



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**Contribuição para Conhecimento do
Parasitismo por *Fasciola hepatica* no
Baixo Alentejo**

Pedro Miguel Batista Banha

Orientador: Professor Doutor Helder Cortes

Orientador externo: Dr. José Mira

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Relatório de Estágio

Évora, 2016



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**Contribuição para Conhecimento do
Parasitismo por *Fasciola hepatica* no Baixo
Alentejo**

Pedro Miguel Batista Banha

Orientador: Professor Doutor Helder Cortes

Orientador externo: Dr. José Mira

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Relatório de Estágio

Évora, 2016

Agradecimentos

Ao Dr. José Mira por ter prontamente aceitado ser meu orientador de estágio, por tudo o que me soube transmitir, pelos ensinamentos teóricos e práticos transmitidos, pela sua amizade, paciência, dedicação e boa disposição que sempre demonstrou ao longo do estágio.

Ao Professor Doutor Helder Cortes por ter aceitado ser meu orientador de estágio, por toda a disponibilidade e ajuda na procurar de estágio e na elaboração deste trabalho.

Ao António Santos e Sr. Godinho por todos conhecimentos transmitidos, pela sua amizade e simpatia que sempre demonstraram ao longo do estágio.

À Dra. Maria João Vila-Viçosa, pela sua disponibilidade, simpatia e por todos os conhecimentos laboratoriais transmitidos.

Aos meus amigos e companheiros, Filipe, Vítor e Pedro por toda a amizade, apoio, camaradagem, incentivo e por todos os bons momentos que passámos ao longo destes anos. Certamente sem eles teria sido muito mais difícil ultrapassar todas as dificuldades.

Aos restantes colegas de turma, pela amizade, apoio e pela excelente turma que formámos ao longo destes anos.

Aos meus pais, por todo o apoio demonstrado, pelos incentivos que me foram dando ao longo desta etapa, pela paciência e compreensão e por todos os sacrifícios que fizeram para que fosse possível a realização deste sonho.

Ao meu irmão, à Filipa e aos meus avós, por todo o apoio, incentivo e disponibilidade demonstrada.

A todos os meus familiares e amigos, que de uma forma ou de outra contribuíram para que fosse possível a realização deste sonho.

O meu muito OBRIGADO.

Resumo

No presente trabalho são descritas as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Universidade de Évora. Na primeira parte é apresentada a descrição das atividades acompanhadas nas áreas de sanidade, profilaxia, clínica médica e clínica cirúrgica de espécies pecuárias. Na segunda parte do relatório é apresentada uma revisão bibliográfica sobre o parasitismo por *Fasciola hepática* em pequenos ruminantes. Por fim, foi realizado um estudo caso sobre fasciolose em pequenos ruminantes no Baixo Alentejo, que consistiu no estudo de 15 animais de cada efetivo, de um total de 17 explorações de ovinos e três de caprinos. Foram pesquisados ovos de *F. hepática*, recorrendo a método coprológico qualitativo de sedimentação, não se tendo encontrado ovos de trematodes em qualquer amostra de fezes observada, ainda que em três explorações ocorreu serologia positiva. Ainda que o parasitismo possa estar presente nas explorações estudadas, atendendo à sua boa condição corporal, não será muito significativo.

Palavras – chave: fasciolose, pequenos ruminantes, *Fasciola hepática*, clínica de espécies pecuárias, Baixo Alentejo.

Abstract

Contribution to the Knowledge of Parasitism by *Fasciola hepatica* in Baixo Alentejo

This report aims to describe the developed activities during the internship integrated on the master degree in veterinary medicine at the University of Évora. Firstly are described the observed actions in the areas of diseases control programs, medical and surgical activities in livestock. The following part of this report consists on a literature review of *Fasciola hepatica*, focusing of fasciolosis in small ruminants. Lastly, was conducted a case study of fasciolosis in small ruminants in the Baixo Alentejo region, in which the study of 15 animals per livestock, in a total of 17 farms of sheep and three of goats. There were searched eggs of *F. hepatica*, through a coprological method of sedimentation, not eggs were found in any sample of observed feces, even do three flocks were serologically positive. Although parasitism could be present in the given area, its dimension, given to the good body conditions of the animals, would not be very significant.

Keywords: fascioliasis, small ruminants, *Fasciola hepatica*, clinic of livestock species, Baixo Alentejo.

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Índice Geral.....	iv
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas	viii
Índice de Gráficos	ix
Lista de Abreviaturas	x
1. Introdução.....	1
2. Atividades realizadas no período de estágio.....	2
2.1. Sanidade animal	2
2.1.1. Plano de erradicação de doenças em bovinos.....	2
2.1.2. Plano de erradicação das doenças dos pequenos ruminantes	3
2.1.3. Plano de controlo e erradicação da doença de Aujeszky.....	3
2.1.4. Ações de Rastreio e Profilaxia.....	4
2.2. Clínica Médica	7
2.2.1. Sistema Digestivo	9
2.2.2. Pele e Glândulas Anexas.....	11
2.2.3. Sistema Reprodutivo.....	13
2.2.4. Sistema Respiratório	15
2.2.5. Sistema Músculo-esquelético.....	16
2.2.6. Sistema Oftalmológico	17
2.2.7. Sistema Nervoso	18
2.2.8. Outras Doenças.....	19
2.2.9. Outras Intervenções	21
2.3. Intervenções Cirúrgicas.....	22
3. Revisão bibliográfica: <i>Fasciola hepatica</i>	23
3.1. Introdução.....	23

3.2.	História.....	24
3.3.	Taxonomia.....	25
3.4.	Morfologia.....	25
3.4.1.	Tegumento	26
3.4.2.	Sistema digestivo	27
3.4.3.	Sistema Excretor	27
3.4.4.	Sistema reprodutor	27
3.4.5.	Sistema nervoso	28
3.5.	Ciclo de vida.....	28
3.5.1.	Ovo.....	29
3.5.2.	Miracídio.....	30
3.5.3.	Esporocisto.....	31
3.5.4.	Rédia	32
3.5.5.	Cercária.....	33
1.5.6.	Metacercária	33
1.5.7.	De metacercária à <i>Fasciola</i> adulta.....	34
3.6.	Patogenia	35
3.7.	Hospedeiro Intermediário.....	36
3.7.1.	Classificação.....	36
3.7.2.	Morfologia <i>Galba truncatula</i>	36
3.7.3.	Ciclo de vida.....	37
3.7.4.	Ecologia	37
3.8.	Fasciolose em pequenos ruminantes	38
3.8.1.	Epidemiologia.....	38
3.8.2.	Fisiopatologia	40
3.8.3.	A relação Hospedeiro/Parasita.....	40
3.8.4.	Sinais Clínicos	42
3.8.4.1.	Forma Aguda	42
3.8.4.2.	Forma Sub-aguda.....	43

3.8.4.3. Forma Crónica	43
3.8.5. Lesões	44
3.8.6. Diagnóstico	46
3.8.6.1. Diagnóstico Clínico	46
3.8.6.2. Diagnóstico Laboratorial	47
3.8.6.4. Diagnóstico Serológico	50
3.8.6.5. Métodos de diagnóstico molecular	52
3.8.6.6. Diagnóstico Diferencial	53
3.8.7. Tratamento	54
3.8.8. Resistência aos anti-helmínticos	58
3.8.9. Prevenção / Controlo	59
3.8.10. Vacinação	61
3.8.11. Fasciolose em Portugal	63
3.8.12. Fasciolose Humana	64
4. Estudo de Caso	67
4.1. Objetivos	67
4.2. Materiais e Métodos	67
4.2.1. Caracterização da região, das explorações e dos animais	67
4.2.2. Colheita de amostras	69
4.2.3. Processamento das amostras	71
4.2.3.1. Análise coprológica	71
4.2.3.2. Análise Serológica	73
4.2.4. Tratamento e processamento de dados	73
4.3. Resultados	73
4.4. Discussão	74
4.5. Conclusão	75
Bibliografia	77

Índice de Figuras

Figura 1 – Alopecia provocada pela sarna psoróptica	12
Figura 2 – Útero prolapsado	14
Figura 3 – Olho de um bovino com inflamação da córnea, característico da QIB.....	17
Figura 4 – Fasciola hepatica, parasita adulto.....	26
Figura 5 – Ciclo de vida Fasciola hepatica.....	29
Figura 6 – Ovo de Fasciola hepatica	30
Figura 7 – Miracídio	31
Figura 8 – Rédia	32
Figure 9 – Cercária	33
Figura 10 – Metacercária.....	34
Figura 11 – Galba truncatula	37
Figura 12 – Edema sub - mandibular num ovino	44
Figura 13 – Fígado de ovelha hemorrágico	45
Figura 14 – Fígado de ovelha com focos de fibrose devido a trajetos migratórios.....	45
Figura 15 – Mapa de localização das explorações	69
Figura 16 – Amostras de sangue em tubo sem anticoagulante.....	70
Figura 17 – Amostras fecais em luva de latex.....	70
Figura 18 - Copo cónico graduado de 250 ml	72
Figura 19 – Placas de Petri	72
Figura 20 - Microscópio estereoscópio para observação de ovos	73

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Ações profiláticas realizadas a bovinos durante o período de estágio	5
Tabela 2 - Ações profiláticas realizadas a pequenos ruminantes durante o período de estágio.....	6
Tabela 3 - Ações profiláticas realizadas a suínos durante o período e estágio.....	7
Tabela 4 - Ações profiláticas realizadas a equinos durante o período de estágio	7
Tabela 5 - Número (n) de casos clínicos referentes ao sistema digestivo no período de estágio. Frequência relativa (%) do total de casos clínicos (n=26)	9
Tabela 6 - Número (n) de casos clínicos referentes à pele e glândulas anexas durante o período de estágio. Frequência relativa (%) do total de casos clínicos (n= 19)	11
Tabela 7 - Número (n) de casos clínicos referentes ao sistema reprodutivo durante o período de estágio. Frequência relativa (%) do total de casos clínicos (n=15)	13
Tabela 8 - Número (n) de casos clínicos referentes ao sistema respiratório durante o período de estágio. Frequência relativa (%) do total de casos clínicos (n=8)	15
Tabela 9 - Número (n) de casos clínicos referentes ao sistema músculo-esquelético durante o período de estágio. Frequência relativa (%) do total de casos clínicos (n=7)	16
Tabela 10 - Número (n) de casos clínicos referentes ao sistema oftalmológico durante o período de estágio. Frequência relativa (%) do total de casos clínicos (n=5)	17
Tabela 11 - Numero (n) de casos clínicos referentes ao sistema nervoso durante o período de estágio. Frequência relativa (%) do total de casos clínicos (n=2)	19
Tabela 12 - Número (n) de casos clínicos referentes a outras doenças durante o período de estágio. Frequência relativa (%) do total de casos clínicos (n=16)	19
Tabela 13 - Número (n) de outras intervenções efetuadas durante o período de estágio. Frequência relativa (%) do total e casos (n= 15).....	21
Tabela 14 - Número (n) de intervenções cirúrgicas efetuadas durante o período de estágio. Frequência relativa (%) do total e casos (n= 25).....	22
Tabela 15 - Vantagens e desvantagens dos testes de diagnóstico para a Fasciola hepatica	53
Tabela 16 - Fasciolicidas usados em pequenos ruminantes	54
Tabela 17 – Espectro de eficácia dos vários anti-helmínticos.....	55

Índice de Gráficos

Gráfico 1- Número (n) de animais rastreados por espécie animal durante o período de estágio. Frequência relativa (%) do total de animais rastreados (n=8246).....	4
Gráfico 2 - Número (n) de casos clínicos por espécie animal no período de estágio. Frequência relativa (%) do total de casos clínicos (n=105)	8
Gráfico 3 - Número (n) de casos clínicos por sistema no período de estágio. Frequência relativa (%) do total de casos clínicos (n=105)	9

Lista de Abreviaturas

ADS – Agrupamento de Defesa Sanitário

AST – Aspartato Aminotransferase

ATP – Adenosina trifosfato

CRB – Complexo respiratório bovino

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DIE – Dispositivo de Identificação Eletrónica

DIV - Divisão de Intervenção Veterinária

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DSVR – Direção de Serviços Veterinários Regional

ELISA-Enzyme Linked Immunosorbent Assay

E/S – excreção/secreção

FABP – Proteína de ligação ao ácido gordo

GGT – Gamaglutamiltransferase

GLDH – glutamato – desidrogenase

GST – glutathione – S – transferase

HD – Hospedeiro definitivo

HI – Hospedeiro intermediário

IDC – Intradermotuberculização Comparada

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IM – Intramuscular

km² - Quilómetro quadrado

LAP – Leucina aminopeptidase

OPP – Organização de Produtores Pecuários

PCR – Polymerase Chain Reaction

PNSA – Plano Nacional de Saúde Animal

PSI – Plano individual de saneamento

QIB – Queratoconjuntivite infecciosa bovina

SC – Subcutâneo

SDH – Sorbitol desidrogenase

UE – União Europeia

1. Introdução

O presente trabalho pretende descrever as atividades realizadas no período de estágio de domínio fundamental no âmbito da conclusão do mestrado integrado em medicina veterinária pela Universidade de Évora. O estágio foi realizado na Clínica Veterinária Dr. José Mira, localizada em Beja, no período compreendido entre 15 de setembro de 2014 e 31 de março de 2015 sob a orientação científica e pedagógica do coorientador Dr. José Mira e orientador Professor Doutor Helder Cortes.

Nas incursões de campo acompanhei a equipa da clinica Dr. José Mira nas diversas atividades, nomeadamente na colaboração ativa em ações de saneamento e profilaxia, clínica e cirurgia em espécies pecuárias. Os objetivos do estágio visam consolidar e pôr em prática todos os conhecimentos científicos adquiridos ao longo do curso.

O relatório está estruturado em três partes, uma primeira parte onde são descritas as atividades desenvolvidas durante o estágio e respetiva casuística, e um desenvolvimento sucinto das afeções mais frequentes, uma segunda parte correspondente a uma revisão bibliográfica referente ao tema *Fasciola hepatica* e, por último, a terceira parte onde é realizado um estudo de caso sobre a prevalência da fasciolose em pequenos ruminantes no Baixo Alentejo.

2. Atividades realizadas no período de estágio

2.1. Sanidade animal

A Sanidade Animal é uma área em que o médico veterinário tem uma enorme responsabilidade na manutenção do estado de saúde dos efetivos, de forma a otimizar o bem-estar dos animais bem como contribuir para o aumento da produção e rentabilidade da exploração.

No decorrer do estágio acompanharam-se ações de saneamento da brigada da clínica Dr. José Mira, que atua na área de intervenção em vários Agrupamentos de Defesa Sanitária (ADS) /Organização de Produtores Pecuários (OPP), fazendo cumprir o Plano Nacional de Saúde Animal (PNSA). O PNSA é desenvolvido pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), sob diretrizes da União Europeia (UE) que posteriormente são executados por brigadas. Dentro do PNSA estão o Programa Nacional de Erradicação da Tuberculose Bovina, o Programa Nacional de Erradicação da Brucelose Bovina, o Programa Plurianual de Vigilância da Leucose Enzoótica Bovina e por fim, o Programa Nacional de Erradicação da Brucelose dos Pequenos Ruminantes.

Atualmente todas as intervenções sanitárias efetuadas num animal são registadas através de um Programa Informático de Saúde Animal (PISA.NET), que é uma aplicação informática oficial de registo de todas as intervenções sanitárias a que um bovino é submetido no âmbito dos programas de erradicação, bem como dos resultados dos respetivos testes realizados em laboratório e das provas efetuadas na exploração.

2.1.1. Plano de erradicação de doenças em bovinos

O programa sanitário em bovinos é realizado em duas intervenções com 72 horas de intervalo. No primeiro dia, realiza-se a colheita individual de sangue (na veia coccígea média, por exemplo) para rastreio da brucelose bovina e leucose enzoótica bovina, altura em que é também executada a Prova da Intradermotuberculinização Comparada (IDC) com posterior leitura da prova 72 horas após inoculação das tuberculinas bovina e aviária. O plano de erradicação da tuberculose bovina na região do Baixo Alentejo consiste na aplicação da prova IDC a todos os bovinos com mais de seis semanas, ficando em epidemiovigilância os vitelos com menos de seis semanas (DGAV, 2015a; Decreto-lei nº272/2000 de 8 de Novembro).

Na brucelose bovina e leucose enzoótica bovina o controlo é feito sorologicamente. No caso da brucelose bovina o controlo é feito a todos os animais com idade igual ou superior a um ano. No controlo sorológico inicial é feito o teste Rosa de Bengala (RB) e qualquer soro positivo é submetido à prova de Fixação do Complemento (FC). Apenas a positividade a FC determina a positividade do animal (DGAV, 2015b; Decreto-lei 244/2000 de 27 Setembro). Relativamente, à leucose enzoótica bovina o controlo sorológico é efetuado à totalidade dos bovinos com idade superior a dois anos. Este controlo é efetuado apenas a efetivos respeitantes a concelhos, abrangidos segundo uma escolha aleatória (DGAV, 2015c; Decreto-lei 114/99 de 14 de Abril).

2.1.2. Plano de erradicação das doenças dos pequenos ruminantes

De acordo com o plano de erradicação das doenças dos pequenos ruminantes o rastreio da brucelose é obrigatório em todos os efetivos, podendo ser feito por amostragem representativa do rebanho ou, efetuado à totalidade do efetivo, consoante o estatuto sanitário da exploração, área epidemiológica e dimensão do rebanho. Caso a localização do rebanho seja em freguesia, concelho, OPP, Divisão de Intervenção Veterinária (DIV), ou Direção de Serviços Veterinários Regional (DSVR) que tenha 99,8% dos efetivos indemnes (B3) ou oficialmente indemnes (B4), o controlo sorológico é realizado anualmente a uma amostragem da fração representativa da população a animais com mais de seis meses de idade. A amostra representativa do rebanho é de 25% das fêmeas em idade reprodutiva para rebanhos superiores a 50 animais, e à totalidade dos machos com idade superior a seis meses. Para rebanhos inferiores a 50 animais o controlo é feito na totalidade dos animais. Em efetivos com classificação sanitária de não indemne (B2) ou que pertençam a áreas epidemiológicas em que a percentagem de rebanhos não-indemnes é superior a 0,2%, o controlo sorológico é realizado à totalidade dos animais com mais de 6 meses de idade (DGAV, 2015d; Decreto-lei 244/2000 de 27 de Setembro).

2.1.3. Plano de controlo e erradicação da doença de Aujeszky

O plano de controlo e erradicação da doença de Aujeszky baseia-se numa avaliação epidemiológica de todas as explorações suínolas, baseada em controlos serológicos por amostragem dos efetivos, e consequente classificação sanitária dos efetivos. Efetivo

desconhecido (A1), efetivo positivo (A2), efetivo em saneamento (A3), efetivo indemne (A4) e efetivo oficialmente indemne (A5). O plano prevê finalmente, uma vacinação massiva dos efetivos com vacinas deletadas (gE-) autorizadas pela DGAV, que permitem distinguir animais vacinados de infetados. Os efetivos com estatuto sanitário A4 para adquirirem o estatuto A5, os produtores terão que solicitar a DGAV por escrito, autorização para suspensão da vacinação, se nos últimos 12 meses não tiverem sido registadas manifestações clínicas, patológicas ou serológicas de doença na exploração e nas explorações situadas num raio de cinco km (DGAV, 2015e; Decreto-Lei 222/2012 de 15 outubro).

2.1.4 Ações de Rastreio e Profilaxia

Durante o estágio foram acompanhadas inúmeras ações de rastreio e profilaxia, representando estas, uma parte bastante importante da casuística deste estágio.

Como foi referido anteriormente, as ações de rastreio são realizadas no âmbito do PNSA, em que, são recolhidas amostras de sangue para rastreio da Brucelose em bovinos e pequenos ruminantes, Leucose Enzoótica em bovinos e doença de Aujeszky em suínos. No rastreio da Tuberculose Bovina é realizada a prova de IDC.

No gráfico 1, estão descritas todas as ações de rastreio animal durante o período de estágio, agrupadas por espécie.

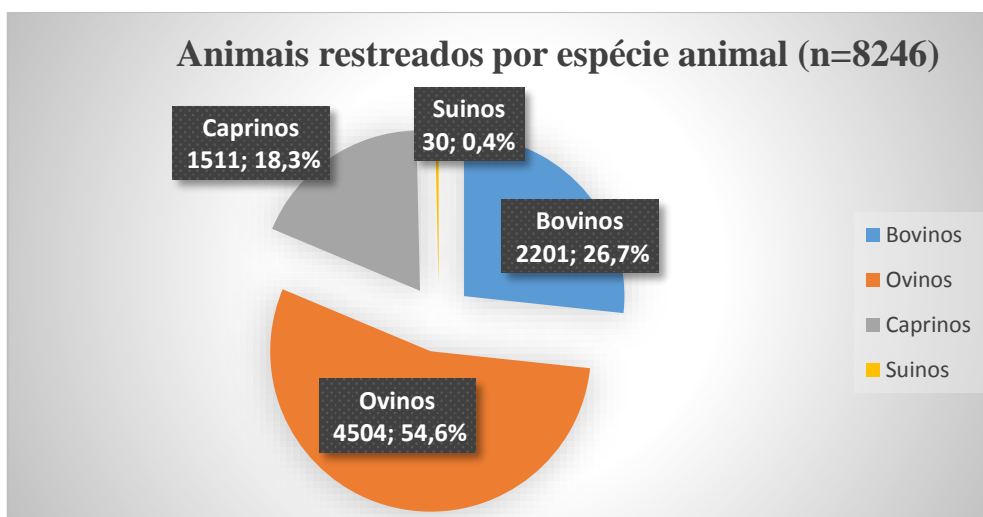


Gráfico 1- Número (n) de animais rastreados por espécie animal durante o período de estágio. Frequência relativa (%) do total de animais rastreados (n=8246)

O gráfico 1 representa, em percentagem, os animais rastreados de acordo com o PNSA. Observando este gráfico constata-se que foram intervencionados 8246 animais, sendo o grupo mais representativo o dos ovinos com 54,6%. Os bovinos, com 26,7%, foram a segunda espécie com maior número de animais intervencionados. Os caprinos, com 18,3% foram a terceira espécie mais intervencionada, sendo este indicador bastante positivo uma vez que o efetivo caprino tem vindo a diminuir ao longo dos anos.

Por fim, com uma percentagem mínima de 0,4%, a intervenção em suínos, tendo sido apenas rastreados 30 animais durante o período em que decorreu o estágio.

As ações de caráter profilático não são obrigatórias, são programadas entre o médico veterinário da exploração e o produtor. A maior parte das intervenções profiláticas realizam-se aquando do saneamento anual, tanto em bovinos como em pequenos ruminantes. Consoante o plano profilático de cada exploração, assim se efetuam as ações de profilaxia, vacinação e desparasitação. Existem explorações onde se faz uma intervenção profilática por ano aquando do saneamento anual, no entanto, existem outras onde se adota um plano de intervenção profilático duas ou mais vezes por ano, consoante as necessidades específicas de cada exploração.

Tabela 1 - Ações profiláticas realizadas a bovinos durante o período de estágio

Espécie animal	Ação profilática	Nº de animais	Nº de explorações
Bovinos	Vacinação - Clostridioses	2840	20
	Vacinação - Vírus diarreia vírica bovina (BVDV), vírus rinotraqueíte infecciosa bovina (IBRV), vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), vírus Painfluenza-3 (PI3V)	677	3
	Vacinação - Leptospirose	150	1
	Vacinação - Pasteurelose	150	1
	Vacinação - Brucelose	112	1
	Desparasitação - Endoparasitas / Ectoparasitas	2840	20

Analisando a tabela 1, constata-se que a vacina para prevenção de clostridioses em bovinos foi a mais utilizada, pois é a doença mais frequente nas explorações pecuárias. Esta vacina garante uma imunização face às principais toxinfecções causadas por

Clostridium spp., como é o caso da enterite hemorrágica causada por *Clostridium perfringens* tipo C, carbúnculo sintomático por *Clostridium chauvoei*, edema maligno por *Clostridium septicum*, hepatite necrosante infecciosa por *Clostridium novyi*, tétano por *Clostridium tetani*. De salientar a vacinação numa exploração contra a *Brucella abortus*, isto deveu-se ao facto de esta exploração estar a ser alvo de um PSI (plano individual de saneamento). A desparasitação é outro dos procedimentos de profilaxia mais requisitado. O desparasitante mais utilizado foi a ivermectina com efeito endoparasiticida e ectoparasiticida, embora nalgumas explorações tenha sido utilizada uma associação de ivermectina/clorsulon, aumentando assim o espectro de ação contra formas adultas de *Fasciola hepatica*.

