentos de uma câmara de McMaster, contando posteriormente o número de ovos visível em ambos os compartimentos, multiplicando por um fator de 50, obtendo desta forma o número de ovos por grama de fezes (opg). Assim, o limiar de deteção desta técnica é 50opg.

- Método de McMaster Modificado: Este método foi primeiramente desenvolvido por Urquhart em 1996 e foi depois adaptado noutra investigação efetuada em Portugal sobre Fasciolose Bovina (Conceição *et al.*, 2002). Esta adaptação teve por base alterar o tempo de sedimentação e adicionar solução detergente. De uma forma esquemática:

1. Pesam-se 10g de fezes de bovino e colocam-se num frasco de plástico ou vidro de 100ml de capacidade, de boca larga.
2. Junta-se 60ml de solução detergente a 5%.
3. Homogeniza-se até que o material fecal se desagregue e forme uma suspensão.
4. Filtra-se 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 1000ml de capacidade, enchendo-o depois com água da torneira até à sua capacidade máxima.
5. Deixa-se sedimentar por 10 minutos e decanta-se.
6. Repõe-se a quantidade de 1000ml e deixa-se sedimentar por mais 10 minutos; esta operação deve realizar-se 3 a 4 vezes ou até que o sobrenadante esteja límpido.
7. Depois da última lavagem passa-se o sedimento para um frasco e repor em 50ml.
8. Observa-se em câmara de McMaster ao microscópio ótico, com objetiva 10x e efetuar a contagem dos ovos de *Fasciola hepatica* e outros elementos parasitários que possam aparecer em 4 câmaras, ter o cuidado de observar o fundo da câmara pois tratam-se de

ovos pesados que sedimentam; considera-se que, se não se observar pelo menos um ovo nessas 4 câmaras, terá de fazer a observação em 8 para perfazer 5ml, volume que nos permite aumentar a sensibilidade do método até 1opg.

A taxa de recuperação de ovo-média deste método é de 76,7%. A sensibilidade analítica é de 33% sempre que o número de ovos por grama (opg) de fezes é inferior a 1,5 e 100% para valores mais elevados (Conceição *et al.*, 2002).

### A3 - Protocolo da técnica de ELISA para detecção de anticorpos (ELISA indireto)

1. **Antigenar** as placas de microtitulação com antígeno de excreção/secreção diluído em PBS (Nota 1 e 2)

Não se sensibiliza a coluna de BRANCOS

Colocam-se 100µl/poço do antígeno diluído

Incubar durante a noite (o mesmo numero de horas para todas as placas) a 4°C, ou incubar na estufa a 37° durante 3-4h.

Após incubação eliminar a solução sensibilizante, sem lavar.

2. **Bloqueio** dos pontos de união inespecíficos dos antígenos à placa com uma solução de leite magro em pó dissolvida a 2% em PT (denomina-se PTL, Nota 1)

Colocar na coluna de BRANCOS

Disponer 200 µl/poço da solução bloqueante

Incubar as placas durante meia hora a 37°C.

Eliminar a solução bloqueante, sem lavar.

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

Depositam-se 100µl/poço. Incluindo um soro controlo Positivo e um soro controlo Negativo com o intuito de os comparar aos soros problema.

Na coluna de BRANCOS coloca-se 100µl de PTL.

Incubar durante meia hora a 37°.

4. **Lavar** os poços com PT a fim de eliminar os anticorpos que não se unem ao poço.

2 lavagens por poço com 200µl/poço.

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

Colocar na coluna de BRANCOS.

Colocam-se 100µl/poço de imunoconjugado

Incubar durante meia hora a 37°

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

Realizam-se 2 lavagens com PT e 2 com água destilada, com 200µl/poço.

7. **Adição do substrato da enzima peroxidase** (OPD, ortofenildiamina, Sigma) para valorizar a sua atividade. (Nota 5)

Depositam-se 100µl/poço desta solução e colocam-se as placas num local escuro durante alguns minutos à temperatura ambiente.

Colocar na coluna de BRANCOS

8. **Deter a reação** adicionando em cada poço 100µl de ácido sulfúrico 3N.

Colocar na coluna de BRANCOS

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

**Nota 1**

1. PBS

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

2. PT (PBS + Tween 20)

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

3. PTL (PT + Leite Magro em pó)

60ml PT + 1,2g Leite

**Nota 2**

APS (Ag Fasciola) – 7,5µl/10ml

Ag Calicophorum – 2,5 µl/10ml

Ag Dicrocoelium - 1 µl/10ml

Nota: Estes valores dependem do método síntese do antígeno.

**Nota 3** – Diluição dos soros a que se obtêm melhores resultados

Para pesquisa de APS –  $1/50$  PTL

Para pesquisa de Calico. -  $1/40$  PTL

Para pesquisa de Dicro -  $1/20$  PTL

**Nota 4** – Diluição do Imunoconjugado a que se obtêm melhores resultados é:

Para pesquisa de APS –  $1/1000$  PTL

Para pesquisa de Calico. -  $1/1500$  PTL

Para pesquisa de Dicro -  $1/1000$  PTL

**Nota 5** – Preparação do OPD

	H <sub>2</sub> O destilada (ml)	Ac. Cítrico (gr)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (gr)	OPD (gr)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ml)
1 placa	12	0,084	0,105	0,012	12
2placas	25	0,175	0,22	0,025	25
3placas	36	0,252	0,3168	0,036	36
4placas	50	0,35	0,44	0,05	50

Técnica:

1. Misturar Ac. Cítrico e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> com a H<sub>2</sub>O destilada. Ajustar o pH a 5 adicionando Na<sub>2</sub>OH 2N para subir o pH e Ac. Clorídrico para baixar.
2. Apenas quando o pH for 5 se pode adicionar o OPD.
3. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adiciona-se apenas no momento de colocar na placa de titulação.