As intervenções profiláticas em pequenos ruminantes (tabela 2) durante o período de estágio foram as mais requisitadas. O plano profilático baseia-se normalmente na vacinação dos efetivos, utilizando na maioria das vezes, uma vacina para prevenção enterotoxémias causadas pelos *Clostridium perfringens* tipo D, *Clostridium sordelli* e da pasteurelose pneumónica provocada pela *Mannhemia hemolytica*. A desparasitação realizada foi, na maioria das vezes, em forma de suspensão oral com um anti-helmíntico de largo espectro (mebendazol 7,5% + closantel 5%), eficaz contra formas gastrointestinais e pulmonares. Observando a (tabela 2), constata-se que a vacinação contra a peeira ou a agalaxia contagiosa ocorreu esporadicamente.

Tabela 2 - Ações profiláticas realizadas a pequenos ruminantes durante o período de estágio

Espécie animal	Ação profilática	Nº de animais	Nº de explorações
Pequenos ruminantes	Vacinação - Clostridioses	6949	43
	Vacinação - Pasteurelose	6254	41
	Vacinação - Peepera	1100	1
	Vacinação - Agalaxia contagiosa	1259	5
	Desparasitação - Endoparasitas / Ectoparasitas	6949	43

A tabela 3 representa as ações profiláticas realizadas em suínos durante o período de estágio. Analisando a tabela constata-se que as ações nesta espécie não tiveram grande relevância, sendo realizadas apenas numa exploração.

Tabela 3 - Ações profiláticas realizadas a suínos durante o período e estágio

Espécie animal	Ação profilática	Nº de animais	Nº de explorações
Suínos	Vacinação - Doença de Aujeszky	30	1
	Desparasitação - Endoparasitas / Ectoparasitas	30	1

A tabela 4 representa as intervenções realizadas em equinos no período de estágio, e tal como a espécie suína, também representou uma percentagem pouco significativa das ações de profilaxia realizadas durante o estágio.

Tabela 4 - Ações profiláticas realizadas a equinos durante o período de estágio

Espécie animal	Ação profilática	Nº de animais	Nº de explorações
Equinos	Vacinação – Influenza equina/Tétano	10	3
	Desparasitação - Endoparasitas / Ectoparasitas	10	3
	Resenho/Identificação eletrónica	8	8

2.2. Clínica Médica

Neste ponto será referida toda a casuística médica acompanhada no período do estágio. Diariamente foram realizadas várias ações no âmbito da clínica de espécies pecuárias. As consultas eram realizadas em sistema ambulatorio e muitas vezes o diagnóstico era presuntivo, uma vez que os meios de diagnóstico são limitados na clínica de campo devido à distância a que as explorações e animais se encontram da clínica e, aos custos inerentes. A espécie bovina foi aquela em que mais casos ocorreram, na área da clínica médica, possivelmente por o valor económico de cada bovino ser superior em relação às outras espécies intervencionadas.

Durante o estágio foram acompanhados 105 casos clínicos, sendo a espécie bovina a mais intervencionada, com 72% dos casos, seguindo-se a espécie ovina com uma percentagem de 24%, a espécie caprina com 3% e a suína com 1% dos casos clínicos foram as espécies menos intervencionadas (gráfico 2).

O gráfico 2, representa todos os animais, por espécie, intervencionados no âmbito da clínica médica das espécies pecuárias.

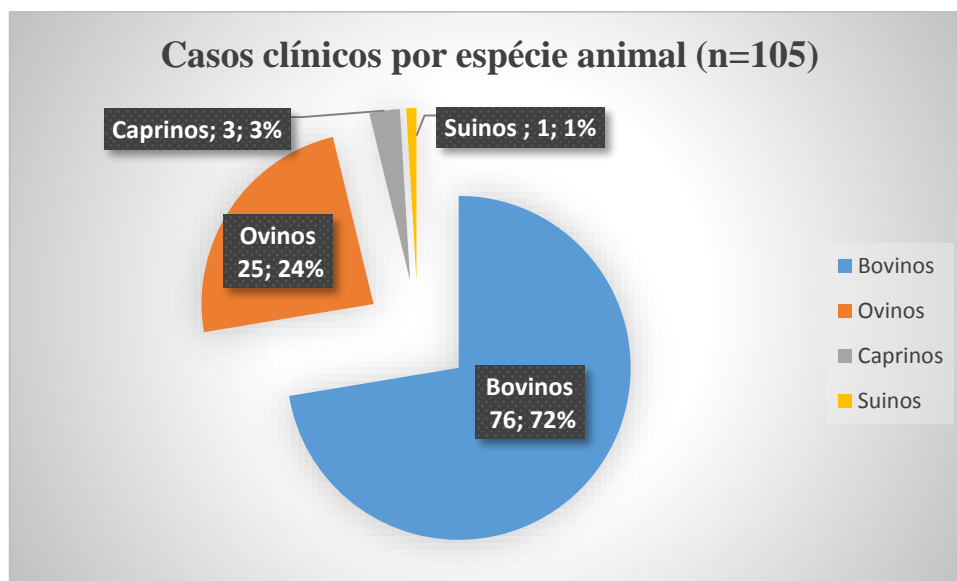


Gráfico 2 - Número (n) de casos clínicos por espécie animal no período de estágio.
Frequência relativa (%) do total de casos clínicos (n=105)

Casos clínicos por sistemas

Analisando o gráfico 3, é notório que o sistema digestivo, a pele e glândulas anexas foram os mais intervencionados no que se refere a casos de clínica médica. A coccidiose e a sarna psorótica contribuíram de certa forma para estes elevados índices. O sistema digestivo, a pele e glândulas anexas apresentaram uma percentagem de 25% e 18%, respetivamente. Por sua vez, os sistemas com menor expressão foram o sistema oftálmico e o sistema nervoso com uma percentagem de 5% e 2%, respetivamente.

De referir que, em todos os casos clínicos acompanhados durante o período de estágio não houve confirmação de diagnóstico. Os animais foram observados, foi-lhes instituído um tratamento consoante o diagnóstico clínico. Posteriormente, não se obteve informação de reversão dos sinais clínicos.

Casos clínicos por sistemas (n=105)

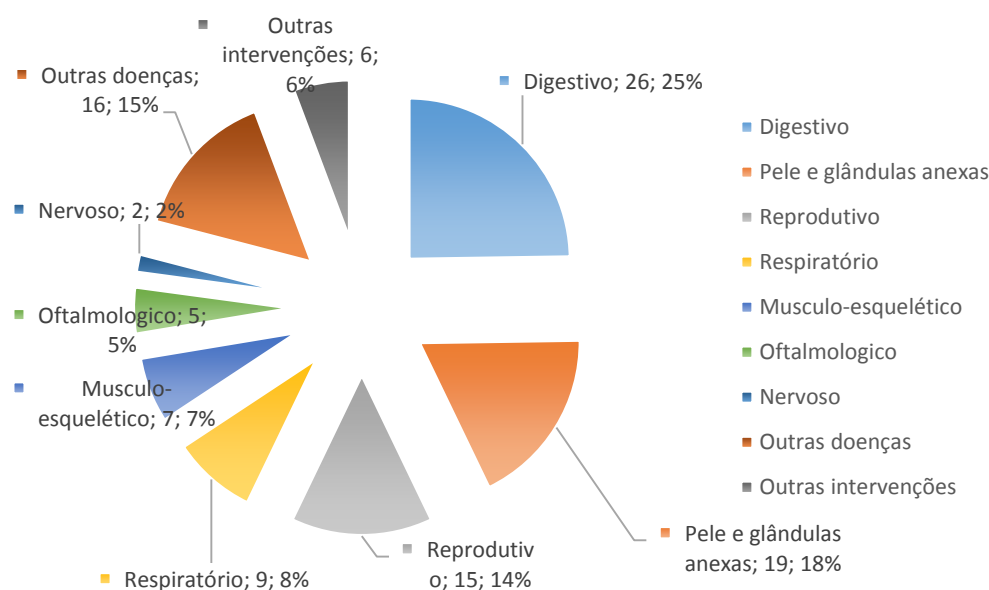


Gráfico 3 - Número (n) de casos clínicos por sistema no período de estágio. Frequência relativa (%) do total de casos clínicos (n=105)

2.2.1. Sistema Digestivo

Na tabela 5 pode observar-se a casuística relacionada com o sistema digestivo presenciada ao longo do estágio.

Tabela 5 - Número (n) de casos clínicos referentes ao sistema digestivo no período de estágio. Frequência relativa (%) do total de casos clínicos (n=26)

Afeção	Bovinos (n)	Ovinos (n)	Total (n)	Total %
Coccidiose	-	11	11	42,30
Diarreia inespecífica	10	-	10	38,46
Diarreia neonatal	2	-	2	7,69
Intoxicação por bolota	1	-	1	3,84
Intoxicação por plantas	1	-	1	3,84
Indigestão simples	-	1	1	3,84
Total	14	12	26	100

Tal como se pode observar na tabela 5, constata-se que a coccidiose em ovinos foi a afeção com maior número de casos clínicos, seguindo-se a diarreia inespecífica em bovinos com um número de casos clínicos muito próximo.

Coccidiose

A coccidiose é causada por coccídias do género *Eimeria* que infetam preferencialmente células intestinais dos ruminantes. Cada espécie hospedeira, no que concerne aos ruminantes domésticos, é parasitada por mais de uma dezena de espécies de *Eimeria*, no entanto, estas apresentam grande especificidade em relação ao hospedeiro. A patogenicidade depende da espécie parasitária e da sua relação com o hospedeiro. As infeções envolvem geralmente várias espécies, ou seja, em casos clínicos de coccidiose é comum a presença de mais de uma espécie e, a doença resulta do elevado número e diversidade de *Eimeria* e, dessa interação nascem as alterações patológicas observadas (Lima, 2004).

Antigamente pensava-se que os géneros de *Eimeria* que parasitavam caprinos eram os mesmos que parasitavam ovinos, no entanto, estes dois hospedeiros são parasitados por géneros de *Eimeria* distintos (Bowman, 2004).

As principais espécies de *Eimeria* spp. causadoras de doença em ovinos são a, *E. ahsata*, *E. bakuensis*, *E. crandallis*, *E. faurei*, *E. granulosa*, *E. intricata*, *E. mársica*, *E. ovinoidalis*, *E. pallida*, *E. parva*, *E. weybridgensis* (Lopez & Ayensa, 1996, referido por Paredes, 2010). De todas estas, as espécies *E. crandallis* e *E. ovinoidalis* são consideradas as espécies mais patogénicas em ovinos e estão associadas ao aparecimento de doença em borregos (Deniz, 2009).

Após a ingestão de oocistos esporulados a partir de ambientes contaminados, os parasitas penetram nas células epiteliais da mucosa intestinal onde se multiplicam. Após um período pré-patente de 12 a 20 dias, dependendo das espécies envolvidas e da sua patogenicidade, os ovinos começam a libertar oocistos para o exterior através das fezes, contaminando assim o ambiente.

A maioria dos casos de coccidiose ocorre como resultado de uma infeção mista, sendo extremamente raro o aparecimento de infeções causadas por uma única espécie (Deniz, 2009). Os animais de todas as idades são suscetíveis a estas infeções, no entanto, os animais mais sensíveis têm entre duas a quatro semanas de vida e o aparecimento do quadro clínico surge quando têm entre quatro a sete semanas de idade (Lopez, 1996, referido por Paredes, 2010). A apresentação e gravidade do quadro clínico da coccidiose depende de muitos fatores, como a espécie de *Eimeria*, dose de oocistos esporulados ingeridos, interação entre espécies de *Eimeria*, idade e estado imunitário dos animais, stresse, manejo, entre outros. Os sinais clínicos podem variar muito, existem animais em que estes são inaparentes, outros podem apresentar diarreias agudas sanguinolentas,

diarreias crônicas e emaciação ou pode mesmo ocorrer a morte súbita do animal (Paredes, 2010).

Os casos clínicos acompanhados durante o estágio foram todos em borregos jovens, o tratamento efetuado foi uma administração, aos animais afetados e aos restantes borregos do rebanho, de diclazuril (1 mg/kg) por via oral. Outros fármacos poderiam ser usados como por exemplo o toltrazuril.

A melhoria das condições higiênicas e sanitárias reduz o nível de infecção e a incidência dos surtos clínicos. A lavagem frequente das instalações e a utilização de bebedouros e comedouros que impeçam a contaminação fecal ajudam a prevenir a doença. Os animais afetados devem ser imediatamente isolados de forma que as suas fezes não contaminem os alimentos e a água destinados aos animais não infetados. Para prevenção da coccidiose nas pastagens os animais não devem ser colocados em pastagens contaminadas especialmente na primeira estação de pastoreio. Os animais jovens devem ser mantidos longe de pastagens altamente contaminadas durante o período em que são mais suscetíveis (Deniz, 2009).

2.2.2. Pele e Glândulas Anexas

A pele e glândulas anexas totalizou um total de 19 ocorrências, distribuídas pela clínica de bovinos e ovinos. Tal como mostra a tabela 6, a sarna psoróptica foi aquela que maior casuística apresentou sete casos clínicos seguida da dermatofitose com quatro casos clínicos.

Tabela 6 - Número (n) de casos clínicos referentes à pele e glândulas anexas durante o período de estágio. Frequência relativa (%) do total de casos clínicos (n= 19)

Afeção	Bovinos (n)	Ovinos (n)	Total (n)	Total %
Sarna psoróptica	-	7	7	36,84
Dermatofitose	4	-	4	21,05
Mal formação das unhas	3	-	3	15,79
Mastite	2	-	2	10,53
Míiase cutânea	1	-	1	5,26
Lesões de fotossensibilidade	1	-	1	5,26
Papilomatose	1	-	1	5,26
Total	12	7	19	100

Sarna Psoróptica

A sarna psoróptica, conhecida vulgarmente como “Ronha” ou “sarna húmida”, é a mais frequente sarna dos ovinos. Afeta animais de qualquer idade, raça ou sexo (Lopes, 2012) e pode causar grandes perdas económicas principalmente em rebanhos explorados para a produção de lã de alta qualidade. A sarna psoróptica é uma doença contagiosa altamente prurítica causada pelo ácaro *Psoroptes ovis* (CFSPH, 2009b). São denominados ácaros das crostas, medem 0,4-0,8 mm e morfologicamente diferenciam-se dos outros porque as patas projetam-se para além das margens do corpo (Meana e Rojo-Vázquez, 2001). Os ácaros *Psoroptes ovis* vivem na base do velo e alimentam-se de exsudados cutâneos. Tem um ciclo de vida de aproximadamente 11 a 19 dias, em ótimas condições, podendo os ácaros adultos viver 40 dias. Normalmente transmite-se por contato direto entre animais, mas outras formas de infeção bastante importante são as fomites (cercas, árvores, comedouros, camas, etc.).

Nem todos os animais infetados manifestam sinais clínicos, no entanto os animais assintomáticos podem propagar a infestação a outros animais, podendo os ácaros em alguns casos sobreviver até dois anos em animais aparentemente normais. No início, são observados tufos de lã destacados à superfície do velo e presos às vedações, árvores ou outros objetos que os animais usam para se coçarem. Nos primeiros estadios da doença observam-se pequenas máculas eritematosas e um exsudado seroso, à medida que a doença progride observam-se grandes lesões cobertas de crostas amareladas principalmente nas zonas do corpo com mais lã. A lã solta-se e cai observando-se uma extensa alopecia (figura 1).



Figura 1 – Alopecia provocada pela sarna psoróptica
(Adaptada de Lagares, 2008)

Os animais não tratados perdem peso, podem desenvolver anemia e existir uma quebra na produção de leite. Nas zonas das lesões podem desenvolver-se infeções secundárias, podendo os animais em casos graves morrer por desidratação ou pneumonia bacteriana secundária (CFSPH, 2009b).

O tratamento efetuado aos animais afetados foi a administrações de ivermectina (200 µg/kg) por via SC. Na generalidade dos casos um tratamento foi o suficiente, no entanto, em algumas situações mais graves o tratamento foi repetido sete dias depois da primeira administração. No tratamento da sarna psoróptica em ovinos podem também ser usados outros fármacos como a moxidectina, doramectina e podem ser efetuados banhos com acaricidas.

2.2.3. Sistema Reprodutivo

A tabela 7 apresenta toda a casuística respeitante ao sistema reprodutivo presenciada durante o período de estágio.

Tabela 7 - Número (n) de casos clínicos referentes ao sistema reprodutivo durante o período de estágio. Frequência relativa (%) do total de casos clínicos (n=15)

Afeção	Bovinos (n)	Ovinos (n)	Total (n)	Total %
Prolapso uterino	4	-	4	26,67
Distócia	2	2	4	26,67
Retenção de membranas fetais	3	-	3	20
Laceração do prepúcio	2	-	2	13,33
Indução de parto	1	1	2	13,33
Total	12	3	15	100

Observando a tabela 7, constata-se que o prolapso uterino e as distócias foram as afeções com maior número de casos clínicos, sendo mesmo superior a mais de metade da casuística assistida dentro do sistema reprodutivo.

Prolapso uterino

O prolapso do útero pode ocorrer em qualquer espécie, no entanto, é mais frequente em vacas e ovelhas. A sua etiologia não está bem definida e ocorre de forma esporádica (Allen *et al.*, 2007). Por outro lado, o decúbito com os quartos traseiros mais baixos, a realização de tração excessiva para resolver partos distócicos ou quando existe retenção das membranas fetais, hipocalcémia e tenesmo após um parto difícil podem conduzir ao prolapso uterino (Allen *et al.*, 2007).

O prolapso uterino pode ocorrer imediatamente a seguir ao parto ou até cerca de 18 horas pós-parto, quando a cérvix está aberta e o útero não apresenta grande tonicidade (Allen *et al.*, 2007; Edmondson *et al.*, 2012).

O prolapso uterino caracteriza-se pela eversão do útero (figura 2), invertendo-se e exteriorizando a mucosa (Alves *et al.*, 2013), sendo esta afeção considerada uma das urgências médicas mais importantes em espécies pecuárias, pois uma vaca que não seja tratada a tempo pode entrar em choque ou morrer devido à elevada perda de sangue pela rutura dos vasos uterinos (Arthur, 1991).



Figura 2 – Útero prolapsado

(Adaptada de <http://centroveterinarioelacial.blogspot.pt/p/el-caso-clinico-del-mes.html>)

Na resolução dos casos acompanhados durante o estágio foi feita uma anestesia epidural baixa com lidocaína 2% (0,0146mg/kg) antes da realização de qualquer procedimento. De seguida o útero foi lavado com água contendo um antisséptico não irritante para a mucosa uterina. O útero foi recolocado na sua posição anatómica com o auxílio de uma plataforma de suporte e foi verificado que existiu inversão total dos cornos uterinos. Por fim foram colocados três alfinetes obstétricos na vulva de forma a evitar recidivas e foi administrada oxitetraciclina (20 mg/kg) por via intramuscular (IM).

2.2.4. Sistema Respiratório

A tabela 8 apresenta toda a casuística respeitante ao sistema respiratório presenciada durante o período de estágio.

Tabela 8 - Número (n) de casos clínicos referentes ao sistema respiratório durante o período de estágio. Frequência relativa (%) do total de casos clínicos (n=8)

Afeção	Bovinos (n)	Total (n)	Total %
Pneumonia	7	7	87,5
Edema pulmonar	1	1	12,5
Total	8	8	100

Pneumonia

As doenças respiratórias nos ruminantes afetam animais de todas as idades e todas as raças, embora determinados grupos etários e sistemas de produção influenciam a etiologia e prevalência da doença. Normalmente os casos de doença no trato respiratório inferior são de etiologia mista, com componente viral e bacteriana. Embora a doença inicialmente surja como uma condição causada por um único agente, frequentemente, e quando o médico veterinário é chamado, já existem infecções secundárias associadas, que complicam o diagnóstico (Plummer *et al.*, 2012).

Nos bovinos as pneumonias são o culminar de um estado que se designa por complexo respiratório bovino (CRB) (Allen *et al.*, 2007). O CRB tem uma etiologia multifatorial, sendo o resultado de uma rutura do equilíbrio entre as defesas naturais do animal e os fatores externos que favorecem a doença. Por fatores externos entende-se o desmame, o transporte, o agrupamento, e muito importante, as condições de manejo e fatores ambientais, tais como, a ventilação adequada, humidade, temperatura, condições de higiene (Allen *et al.*, 2007; Margarido *et al.*, 2008).

Os numerosos agentes infecciosos que estão associados com o CBR são ubiqüitários em populações de ruminantes e as bactérias mais frequentemente associadas com esta broncopneumonia fazem parte da flora nasofaríngea destes animais (Smith, 2009). Os agentes virais, tais como o herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1), o vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) e o vírus parainfluenza-3 (PI-3), podem produzir uma

sintomatologia clínica compatível com CBR, mas o seu envolvimento é geralmente considerado como antecedente ou concomitante com infecções bacterianas (Taylor *et al.*, 2010). As formas mais fatais de CBR são as pneumonias bacterianas, que ocorrem seis a dez dias depois de um período ou agente de stress (Panciera e Confer, 2010). Os agentes bacterianos, geralmente, associados ao CBR são a *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* e *Mycoplasma bovis* (Panciera & Confer 2010). Estes patogénios apresentam fatores de virulência únicos e comuns mas as manifestações pneumónicas resultantes podem ser similares (Griffin *et al.*, 2010).

A maioria dos animais apresenta febre, entre 40 a 41 °C. Achados transversais a todos os animais afetados com CRB são a anorexia com depressão do estado geral e orelhas caídas. Apresentam dispneia inspiratória e expiratória e à auscultação observa-se aumento dos sons expiratórios, estertores e ruídos de crepitação (Margarido *et al.*, 2008).

No tratamento dos animais afetados realizara-se duas administrações de florfenicol (20 mg/kg) por via IM com 48 horas de intervalo ou uma administração (40mg/kg) por via SC e uma administração de flunixin meglumina (2,2 mg/kg) por via IM. Outros antimicrobianos podem ser usados como a tulatromicina, tildipirosina, tilmicosina entre outros.

2.2.5. Sistema Músculo-esquelético

A tabela 9 apresenta toda a casuística respeitante ao sistema músculo-esquelético presenciada durante o período de estágio.

Tabela 9 - Número (n) de casos clínicos referentes ao sistema músculo-esquelético durante o período de estágio. Frequência relativa (%) do total de casos clínicos (n=7)

Afeção	Bovinos (n)	Ovinos (n)	Total (n)	Total %
Trauma muscular	4	-	4	57,16
Lesão pós-parto	-	1	1	14,28
Poliartrite	1	-	1	14,28
Laceração musculo-cutânea	1	-	1	14,28
Total	6	1	7	100

Observando a tabela 9, constata-se que os traumas musculares constituíram a situação clínica com mais expressão no sistema músculo-esquelético. Estes casos deveram-se em grande parte a lutas entre animais, ficando estes afetados a nível muscular. O tratamento efetuado nestes casos foi a administração de dexametasona (0,08 mg/kg) ou flunixinina meglumina (2,2 mg/kg).

2.2.6. Sistema Oftalmológico

A tabela 10 apresenta toda a casuística respeitante ao sistema oftalmológico presenciada durante o período de estágio.

Tabela 10 - Número (n) de casos clínicos referentes ao sistema oftalmológico durante o período de estágio. Frequência relativa (%) do total de casos clínicos (n=5)

Afeção	Bovinos (n)	Total (n)	Total %
Queratoconjuntivite infecciosa	4	4	80
Uveíte	1	1	20
Total	5	5	100

Queratoconjuntivite infecciosa bovina

A queratoconjuntivite infecciosa bovina (QIB) é uma inflamação da córnea (figura 3), que inclui a órbita e a superfície interna das pálpebras. Normalmente a inflamação estende-se a estruturas mais internas do olho (Radostits *et al.*, 2007). É uma doença infecciosa altamente contagiosa, muitas vezes denominada por “pink eye”.



Figura 3 – Olho de um bovino com inflamação da córnea, característico da QIB

(Adaptada de Whittier *et al.*, 2009)

O principal agente etiológico da QIB é a *Moraxella bovis*, porém outros agentes infecciosos (adenovírus, *Mycoplasma* e *Listeria*) foram isolados de olhos que exibiam sinais clínicos similares aos observados na QIB induzida por *Moraxella* (Ogilvie, 1998). As condições ambientais secas com pó no ar, a presença de agentes irritantes como pólenes, ervas altas ou moscas, muitas vezes associados ao stress do transporte levam a uma maior predisposição para a doença. Os animais jovens são os mais afetados. Os sinais clínicos iniciais são fotofobia e epífora, mais tarde a exsudação ocular pode tornar-se mucopurulenta. Podem surgir úlceras no centro da córnea, precedidas por uma opacificação primária. Passadas 48 a 72 horas, toda a córnea pode estar opaca, devido ao edema, e resultar em cegueira no olho afetado (Whittier *et al.*, 2009).

O diagnóstico baseia-se na ocorrência dos sintomas oculares em consonância com a ausência de doença sistêmica concomitante. O tratamento dos animais acometidos pela doença é importante, não só pelo sucesso na recuperação do próprio animal mas também para travar a excreção da bactéria e portanto a contaminação do restante efetivo saudável (Whittier *et al.*, 2009). O tratamento efetuado aos animais afetados com esta patologia revelou-se eficaz com a administração de oxitetraciclina (20 mg/Kg) por via IM, sendo repetido o tratamento 48 horas depois, em alguns casos mais graves. Outra opção é injetar uma mistura de penicilina e dexametasona na mucosa sub-conjuntiva. Se a injeção for efetuada de forma correta, a conjuntiva irá inchar e forma-se uma pequena bolha que contém o medicamento (Whittier *et al.*, 2009). As medidas preventivas incluem o controlo das moscas com repelentes, minimização das poeiras do feno e ração, disponibilização de sombras e, indiretamente, a imunização dos animais contra infeções virais tais como a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e a diarreia viral bovina (BVD) (Lalman, 1997).

2.2.7. Sistema Nervoso

A tabela 11 representa a única afeção referente ao sistema nervoso. Durante o estágio foram abordados apenas dois casos clínicos em bovinos, aos quais lhes foi administrado dexametasona (0,08 mg/kg) por via IM. Os dois animais responderam bem ao tratamento, recuperando por completo dos sinais clínicos demonstrados.

Tabela 11 - Numero (n) de casos clínicos referentes ao sistema nervoso durante o período de estágio. Frequência relativa (%) do total de casos clínicos (n=2)

Afeção	Bovinos (n)	Total (n)	Total %
Ataxia	2	2	100
Total	2	2	100

2.2.8. Outras Doenças

A tabela 12 representa todas as outras doenças acompanhadas no período de estágio. De referir que, em todas as afeções deste grupo não houve confirmação de diagnóstico. Os animais foram observados, o tratamento foi instituído consoante o diagnóstico clínico, posteriormente, não se obteve informação de reversão dos sinais clínicos.

Tabela 12 - Número (n) de casos clínicos referentes a outras doenças durante o período de estágio. Frequência relativa (%) do total de casos clínicos (n=16)

Afeção	Bovinos (n)	Ovinos (n)	Caprinos (n)	Total (n)	Total %
Babesiose	3	-	-	3	18,75
Peeira	-	2	-	2	12,5
Fasciolose	3	-	-	3	18,75
Clostridioses	2	-	-	2	12,5
Agaláxia Contagiosa	-	-	3	3	18,75
Leptospirose	2	-	-	2	12,5
Theileriose	1	-	-	1	6,25
Total	11	2	3	16	100

Babesiose

A babesiose é a doença causada pelos protozoários intra-eritrocitários pertencentes ao Reino PROTISTA, Sub reino PROTOZOA, filo Apicomplexa, subclasse Piroplasmia, ordem Piroplasmida e género *Babesia*, segundo Levine *et al.* (1980). Estes afetam animais domésticos provocando anemia e hemoglobínúria e são transmitidos por carraças da família Ixodidae.

Existem diversas espécies de *Babesia*, mas as que infetam bovinos e de maior importância na Europa, e consequentemente em Portugal, são *Babesia divergens*, *B. bigemina* e *B. bovis*. Estas espécies estão agrupadas em pequenas babesias, de corpos piriformes e com 1,0-2,5µm de comprimento, e em grandes babesias, com 2,5-5,0µm de comprimento. Trofozoitos de *B. bovis* são pequenos (1-1,5 µm x 0,5-1,0 µm), e normalmente encontram-se aos pares e centralmente nos eritrócitos. *B. divergens* assemelha-se com *B. bovis*, mas os pares normalmente estão numa posição mais periférica. *B. bigemina* é uma babesia grande (3-3,5 µm x 1-1,5 µm) e pode preencher o glóbulo vermelho. A variabilidade morfológica que existe entre espécies pode tornar a identificação difícil (CFSPH, 2008b).

As babesias são transmitidas por carrças e tem um ciclo com duas fases: uma fase no vetor, onde ocorre reprodução sexuada (gametogonia) e assexuada (esporogonia), e outra no hospedeiro definitivo, em que o protozoário apenas se reproduz assexuadamente (esquizogonia) (Urquhart *et al.*, 1998).

A ocorrência de babesiose depende de vários fatores. A virulência da espécie de babesia irá influenciar a severidade da doença e as taxas de morbidade e mortalidade. *B. bovis* é a espécie mais patogénica encontrada em bovinos (Urquhart *et al.*, 1998).

Relativamente ao hospedeiro, a idade é algo a considerar e conhece-se uma certa resistência de infeção em animais jovens, comparando com animais adultos, não se conhecendo a razão para tal. O seu estado imune é um dos fatores mais importantes. Em regiões endémicas, os bezerros adquirem imunidade passiva através da ingestão de colostro de progenitoras que já tiveram contacto anterior com o parasita, e sofre apenas infeções transitórias com discreta sintomatologia. Essas infeções são suficientes para induzir uma imunidade ativa, protegendo os animais da manifestação clínica, mas eles serão portadores, por muitos meses e/ou anos, e reservatórios para a infeção de carrças e outros animais (Urquhart *et al.*, 1998).

Em zonas endémicas, onde há muitos vetores infetados, a imunidade do hospedeiro mantém-se a um nível alto e “estável”, atingindo um “equilíbrio enzoótico”. Pelo contrário, em zonas com baixa carga de carrças, o estado imunitário da população animal é também baixo. Se em certas circunstâncias o número de vetores aumentar devido a alterações climáticas ou à diminuição do tratamento dos animais e terrenos com acaricidas, ou se animais não indemnes são introduzidos em zonas endémicas, a incidência de babesiose pode aumentar.

O aparecimento ocasional da doença pode também acontecer, particularmente em animais adultos, se existiu alguma situação de grande stress, como o parto, fome, transporte ou a presença de outra patologia concomitante (Magalhães, 2012).

O período de incubação depende das espécies transmitidas: *B. bigemina* demora quatro a cinco dias e *B. bovis* 10 a 12 dias. Os animais começam por ficar prostrados, deprimidos, afastam-se do grupo onde estão e deixam de comer. A febre é normalmente o primeiro sinal clínico a surgir. Os outros sinais característicos da babesiose são mucosas pálidas, ritmo cardíaco e respiratório aumentado. A contínua e rápida anemia verificada tem como consequência hemoglobulinemia e bilirrubinemia (manifestando-se por icterícia e as mucosas tornam-se amarelas) e hemoglobinúria. Diarreia, atonia ruminal e dispneia grave podem desenvolver-se em animais mais severamente afetados. Podem surgir sinais neurológicos, devido ao sequestro de eritrócitos afetados pelos capilares cerebrais. A maioria desses animais morre.

O tratamento instaurado durante o período de estágio aos animais afetados foi a administração de dipropionato de imidocarb (3 mg/kg) por via SC, flunixinina meglumina (2,2 mg/kg) por via IM e oxitetraciclina (20mg/kg) por via IM.

2.2.9. Outras Intervenções

A tabela 13 representa todas as outras intervenções de relevo efetuadas no período de estágio. Deste grupo de intervenções a necropsia, com seis intervenções foi o procedimento mais realizado. Este procedimento mostrou-se extremamente importante no diagnóstico de algumas doenças, por exemplo, nos casos de leptospirose e clostridioses.

Tabela 13 - Número (n) de outras intervenções efetuadas durante o período de estágio. Frequência relativa (%) do total e casos (n= 15)

Afeção	Bovinos (n)	Suínos (n)	Total (n)	Total %
Necropsia	5	1	6	85,7
Eutanásia	1		1	14,3
Total	6	1	7	100

2.3. Intervenções Cirúrgicas

Observando a tabela 14, constata-se que o procedimento cirúrgico com maior relevância foi a orquiectomia, tendo a cesariana pouco expressividade. A espécie suína foi a espécie mais intervencionada cirurgicamente, seguida pela espécie equina.

Tabela 14 - Número (n) de intervenções cirúrgicas efetuadas durante o período de estágio. Frequência relativa (%) do total e casos (n= 25)

Cirurgia	Suínos (n)	Bovinos (n)	Equinos (n)	Total (n)	Total %
Orquiectomia	22	-	2	24	96
Cesariana	-	1	-	1	4
Total	22	1	2	25	100

Em relação à orquiectomia em suínos, esta tem como principal objetivo melhorar a qualidade da carne diminuindo os odores característicos da carne de suínos machos. Em relação à orquiectomia em equinos, tratando-se de um animal de lazer, desporto ou simplesmente animal de companhia o objetivo da orquiectomia neste caso é diminuir o comportamento sexual e comportamento agressivo, tornando o animal mais dócil. A realização desta cirurgia normalmente melhora a relação animal/homem.

3. Revisão bibliográfica: *Fasciola hepatica*

3.1. Introdução

O parasitismo é uma relação muito 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 (Fernández e Cordero del Campillo, 2001).

A classe Trematoda é uma grande classe com 15000 – 20000 espécies que utilizam um grande grupo de vertebrados como hospedeiros. Tem duas sub-classes: *Aspidogastrea* e *Digenea*. A primeira é uma sub-classe pequena, parasitando moluscos, peixes e tartarugas, tendo por isso menos interesse veterinário, sendo a *Digenea* a sub-classe com maior interesse. O ciclo de vida do parasita *Fasciola hepatica* é típico desta sub-classe (Bowman, 2004). A fasciolose, designada vulgarmente por papo ou papeira, amarela ou fígado podre é uma parasitose provocada pela *Fasciola hepatica*, conhecida em termos vernáculos como “Grande dúvia do fígado” (Gomes, 2012). Esta doença afeta principalmente ruminantes, ou seja, bovinos, ovinos e caprinos (Silva *et al.*, 2004), mas também atinge outros mamíferos, incluindo o homem. Este parasita de forma foliácea é achatados dorsoventralmente, possuem trato digestivo cego, ventosas para fixação e são hermafrodita, encontrando-se os adultos nos ductos biliares do fígado dos hospedeiros (Urquhart *et al.*, 1998). Tem um ciclo de vida heteróxico (Conceição *et al.*, 2004), necessitando de um hospedeiro intermediário (HI), um molusco da espécie *Galba truncatula*, onde o seu aparecimento depende da presença de humidade elevada, chuvas frequentes e temperaturas amenas (Arias *et al.*, 2011). A fasciolose, que é provavelmente a infeção helmíntica mais comum em ruminantes, com prevalências de 30-90%, principalmente em áreas tropicais, tem sido reconhecida como um verdadeiro problema veterinário. A infeção induz perdas de produtividade (por exemplo carne, leite, lã), com consequências económicas importantes especialmente em bovinos e ovinos, porém não foi avaliada em Portugal (Conceição *et al.*, 2004; Hurtrez-Boussès *et al.*, 2001). Na Austrália, as perdas de produção pecuária atribuídas à *Fasciola hepatica* foram estimadas em 34 a 54 milhões de euros no ano de 2009 e custos de tratamento de 6,7 milhões de euros (Brockwell *et al.*, 2014).

A fasciolose é uma importante zoonose, cerca de 17 milhões de seres humanos são considerados infetados e 180 milhões estão em risco de infecção. Em algumas regiões, a prevalência da infecção por *Fasciola* é extremamente elevada, particularmente na América do Sul, onde a fasciolose é considerada um grave problema de saúde (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2001).

3.2. História

A presença de *Fasciola hepatica* na vida do Homem remonta aos seus antepassados mais longínquos. Ovos de *Fasciola hepatica* foram encontrados em múmias, mostrando que a infecção humana já ocorria em tempos remotos, pelo menos, tão cedo quanto os tempos faraônicos. Na verdade, *Fasciola hepatica* foi o primeiro trematode a ser relatado (Stanford University, 2015) e a primeira descrição bibliográfica da fasciolose é feita em 1200 no livro intitulado “Black Book of Chirk” (Andrews, 1999). O francês Jean de Brie, fez as primeiras referências à *Fasciola hepatica* (Stanford University, 2015) mencionando em 1379 a doença “liver rot” em ovinos, mas não descreve o parasita nem o associa à doença. Em 1698 Bidloo observou vermes dentro dos ductos biliares de ovelhas, veados e vitelos e ovos dentro dos parasitas (Andrews, 1999). Linneu em 1758 atribuiu-lhe um nome em latim (Stanford University, 2015) e chama-lhe *Fasciola hepatica*, indicando a sua forma de folha e os órgãos que mais afeta (Arroyo *et al.*, 1981). Em 1807 Nitzsch verificou as formas enquistadas das cercárias (Andrews, 1999) e em 1837 De Filippi, para homenagear Redi, denominou um estágio que tinha visto a emergir do caracol como rédias. A próxima contribuição significativa foi feita por Mehlis em 1831 que observou a saída do miracídio através do opérculo dos ovos dos trematodes, o que foi verificado seis anos mais tarde por Creplin na *Fasciola hepatica* (Andrews, 1999). Von Siebold, em 1835, relacionou vários estádios e observou o enquistamento em caracóis, mais tarde em 1842 Steenstrup tenta explicar a relação entre os estádios larvares com o parasita adulto. Em 1875 Weinland relaciona a *Fasciola hepatica* com os estádios larvares que encontra em *Lymnaea truncatula* (Cordero del Campillo, 2001) e ainda coloca a hipótese das ovelhas se infetarem por ingestão de cercárias enquistadas na erva (Andrews, 1999). Vinte anos mais tarde, Thomas e Leuckart mostraram o ciclo de vida completo, mas não conseguiram demonstrar a infecção por ingestão das metacercárias, o que foi alcançado por Lutz em 1892/1893. As migrações intraorgânicas foram descritas em 1914

por Sinitzin (Bowman, 2004) e em 1952 Neidstein publica a sua obra “Chemical Physiology of Endoparasitic Animals”, na qual relata os seus estudos sobre a fisiologia e a bioquímica da *Fasciola hepatica* (Cordero del Campillo, 2001).

3.3. Taxonomia

Relativamente à taxonomia, de acordo com Keiser e Utzinger (2009), a *Fasciola hepatica* pertence:

Reino: Animalia

Sub-reino: Metazoa

Filo: Platyhelminthes

Classe: Trematoda

Sub-classe: Digenea

Superordem: Anepitheliocystida

Ordem: Echinostomatida

Família: Fasciolidae

Género: *Fasciola*

Espécie: *Fasciola hepatica*

3.4. Morfologia

Fasciola hepatica (figura 4) é um trematode de grandes dimensões em forma de folha (Urquhart *et al.*, 1998), o seu corpo é largo, achatado dorsoventralmente e com simetria bilateral (Chandra, 2015). O parasita adulto mede cerca de 18 a 51 milímetros (mm) de comprimento e 4 a 13 mm de largura, sendo a sua extremidade anterior, em forma de cone, mais larga que a posterior (Stanford University, 2015; Vázquez e Pérez, 2001). Possui duas ventosas, uma ventosa oral na extremidade anterior em torno da boca e uma grande ventosa ventral ou acetábulo para fixação ao hospedeiro através da produção de vácuo (Chandra, 2015). Cada parasita possui ovários e testículos, que são altamente

ramificados e permitem a produção de ovos de forma independente (Stanford University, 2015). A abertura genital está situada na parte ventral da extremidade anterior, existindo na extremidade posterior um poro excretor para excreção de resíduos azotados. Na superfície do corpo existem numerosas espiculas que ajudam na movimentação dentro dos ductos biliares (Chandra, 2015). As formas imaturas tem 1 a 2 mm de comprimento e tem uma forma lanceolada (Urquhart *et al.*, 1998).

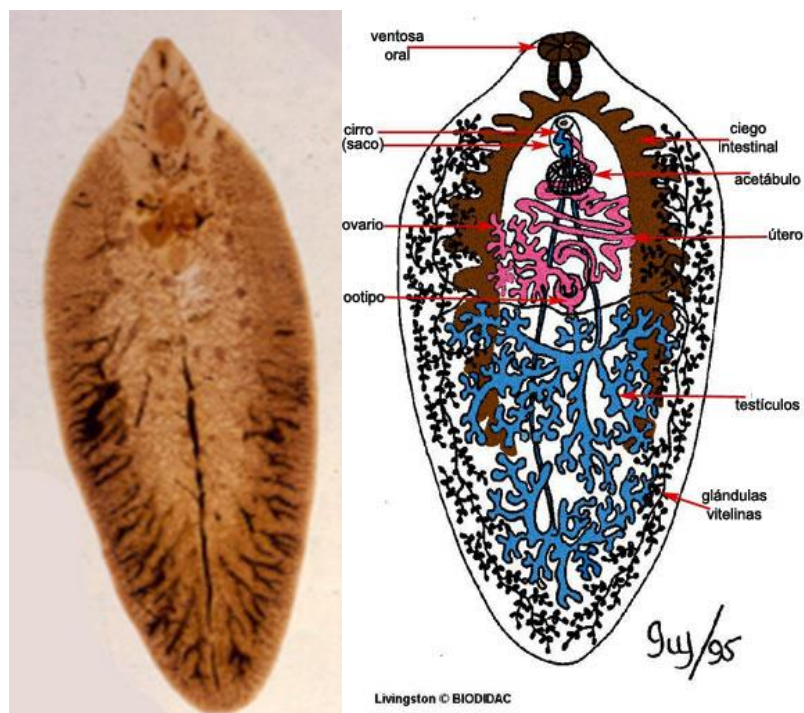


Figura 4 – *Fasciola hepatica*, parasita adulto

(Adaptada de

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/fasciolosis.html>)

3.4.1. Tegumento

O tegumento é uma das estruturas mais importantes na biologia do parasita, sendo o primeiro local de interação entre o parasita e o hospedeiro (Toet *et al.*, 2014). É uma camada acelular basófila mais ou menos homogênea e a sua espessura varia entre 7 e 16 μm . Trata-se de uma membrana de organização sincicial cuja superfície externa, o glicocálice, está coberto de espinhos dirigidos para trás. A camada interna do tegumento é formada por células nucleadas que se projetam para o interior do parênquima e entre as

duas camadas existem pontes citoplasmáticas e uma membrana basal (González, 2001). O tegumento tem uma série de importantes funções, a síntese e secreção de várias substâncias, absorção de nutrientes, regulação osmótica, proteção contra a resposta imune do hospedeiro, proteção contra enzimas digestivas e bile do hospedeiro e percepção sensorial. Por conseguinte, a integridade da superfície da membrana plasmática e o tegumento sincicial é essencial para a viabilidade do parasita (McKinstry *et al.*, 2003).

3.4.2. Sistema digestivo

O sistema digestivo é constituído pela boca, faringe, esófago e intestinos. A boca comunica com uma faringe arredondada e fortemente musculada. Esta comunica com o esófago que se bifurca na sua parte posterior em dois ramos intestinais, que se estendem ao longo das bordas laterais até ao extremo posterior do corpo, terminando em fundo de saco. A *Fasciola hepatica* ingere sangue e detritos celulares (González, 2001).

3.4.3. Sistema Excretor

O sistema excretor tem simetria bilateral e é do tipo protonefrítico (González, 2001). Consiste numa fina malha de pequenos canais que se ramificam por todo o corpo e terminam em fundo de saco nas células flama. Todos os canais se reúnem para formar um único canal excretor que termina no poro excretor na extremidade posterior do parasita. O sistema excretor elimina os desperdícios nitrogenados do corpo (Lapage, 1979).

3.4.4. Sistema reprodutor

A *Fasciola hepatica* é um parasita hermafrodita. 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 comum, que se alarga quando entra na bolsa do cirro para formar a vesícula seminal (González, 2001), na qual se armazenam os espermatozoides (Lapage, 1979). No interior desta bolsa estão ainda as glândulas prostáticas e o cirro (González, 2001), este transfere os espermatozoides ao órgão reprodutor feminino e comporta-se como um pénis (Lapage, 1979). 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 que termina numa pequena câmara denominada oótipo. O oótipo está rodeado por glândulas unicelulares - glândulas de Mehlis, e recebe através do ducto vitelino, substâncias segregadas pelas glândulas vitelinas, 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 sai do oótipo e é um tubo longo com circunvoluções, que se localiza anteriormente aos testículos e desemboca no átrio genital, assim como o cirro. O átrio genital comunica com o exterior através do poro genital (González, 2001).

3.4.5. Sistema nervoso

O sistema nervoso é constituído por gânglios cerebrais emparelhados, situados em ambos lados da faringe (Brownlee *et al.*, 1994) e unidos por uma interseção supraesofágica, três pares de cordões nervosos longitudinais dorsais, laterais e ventrais e uma série de comissuras nervosas onde se unem os cordões nervosos anteriores e posteriores (González, 2001). Os parasitas adultos não possuem olhos nem órgãos sensoriais especializados, no entanto podem observar-se manchas oculares nos miracídios, esporocistos e cercárias (Lapage, 1979).

3.5. Ciclo de vida

O ciclo de vida da *Fasciola hepatica* (figura 5) é um ciclo indireto, complexo (González, 2001), que pode ser dividido em cinco fases: (i) passagem dos ovos do hospedeiro para o ambiente exterior e seu desenvolvimento; (ii) eclosão do miracídio (Andrews, 1999), procura e penetração no HI adequado, um caracol do género *Galba*, *Fossaria* e *Pseudosuccinea* (CDC, 2015); (iii) desenvolvimento e multiplicação do parasita no interior do caracol; (iv) emergência das cercárias a partir do caracol e posterior enquistamento; (v) ingestão das metacercárias infetantes pelo hospedeiro definitivo (HD) e desenvolvimento do parasita até à fase adulta (Andrews, 1999).

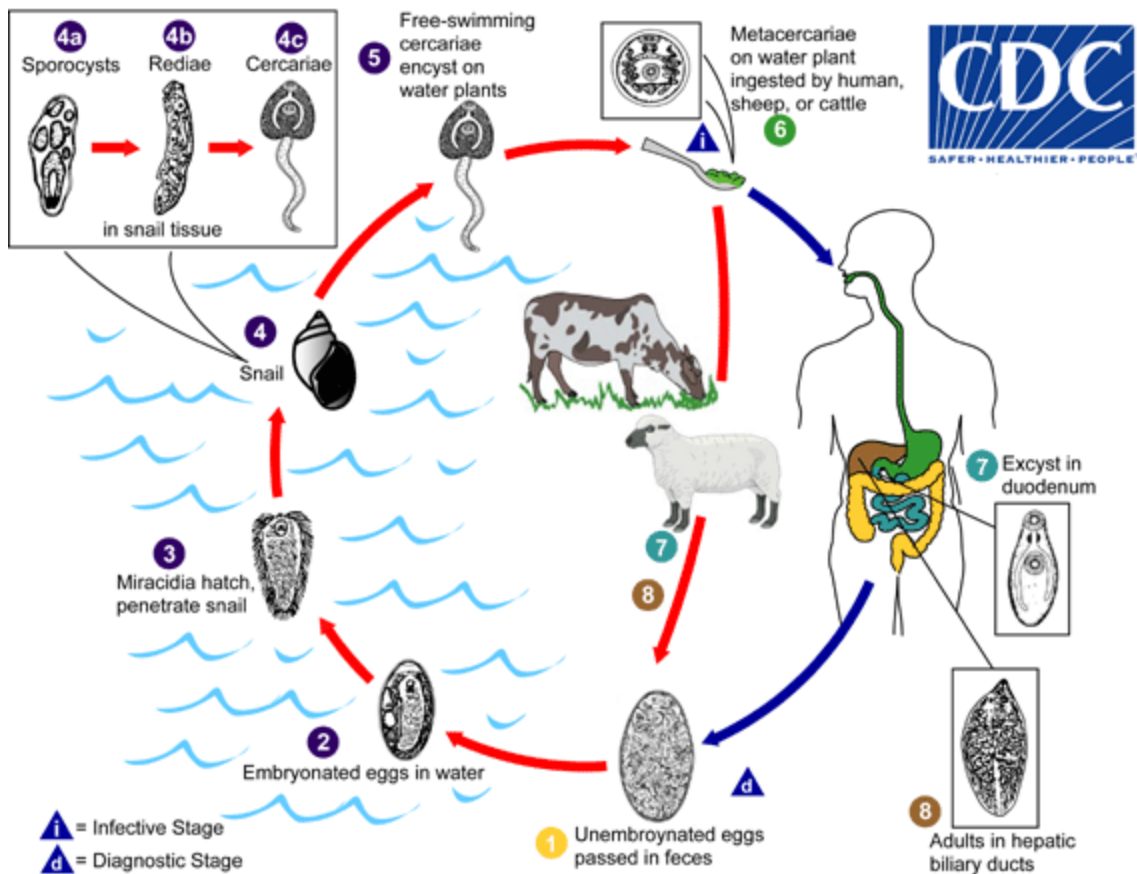


Figura 5 – Ciclo de vida *Fasciola hepatica*

(Adaptado de <http://www.cdc.gov/parasites/fasciola/biology.html>)

3.5.1. Ovo

Os ovos (figura 6) da *Fasciola hepatica*, tem forma elipsoide, são operculados, medem 130-150 x 63-90 μm (Hussein *et al.*, 2010), a casca é relativamente grossa e lisa e tem uma coloração castanho amarelada (Andrews, 1999). O parasita adulto elimina entre dois e cinco mil ovos por dia, mas este número depende de fatores relacionados com o hospedeiro e o próprio parasita. Por exemplo a espécie do hospedeiro, a alimentação, carga parasitária, duração da infecção. A eliminação de ovos não é constante e observa-se um aumento de eliminação de ovos durante a primavera e outono, podendo no entanto ocorrer durante todo o ano. No momento da postura os ovos não são segmentados e estes só se desenvolvem se as condições termo – higrométricas forem adequadas. Temperaturas entre 10 e 30 $^{\circ}\text{C}$ são necessárias para o desenvolvimento do ovo (González, 2001), sendo que a 10 $^{\circ}\text{C}$ o desenvolvimento do ovo leva cerca de seis meses e a 30 $^{\circ}\text{C}$ completa-se em oito dias. A uma temperatura de 37 $^{\circ}\text{C}$ os ovos não se desenvolvem e após 24 dias

ocorre uma mortalidade de 100%, no entanto a uma temperatura entre 2 e 10°C permanecem viáveis durante dois anos e meio, 17 dias a – 5°C e 24 horas a – 15°C. O pH ideal para o seu desenvolvimento é de 7 mas valores entre 4,2 e 9 são tolerados (Andrews, 1999). 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, dentro do ovo, desenvolve-se uma larva móvel, que devido aos seus cílios denominada miracídio (González, 2001).



Figura 6 – Ovo de *Fasciola hepatica*

(Adaptada de <http://www.cdc.gov/dpdx/fascioliasis/gallery.html#eggs>)

3.5.2. Miracídio

O miracídio (figura 7) de forma ovoide e alargada (González, 2001) está completamente coberto de cílios e tem uma papila cônica na sua extremidade anterior (Bowman, 2004) e uma glândula apical cuja secreção colabora na dissolução dos tecidos do hospedeiro (caracol) durante o processo de penetração (González, 2001). Tem um par de manchas oculares, um sistema nervoso, um sistema excretor rudimentar e um grupo de células germinativas que são as progenitoras da geração seguinte de larvas (Bowman, 2004). As suas dimensões após a saída do ovo são 220 – 500 μm x 70 – 80 μm (Hussein *et al.*, 2010). A eclosão do miracídio depende da luz, estimulando esta, a produção de uma enzima

proteolítica fotoativa que debilita a união do opérculo com a casca do ovo. A atividade do miracídio e o meio interno do ovo pressionam o opérculo abrir e permitem a sua saída para o exterior. A uma temperatura de 26°C o processo completa-se em 12 dias, no entanto em condições naturais com temperaturas entre 10 e 12°C são necessárias várias semanas (até 2 meses) (González, 2001). Segundo Urquhart *et al.* (1998) o miracídio após a eclosão tem 3 horas para encontrar o caracol, (Bowman, 2004) afirma que este deve encontrar um hospedeiro num prazo de 24 horas, caso contrário este esgota as suas reservas de energia e morre. Segundo (Hussein *et al.*, 2010) o tempo de vida do miracídio variou entre 8 e 10 horas. No processo de busca de hospedeiro estão implicados estímulos quimiotáticos, fatores como temperatura, pH, oxigénio dissolvido, composição iónica, a salinidade e turvação da água (González, 2001).



Figura 7 – Miracídio

(Adaptada de Hussein *et al.*, 2010)

3.5.3. Esporocisto

Uma vez alcançado o caracol, o miracídio pode penetrar no caracol em qualquer parte do seu corpo mas geralmente fá-lo na abertura respiratória (Lapage, 1979), ao penetrar perde os cílios e migra através dos vasos sanguíneos ou vasos linfáticos, locais de abundante alimento, até à região periesofásica transformando-se em esporocisto (González, 2001). O esporocisto é uma pequena bolsa de tecido, sem nenhuma forma especial (Lapage, 1979), com 0,3 a 1,5 mm de diâmetro contendo células germinativas que dão origem a pequenas rédias (ASP, 2015). Sobre a nutrição dos esporocistos pouco se sabe, mas

pensa-se que devem obter os seus nutrientes através da parede do corpo, uma vez que carecem de boca (González, 2001).

3.5.4. Rédia

A rédia (figura 8) é alongada (González, 2001), mais ou menos de forma cilíndrica (Andrews, 1999), tem uma boca na parte anterior que comunica com uma faringe musculada e um curto intestino que termina em fundo de saco (Lapage, 1979). Mede cerca de 1 a 3 mm de comprimento e tem alguma capacidade de movimentação (Andrews, 1999). Alimenta-se de hemolinfa e tecidos, especialmente das células glandulares digestivas (González, 2001). Igualmente ao esporocisto a rédia contém células germinativas que são as progenitoras de rédias de 2ª geração (Bowman, 2004). Após 15 dias já existe uma geração de rédias e normalmente a 1ª geração dá lugar à seguinte fase larvar, chamada cercaria. Contudo se as condições nutritivas e ambientais para o caracol forem desfavoráveis podem formar-se rédias de 2ª ou 3ª geração (González, 2001). A migração das larvas podem causar graves lesões e morte ao caracol em infeções maciças (Andrews, 1999).

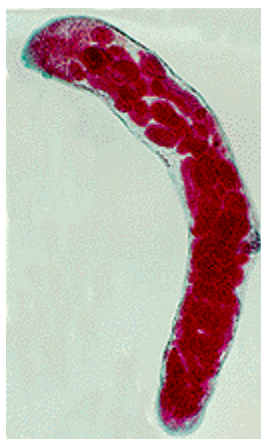


Figura 8 – Rédia

(Adaptada de

<http://research.vet.upenn.edu/ParasiteLifeCycles/FasciolahepaticaLifeCycle/FasciolahepaticaBiologyofSnailIntHost/tabid/7958/Default.aspx>)

3.5.5. Cercária

A cercária (figura 9) é na realidade uma fasciola jovem (Taylor *et al.*, 2007), assemelha-se a um girino, tem um corpo discoide e uma cauda longa. O corpo mede 250 a 350µm de comprimento e a cauda mede aproximadamente o dobro (Andrews, 1999). Possui alguns órgãos próprios do adulto, ventosa oral e ventral, boca, faringe, intestino bifurcado, canais excretores com células “flama” e percursores dos órgãos reprodutores (Bowman, 2004). O verdadeiro estímulo para a emergência das cercarias dependa da espécie, porem é mais comumente uma alteração na temperatura ou intensidade da luz. Uma vez infetado, o caracol poderá produzir cercárias indefinidamente, apesar da maioria dos caracóis infetados morrer prematuramente por intensa destruição do hepatopâncreas (Taylor *et al.*, 2007). O número de cercárias formadas por caracol é muito variável e não depende do número de miracídios que o infetou, podendo um caracol emitir desde 10 a 4000 cercárias, sendo 100 o número médio (González, 2001).



Figure 9 – Cercária

(Adaptada de <http://cal.vet.upenn.edu/projects/parasit06/website/lab6new2009.htm>)

1.5.6. Metacercária

Tipicamente, as cercárias nadam por algum tempo, utilizando uma película de água e, dentro de uma hora aproximadamente, fixam-se à vegetação, perdem a cauda e enquistam-se (Taylor *et al.*, 2007). Esta fase denomina-se metacercária e é a forma

infetante para os hospedeiros definitivos (González, 2001). A metecercária (figura 10) é uma estrutura arredondada de aproximadamente 0,2 mm de diâmetro e encontra-se enquistada nas plantas ou qualquer outra estrutura (Lapage, 1979). O quisto é constituído por uma parede externa com duas membranas, uma exterior de natureza proteica e uma interior fibrosa, a parede interna é também constituída por duas membranas, a primeira de natureza polissacárida e a segunda corresponde a lamelas de proteínas envolvidas numa matriz de lipoproteínas. As características da parede do quisto protege-as da influência desfavorável do frio, calor, dessecação (González, 2001), bactérias, fungos (Andrews, 1999) e permite-lhes sobreviver no meio exterior por longos períodos de tempo (até 12 meses). As metacercárias são muito sensíveis a altas temperaturas e à dessecação, suportando melhor as baixas temperaturas, o que lhes permite sobreviverem no inverno, embora a importância destas metecercárias na transmissão de fasciolose seja muito baixa (González, 2001). Um mínimo de 6 a 7 semanas é necessário para que o desenvolvimento de miracídio em metecercária se complete, embora em condições desfavoráveis seja necessário um período de vários meses. A infeção de um caracol com um miracídio pode produzir mais de 600 metacercárias (Taylor *et al.*, 2007).

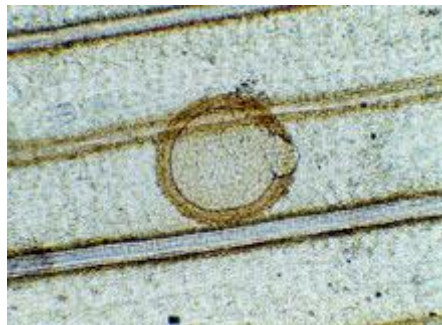


Figura 10 – Metacercária

(Adaptada de <http://cal.vet.upenn.edu/projects/parasit06/website/lab6new2009.htm>)

1.5.7. De metacercária à *Fasciola* adulta

A *Fasciola hepatica* tem como HD ovinos, bovinos, caprinos, equinos, cervídeos, humanos e outros mamíferos (Taylor *et al.*, 2007), sendo os ruminantes (ovinos, caprinos e bovinos) os principais HD causando grandes perdas económicas na sua produção (Silva

et al. 2004). A infecção dos ruminantes ocorre durante o pastoreio, embora também seja possível em animais estabulados através de águas contaminadas, fenos, ou silagens mal efetuadas. Nem todas as metacercárias ingeridas chegam ao fígado, podendo perder-se entre 25 – 60 % nas fezes ou por migração intraorgânica. O desenquistamento das metacercárias acontece em duas fases, a fase de ativação e a fase de emergência (González, 2001). A primeira acontece no rúmen e é estimulada por uma alta concentração de dióxido de carbono, um ambiente redutor e temperaturas cerca de 39 °C, sendo esta fase um pré-requisito para a fase de emergência. A segunda ocorre no intestino delgado abaixo da abertura do ducto colédoco, é desencadeada pela bÍlis e pela ação de uma enzima secretada pelo próprio parasita induzindo movimentos musculares neste (Andrews, 1999). Após o desenquistamento as fascíolas jovens migram através da parede do intestino, atravessam o peritoneu e chegam ao fígado onde começam a penetrar a cápsula de Gibson cerca de 90 horas pós infecção (González, 2001). As fascíolas jovens fazem túneis pelo parênquima hepático durante 6 a 8 semanas e em seguida entram nos pequenos ductos biliares, onde amadurecem em cerca de 4 semanas, após este período migram para os ductos maiores e, ocasionalmente para a vesícula biliar. O período entre a ingestão de metacercárias e o aparecimento de ovos de fascíola nas fezes é de 10 a 12 semanas e assim o período mínimo para a conclusão do ciclo de vida da *Fasciola hepatica* é de 17 a 19 semanas (Mitchell, 2002). A longevidade da *Fasciola hepatica* em ovinos não tratados pode ser de anos (Taylor *et al.*, 2007).

3.6. Patogenia

A patogenia pode ser dividida em duas fases, a primeira fase ocorre durante as migrações no parênquima hepático e está associada a lesão hepática e hemorragia (Taylor *et al.*, 2007), nesta fase as migrações podem veicular outros agentes infecciosos, pode provocar obstrução do fluxo biliar e facilitar a multiplicação de agentes que em condições normais não provocariam doença (Vázquez e Pérez, 2001). A segunda fase ocorre quando o parasita se encontra dentro dos ductos biliares e resulta da atividade hematófaga dos parasitas adultos (Taylor *et al.*, 2007), estes produzem irritação das superfícies epiteliais com as quais entram em contacto, devido ao seu tegumento espinhoso (Vázquez e Pérez, 2001).

3.7. Hospedeiro Intermediário

O ciclo de vida da *Fasciola hepatica* tem como HI caracóis de água doce da família Lymnaeidae (Novobilský *et al.* 2014), sendo o caracol da espécie *Galba truncatula* o principal HI (Cwiklinski *et al.* 2015).

3.7.1. Classificação

Segundo Jong (2012), *Galba truncatula* pertence ao Reino Animalia, ao sub-reino Eumetazoa, Filo Mollusca, Classe Gastropoda, Sub-classe Orthogastropoda, Ordem Pulmonata, Família Lymnaeidae, Subfamília Lymnaeinae, Genero *Galba* e Espécie *Galba truncatula*. Segundo Taylor (2007) fora da Europa existem outros Lymnaeinae com importância enquanto hospedeiros intermediários de *Fasciola hepatica*, *G. tomentosa* Austrália, Nova Zelândia, *G. columella* América do Norte, Austrália, Nova Zelândia, *G. bulimoides* Sul dos Estados Unidos, Caribe, *G. humilis* América do Norte, *G. viator* América do Sul, *G. diaphena* América do Sul.

3.7.2. Morfologia *Galba truncatula*

A *Galba truncatula* (figura 11) é um pequeno caracol de água doce, medindo cerca de 7 a 12 mm (NatureSpot, 2015), a casca em geral é castanha e tem o aspeto de uma pequena torre, enrolando-se numa série de espirais (Taylor *et al.*, 2007). A espiral é muito alta, termina de forma arredondada e o diâmetro da abertura é cerca de um terço do comprimento da concha e o corpo da espira ocupa mais de metade do comprimento da concha. A abertura tem tendência a ser de forma romboide (Costa, 2010).



Figura 11 – *Galba truncatula*

(Adaptada de <http://www.nmr-pics.nl/Lymnaeidae/album/slides/Galba%20truncatula.html>)

3.7.3. Ciclo de vida

Estes caracóis são hermafroditas, tem a 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 com uma duração mínima de 11 a 12 dias a temperaturas entre 21 e os 30 °C (Gomes, 2012).

3.7.4. Ecologia

Estes molúsculos têm uma distribuição geográfica muito ampla (Vázquez e Pérez, 2001), desenvolvem-se em habitats semiaquáticos, águas claras, paradas ou de pequena corrente e lamas húmidas. Os seus habitats podem ser permanentes, como charcas, cursos de água, margens de pequenas lagoas, ou temporários após chuvas pesadas ou inundações, podendo ser constituídos por marcas de cascos, sulcos de rodas ou poças de água (Taylor *et al.*, 2007). Desenvolvem-se melhor em solos argilosos (Lapage, 1979), com pH ligeiramente ácido podendo o ambiente excessivamente ácido ser prejudicial, como

ocorre em zonas de musgos (Urquhart *et al.*, 1998), sendo que a presença de algumas plantas por si só podem fazer suspeitar a presença destes caracóis (agrião, juncos, ranúnculos, verónicas, festuca) (Gomes, 2012). São capazes de suportar a seca de verão ou o congelamento durante o inverno por vários meses, estivando ou hibernando, respetivamente. A temperatura ideal para o seu desenvolvimento é entre os 15 a 22°C, cessando a temperaturas abaixo dos 5°C (Taylor *et al.*, 2007), no entanto os caracóis jovens podem beneficiar de temperaturas baixas, uma vez que foi observado que, após esta exposição, quando voltam as temperaturas ideais, os caracóis demonstravam uma grande atividade e apetite, crescimento rápido, aumento do tempo de vida e maior descendência em relação aos caracóis velhos (Hodasi, 1976). Vivem ativamente pelo menos um ano, podendo produzir 25000 a 160000 novos indivíduos, mas este período pode prolongar-se até três anos por hibernação em lugares protegidos. Alimentam-se de algas, principalmente de diatomáceas (Lapage, 1979).

3.8. Fasciolose em pequenos ruminantes

Tendo em conta que o estudo caso foi realizado em pequenos ruminantes, em seguida irá ser desenvolvida a revisão da fasciolose em ovinos e caprinos.

3.8.1. Epidemiologia

Uma vez que o ciclo de vida da *Fasciola hepatica* é um ciclo heteroxeno e com formas livres, está muito dependente das condições ecológicas para o seu desenvolvimento. Há assim, três fatores principais que influenciam a produção de metacercárias para a existência de surtos de fasciolose, disponibilidade de habitats adequados aos moluscos, temperatura e humidade. As baixas temperaturas representam um fator limitante na progressão do ciclo de vida. Para que os caracóis se reproduzam e para o desenvolvimento de *Fasciola hepatica* no seu interior é necessária uma temperatura diurna/noturna média de 10°C ou mais. Quando as temperaturas sobem para 15°C e se mantêm acima deste nível ocorre multiplicação significativa dos moluscos e das formas larvares dos trematodes.

Quanto à humidade, as condições ideais ocorrem quando a pluviosidade excede a evaporação e assim se atinge a saturação do meio ambiente. Estas condições, também

favorecem o desenvolvimento dos ovos de *Fasciola hepatica*, a procura de caracóis pelos miracídios e a dispersão das cercárias após a saída dos caracóis (Taylor *et al.*, 2007). Nas regiões temperadas do hemisfério norte o desenvolvimento ocorre no final da primavera / início de verão e continua durante o verão. A densidade máxima de metacercárias na erva surge no final de verão e outono e as manifestações clínicas aparecem, normalmente, no fim do outono e durante o inverno (Vázquez e Pérez, 2001). Esta conhece-se como infecção de verão dos caracóis (Urquhart *et al.*, 1998) e corresponde ao período de máximo risco de infecção para os HD, pois este período coincide com o esgotamento dos pastos e o aproveitamento das zonas de regadio, onde há maior concentração de metacercárias (Vázquez e Pérez, 2001). Por outro lado existe a infecção de inverno dos caracóis, em que aparecem metacercárias em maio/junho. As cercárias originam-se de caracóis que foram infetados no outono anterior e nos quais o desenvolvimento larvar cessou durante o período de hibernação de inverno (Taylor *et al.*, 2007). Tanto os ovos como as metacercárias de *Fasciola hepatica* podem sobreviver durante o inverno e desempenham um papel muito importante na epidemiologia. Os ovos, eclodindo em miracídios no final da primavera, podem infetar os caracóis. As metacercárias, infetando os animais no início da primavera, resultam na viabilidade dos ovos em meados do verão, no período ideal de reprodução dos caracóis (Urquhart *et al.*, 1998). A epidemiologia também depende do sistema de pastoreio. A contaminação contínua dos pastos provem de ovinos cronicamente infetados, onde as fascíolas, na ausência de tratamentos podem viver tanto como os ovinos. As infecções massivas não são raras em ovelhas e um só animal pode eliminar 2 a 3,5 milhões de ovos por dia. É preciso lembrar que a *Fasciola hepatica* pode infetar outros mamíferos, como equinos, suínos, cervídeos coelhos, alguns animais silvestres, contribuindo estes hospedeiros como reservatório da *Fasciola hepatica* (Urquhart *et al.*, 1998). O potencial biótico dos caracóis é muito elevado podendo a partir de um único individuo formar-se 25000 novos exemplares, se as condições ambientais forem as adequadas (Vázquez e Pérez, 2001). Quando é avaliada a prevalência da fasciolose segundo a idade, os dados indicam que animais com mais de dois anos de idade tiveram maior prevalência que animais mais novos. 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 seleccionadas para reprodução enquanto os machos são geralmente abatidos mais precocemente. 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).

3.8.2. Fisiopatologia

A patogenia da fasciolose depende do número de parasitas que invadem o fígado e está associada com as formas parasitárias imaturas migrantes no parênquima hepático e, posteriormente, com a atividade hematófaga das formas adultas nos condutos biliares. A fasciolose cursa com anemia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e, dependendo da intensidade e duração da infecção, com híper ou hipoproteinemia (Vázquez e Pérez, 2001). A diminuição do apetite, a perda de condição corporal, hipotermia e decúbito são sinais clínicos mostrados pelos animais infetados por *Fasciola hepatica* (Hilbe *et al.*, 2015). O desenvolvimento de todas estas alterações dependem fundamentalmente da fase, da duração, da intensidade da infecção e do estado nutritivo e imunitário do hospedeiro. Os borregos infetados experimentalmente com *Fasciola hepatica* e alimentados com uma dieta de baixo valor proteico, mostraram primeiro o aparecimento de sinais clínicos, que outros borregos infetados mas com uma melhor alimentação (Vázquez e Pérez, 2001).

3.8.3. A relação Hospedeiro/Parasita

A adaptação parasitária que se desenvolve lentamente ao longo do tempo faz que um hospedeiro se torne natural ou normal para um parasita, permitindo a este a sua penetração, crescimento, nutrição e reprodução. Pelo contrário, quando o hospedeiro não está adaptado, ou o grau de adaptação é baixo, sofre uma ação patogénica muito intensa por parte do parasita. No caso da *Fasciola hepatica*, os miracídios, os esporocistos e as rédias são bastante específicos e só sobrevivem num número limitado de espécies de moluscos estreitamente relacionadas (Vázquez e Pérez, 2001). Consoante a espécie do HD, há uma variação considerável na suscetibilidade à infecção 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 fatores 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, a composição iónica em parasitas de bovinos é diferente em parasitas de ovinos, o sucesso de infeções experimentais de caracóis ser marcadamente diferente entre miracídios obtidos de diferentes HD (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2001).

Os hospedeiros definitivos podem ser agrupados quanto à 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 infeção e não desenvolvem resistência à reinfeção. Isto porque apesar de haver uma reação tecidular não há produção de tecido fibroso, nem reação celular suficiente para imobilizar ou destruir o parasita. A prevalência de infeção 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, os humanos, entre outros. Estes por sua vez adquirem alguma resistência à reinfeção. A extensa fibrose hepática que se desenvolve em resposta à primoinfeção 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 (Gomes, 2012).

Os hospedeiros desenvolveram mecanismos de defesa para se protegerem contra a invasão e estabelecimento dos parasitas, tanto específicos (humorais e celulares) como inespecíficos (mucosas, pele, tosse, diarreia, etc.), contudo, embora os parasitas provoquem danos físicos, trauma e desorganização, muitos dos sintomas patológicos debilitantes são resultado das respostas imunitárias aos produtos de excreção/secreção (E/S), da superfície do parasita (Vázquez e Pérez, 2001). A *Fasciola hepatica*, aparentemente usa um número de protéases de cisteína, durante o seu ciclo de vida, provavelmente para alimentação, invasão dos tecidos e evasão imune. A protéase de cisteína, catepsina B, secretada pelas formas imaturas da *Fasciola hepatica* é a principal proteína encontrada nos produtos de (E/S) (Beckham *et al.*, 2006), demonstrando ter um papel crucial para a invasão e migração pelo parasita (Beckham *et al.*, 2009). Duas catepsinas L (L1 e L2), são os produtos de E/S predominantes das formas adultas de *Fasciola hepatica* (Cancela *et al.*, 2008), desempenhando um papel importante na sua patogenicidade. As enzimas participam na aquisição de nutrientes por catabolizar das proteínas do hospedeiro em péptidos absorvíveis, facilita a migração do parasita pelo intestino e fígado através da destruição das proteínas intersticiais da matriz tais como, fibronectina, laminina e colagénio e estão implicadas na inativação das defesas imunitárias do hospedeiro por clivagem de imunoglobulinas. Recentemente foi demonstrado que a catepsina L é capaz de suprimir a resposta imunitária das células Thelper tipo 1 (Th1) em animais de laboratório infetados, tornando-os mais suscetíveis a infeções bacterianas concomitantes (Dixit *et al.*, 2008).

3.8.4. Sinais Clínicos

A fasciolose clínica em ovinos e caprinos geralmente é classificada de três formas clínicas, aguda, sub-aguda e crônica (Urquhart *et al.*, 1998). O aparecimento de qualquer uma destas formas está relacionada com a época do ano, a disponibilidade de metacercárias disponíveis nos pastos e pela quantidade de metacercárias ingeridas (Vázquez e Pérez, 2001).

3.8.4.1. Forma Aguda

Esta forma da doença ocorre duas a seis semanas após a ingestão de grandes quantidades de metacercárias, em geral acima de 2000 (Urquhart *et al.*, 1998), geralmente afeta borregos expostos pela primeira vez ao parasita. Admite-se que o maior grau de infecção 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 (Gomes, 2012).

Foram descritos dois tipos de fasciolose aguda, o primeiro caracteriza-se pela presença de 1000 a 2500 parasitas no fígado dos quais pelo menos 60 % encontram-se migrando pelo parênquima hepático, no segundo tipo encontram-se 700 a 1000 parasitas no interior dos ductos biliares numa percentagem maior que no primeiro tipo (Vázquez e Pérez, 2001). A migração dos parasitas pelo parênquima hepático provoca uma intensa hemorragia (Boray e Murray, 1999), levando ao aparecimento de uma anemia hemorrágica aguda do tipo normocítica e normocrômica (Vázquez e Pérez, 2001). Os animais afetados por esta forma da doença podem não apresentar qualquer sinal clínico morrendo repentinamente devido à perda exagerada de sangue (Boray e Murray, 1999), no entanto podem manifestar sinais clínicos como perda de peso, palidez das mucosas, apatia, tremores musculares e salivação (Fiss *et al.*, 2013). A morte súbita pode ocorrer devido a uma hepatite necrótica infecciosa também chamada de “Black Disease”, que é uma doença causada pela bactéria *Clostridium novyi* tipo B, em que as migrações feitas pelos parasitas no fígado proporcionam um ambiente anaeróbio apropriado para a germinação dos esporos da referida bactéria e assim se desenvolve a doença (Mitchell, 2002) (Boray e Murray, 1999), embora atualmente isto seja menos comum devido à vacinação disseminada contra as clostridioses (Taylor *et al.*, 2007).

3.8.4.2. Forma Sub-aguda

A forma sub-aguda da doença é caracterizada pela ingestão de um grande número metacercárias por um período de tempo suficiente longo não causando a forma aguda da doença (Vázquez e Pérez, 2001), enquanto algumas metacercárias atingem os ductos biliares outras ainda estão a migrar, provocando lesões semelhantes à forma aguda, mas menos graves. Esta forma da doença aparece seis a dez semanas após a ingestão de aproximadamente 500 a 1500 metacercárias (Urquhart *et al.*, 1998) e existe um equilíbrio da quantidade de formas imaturas e adultos do parasita no fígado. Os animais afetados perdem peso durante uma a duas semanas antes de aparecerem os primeiros sinais clínicos e são incapazes de acompanhar o resto do rebanho. Os sinais clínicos observados são palidez das mucosas, hepatomegalia palpável, por vezes ascite e edema sub-mandibular. Na maior parte das vezes os animais acabam por morrer uma a duas semanas após o aparecimento dos sinais clínicos (Vázquez e Pérez, 2001).

3.8.4.3. Forma Crónica

A forma crónica é a forma mais comum da doença em, ovinos, caprinos e bovinos (Boray e Murray, 1999) e ocorre normalmente quatro a cinco meses após a ingestão de quantidades moderadas (200 a 500) de metacercárias. Os parasitas adultos presentes nos ductos biliares podem ingerir cerca de, 0,5 ml de sangue por dia por parasita (Taylor *et al.*, 2007), levando ao aparecimento de uma anemia severa, inflamação crónica e espessamento dos ductos biliares. Os sinais clínicos desenvolvem-se lentamente, tornando os animais afetados cada vez mais anémicos, com perda de peso, com apetite reduzido, com as mucosas da boca e olhos pálidas, com ascite, com edema sub-mandibular (figura 12) e diarreia em casos graves, verificando-se relutância ao movimento por parte destes (Boray e Murray, 1999). O quadro clínico dos animais pode complicar-se com a presença de nematodes abomasais como por exemplo a *Teladorsagia (ostertagia) ostertagi* (Mitchell, 2002). Berry e Dargie (1976) constataram que ovelhas que foram alimentadas com uma ração com baixos níveis de proteína desenvolveram alterações clínicas como, anemia, hipoalbuminemia, perda de peso, mais cedo que ovelhas alimentadas com rações com elevados teores proteicos, verificando assim, que os níveis nutricionais dos animais é um ponto bastante importante no despoletar da doença.

Em infecções leves, os sinais clínicos podem não ser facilmente discerníveis, mas os parasitas podem ter um efeito importante sobre a produção, uma vez que existe uma diminuição do apetite levando a défices de absorção de proteínas, hidratos de carbono e minerais (Taylor *et al.*, 2007).



Figura 12 – Edema sub - mandibular num ovino
(Adaptado de Mitchell, 2002)

3.8.5. Lesões

As lesões provocadas pela *Fasciola hepatica* variam de acordo com a fase de desenvolvimento do parasita no fígado e a espécie hospedeira envolvida, podendo ser de dois tipos. Lesões no parênquima hepático provocadas pela migração dos parasitas jovens e lesões dos ductos biliares relacionadas com a presença de parasitas adultos (Urquhart *et al.*, 1998). A gravidade e duração da fase aguda e/ou crónica depende de alguns fatores como a carga parasitária, a idade e a imunidade do hospedeiro (Costa, 2010). Os parasitas chegam ao fígado uma semana após a ingestão de metacercárias e no caso da fasciolose aguda e sub-aguda as lesões observáveis são resultado da migração dos parasitas jovens (Vázquez e Pérez, 2001). Estas migrações provocam uma extensa destruição hepática, levando a rutura de vasos sanguíneos (Mitchell, 2002), sendo que as principais lesões observadas são o fígado dilatado e hemorrágico (figura 13) (Urquhart *et al.*, 1998) e uma fibrose hepática focal (figura 14). São ainda encontrados parasitas jovens e adultos no parênquima hepático e peritoneu (Vázquez e Pérez, 2001).



Figura 13 – Fígado de ovelha hemorrágico
(Adaptado de Boray e Murray, 1999)

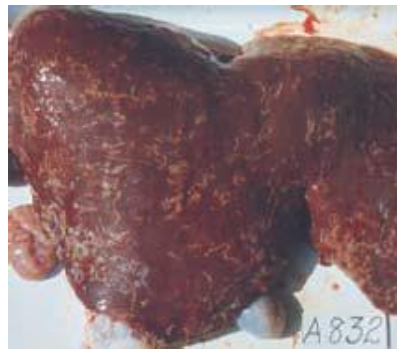


Figura 14 – Fígado de ovelha com focos de fibrose devido a trajetos migratórios
(Adaptado de Boray e Murray, 1999)

Na fasciolose crônica é necessário um longo período de tempo para que se desenvolvam lesões bem visíveis, desenvolvendo-se fibrose hepática como consequência da fase migratória e colangite hiperplásica pela presença dos parasitas adultos no interior dos ductos biliares e vesícula biliar (Vázquez e Pérez, 2001). O fígado apresenta um contorno irregular e uma coloração pálida, estando o lobo ventral mais afetado e reduzido de tamanho (Taylor *et al.*, 2007).

A fibrose hepática é um processo complexo e envolve pelo menos quatro mecanismos:

- Como resultado da reorganização dos trajetos migratórios originados pelos parasitas desenvolve-se a fibrose pós necrótica, pode observar-se em todo o fígado no entanto é mais frequente no lobo ventral.
- A fibrose isquêmica é o resultado da reconstrução das áreas de necrose coagulativa e microtrombos originado pelos parasitas nos sinusoides hepáticos.

- A intensa erosão causada pela atividade dos parasitas nos ductos biliares provoca uma intensa reação inflamatória, cuja reorganização resulta numa fibrose peribiliar.

- Por último produz-se uma fibrose monolobular, que consiste na conexão dos espaços porta com tecido fibrótico.

A lesão mais significativa aparece na vasculatura hepática, observando-se uma flebite da veia porta, cuja reorganização origina uma hipertensão portal. A colangite hiperplásica acontece quando as fascíolas adultas com as suas espinhas e ventosas produzem uma intensa irritação do epitélio e modificam a sua estrutura (Vázquez e Pérez, 2001).

Quando as infeções são maciças e repetidas, pode surgir peritonite provocada pelos jovens parasitas a caminho do fígado ou por ruptura da cápsula do fígado. A peritonite pode ser aguda e exsudativa ou crónica e proliferativa. Frequentemente fica limitada na cápsula, principalmente na superfície visceral ou pode estar restrita ao peritoneu parietal. Em casos agudos há depósitos fibrinohemorrágicos nas superfícies serosas e nos casos crónicos pode verificar-se placas de fibrina com adesões ou um espessamento mais ou menos difuso do tecido conjuntivo. Alguns parasitas podem ser encontrados microscopicamente nos depósitos fibrinosos e nos espessamentos peritoneais difusos encontram-se túneis de migração contendo sangue, detritos e parasitas jovens. Nos casos em que há envolvimento do peritoneu visceral, podem ser encontrados parasitas nos linfonodos mesentéricos que se encontram aumentados (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

3.8.6. Diagnóstico

Em geral, o diagnóstico de uma doença não é uma tarefa fácil, no caso da fasciolose como já foi dito anteriormente os animais doentes por vezes não mostram sinais clínicos específicos e alguns animais com sintomas podem padecer de outra doença infecciosa ou parasitária, no entanto, a combinação de sinais clínicos, sintomas, utilização de técnicas específicas (biopatológicas, parasitológicas e imunológicas) e achados de necropsia ajudam o médico veterinário a chegar ao diagnóstico correto (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

3.8.6.1. Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico deve basear-se na sintomatologia, na ocorrência sazonal, nos tipos de clima prevalentes e na história progressiva de fasciolose na exploração ou na

identificação de habitats de caracóis (Taylor *et al.*, 2007). Na forma aguda da fasciolose, a história do rebanho pastando em áreas endêmicas, especialmente durante o fim do verão e no outono, observação de mortes súbitas, relutância ao movimento e pastoreio da parte de outros animais do rebanho (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012), a presença de sinais clínicos, como perda de peso, palidez das mucosas, apatia e tremores musculares e salivação podem levar o clínico a diagnosticar um surto de fasciolose (Fiss *et al.*, 2013). Na forma sub-aguda da doença os animais mostram os mesmos sinais clínicos, podendo apresentar dor à palpação do abdómen (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012), hepatomegalia palpável, ascite, edema sub-mandibular (Vázquez e Pérez, 2001) e algumas lesões no fígado. Para uma confirmação correta da doença deve-se recorrer à necropsia de animais recém – falecidos ou gravemente afetados.

A fasciolose crônica pode ocorrer em qualquer momento do ano, mas é mais frequente durante o inverno/primavera e é caracterizada por uma perda progressiva da condição corporal, edemas de algumas partes do corpo, especialmente do abdómen e região sub-mandibular, mucosas pálidas e morte de alguns animais mais magros. Sob estas circunstâncias, o diagnóstico deve ser apoiado por um exame fecal e presença de ovos nas fezes, no entanto, hoje em dia a utilização de técnicas não invasivas como, Raio-X, ecografia, tomografia axial computadorizada e ressonância magnética, podem ser bastante úteis num diagnóstico clínico mais correto (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). Nesta forma da doença também é muito importante a realização de necropsia de animais afetados, onde geralmente se encontra fascíolas adultas nos ductos biliares e lesões no fígado como, fibrose hepática e colangite hiperplásica (Vázquez e Pérez, 2001).

3.8.6.2. Diagnóstico Laboratorial

Hemograma e Análises bioquímicas

A fasciolose, pela sua ação sobre o fígado e sistema circulatório causa várias alterações passíveis de serem medidas a nível laboratorial (Gomes, 2012). Parâmetros sanguíneos e a mensuração dos níveis de algumas enzimas hepáticas são bastante úteis para o diagnóstico da infeção, no entanto o seu valor depende da sensibilidade, especificidade e estabilidade no plasma (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). Na forma aguda da doença os animais apresentam um quadro de anemia hemorrágica aguda normocítica e normocrômica, uma marcada eosinofilia, uma hiperglobulinemia e um hematócrito de 7

a 10 % em animais terminais (Vázquez e Pérez, 2001). A eosinofilia pode sugerir a presença de uma infecção provocada por um helminte, mas a ausência de eosinofilia não pode excluir a presença destes parasitas (Şimşek *et al.*, 2006). Na forma sub – aguda da doença desenvolve-se gradualmente uma anemia hipocrômica macrocítica, uma reticulocitose marcada (8 a 3 %), mas esta só se observa em animais com hematócrito abaixo de 25 %. Inicialmente, observa-se uma hiperproteinemia, devida ao aumento das imunoglobulinas como resposta aos antígenos parasitários, seguindo-se uma hipoproteinemia devida particularmente à diminuição dos níveis plasmáticos de albumina. Na forma crónica observa-se uma hipoproteinemia, uma anemia crónica hipocrômica macrocítica com uma reticulocitose de (4 a 20 %) nos animais terminais, podendo o hematócrito ser de 11 a 19 %.

O aumento da atividade plasmática da glutamato-desidrogenase (GLDH), enzima mitocondrial hepatocitária, indica um processo agudo recente (Vázquez e Pérez, 2001) e este aumento deve-se ao dano no fígado causado pela migração dos parasitas (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). A atividade plasmática do aspartato aminotransferase (AST) e do sorbitol desidrogenase (SDH) também aumenta durante a migração dos parasitas pelo parênquima hepático, apesar de serem enzimas menos específicas. A gama-glutamil transpeptidase (GGT) originada no epitélio dos ductos biliares, alcança os valores plasmáticos mais elevados quando os trematodes se encontram nos ductos biliares (Campillo 2001), assim, o aumento dos níveis das enzimas AST e GLDH pode ser útil no diagnóstico de fasciolose aguda, duas a três semanas após a infecção, enquanto a elevação dos níveis da enzima GGT pode indicar fasciolose crónica (Mitchell, 2002).

Outro parâmetro que pode estar alterado em infecções por *Fasciola hepatica* é a concentração de bilirrubina sérica. Quando se verifica colestase associada à obstrução do fluxo biliar os valores de bilirrubina estão aumentados, o que se pode verificar segundo alguns autores entre as 6 e as 14 semanas (Mekroud *et al.*, 2007).

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 infecção (Gomes, 2012). Foi observado num estudo que os níveis de imunoglobulinas IgM e IgG aumentou duas semanas após a infecção, a IgM mostrou dois picos na semana 3 e 13 e a IgG mostrou aumento de valores após a 5 e 6 semana (Mekroud *et al.*, 2007).

Coprologia

A presença de ovos nas fezes é a melhor maneira de saber se um animal está parasitado, no entanto as análises coprológicas são de valor limitado em animais recém infetados. A detecção de ovos nas fezes é um método de diagnóstico muito valioso na forma crônica da doença, na forma aguda da doença, as análises coprológicas são negativas podendo também ser na forma sub-aguda. (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). As técnicas coprológicas não permitem detetar:

- Infecções na fase pré patente, ou seja, durante a migração dos parasitas através do parênquima hepático;
- Infecções com baixa intensidade, uma vez que a eliminação é escassa e a postura pode ser irregular e passar despercebida (Dorchies, 2015).

Deste modo os resultados negativos de exames coprológicos individuais não permitem excluir a infecção por *Fasciola hepatica*, mesmo que sejam realizados numa dezena de indivíduos do efetivo (Happich e Boray, 1969). Os métodos coprológicos utilizados tem desvantagens em relação a outros métodos de diagnóstico, estes, só detetam ovos nas fezes a partir da 10^a-11^a semanas pós infecção, além disso têm uma baixa sensibilidade (30%), o que pode dar origem a falsos negativos (Şimşek *et al.*, 2006). Por outro lado, 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 infecção ativa e de um foco de infecção (Dorchies, 2015).

Os ovos de *Fasciola hepatica* são pesados e densos, portanto não flutuam em água e requerem ou líquidos de elevada densidade para técnicas de flutuação ou a utilização de técnicas de sedimentação (Costa, 2010). Os métodos de flutuação utilizam soluções de elevada densidade como o sulfato de zinco e o iodeto de mercúrio. Soluções muito concentradas de sulfato de zinco têm o inconveniente de por vezes deformar os ovos e estes colapsarem devido a fenómenos osmóticos, o que pode tornar difícil a sua identificação. A flutuação com sulfato de zinco é uma técnica muito difundida, mas ineficaz frente a um baixo número de ovos eliminados, recomendando-se então, os métodos de sedimentação. Os métodos de sedimentação baseiam-se na maior densidade dos ovos de trematodes do que os detritos presentes nas fezes, o que permite concentrá-los no sedimento após várias lavagens (Vázquez e Pérez, 2001). A observação dos ovos ao microscópio pode ser facilitada pela adição de um corante (azul de metileno),

realçando a cor amarelada dos ovos (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). 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, 2015). Esta técnica é especialmente útil para diagnóstico quantitativo, especialmente para pequenas infeções (Happich e Boray, 1969). O ELISA (*Enzyme – Linked Immunosorbent Assay*) sanduíche descrito por Duménigo *et al.*, (1999) deteta coproantígenos de produtos de E/S da *Fasciola hepatica*. Este método de diagnóstico detetou coproantígenos com baixas cargas parasitárias (1 a 36 parasitas) e a primeira deteção aconteceu a 1 a 5 semanas pós infeção (Dorchies, 2015). Num estudo realizado por Pajares (1997), o ELISA sanduíche mostrou ter uma sensibilidade e especificidade muito superior a qualquer outro método utilizado no diagnóstico da *Fasciola hepatica* (Pajares, 1997). No entanto estes métodos são muito caros e difíceis de comprar, sendo utilizados quase exclusivamente por investigadores em trabalhos experimentais (Dorchies, 2015).

3.8.6.4. 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 técnicas 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. Grande parte dos testes utilizados detetam anticorpos sanguíneos, mas também podem ser detetados antígenos, tanto no soro como nas fezes (Gomes, 2012).

Para o diagnóstico serológico estão descritas varias técnicas como, precipitação, aglutinação, imunofluorescência, ELISA, fixação do complemento (Vázquez e Pérez, 2001), imunoeletroforese e o immunoblotting (Alvarez Rojas *et al.*, 2014), no entanto, atualmente a técnica mais utilizada é a prova de ELISA, utilizando antígenos de E/S para a deteção de anticorpos (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012), esta prova é segura, barata e de fácil procedimento (Dorchies, 2015).

Existem vários tipos de testes:

- Testes sorológicos para deteção de anticorpos no soro:

Como a *Fasciola hepatica* induz uma resposta humoral no hospedeiro infetado, a maioria dos métodos sorológicos utilizados no diagnóstico detetam anticorpos no soro utilizando antígenos de *Fasciola hepatica*. Uma desvantagem desta técnica é a incapacidade de diferenciar uma infecção ativa ou uma exposição anterior. Outra desvantagem é a possibilidade de reações cruzadas com antígenos de outros trematodes relacionados com a *Fasciola hepatica* (Alvarez Rojas *et al.*, 2014).

São os mais usados atualmente, recorrem a uma técnica de ELISA indireto, e podem utilizar antígeno somático f2 (Institut Pourqueir, Montpellier, France, 1985), antígenos de excreção/secreção (ES) em bruto ou sob a forma de frações purificadas/recombinantes. Uma das frações antigénicas mais ativas é a proteinase catepsina L1 das células do epitélio intestinal, que cliva imunoglobulinas e inibe a ação dos eosinófilos sobre os jovens parasitas (Dorchies, 2015). Em experiências realizadas por vários autores, os anticorpos podem ser detetados a partir de duas semanas pós infecção e permanecerem em níveis elevados até 20 semanas pós infecção (Alvarez Rojas *et al.*, 2014). Estes testes são fiáveis, tem elevada sensibilidade e especificidade. Por exemplo 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 antígenos purificados (Dorchies, 2015). Outro antígeno recombinante usado atualmente, designado rFh8, é uma proteína de ligação de cálcio presente nos antígenos 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).

- Testes sorológicos para deteção de antígenos no soro:

Uma vez que a deteção de anticorpos anti-*Fasciola hepatica* no soro ou no leite não permite diferenciar uma infecção ativa de uma infecção antiga, a deteção de antígenos específicos pode ser útil no início de uma infecção de *Fasciola hepatica*. Em geral, os antígenos são encontrados no soro a partir de uma semana pós infecção, muito mais cedo que a deteção de antígenos nas fezes que é cerca de 4 semanas pós infecção. Além disso, e em contraste com os níveis de ovos detetados nas fezes, existe uma correlação positiva entre os níveis de antígenos e a carga parasitária (Alvarez Rojas *et al.*, 2014). Foi também

demonstrado que um ELISA sanduíche baseado num anticorpo monoclonal (ES 78), é um método sensível, específico e adequado para a deteção de *Fasciola hepatica* no soro e fezes de animais e humanos com fasciolose ativa (Dorchies, 2015).

Apesar da deteção de antigénios circulantes ser aparentemente melhor que os anticorpos para o diagnóstico precoce de fasciolose, a sua utilidade é limitada após 7 semanas de infeção, provavelmente devido à formação de imunocomplexos (Costa, 2010).

3.8.6.5. Métodos de diagnóstico molecular

Até à data, vários métodos baseados em PCR, utilizando DNA Nuclear ou mitocondrial, tem sido aplicados para a caracterização genética, a identificação e ou diferenciação de espécies de Fascíola. Existem estudos que demonstram que foi detetado por PCR DNA de *Fasciola hepatica* nas fezes de ovino muito antes de serem detetados ovos nas fezes dos mesmos (Alvarez Rojas *et al.*, 2014).

Em suma, apesar da investigação relativamente intensiva, ainda não existem métodos de diagnósticos muito sensíveis e específicos na diferenciação entre o período pré patente e o período de infeção, existindo vantagens e desvantagens nos variados métodos (tabela 15). Grandes progressos em tecnologias de sequenciamento de ácidos nucleicos levantam grandes expectativas no melhoramento do diagnóstico, pois claramente um diagnóstico preciso é essencial para, estimar a distribuição e prevalência da *Fasciola spp.* e resistência a drogas, alterações que avaliam a prevalência e distribuição geográfica a seguir ao tratamento anti- helmíntico e estabelecer um tratamento e controlo eficaz da fasciolose (Alvarez Rojas *et al.*, 2014).

Tabela 15 - Vantagens e desvantagens dos testes de diagnóstico para a *Fasciola hepatica*

(Adaptado de Alvarez Rojas *et al.*, 2014)

Teste	Vantagens	Desvantagens	Deteção pós infecção	Distingue infecção atual de infecção passada
Deteção de ovos	Barato	Baixa sensibilidade	8 semanas pós infecção	Deteta infecção patente
Deteção de anticorpos no soro		Sem correlação com carga parasitária; custos ELISA	2 semanas pós infecção	Não
Deteção de antígenos no soro	Tem correlação positiva com carga parasitária	Deteta apenas estágios de migração no fígado; custos ELISA	2 semanas pós infecção	Deteta infecção atual
Deteção de antígenos nas fezes	Tem correlação positiva com carga parasitária	Custos ELISA	4 semanas pós infecção	Deteta infecção patente
Deteção DNA (PCR)	Alta sensibilidade e especificidade	Custo do termociclador		Deteta infecção patente

3.8.6.6. Diagnóstico Diferencial

Como diagnóstico diferencial a fasciolose tem as deficiências nutricionais de cobre e cobalto, a hepatite necrótica infecciosa “black disease”, enterotoxemia, melanose, melanoma e antrax (FAO, 2015). A fasciolose crónica caracterizada pela má condição corporal dos animais pode ser confundida com nutrição inadequada do rebanho, parasitismo crónico incluindo parasitoses resistentes a anti – helmínticos, peira, doença de Johne, má dentição e claudicação severa crónica (NADIS, 2015).

3.8.7. Tratamento

O tratamento da fasciolose deve ser direcionado, tanto contra as fascíolas adultas, localizadas nos ductos biliares, como contra as imaturas em migração pelo parênquima hepático (Vázquez e Pérez, 2001). Os fasciolicidas (tabela 16) usados para tratamento pertencem aos seguintes grupos: fenóis halogenados, salicilanilidas, benzimidazóis, sulfonamidas e os fenoxialcanos (Flores-Ramos *et al.*, 2014). 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 atuam principalmente sobre os estágios larvares (tabela 17).

A escolha do fármaco depende do tipo de produção. Poucos fármacos podem ser usados em animais 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 adolelescências ou larvas em migração com idade até seis semanas) ou efetiva contra todos os estágios do parasita (Flores-Ramos *et al.*, 2014; Gomes, 2012).

Tabela 16 - Fasciolicidas usados em pequenos ruminantes

Grupo	Princípio ativo	Nome comercial	Via Adm.	Dose	Int. Segurança (dias)	
					Leite	Carne
Fenóis halogenados	Nitroxinil	Dovenix®	SC	10mg/kg	X	60
Salicilanilidas	Closantel	Flukiver®	SC	5mg/kg	X	28
		Seponver Puls®	Oral	10mg/kg	X	28
		ClosamectinFF®	SC	5mg/kg	X	28
Benzimidazóis	Triclabendazol	Cydectin	Oral	10mg/kg	X	31
		TriclaMox®				
	Albendazol	Albendavet 19®	Oral	7,5mg/kg	4	10
		Valben 2,5 %®	Oral	7,5mg/kg	3	12
Sulfonamidas	Clorsulon	Ivermectina+Clorsulon Sanfer®	SC	2mg/kg	28	28
Fenoxialcanos	Dianfenetida*	Coriban®	Oral	80mg/kg	N.S	N.S

* Não comercializado em Portugal; N.S – Não sabe;

Tabela 17 – Espectro de eficácia dos vários anti-helmínticos

(Adaptado de Fairweather e Boray, 1999)

Idade dos parasitas em semanas															
Princípio ativo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Albendazol										50-70 %	80-99%				
Clorsulon									90 – 99 %						
Closantel								50 – 90 %		91 – 99 %					
Nitroxinil								50 – 90 %		91 – 99 %					
Triclabendazol			90 – 99 %			99 – 100 %									
Dianfenetida	100 – 91 %						80 – 50 %								

- Fenóis Halogenados

Fenóis halogenados são bastante ativos contra parasitas adultos, mas apenas o nitroxinil mostra boa atividade, embora irregular, contra parasitas entre as seis e oito 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 e Boray, 1999). O nitroxinil está disponível no mercado com o nome Dovenix® e é administrado via SC na dose de 10 mg/Kg, geralmente não se observam efeitos adversos mesmo em doses elevadas, no entanto podem aparecer alguns sintomas como perda de apetite, ansiedade e imobilidade (Apifarma, 2015).

- Salicilanilidas

As salicilanilidas têm ação adulticida e ação contra as formas imaturas a partir das seis semanas, mas não são efetivas contra fases mais precoces. Interferem na fosforilação oxidativa o que conduz a alterações metabólicas como estimulação do consumo de

oxigênio, aumento de absorção de glucose, diminuição das reservas de glicogênio, alterações no rácio oxaloacetato/malato e diminuição da síntese de ATP. Foi proposta uma forma alternativa para a ação metabólica do closantel, nomeadamente na glicólise com a acumulação de glucose 6-fosfato previa à redução do ATP. Também é observada uma diminuição do pH e diminuição do potencial de membrana levando à redução da motilidade do parasita. A ação do closantel pode servir para tornar disfuncionais os mecanismos responsáveis pela remoção do excesso de protões e manutenção da homeostasia no parasita. Estas substâncias provocam lesões no tegumento e causam paralisia espástica no parasita, resultante da penetração dos iões de cálcio nas células musculares. A paralisia provoca interrupção na alimentação e conseqüentemente fome, de forma que os parasitas têm de recorrer às suas reservas energéticas para sobreviver (Fairweather e Boray, 1999). O closantel está disponível no mercado com o nome de Flukiver®, é administrado por via SC na dose de 5 mg/kg. Em doses terapêuticas não apresenta qualquer efeito tóxico e tem uma margem de segurança bastante elevada, no entanto em doses muito elevadas pode aparecer diminuição da visão ou cegueira, anorexia, incoordenação ação motora e fraqueza geral. Outra forma de closantel apresentada é o Seponver Plus®, este é administrado de forma oral na dose de 10 mg/kg e apresenta os mesmos efeitos secundários que o anterior. Existe ainda o Closamectin FF®, que é administrado por via subcutânea na dose de 5 mg/kg, este pode em casos de sobredosagem sintomas como perda de apetite, fezes moles, aumento da frequência de defecação, hiperventilação, hipertermia, descoordenação, convulsões e taquicardia (Apifarma, 2015).

- Benzimidazóis

Os benzimidazóis comuns, como, cambendazol, fenbendazol, mebendazol e oxfendazol tem um largo espectro contra nematodes e cestodes e até mesmo contra outros trematodes, no entanto tem pouca ou nenhuma atividade contra a *Fasciola hepatica*. Apenas o albendazol e o triclabendazol tem sido recomendados para o uso como fasciolícidias. Atuam especificamente por fixação às tubulinas citoplasmáticas com conseqüente inibição da polimerização de microtúbulos interferindo com o metabolismo mitocondrial e ainda afetam a síntese de proteínas. Estes mecanismos parecem estar interrelacionados uma vez que qualquer alteração nos microtúbulos é acompanhada por desorganização de organelas, em particular do aparelho de Golgi que está ativamente envolvido na síntese de proteínas. Estes compostos induzem lesões nas células intestinais e no sistema

reprodutor do parasita, interrupção da alimentação e da postura de ovos pelo parasita (Fairweather e Boray, 1999). Sendo o triclabendazol um derivado do benzimidazol e, por analogia com o que é conhecido sobre os outros benzimidazóis, seria de prever que este se liga-se à tubalina e assim os processos nos microtúbulos, no entanto estudos mostram que este provoca inibição da mitose das células vitelinas e espermatogénicas, interrupção nos processos de transporte do tegumento, o que leva a danos graves na superfície deste, culminando na perda total do tegumento (Brennan *et al.*, 2007). O triclabendazol tem como nome comercial Cydectin TriclaMox®, é administrado por via oral na dose de 10 mg/kg, é o único anti-helmíntico eficaz contra todas as formas parasitárias. Em doses elevadas pode apresentar sintomas como salivação, depressão, sonolência, ataxia e perda de apetite. O albendazol está representado no mercado pelo Albendavet 19® e pelo Valben 2,5 %®, estes são administrados por via oral na dose de 7,5 mg/kg e apresentam como efeitos secundários em doses elevadas sintomas como, anorexia, perda de peso e incoordenação motora (Apifarma, 2015).

- 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 (Gomes, 2012). Através da inibição das enzimas glicolíticas 3-fosfoglicerato cinase e fosfogliceromutase, interrompe a glicólise que é a principal via metabólica utilizada pelo parasita para a produção de energia. A redução da disponibilidade de energia é acompanhada por uma paralisia flácida progressiva. O clorsulon liga-se à anidrase carbónica dos eritrócitos dos animais em tratamento, deste modo quando tem acesso ao parasita, por via oral durante a ingestão de sangue, provoca necrose das células digestivas do parasita (Fairweather e Boray, 1999). Em Portugal não está disponível nenhuma apresentação comercial de clorsulon para ovinos e caprinos, no entanto existe noutros países uma apresentação comercial com o nome Ivermectina+Clorsulon Sanfer®, este é administrado por via SC na dose de 2 mg/kg.

- Fenoxialcanos

A dianfenetida é muito eficaz contra as formas imaturas do parasita até às 6 semanas de idade, podendo mesmo ser eficaz contra parasitas de um dia de idade. No entanto, a

eficácia vai diminuindo progressivamente contra as formas adultas. A dianfenetida 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, no entanto, têm sido observadas alterações no transporte de glucose e níveis de ATP. Sabe-se que a dianfenetida provoca graves lesões na superfície tegumentar (Fairweather e Boray, 1999). Não existe nenhuma apresentação comercial em Portugal deste princípio ativo.

3.8.8. Resistência aos anti-helmínticos

Em geral, o desenvolvimento de resistência aos anti-helmínticos é influenciado por fatores relacionados com o hospedeiro, com o parasita, com o modo de utilização dos anti-helmínticos e com o ambiente. Uma vez alcançada a resistência, a reversão da suscetibilidade é pouco provável, de modo que a estratégia principal para diminuir a resistência passa pela deteção precoce de resistência e pela gestão adequada de anti-helmínticos (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). A resistência aos anti-helmínticos tornou-se um grande problema em medicina veterinária, e ameaça tanto o rendimento agrícola como o bem-estar animal (Wolstenholme *et al.*, 2004), sendo particularmente importante em nematodes. A resistência aos anti-helmínticos na *Fasciola hepatica* ainda não é um grande problema mas esta tem vindo a ser identificada por vários autores tanto em laboratório como no campo (Fairweather e Boray, 1999), existindo relatos de resistência a uma serie de anti-helmínticos, por exemplo closantel, triclabendazol, nitroxinil e albendazol (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). A base molecular e bioquímica da resistência ainda não está bem compreendida, no entanto, ela pode ocorrer de diversas maneiras, existir uma alteração molecular no alvo, para que o medicamento não reconheça esse alvo tornando-se ineficaz, uma alteração no metabolismo que inativa, remove ou impede a ativação do medicamento, uma alteração na distribuição do medicamento no organismo ou ainda uma amplificação de genes-alvo para superar a ação do medicamento (Wolstenholme *et al.*, 2004). 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 manejo, pode reduzir o

nível de infecção 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 manejo é ainda mais complicado visto esta ter um ciclo indireto, o que torna mais difícil compreender o ponto em que se desenvolveram resistências (Gomes, 2012). Várias estratégias tem sido propostas para ajudar a evitar ou pelo menos retardar o desenvolvimento de resistências. Estas incluem, limitação do uso de anti-helmínticos usados no tratamento, dosagens adequadas e desparasitações estratégicas com base em dados epidemiológicos, rotação anual de anti-helmínticos de diferentes grupos químicos e desenvolvimento de vacinas. Outra estratégia que parece ter bons resultados é a combinação de anti-helmínticos. Estudos recentes demonstram que anti-helmínticos que individualmente têm a sua eficácia afetada, quando combinados com outros anti-helmínticos aumentam a sua eficácia (Fairweather e Boray, 1999), no entanto é preciso ter em atenção que pode, por outro lado, dar azo a desenvolver múltiplas resistências (Gomes, 2012). No caso particular da fasciolose, em determinadas fases da doença a não existência de sinais clínicos, pode levar à subestimação das resistências em determinado rebanho. Em casos de suspeita de resistência, pode recorrer-se ao Teste de Redução de Contagem de Ovos, no entanto, um dos fatores a ter em conta na realização deste teste, é respeitar um intervalo suficientemente longo para permitir a expulsão dos ovos, assim, 14 dias é o intervalo adequado (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

3.8.9. Prevenção / Controlo

A *Fasciola 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 (Gomes, 2012). A prevenção da fasciolose usando um controlo de medidas integradas com um sistema de previsão é preferível ao tratamento de animais afetados, onde o bem-estar animal pode estar comprometido e ocorrer perdas económicas (Mitchell, 2002). Para uma prevenção e controlo eficaz devem ser adotadas três estratégias, (i) uso estratégico de anti-helmínticos, com o objetivo de reduzir o número de ovos na pastagem e o número de parasitas no HD; (ii) reduzir o número de hospedeiros intermediários (*Galba truncatula*), (iii) fazer uma

gestão agrícola das áreas propensas ao parasita, tentando reduzir a exposição à infecção (Boray e Murray, 1999).

- Uso de anti-helmínticos

O número de anti-helmínticos atualmente disponíveis para o tratamento da fasciolose é limitado e a sua eficácia é muito variável, tendo alguns eficácia contra todas as formas parasitárias e outros apenas contra as formas adultas (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012), assim na escolha do fármaco a utilizar, à parte das considerações económicas, deve ter-se em conta em que fase do ciclo a *Fasciola hepatica* se encontra e a epidemiologia local, que nos permite conhecer quando é o maior risco de infecção (principalmente no outono). Em áreas endémicas devem ser realizados pelo menos dois tratamentos anuais (Vázquez e Pérez, 2001), um tratamento em abril/maio utilizando um medicamento eficaz contra parasitas adultos e parasitas imaturos já avançados e outro tratamento em outubro utilizando um medicamento eficaz contra formas iniciais do parasita, por exemplo o triclabendazol. Em anos com uma pluviosidade mais elevada pode ser necessário a aplicação de tratamentos adicionais (Urquhart *et al.*, 1998).

- Redução de hospedeiros intermediários

Antes de ser realizado qualquer controlo de HI, deve ser feito um levantamento da área em relação aos habitats dos HI para determinar se são localizados ou difusos (Urquhart *et al.*, 1998). Uma vez identificadas essas zonas, evitar o pastoreio dos animais em períodos de alto risco de infecção ou cercar estas zonas pode ser uma solução, no entanto pode ser difícil de realizar (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). Outro método que mostrou ser bastante eficaz na redução ou mesmo eliminação de HI é a drenagem de zonas alagadas, mas se em algumas propriedades esta medida possa ser exequível noutras pode ser bastante caro impossibilitando a sua realização (Harris e Charleston, 1971). O uso de moluscicidas atraiu grande atenção há alguns anos e alguns aplicados com as técnicas apropriadas são eficazes, no entanto a eficiência deste método é duvidosa, por causa do grande potencial biótico dos caracóis, dos custos inerentes a este método e do impacto ambiental. Os moluscicidas mais importantes são a niclosamida, o pentaclorofenato de sódio e o N – tritil – morfolina (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). Os métodos biológicos consistem essencialmente em colocar nas pastagens muito afetadas por *Galba truncatula* inimigos naturais, como as aves. Algumas observações feitas em pequenas parcelas de

experimentação, mostram que as aves alimentam-se dos caracóis e apesar de não os fazer desaparecer dos terrenos, diminuem a sua quantidade. Outros animais úteis na destruição dos caracóis são os ouriços, pirilampos, rãs, sapos e algumas larvas de dípteros alimentam-se exclusivamente dos corpos vivos dos caracóis. A luta biológica, possível outrora, está atualmente posta de parte, devido à dificuldade (demasiado complexa) de ter posta aplicação prática (Costa, 2010).

- Métodos de gestão agrícola

O uso de rotação de pastagens ou de hospedeiros menos suscetíveis também pode ser eficaz, ainda que, na gestão duma exploração nem sempre seja possível a sua aplicação (Vázquez e Pérez, 2001). O método de rotação de pastagens consistem no pastoreio dos animais, em áreas potencialmente infetadas com metacercárias e onde existem condições de desenvolvimento do ciclo da *Fasciola hepatica* para áreas livres de metacercárias e onde não existem condições para o desenvolvimento do parasita (Boray e Murray, 1999). O pastoreio em áreas contaminadas não pode exceder as 9 semanas, evitando assim a infeção dos caracóis. Quando os animais são de novo introduzido em pastagens contaminadas devem ser tratados com anti-helmínticos duas semanas antes, pois este é o período em que, apesar dos parasitas já terem morrido, os ovos podem ficar armazenados na vesícula biliar e serem excretados pelos HD (Harris e Charleston, 1971). Quando são introduzidos animais novos numa exploração agrícola, estes devem ser mantidos em quarentena, num local livre de HI, e tratados com um anti-helmíntico eficaz contra todas as formas parasitárias da *Fasciola hepatica* (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

3.8.10. Vacinação

A vacinação seria certamente uma estratégia de controlo da fasciolose em alternativa ao tratamento dos animais com fasciolicidas, devido à presença de populações de parasitas resistentes a anti-helmínticos e à preocupação de toda cadeia de produção, do sector de transformação e comercialização, das autoridades sanitárias e dos consumidores em relação à presença de resíduos químicos nos alimentos (McDougall, 2012). Tem sido feitos grandes avanços na identificação de potenciais antigénios em vacinas, mas ainda não foi atingido um nível de eficácia exigido para a sua comercialização. A patogénese

da fasciolose está associada a danos no fígado que são resultado da migração e alimentação dos parasitas, bem como da resposta imunitária aos produtos de E/S secretados pelos parasitas (Molina-Hernández *et al.*, 2015). O controlo imunoprolático da fasciolose foi tentado em ovinos e bovinos usando extratos de parasitas ou antígenos parasitários o que suscitou diferentes níveis de proteção. Os antígenos utilizados são a GST (glutathione-S-transferase), proteases de cisteína (catpesina L), proteína de ligação ao ácido gordo (FABP), leucina aminopeptidase (LAP) e hemoglobina parasitária (McDougall, 2012).

A GST está envolvida nos passos iniciais de desintoxicação e xenobióticos e compostos tóxicos endógenos (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012) e foi o primeiro antígeno a induzir níveis elevados de proteção em ovinos (Sexton *et al.*, 1990, referido por McDougall, 2012) e em bovinos, sendo o nível de proteção dependente do adjuvante (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). Estudos com GST de *Fasciola hepatica* mostraram apenas uma eficácia de apenas 29 % em ovinos e 43 % em bovinos, em oito e quarto ensaios respetivamente (Toet *et al.*, 2014).

Os parasitas adultos secretam em abundância proteases de cisteína (catpesina L), representando cerca de 80 % dos produtos de E/S, que eles usam para digerir proteína no sangue, incluindo hemoglobina, albumina e imunoglobulina (Molina-Hernández *et al.* 2015). Um ensaio realizado por Wijffels (1994) mostrou que uma vacinação com uma mistura de catepsinas (L1 e L2) não reduziu significativamente a carga parasitária em comparação com animais não vacinados, no entanto, a produção de ovos foi reduzida em 69,7 % e a viabilidade dos ovos produzidos reduziu 80 % (McDougall, 2012). Um estudo em ovinos, mostrou que, uma combinação de catepsinas (L1 e L2) induziu 60% de proteção e quando utilizadas individualmente essa proteção era de (34 e 33 %) respetivamente (Molina-Hernández *et al.*, 2015). Outros estudos mostraram que a utilização de uma catepsina L1 demonstrou eficácia de 42 – 69 % em bovinos mas mostrou-se modesta em ovinos ficando nos 34 % (Toet *et al.*, 2014).

O antígeno FABP pertence a uma família de proteínas envolvidas na ligação e transporte de uma classe de ligantes hidrofóbicos através da membrana, e foi o primeiro antígeno purificado a ser testado numa vacina contra a fasciolose (McDougall, 2012). Uma mistura de várias isoformas de FABP tem demonstrado uma eficácia limitada contra a *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica*, sendo em bovinos (31 a 55 %) e em ovinos (24 a 42 %) (Toet *et al.*, 2014).

As aminopeptidases catalisam a remoção de aminoácidos do N – terminal de péptidos e proteínas (McDougall, 2012). LAP nativa e recombinante mostraram uma proteção de 49 a 89 % em dois ovinos. Este resultado é o melhor nível de proteção mostrado até ao momento por um antigénio e esta elevada eficácia pode estimular a comercialização de uma vacina (Toet *et al.*, 2014).

Outro antigénio secretado por parasitas adultos é a hemoglobina parasitária. Esta pode ser importante no transporte de oxigénio. A vacinação de bovinos com hemoglobina induziu uma proteção de 44 % e a viabilidade dos ovos produzidos teve uma redução de 60 % (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). Apesar de todos estes progressos ao longo das últimas décadas, ainda não existe uma vacina disponível no mercado.

3.8.11. Fasciolose em Portugal

O clima em Portugal favorece o desenvolvimento e propagação da *Fasciola hepatica*. As temperaturas amenas e a humidade permitem o desenvolvimento saudável dos ovos e a humidade presente nos meses de inverno promove a abundância do seu hospedeiro intermediário. A *Fasciola* exhibe uma preferência para as áreas ao redor dos grandes rios como o rio Tejo, Douro, Minho e Vouga. Também está presente em alguns microclimas no Alentejo, Beira Litoral e Algarve (Gavião, 2015). Em Portugal nunca foi realizado um estudo que englobasse todo o país, tendo sido alvo de estudo apenas algumas regiões. Do ponto de vista económico sabe-se que esta parasitose provoca enormes perdas, devido ao seu impacto no bem-estar e saúde animal, podendo afetar a viabilidade económica das explorações agrícolas afetadas (Roque, 2012). Os primeiros estudos foram realizados por Silva Leitão na década de 1950 que mostrou elevadas incidências de fasciolose bovina no norte do país (Costa, 2010). Um estudo realizado em 1989/1990 a 45 rebanhos de pequenos ruminantes nos concelhos de Mafra e Lourinhã mostraram que 30 % dos efetivos se encontrava infetado com *Fasciola hepatica*. Em 1996 foi realizado um estudo de prevalência de fasciolose nos matadouros de Aveiro e Vale de Cambra no qual foram quantificados os animais infetados provenientes dos concelhos de Vagos, Ílhavo e Estarreja, levando a concluir que existem animais infetados nestas zonas do país (Conceição, 2001 referido por Costa, 2010). Um estudo realizado por Maria Amélia Grácio (2011) nos matadouros de Leiria e Alcains, os quais receberam bovinos e ovinos do centro e sul do país, mostrou que existe fasciolose nos distritos de Castelo Branco,

Coimbra, Leiria, Santarém, Lisboa, Setúbal, Portalegre, Évora, Beja e Faro (Grácio, 2011). Um outro estudo realizado no concelho de Odemira, em bovinos provenientes de 4 explorações de regime extensivo, foi detetada uma prevalência de 3,7% através de técnicas serológicas, tendo a pesquisa de ovos de fasciola nas fezes sido negativa para todos os animais (Cardoso, 2010).

Um estudo realizado no Norte de Portugal e Noroeste de Espanha, mais precisamente no matadouro de Lugo (Espanha), onde semanalmente são abatidos cerca de 1300 animais (gado bovino) oriundos destas duas regiões, revelou uma prevalência de *Fasciola hepatica* de aproximadamente 28% (Arias *et al.*, 2011).

Num estágio realizado por Gavião (2013) durante os meses de novembro, dezembro, janeiro e fevereiro no Matadouro da Beira Litoral, as reprovações de fígados devido a fasciolose teve uma prevalência de 1,97% (para um total de 3253 bovinos abatidos) (Gavião, 2015).

Num estudo realizado por Santos (2011/2012) na Tapada de Mafra, foi demonstrado que a *Fasciola hepatica* continua a ser a maior preocupação sanitária nas populações de ungulados, estando presente em todas as populações, tendo no entanto maior relevância nos gamos. Dos 17 gamos caçados a *Fasciola hepatica* estava presente em 76,47%, dos 9 javalis caçados 55, 56% apresentou parasitas, já nos veados não foram encontrados quaisquer parasitas (Santos, 2013).

De referir que nos diferentes estudos anteriormente mencionados, os meios de diagnóstico utilizados não foram os mesmos, assim como as espécies utilizadas. A metodologia, as diferentes espécies e as diferentes dimensões das amostras utilizadas podem explicar a discrepância nos resultados obtidos nos variados estudos.

3.8.12. Fasciolose Humana

Estima-se que existam cerca de 40 milhões de pessoas infetadas por pelo menos umas das diferentes espécies de trematodes e várias infeções causadas por estes parasitas são re-emergentes. A fasciolose é causada principalmente pela *Fasciola hepatica* e em menor grau pela *Fasciola gigantica*. Esta é uma doença bastante importante, estando cerca de 17 milhões de seres humanos infetados e 180 milhões estão em risco de infeção. Em algumas regiões, a prevalência da infeção por fascíola é extremamente elevada,

particularmente na América do Sul (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2001), Egito e Irão, sendo relatadas prevalências de 72% em algumas comunidades do Altiplano Boliviano. Na maior parte dos países a fasciolose está sub-diagnosticada (Ashrafi *et al.*, 2015). O homem é um hospedeiro acidental, o ciclo de infecção na natureza mantém-se entre os animais (especialmente entre ovinos e bovinos) e os moluscos. Podendo então considerar-se que os animais podem ser vistos como reservatórios da infecção para o homem (Barriga, 2003). Em Portugal, é fundamentalmente o agrião (*Sisymbrium nasturtium aquaticum*), ingerido cru, o principal veículo para a parasitose humana, mas também a água bebida em local onde se encontrem moluscos parasitados pode conter metacercárias (Calretas *et al.*, 2003). Em França, onde o consumo de salada de agrião é muito comum (consumem-se cerca de 10 mil toneladas por ano), a infecção humana é mais frequente do que nos outros países europeus. Em certas ocasiões, a alface e outras plantas consumidas cruas podem estar contaminadas servindo como fonte de infecção assim como a água corrente (Gavião, 2015). O efeito na saúde do homem depende do número de parasitas e na duração da infecção. A migração das fascíolas através da parede intestinal e pelo peritoneu pode não causar manifestações clínicas. Por outro lado, as migrações pelo parênquima hepático podem causar lesões traumáticas, necróticas e inflamatórias cuja gravidade depende do número de parasitas. Nos ductos biliares a fascíola adulta causa proliferação celular no epitélio dos ductos, inflamação e fibrose (Barriga, 2003). Durante a fase aguda poucas vezes se suspeita desta patologia, a não ser em regiões hiperendémicas ou em casos de surtos epidémicos. A maioria dos pacientes é assintomática, ou apresenta sintomas inespecíficos. A principal sintomatologia compreende hepatomegalia, febre (aproximadamente 40°C), acentuada eosinofilia (60 a 80% de eosinófilos no sangue), dores abdominais e diarreia. Um quinto dos pacientes tem urticária, com dermatografismo, e alguns apresentam acessos de asma. Podem também apresentar alterações nas provas da função hepática e anemia. Na fase crónica os sintomas mais frequentes são: dor abdominal, geralmente localizada no epigástrio ou no hipocôndrio direito, com carácter de dor cólica, ou de outro tipo, com poucas evacuações diárias ou, em alguns casos, obstipação intestinal, anorexia e dispepsia. Muitas vezes existe perda de peso, um quadro de icterícia, esplenomegalia, prurido e urticária. Os eosinófilos geralmente também estão elevados (25-80%), anemia leve ou moderada. Agravamentos súbitos da evolução clínica costumam resultar de uma infecção biliar, ou de uma obstrução mecânica, por parasitas ou por cálculos, exigindo intervenção cirúrgica de urgência. Os casos fatais conhecidos estão

relacionados com elevada carga parasitária, na fase aguda, ou com acidentes hemorrágicos (Rey, 2002, referido por Roque, 2012).

Na literatura há opiniões de que doentes infetados com trematodes hepáticos podem desenvolver cancro no fígado, pâncreas e intestino (Khamidullin *et al.*, 2011). As manifestações clínicas são muito variáveis e inespecíficas, não permitindo, por si só, na maioria dos casos, chegar ao diagnóstico. Daí a importância dos dados epidemiológicos como os hábitos alimentares ou o tipo de ambiente em que os doentes vivem habitualmente (a *Fasciola hepatica*, pelas suas características, está mais associada ao ambiente rural). O diagnóstico pode ser confirmado com a presença de ovos nas fezes ou pesquisa de ovos no aspirado duodenal, por testes serológicos nomeadamente fixação do complemento, imunofluorescência, hemaglutinação indireta e ELISA, por fim os exames de imagem como a TAC ou a ecografia podem tornarem-se úteis. No tratamento têm sido utilizados fármacos, tais como o niclofolan, a emetina, o albendazole e o fenbendazole, com sucesso apenas em casos isolados, ou com efeitos secundários graves. O triclabendazol, foi utilizado pela primeira vez no tratamento da fasciolose humana em 1988. Desde essa data, têm sido relatados vários casos tratados com sucesso, tanto na literatura internacional como nacional (Calretas *et al.*, 2003). A lavagem das plantas para consumo é essencial como prevenção da fasciolose humana. Ao enxaguar as verduras durante 10 minutos em água corrente elimina apenas 50% das metacercárias, mas com ácido cítrico (10mL/L) ou vinagre comercial (120mL/L), ou sabão líquido (12mL/L), hipoclorito de sódio (2,5%) ou permanganato de potássio (24mg/L) vai separar ou eliminar na totalidade as formas parasitárias. O controlo da fasciolose animal eventualmente diminuiria a fasciolose humana (Barriga, 2003).

4. Estudo de Caso

4.1. Objetivos

A *Fasciola hepatica* é um parasita que provoca problemas de saúde e bem-estar animal, problemas económicos em explorações pecuárias atendendo aos elevados prejuízos produtivos, morte de animais e custos terapêuticos no tratamento e prevenção da morbilidade e, de tratando-se de uma zoonose, também é um problema de saúde pública. Dado o impacto que esta parasitose tem, torna-se necessário desenvolver metodologias e técnicas que permitam detetar a presença deste parasita, quer em animais quer em humanos, e assim melhor perceber o impacto que esta parasitose representa, em que locais procede à implementação de medidas adequadas ao controlo da fasciolose. A prevalência desta parasitose está provavelmente sub-estimada, devido à avaliação do parasitismo através testes coprológicos de sedimentação ser pouco frequente, pela inexistência de estudos epidemiológicos em explorações ou de registos pelos veterinários aquando do abate de animais. Em Portugal existem poucos estudos da prevalência da *Fasciola hepatica* nas explorações pecuárias, não sendo fácil por isso realizar bons planos estratégicos de erradicação da doença.

O principal objetivo deste estudo, no âmbito do mestrado integrado em medicina veterinária da Universidade de Évora foi o de contribuir para o estudo da fasciolose em pequenos ruminantes no Baixo Alentejo, principalmente ovinos e em menor percentagem em caprinos.

A nível laboratorial, foi realizada uma técnica de deteção de ovos utilizando um método qualitativo, de sedimentação, e procedeu-se à recolha de sangue para avaliação serológica da presença de anticorpos que permitam, como recurso a técnicas de maior sensibilidade perceber da adequada utilização do teste coprológico de sedimentação na avaliação do parasitismo por *Fasciola hepatica* em pequenos ruminantes no Alentejo.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Caracterização da região, das explorações e dos animais

O Baixo Alentejo faz parte da extensa região Alentejo, integrando 13 concelhos. Tem um clima mediterrâneo, sendo caracterizado por uma temperatura média anual elevada que oscila entre os 15°C e os 17°C, com uma temperatura mínima é de 9,7°C e a máxima de

23,6°C. A precipitação anual média é de 464,69 mm e esta é mal repartida ao longo do ano, verificando-se um excesso de água no inverno e acentuada carência no verão.

O Baixo Alentejo ocupa uma área de 8542,72 km², tem uma população de 124690 habitantes, no que resulta uma densidade populacional muito baixa, de apenas de 14,6 h/km² (INE, 2015; Beja digital, 2015), o que representando 1,2% da população portuguesa em 16% da área de Portugal.

As principais atividades económicas do Baixo Alentejo desenvolvem-se em torno da exploração mineira (pirites), da silvicultura, da exploração das espécies cinegéticas, da agropecuária, pastorícia e produtos derivados (Beja digital, 2015). Uma percentagem significativa do território alentejano tem utilização agrícola e florestal. São exemplos: o sequeiro intensivo nos Barros de Beja, o regadio e hortofloricultura na Lezíria do Tejo e Litoral Alentejano, os montados de sobro e azinho, entre outros. Apesar do potencial endógeno destes territórios, tem-se assistido a um processo de despovoamento intenso nas áreas rurais, contribuindo para o agravamento do contraste urbano/rural. Este fenómeno, além de colocar em risco o desaparecimento dos aglomerados de menor dimensão por falta de atratividade, causa igualmente o abandono rural e a consequente perda de carácter e identidade da paisagem. A implementação de investimentos estruturantes, de que o empreendimento de fins múltiplos do Alqueva é o exemplo mais eloquente, constitui uma oportunidade de inversão desta tendência, pela potenciação de um conjunto de atividades económicas, tais como, a fileira agroalimentar, as energias renováveis, o turismo, o ambiente, entre outras.

Segundo dados do INE (2013) o efetivo de pequenos ruminantes no Baixo Alentejo é de 511038 ovinos e 36693 caprinos, contribuindo assim, com 24,4% e 9,1% do efetivo nacional, respetivamente.

Para o presente trabalho foram utilizados 20 rebanhos, todos eles situados todos no Baixo Alentejo (figura 15), num total de 2640 animais, em que 85% foram rebanhos de ovinos e os restantes 15% dos animais correspondem a explorações de caprinos. No total dos 20 rebanhos, 55% destes tinha menos de 100 animais no seu efetivo. A seleção das explorações correspondeu a aceitar as que estavam incluídas na normal calendarização das ações médico veterinárias em curso durante o período de desenvolvimento do trabalho.

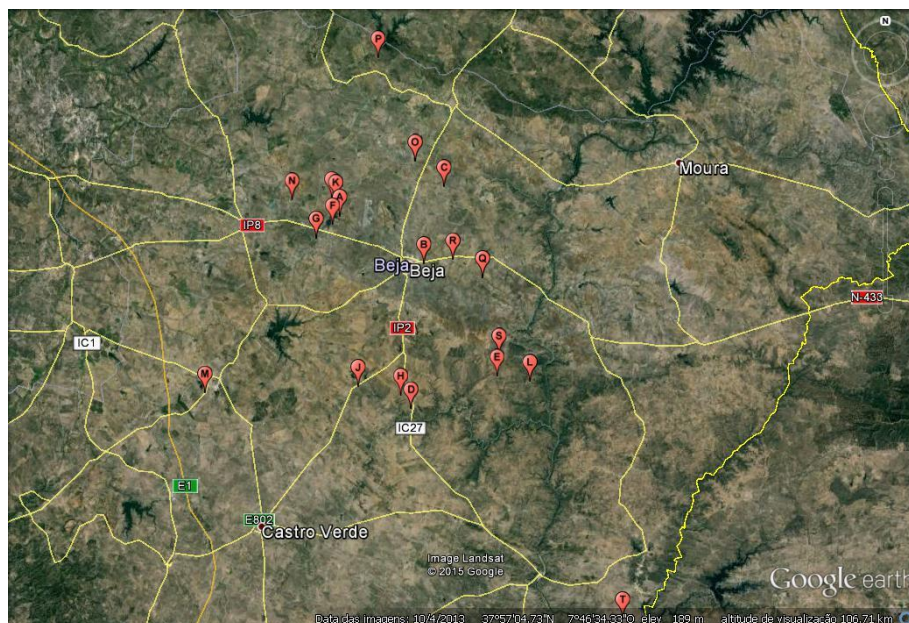


Figura 15 – Mapa de localização das explorações

4.2.2. Colheita de amostras

Foram colhidos dois tipos de amostras para o presente trabalho. As colheitas de sangue para pesquisa de anticorpos anti-*Fasciola hepatica* pelo método de ELISA e colheita de amostras fecais para pesquisa de ovos. As colheitas de amostras biológicas foram efetuadas a 15 animais de cada exploração, perfazendo um total de 300 animais. A recolha de amostras biológicas aos animais decorreu no período de 03 de Fevereiro a 11 de Abril de 2015.

Quanto às amostras de sangue (figura 16), foram colhidos aproximadamente 2 a 3 ml de sangue por animal para tubos sem anticoagulante, a partir da veia jugular, identificadas e imediatamente acondicionadas a 4°C. Posteriormente, já no laboratório, procedeu-se à centrifugação durante 45 minutos a 3,500 rpm e o soro foi armazenado a -20°C para posterior análise sorológica.

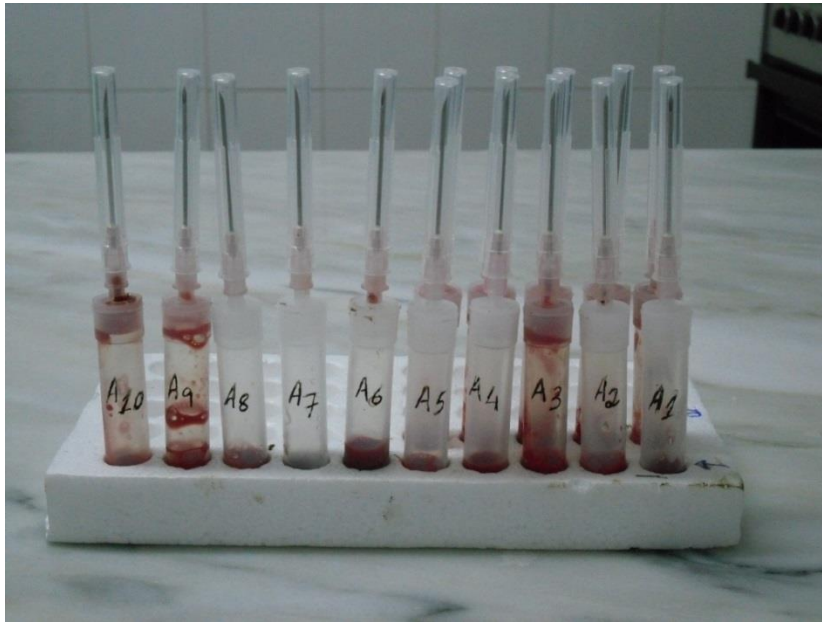


Figura 16 – Amostras de sangue em tubo sem anticoagulante

As colheitas de amostras fecais (figura 17) foram efetuadas diretamente da ampola rectal com recurso a luva de látex, com utilização única onde foram armazenadas (após inversão) e identificadas (com o nome da exploração e nº da amostra) as respetivas amostras de cada um dos 15 animais de cada exploração, perfazendo um total de 300 animais. Todas as amostras foram, ainda na exploração, acondicionadas numa arca térmica a 4°C e posteriormente analisadas em laboratório, num período máximo de 8 dias após a colheita.



Figura 17 – Amostras fecais em luva de latex

4.2.3. Processamento das amostras

4.2.3.1. Análise coprológica

O método utilizado neste estudo foi um método qualitativo, ou seja, atendendo à natureza dos ovos de *Fasciola hepatica*, recorreu-se ao método de sedimentação. Uma vez que os ovos de *Fasciola hepatica* são pesados e densos, tem grande dificuldade em flutuar, assim, esta técnica é a que melhores resultados obtém na pesquisa de ovos de *Fasciola hepatica*. O material necessário para realizar esta técnica é constituído por:

- a) amostra de fezes
- b) balança
- c) pinça
- d) copo de vidro
- e) copo cónico graduado de 250 ml
- f) passador de rede
- g) detergente
- h) placas de Petri

De modo a aumentar a sensibilidade da técnica de sedimentação no Laboratório de Parasitologia Victor Caeiro da Universidade de Évora optámos por adaptá-la e esta realiza-se da seguinte forma:

- Pesar 5 g (grama) de fezes, e num copo de vidro, adicionar água com detergente (loiça, por exemplo) a 0,2% e homogeneizar;
- Deitar num copo cónico graduado de 250 ml, o homogeneizado filtrando-o com o passador;
- Perfazer com água e detergente a 0,2% até aos 250 ml (figura18);
- Deixar repousar a solução 10 minutos;
- Rejeitar o sobrenadante e perfazer de novo até aos 250 ml, com água e detergente a 0,2%;
- Deixar repousar a solução durante 10 minutos;
- Rejeitar o sobrenadante, dividir o sedimento em quatro placas de Petri (figura 19) e observar ao microscópio estereoscópio (Leitz, M8) 40x (figura 20);

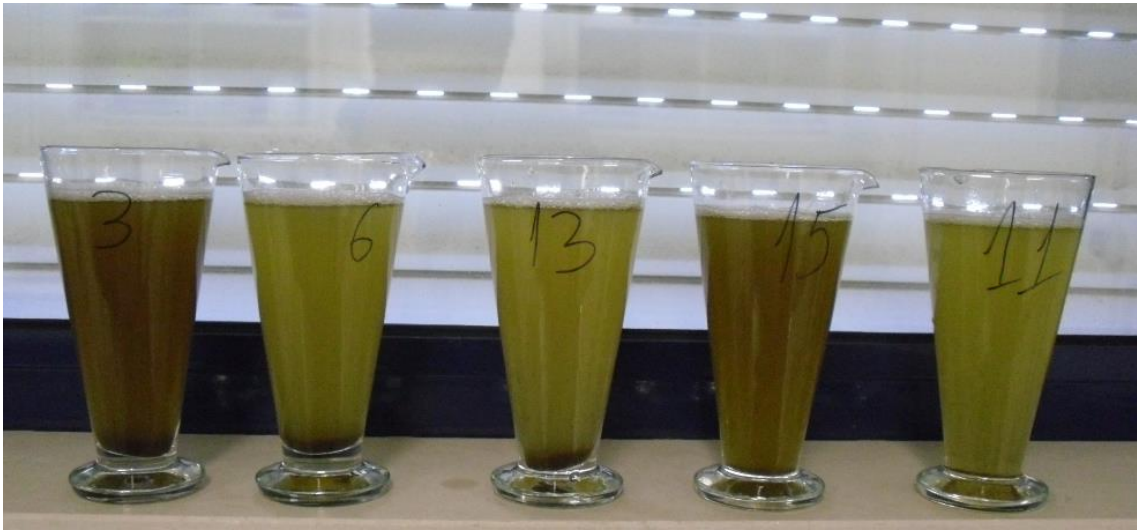


Figura 18 - Copo cónico graduado de 250 ml

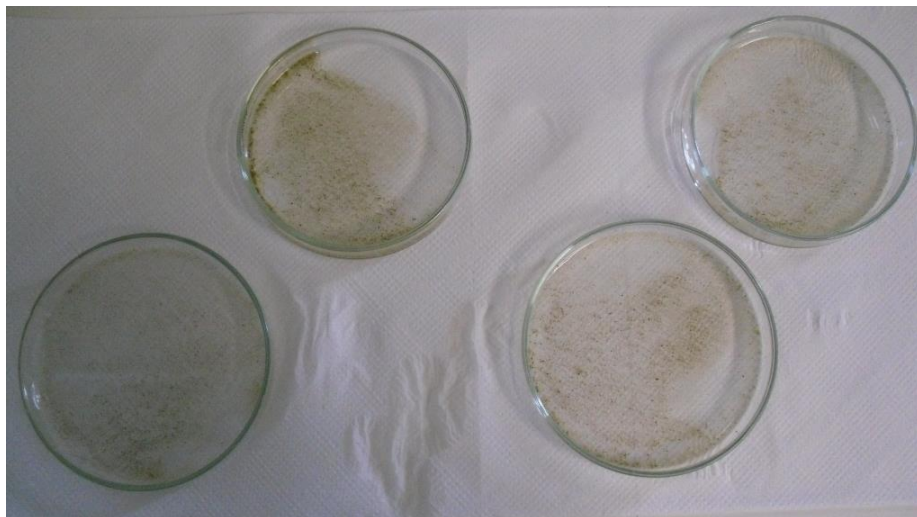


Figura 19 – Placas de Petri



Figura 20 - Microscópio estereoscópio para observação de ovos

4.2.3.2. Análise Serológica

Na análise sorológica foi utilizada uma técnica de ELISA indireto, de nome comercial “POURQUIER-ELISA Fasciola Hepatica Serum and Milk Verification”. Este teste utiliza um antígeno “f2” purificado a partir de extratos de *Fasciola*. Este antígeno é muito imunogénico e altamente específico para a *Fasciola hepatica*.

4.2.4. Tratamento e processamento de dados

No processamento de dados foi utilizado o software Microsoft Excel 2013® no registo dos dados referentes aos animais, explorações de origem e correspondentes resultados das análises coprológicas.

4.3. Resultados

Não foram observados ovos de trematodes em qualquer das análises coprológicas realizadas às amostras de fezes dos pequenos ruminantes presentes nas explorações do distrito de Beja.

No total dos 300 soros examinados, 99 % (297/300) foram negativos e 1% (3/300) foram positivos. Os três soros positivos pertenciam a animais de diferentes explorações. Dos três animais positivos um foi caprino e os restantes foram ovinos.

4.4. Discussão

Apesar de se terem utilizado cinco grama de fezes de cada animal, aumentando assim a probabilidade de se encontrarem ovos de trematodes, no presente trabalho não foi possível encontrar a presença de *Fasciola hepatica* no conjunto das explorações em estudo.

No caso de os animais se encontrarem parasitados, atendendo ao facto de a excreção de ovos nas fezes depender de fatores relacionados com o hospedeiro e o próprio parasita, por exemplo a espécie do hospedeiro, a alimentação, carga parasitária, duração da infeção. A eliminação de ovos não é constante e observa-se um aumento de eliminação de ovos durante a primavera e outono, podendo no entanto ocorrer durante todo o ano (Vázquez e Pérez, 2001).

Os ovinos e caprinos são espécies muito sensíveis ao parasitismo por *Fasciola hepatica*, desenvolvendo frequentemente um estado agudo da doença, no entanto a fasciolose crónica é a forma mais comum em ovinos e caprinos ocorrendo normalmente quatro a cinco meses após a ingestão de quantidades moderadas (200 a 500) de metacercárias.

Não sendo o Alentejo área geográfica onde as condições edafoclimáticas para a existência de *Galba truncatula*, não é muito espectável que a forma mais comum de expressão do parasitismo por *Fasciola hepatica* seja essa manifestação aguda da doença anteriormente referida.

A observação de ovos nas fezes, recorrendo a testes coprológicos diretos é a forma mais específica de definir se um animal está parasitado. No entanto as análises coprológicas não permitem detetar infeções na fase pré patente, ou seja, durante a migração dos parasitas através do parênquima hepático nem infeções com baixa intensidade, uma vez que a eliminação é escassa e a postura pode ser irregular e passar despercebida, também pela libertação irregular de bílis pela vesícula biliar, onde os ovos se encontram (Dorchies, 2015). Deste modo os resultados negativos de exames coprológicos individuais não permitem excluir a infeção por *Fasciola hepatica*, mesmo que sejam realizados numa

dezena de indivíduos do efetivo (Happich e Boray 1969). Os métodos coprológicos utilizados apresentam algumas desvantagens em relação a outros métodos de diagnóstico, estes, só detetam ovos nas fezes a partir da 10^a-11^a semanas pós infecção, além disso têm uma baixa sensibilidade (30%), o que pode dar origem a falsos negativos (Şimşek et al. 2006). Costa (2010) demonstrou no seu estudo que de todos os animais aos quais foram colhidas fezes para pesquisa de ovos de *Fasciola hepatica* obtiveram resultados negativos 100%, comparando com o método serológico que revelou 100% dos animais positivos. Por outro lado, 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. Por tudo anteriormente referido e pelos motivos anteriormente mencionados e atendendo a que o período de recolha das amostras foi bastante curto não podemos afirmar que nas explorações estudadas não esteja presente a infecção parasitária por *Fasciola hepatica*.

Ainda que ao nível de explorações os resultados positivos na sorologia não tenham sido muito expressivos (apenas 1 animal por exploração), 15% das explorações com reações positivas ao teste ELISA, permite-nos sugerir que a infecção parasitária por *F. hepatica*, ainda que não predominem na região, pode ter mais importância que a que presentemente lhe é atribuída.

4.5. Conclusão

Ainda que na região em estudo (Baixo Alentejo) não predominem terrenos de regadio e a pluviosidade seja baixa e para além do Outono e inverno pouca chuva ocorra a sul do Tejo, diminuindo as condicionantes edafoclimáticas que favorecem a existência do hospedeiro intermediário, na verdade em muitas explorações agrícolas existem pequenos nichos (em redor de alguns ribeiros, barragens, ambientes mais húmidos) onde a *Fasciola hepatica* encontra condições para a sua existência. Não esquecendo dois fatores muito importantes, temperatura e humidade, estando assim reunidas condições para o aparecimento de alguns surtos de fasciolose no Baixo Alentejo ou, a existência de parasitismo em níveis que não apresentam sinais clínicos na maioria dos animais parasitados.

É provável, atendendo à boa condição corporal que os efetivos apresentavam que, mesmo podendo estar presente o parasitismo por *Fasciola hepatica*, em verdade e atendendo à natureza aguda que este representa para pequenos ruminantes, não aconteça com grande

número de parasitas, justificando assim a ausência de ovos nas fezes. Pois parece ter de ocorrer um mínimo de adultos de *Fasciola hepatica* nos canais biliares para que a eliminação de ovos seja detetada em contagem fecal (Dorchies, 2015).

As explorações de caprinos são normalmente explorações extensivas, com terrenos mais pobres em termos de pastagens, mais inclinados, mais áridos, conjuntamente com hábitos de ingestão arbustivos que estes animais possuem. Os caprinos apresentam ainda menores probabilidades de se encontrarem parasitados na área geográfica e condições em que se encontraram no Baixo Alentejo, ainda que, em explorações intensivas de aptidão leiteira, sendo o caso de duas das três explorações de caprinos estudadas neste trabalho, nas quais, aos animais possa ser fornecido alimento forrageiro recém-cortado, pastorear em zonas de regadio ou que em determinada fase do ciclo produtivo (animais jovens, adultos no período seco) pastoreiem por terrenos onde existam condições ao desenvolvimento de *Fasciola hepatica*, a probabilidade do aparecimento de surtos de fasciolose aumente significativamente.

Apesar de ser um método simples e rápido de efetuar, a coprologia não é o método mais sensível para o diagnóstico de fasciolose. Os métodos coprológicos podem ser modificados de forma a melhorar a sensibilidade dos mesmos. No entanto, mesmo que tivessem uma elevada sensibilidade, estes testes não têm utilidade para o diagnóstico de infeções recentes, o que pode ser importante e decisivo para o sucesso do tratamento e recuperação das lesões de animais doentes. Muitas vezes os animais afetados não apresentam sinais clínicos evidentes. No entanto podem ser significativas as quebras de produção o que pode resultar em perdas económicas significativas. É importante avaliar e monitorizar o parasitismo em explorações pecuárias, existindo em Portugal muito poucos estudos nesse sentido. E, o caso concreto do parasitismo por *Fasciola hepatica* não deve ser negligenciado.

Bibliografia

Allen D., Anderson D., Jeffcott L., Quesenberry K., Radostits O., Reeves P. e Wolf A., (2007) Manual Merck de Veterinária, (6 ed.), pp. 1128-1130;1166-1175.

Alvarez Rojas, Cristian A., Aaron R. Jex, Robin B. Gasser, e Jean-Pierre Y. Scheerlinck. (2014). «Techniques for the Diagnosis of Fasciola Infections in Animals: Room for Improvement». *Advances in Parasitology* 85: 65–107. doi:10.1016/B978-0-12-800182-0.00002-7.

Alves M., Benesi F., Gregory L., Libera A., Sucupira M., Pogliani F. e Gomes V., (2013) Prolapso vaginal e uterino em ovelhas. *Pesquisas veterinárias do Brasil*, 33:171-176

Andrews, S.J. (1999). The life cycle of *Fasciola hepatica*. In J.P. Dalton (Ed.), *Fasciolosis*. Cambridge: CAB INTERNATIONAL, pp. 1-21.

Apifarma (2015). Simposium Veterinário Apifarma. Acedido a 19/06/2015; disponível em:<http://www.apifarma.pt/simposiumvet/Paginas/Pesquisaavancada.aspx>.

Arias M., Lomba C., Dacal V., Vázquez L., Pedreira J., Francisco I., Piñeiro P., et al. (2011). «Prevalence of Mixed Trematode Infections in an Abattoir Receiving Cattle from Northern Portugal and North-West Spain». *The Veterinary Record* 168 (15): 408. doi:10.1136/vr.d85.

Arroyo R., Mora J., Molina S., Troper L., e Amador A., (1981). «Fascioliasis hepática humana en Costa Rica». *Revista Costarricense de Ciencias Médicas* 2 (1): 35–57.

Arthur G.H., Noakes D.E. y Pearson H. (1991). Reproducción y obstetricia en Veterinaria. (6 ed.) Interamericana-McGraw Hill, Madrid, pp. 325-328

Ashrafi K., Saadat F., O'Neill S., Rahmati B., Tahmasbi H., Dalton J. P., Nadim A., Asadinezhad M., e Rezvani S. M., (2015). «The Endemicity of Human Fascioliasis in Guilan Province, Northern Iran: The Baseline for Implementation of Control Strategies». *Iranian Journal of Public Health* 44 (4): 501–11.

ASP, (2015) Australian Society for Parasitology. Acedido a 8/05/2015; disponível em: <http://parasite.org.au/para-site/text/fasciola-text.html>.

Barriga, O. O. (2003). Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. Tercera edición. Volumen III – Parasitosis. Publicacion científica y Técnica no. 580, pp131 - 139;

Beckham S. A., Law R., Smooker P. M., Quinsey N. S., Caffrey C. R., McKerrow J. H., Pike R. N., e pithill T. W., (2006). «Production and Processing of a Recombinant Fasciola Hepatica Cathepsin B-like Enzyme (FhcatB1) Reveals Potential Processing Mechanisms in the Parasite». *Biological Chemistry* 387 (8): 1053–61. doi:10.1515/BC.2006.130.

Beckham S. A., Piedrafita D., Phillips C. I., Samarawickrema N., Law R., Smooker N., Quinsey N., 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 (7): 1601–12. doi:10.1016/j.biocel.2009.02.003.

Beja digital (2015). Acedido a 06/07/2015; disponível em:<http://www.bejadigital.biz/pt/conteudos/territorial/caracterizacao+do+distrito/>

Berry, C. I., e J. D. Dargie. (1976). «The role of host nutrition in the pathogenesis of ovine fascioliasis». *Veterinary Parasitology* 2 (4): 317–32. doi:10.1016/0304-4017(76)90061-3.

Boray, J. e Murray G. (1999). Liver fluke disease in sheep and cattle. NSW Agriculture. [http://www.wormboss.com.au.sci-hub.org/files/pages/worms/flukes/liver fluke/Prime_Fact_446___Liver_fluke_disease_in_sheep_and_cattle.pdf](http://www.wormboss.com.au.sci-hub.org/files/pages/worms/flukes/liver%20fluke/Prime_Fact_446___Liver_fluke_disease_in_sheep_and_cattle.pdf).

Bowman, D.D. (2004). *Georgis Parasitologia para veterinarios*. (8th ed.). Madrid: Elsevier, pp. 100, 121-128.

Brennan, G. P., I. Fairweather, A. Trudgett, E. Hoey, null McCoy, M. McConville, M. Meaney, et al. (2007). «Understanding Triclabendazole Resistance». *Experimental and Molecular Pathology* 82 (2): 104–9. doi:10.1016/j.yexmp.2007.01.009.

Brockwell Y. M., Elliott T., Anderson G., Stanton R., Spithill T., e Sangster N., (2014). «Confirmation of Fasciola Hepatica Resistant to Triclabendazole in Naturally Infected Australian Beef and Dairy Cattle». *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance* 4 (1): 48–54. doi:10.1016/j.ijpddr.2013.11.005.

Brownlee, D. J., G. P. Brennan, D. W. Halton, I. Fairweather, e C. Shaw. (1994). «Ultrastructural Localisation of FMRamide- and Pancreatic Polypeptide-Immunoreactivities within the Central Nervous System of the Liver Fluke, *Fasciola Hepatica* (Trematoda, Digenea)». *Parasitology Research* 80 (2): 117–24.

Calretas, S., Laiz, M., Simao, A., Carvalho, A., Rodrigues, A, Sá, A., Santos, A., Santos, R., Silva, J.A.P., Reis, C., Almiro, E., Porto, A. (2003). Seis casos de fasciolíase hepática. Hospital Universitário de Coimbra.

Cancela M., Acosta D., Rinaldi G., Silva E., Durán R., Roche I., Zaha A., Carmona C., e Tort J.F. (2008). «A Distinctive Repertoire of Cathepsins Is Expressed by Juvenile Invasive *Fasciola Hepatica*». *Biochimie* 90 (10): 1461–75. doi:10.1016/j.biochi.2008.04.020.

Cardoso J., (2010). Contribuição para o estudo do parasitismo gastrointestinal e hepático em bovinos de carne em regime extensivo no Concelho de Odemira. Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, pp.86-87.

CDC, (2015). Centers for Disease Control and Prevention. Fascioliasis. Acedido 7/05/2015; disponível em: <http://www.cdc.gov/dpdx/fascioliasis/>.

CFSPH, (2009a) “Sheep Scab - The Center for Food Security and Public Health”, Acedido em (12/12/2015); disponível em: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/psoroptes_ovis.pdf

CFSPH, (2008b) “Bovine Babesiosis - The Center for Food Security and Public Health”, Acedido em (15/12/2015); disponível em: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_babesiosis.pdf

Chandra. G., (2015). *Fasciola hepatica* – The Liver Fluke Acedido a 20/04/2015; disponível em: <http://www.iaszoology.com/fasciola-hepatica/>.

Conceição M., Costa I., Castro A., Louzã A.C., e Costa J. C., (2004). «Herd-Level Seroprevalence of Fasciolosis in Cattle in North Central Portugal». *Veterinary Parasitology* 123 (1-2): 93–103. doi:10.1016/j.vetpar.2004.04.012.

Cordero del Campillo M., (2001). Historia de la parasitología. Parasitología y enfermedades en la formación del veterinário. In *Parasitología Veterinaria*, (1ª ed) Cordero del Campillo M., Rojo Vázquez F. A., Martines Fernández A. R., Sánchez Acedo

C., Hernández Rodríguez S., Navarrete López-Cozar I., Díez Baños P., Quiroz Romero H. & Carvalho Varela M., Madrid, España: McGraw-Hill-Interamericana de España, S. A. U., pp. 11.

Costa A. (2010) Fasciolose bovina : aspectos clínicos e epidemiológicos no Alentejo. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, pp.18, 37, 47-48.

Cwiklinski K., Allen K., LaCourse J., Williams D., Paterson S., e Hodgkinson J., (2015). «Characterisation of a Novel Panel of Polymorphic Microsatellite Loci for the Liver Fluke, Fasciola Hepatica, Using a next Generation Sequencing Approach». Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases 32 (Junho): 298–304. doi:10.1016/j.meegid.2015.03.014.

Decreto-Lei nº 114/99, Diário da República nº 114, I série A de 14 de Abril, INCM, Portugal, 1999.

Decreto-Lei nº 222/2012, Diário da República nº 199, 1.ª série de 15 de outubro, INCM, Portugal, 2012

Decreto-Lei nº 244/2000, Diário da República nº 224, I série A de 27 de Setembro, INCM, Portugal, 2000.

Decreto-Lei nº 272/2000, Diário da República nº 258, I série A de 8 de Novembro, INCM, Portugal, 2000.

Deniz A. (2009). Coccidiose Ovina - Revisão Bibliográfica. Acedido em 10/12/2015; disponível em: http://www.bayervet.com.pt/export/sites/bayervetpt/pt/_galleries/pics_new/Alb_3_2009_TCapa1.pdf

DGAV, (2015a). Direção Geral de Alimentação e Veterinária. Tuberculose bovina. Acedido a 25-11-2015 em: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=19058&generico=19042&cboui=19042>

DGAV, (2015b) Direção Geral de Alimentação e Veterinária. Brucelose Bovina. Acedido a 25-1-2015 em: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=18550&generico=18472&cboui=18472>

DGAV, (2015c) Direção Geral de Alimentação e Veterinária. Leucose enzoótica bovina. Acedido a 25-11-2015 em: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=18650&generico=18651&cboui=18651>

DGAV, (2015d) Direção Geral de Alimentação e Veterinária Brucelose dos pequenos ruminantes. Acedido a 25-1-2015 em: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=18457&generico=18471&cboui=18471>

DGAV, (2015e) Direção Geral de Alimentação e Veterinária. Doença de Aujeszky. Acedido a 25-1-2015 em: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=5686039&generico=5849894&cboui=5849894>

Dixit A. K., Dixit P., e Sharma R. L., (2008). «Immunodiagnostic/protective Role of Cathepsin L Cysteine Proteinases Secreted by Fasciola Species». *Veterinary Parasitology* 154 (3-4): 177–84. doi:10.1016/j.vetpar.2008.03.017.

Dorchies P. (2015). «Flukes: old parasites but new emergence». Acedido a 11/06/2015 em: http://www.ivis.org/proceedings/wbc/wbc2006/dorchies.pdf?origin=publication_detail&ntified.

Edmondson M. A., Roberts J. F. e Baird A. N., (2012) Theriogenology of sheep and goats. *In* Sheep and goat medicine. Pugh, D.G. & Baird, A., Elsevier Saunders, Missouri, USA, pp. 198-201.

Fairweather I., e Boray J. C., (1999). «Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance and Its Management». *Veterinary Journal* (London, England: 1997) 158 (2): 81–112. doi:10.1053/tvj.1999.0377.

FAO, (2015). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Manual on meat inspection for developing countries. CHAPTER 5: SPECIFIC DISEASES OF SHEEP AND GOATS. Acedido a ; disponível em: <http://www.fao.org/docrep/003/t0756e/t0756e06.htm>.

Fiss L., Adrien M., Marcolongo-Pereira C., Assis-Brasil N., Sallis E., Riet-Correa F., Ruas J., e Schild A., (2013). «Subacute and Acute Fasciolosis in Sheep in Southern Brazil». *Parasitology Research* 112 (2): 883–87. doi:10.1007/s00436-012-3096-2.

Flores-Ramos M., Ibarra-Velarde F., Hernández-Campos A., Montenegro Y., Jung-Cook H., Cantó-Alarcón G., Misael del Rivero L., e Castillo R., (2014). «A Highly Water Soluble Benzimidazole Derivative Useful for the Treatment of Fasciolosis». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24 (24): 5814–17. doi:10.1016/j.bmcl.2014.10.017.

Gavião A., (2015). Impacto da fasciolose em inspeção higio-sanitária de bovinos. Tese de mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Universidade de Trás-os-Montes e Alto-Douro, Portugal, pp.44-45.

Gomes C., (2012). Fasciolose em bovinos de engorda. Tese de mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, pp.5, 16-17, 21-24,26-27.

González M. Y. M., (2001). Trematodos. In *Parasitología Veterinaria*, (1ª ed) Cordero del Campillo M., Rojo Vázquez F. A., Martines Fernández A. R., Sánchez Acedo C., Hernández Rodríguez S., Navarrete López-Cozar I., Díez Baños P., Quiroz Romero H. & Carvalho Varela M., Madrid, España: McGraw-Hill-Interamericana de España, S. A. U., pp. 85-101.

Griffin D., Chengappa M. M., Kuszak J., Mcvey D. S., (2010) Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.04.004.

Happich F. A., e Boray J. C., (1969). «Quantitative Diagnosis of Chronic Fasciolosis. 1. Comparative Studies on Quantitative Faecal Examinations for Chronic Fasciola Hepatica Infection in Sheep». *Australian Veterinary Journal* 45 (7): 326–28.

Harris R. E., e Charleston W. A., (1971). «Control of Fascioliasis--Some Theoretical and Practical Considerations». *New Zealand Veterinary Journal* 19 (4): 65–72. doi:10.1080/00480169.1971.33934.

Hilbe, M., N. Robert, A. Pospischil, e C. Gerspach. (2015). «Pulmonary Arterial Lesions in New World Camelids in Association With *Dicrocoelium dendriticum* and *Fasciola hepatica* Infection». *Veterinary Pathology*, Janeiro. doi:10.1177/0300985814564978.

Hodasi J. K., (1976). «The Effects of Low Temperature on *Lymnaea truncatula*». *Zeitschrift Für Parasitenkunde (Berlin, Germany)* 48 (3-4): 281–86.

Hurtrez-Boussès S., Meunier C., Durand P., e Renaud F., (2001). «Dynamics of Host-Parasite Interactions: The Example of Population Biology of the Liver Fluke (*Fasciola Hepatica*)». *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 3 (10): 841–49.

Hussein A., Hassan I., e Khalifa R., (2010). «Development and Hatching Mechanism of *Fasciola* Eggs, Light and Scanning Electron Microscopic Studies». *Saudi Journal of Biological Sciences* 17 (3): 247–51. doi:10.1016/j.sjbs.2010.04.010.

INE (2013). Instituto Nacional de Estatística; Anuário Estatístico da Região Alentejo em 2012. Acedido a 06-07-2015; disponível em: http://www.ine.pt/ngt_server/attachfileu.jsp?look_parentBoui.

Jong, Y.S.D.M. (2012). *Fauna Europaea*. Acedido a 14/05/2015; disponível em: <http://www.faunaeur.org/index.php>.

Keiser J., e Utzinger J., (2009). «Food-Borne Trematodiasis». *Clinical Microbiology Reviews* 22 (3): 466–83. doi:10.1128/CMR.00012-09.

Khamidullin R. I., Aglullin I. R., Rakhmanin I.A., Pogorel'tsev V.I., Khamidullin A.R., Galkina I.V., Khamidullin I.R., e Sultanaeva E.G., (2011). «Parasitic factor and cancer». *Gigiena I Sanitariia*, n. 6 (Dezembro): 8–11.

Lagares A., (2008) *Parasitoses em Pequenos Ruminantes na Região da Cova da Beira*. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, pp.48.

Lalman D., (1997). *Pinkeye in cattle infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK)*, Division of agricultural sciences and natural resources, Oklahoma state university, F-9128.

Lapage G., (1979) *Parasitologia Veterinaria*, (1ª ed.), Companhia Editorial Continental, S.A., México, pp.235-245.

Lima J.D., (2004). *Coccidiose dos ruminantes domésticos*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13, 9-13.

Lopes D. D., (2012). *Parasitoses externas em pequenos ruminantes*. In Mendonça A. (Eds) *Guia sanitário para criadores de pequenos ruminantes*. Instituto Politécnico de Bragança. ISBN 978-972-745-137-1, pp. 145-149.

Lopez D.F. e Ayensa M.C., (1996). *Diagnostico*. *Aula Veterinária Ovis*, 45, 41-47.

Lopez D.F., (1996). Patologia y clinica. Aula Veterinária Ovis, 45, 31-39.

Grácio M., Santos I., (2011). «PRELIMINARY SURVEY OF ANIMAL FASCIOLIASIS IN PORTUGUESE ABATTOIRS». Acta Parasitologica Portuguesa Vol.18 (1-2).

Magalhães A., (2012) Hemoparasitoses em Bovinos na Região de Portalegre. Relatório de Estágio do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Universidade do Porto, Portugal, pp. 9-12.

Margarido S., Neto D. e Ferreira F., (2008) Doenças respiratórias dos bovinos. Revista científica eletrónica de Medicina Veterinária10: 1-6.

Martínez Fernández A. R. y Cordero del Campillo, M., (2001). El parasitismo y otras asociaciones biológicas. Parásitos y hospedadores. In *Parasitología Veterinaria*, (1ª ed) Cordero del Campillo M., Rojo Vázquez F. A., Martines Fernández A. R., Sánchez Acedo C., Hernández Rodríguez S., Navarrete López-Cozar I., Díez Baños P., Quiroz Romero H. & Carvalho Varela M., Madrid, España: McGraw-Hill-Interamericana de España, S. A. U., pp. 25.

McDougall H.C., (2012) Identifying “hidden” antigens in the liver fluke, *Fasciola hepatica*. Thesis of Doctor of Philosophy, The University of Glasgow, Scotland, pp 34-40.

McKinstry B., Fairweather I., Brennan G.P., e Forbes A.B., (2003). «*Fasciola Hepatica*: Tegumental Surface Alterations Following Treatment in Vivo and in Vitro with Nitroxylnil (Trodat)». *Parasitology Research* 91 (3): 251–63. doi:10.1007/s00436-003-0930-6.

Meana A. y Rojo Vázquez F. A., (2001). Parasitosis cutáneas y afines. Sarnas. In *Parasitología Veterinaria*, (1ª ed) Cordero del Campillo M., Rojo Vázquez F. A., Martines Fernández A. R., Sánchez Acedo C., Hernández Rodríguez S., Navarrete López-Cozar I., Díez Baños P., Quiroz Romero H. & Carvalho Varela M., Madrid, España: McGraw-Hill-Interamericana de España, S. A. U., pp. 405.

Mekroud A., Chauvin A., e Rondelaud D., (2007). «Variations of biological indicators as highly presumptive markers for fasciolosis in experimentally-infected sheep». *Revue Med Vet* 158: 437–41.

Mitchell G. (2002) «Update on fasciolosis in cattle and sheep». In Practice 24 (7): 378–85.

Molina-Hernández V., Mulcahy G., Pérez J., Martínez-Moreno A., Donnelly S., O’Neill S., Dalton J. P., e Cwiklinski K., (2015). «Fasciola Hepatica Vaccine: We May Not Be There yet but We’re on the Right Road». Veterinary Parasitology 208 (1-2): 101–11. doi:10.1016/j.vetpar.2015.01.004.

NADIS, (2015). National Animal Disease Information Service; Liver Fluke Control in Sheep. Acedido a 12/06/2015; disponível em: <http://www.nadis.org.uk/bulletins/liver-fluke-control-in-sheep.aspx>.

NatureSpot, (2015). Dwarf Pond Snail - *Galba truncatula*. Acedido a 14/05/2015; disponível em: <http://www.naturespot.org.uk/species/dwarf-pond-snail>

Novobilský A., Engström A., Sollenberg S., Gustafsson K., Morrison D., e Höglund J., (2014). «Transmission Patterns of Fasciola Hepatica to Ruminants in Sweden». Veterinary Parasitology 203 (3-4): 276–86. doi:10.1016/j.vetpar.2014.04.015.

Pajares T., (1997). Detección de Coproantígenos de Fasciola hepatica en Ovinos y Bovinos Mediante un método de ELISA.

Pancieria R. J., Confer A. W., (2010) Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.04.001.

Paredes P., (2010) Coccidiose em Pequenos Ruminantes. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, pp. 10-11, 27-28.

Plummer P.J., Plummer C.L. e Still K. M., (2012) Diseases of the respiratory system. In Sheep and goat medicine. Pugh, D.G. & Baird, A., Elsevier Saunders, Missouri, USA, pp. 126-139.

Ogilvie T., Pringle J., Ihle S., (1998). Large animal internal medicine. First edition; Lippincott Williams and Wilkins, United States, pp. 285-299.

Radostits O. M., Gay C.C., Blood D. C., Hinchcliff K.W., (2000). Veterinary Medicine (9th ed.). A textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses. Diseases caused by *Haemophilus* and *Moraxella spp.*, WB Saunders, 891-892.

Rojo-Vázquez F. A., Meana A., Valcárcel F., e Martínez-Valladares M., (2012). «Update on Trematode Infections in Sheep». *Veterinary Parasitology* 189 (1): 15–38. doi:10.1016/j.vetpar.2012.03.029.

Rojo Vázquez F. A. y Ferre Pérez I., (2001). Parasitosis hepáticas. Fasciolosis. In *Parasitología Veterinaria*, (1ª ed) Cordero del Campillo M., Rojo Vázquez F. A., Martines Fernández A. R., Sánchez Acedo C., Hernández Rodríguez S., Navarrete López-Cozar I., Díez Baños P., Quiroz Romero H. & Carvalho Varela M., Madrid, España: McGraw-Hill-Interamericana de España, S. A. U., pp. 260-271.

Roque C. (2012) Estudo preliminar para a estimativa da prevalência de infeções e coinfeções, aparentes e não aparentes, causadas por helmintas em animais abatidos em matadouros de Portugal. Tese de Mestrado em Ciências Biomédicas, Universidade Nova de Lisboa, Portugal, pp.33.

Santos D., (2013) Caracterização do Parasitismo de Ungulados Silvestres e aspetos da sua Epidemiologia na Tapada Nacional de Mafra, Concelho de Mafra, Portugal. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, pp.49-52.

Silva E., Castro A., Lopes A., Rodrigues A., Dias C., Conceição A., Alonso J., et al. (2004). «A Recombinant Antigen Recognized by Fasciola Hepatica-Infected Hosts». *The Journal of Parasitology* 90 (4): 746–51. doi:10.1645/GE-136R.

Simões J. e Quaresma M., (2003) Prolapsos uterinos em ruminantes. *Medicina veterinária*, 54: 30-37.

Şimşek S., Köroğlu E., Ütük A.E., 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 (4): 411–15.

Smith B. P., (2009) Diseases of the respiratory system. In *Large animal internal medicine*, 4ª Ed, Mosby Elsevier, pp. 602.

Stanford University, (2015). Acedido a 29/04/2015; disponível em: <http://web.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2001/fascioliasis/Fasciola.htm> 29/4/15.

Taylor J. D., Fulton R. W., Lehenbauer T. W., Step D. L., Confer A. W., (2010) "The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors?" *The Canadian veterinary journal*, 51(10), 1095-102

Taylor M.A., Coop R.L., e Wall R.L., (2007). *Veterinary Parasitology*. (3th ed.). Oxford: Blackwell Publishing, pp. 201-208.

Toet H., Piedrafita D., e Spithill T., (2014). «Liver Fluke Vaccines in Ruminants: Strategies, Progress and Future Opportunities». *International Journal for Parasitology* 44 (12): 915–27. doi:10.1016/j.ijpara.2014.07.011.

UNAM, (2015). Universidad Nacional Autónoma de México. Acedido a 13/04/2015; disponível em: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/fasciolosis.html>.

University of Pennsylvania, (2015). Acedido a 20/04/2015; disponível em: <http://cal.vet.upenn.edu/projects/parasit06/website/lab6new2009.htm>.

Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A.M. e Jennings F.W., (1998). *Parasitologia Veterinária*. (2ª ed.), GUANABARA KOOGAN S.A., pp. 88-99, 210-213.

Whittier W., Currin J., Currin N., (2009) Pinkeye in Beef Cattle. *Large Animal Clinical Sciences*, Virginia Tech, 400-750

Wolstenholme J., Fairweather I., Prichard R., Samson-Himmelstjerna G., e Sangster N., (2004). «Drug Resistance in Veterinary Helminths». *Trends in Parasitology* 20 (10): 469–76. doi:10.1016/j.pt.2004.07.010.

Yildirim A., Ica A., Duzlu O., e Inci A., (2007). «Prevalence and risk factors associated with *Fasciola hepatica* in cattle from Kayseri province, Turkey». *Revue de médecine vétérinaire* 158 (12): 613.