

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

Investigação na Área das Doenças Infecciosas e Parasitárias

Lara Gabriela Correia Augusto

Orientador(es) | Isabel Curralo Lopes de Carvalho

Jacinto José Carneiro Gomes

Ana Cláudia do Souto Gonçalves Norte

Elsa Maria Leclerc Duarte

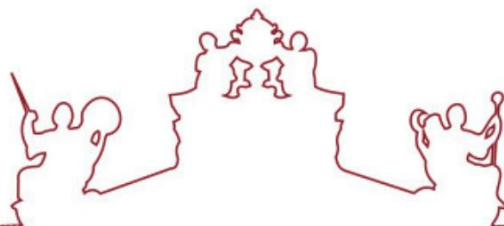
Évora 2019

---

---

---

---



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

Investigação na Área das Doenças Infecciosas e Parasitárias

Lara Gabriela Correia Augusto

Orientador(es) | Isabel Curralo Lopes de Carvalho

Jacinto José Carneiro Gomes

Ana Cláudia do Souto Gonçalves Norte

Elsa Maria Leclerc Duarte

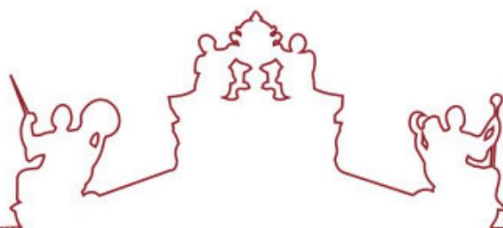
Évora 2019

---

---

---

---



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Rita Payan Carreira (Universidade de Évora)

Vogal | Helder Carola Espiguinha Cortes (Universidade de Évora)

Vogal-orientador | Elsa Maria Leclerc Duarte (Universidade de Évora)

## **Agradecimentos**

Aos meus pais pelo apoio incondicional, pelos conselhos, pela paciência, pelo suporte e orientação.

Aos meus irmãos, tios (as), primos (as) e avós porque a família é a única base constante que temos na vida e representa aqueles com quem podemos sempre contar.

Aos meus amigos, tanto aqueles que me conhecem desde o ensino básico até aqueles que só conheci na universidade. Os amigos são a família que escolhemos.

A todos os médicos veterinários, professores, auxiliares e técnicos com quem tive a oportunidade de me cruzar no caminho e que partilharam o seu tempo comigo transmitindo-me conhecimentos e ensinamentos essenciais.

A todos os que contribuíram para a realização deste trabalho, nomeadamente à Professora Doutora Elsa Duarte, à Doutora Isabel Carvalho, à Doutora Cláudia Norte, ao Doutor Jacinto Gomes e a todo o pessoal do CEVDI e INIAV. Sem vocês nada disto seria possível.

A todos aqueles que sempre acreditaram mas também aos que duvidaram: esta é a prova de que com foco, determinação e perseverança tudo se consegue.

“Sabemos muito mais do que achamos e podemos muito mais do que imaginamos.”

José Saramago

A todos, um sincero obrigada.

## Resumo - Investigação na Área das Doenças Infeciosas e Parasitárias

Esta dissertação descreve o trabalho de investigação realizado durante os estágios no Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, de Outubro a Dezembro de 2018 e no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, de Janeiro a Abril de 2019.

No primeiro estágio o objetivo era estudar quais as amostras biológicas de colheita pouco invasiva (sangue total, penas e biópsias de pele) que permitem avaliar com precisão o estado de infeção por *Borrelia burgdorferi* s.l. em aves.

No segundo estágio pretendeu-se conhecer a distribuição e determinar a ocorrência de resistência a anti-helmínticos em nematodes gastrointestinais, nas zonas de Setúbal e Sintra, recorrendo ao teste de redução de contagem de ovos nas fezes e a métodos moleculares para deteção de genótipos resistentes de *Haemonchus contortus* e, obter informação sobre as práticas de desparasitação das Organizações de Produtores Pecuários de Portugal Continental.

**Palavras-chave:** *Borrelia burgdorferi* s.l., *Haemonchus contortus*, diagnóstico molecular, resistência a anti-helmínticos

## **Abstract - Research on Infectious and Parasitic Diseases**

This report describes the work developed during my internships at the Center for Vectors and Infectious Diseases of the National Health Institute Doutor Ricardo Jorge, from October to December 2018, and from January to April 2019 at the National Institute for Agrarian and Veterinarian Research.

The main goal of the first project was to find the best biological sample (whole blood, feathers or skin tissue), that requires a minimal invasive collection procedure, to evaluate with precision the *Borrelia burgdorferi* s.l infection status of wild birds.

The goals of the second project were to assess the distribution of *Haemonchus contortus* and to determine the anthelmintic resistance level in the Setúbal and Sintra areas, by applying the Fecal Egg Count Reduction Test and molecular techniques to detect resistant genotypes. We also wanted to obtain data on the deworming practices used by farmers associations from mainland Portugal.

**Keywords:** *Borrelia burgdorferi* s.l., *Haemonchus contortus*, anthelmintic resistance, molecular biology techniques

## Índice Geral

Agradecimentos.....	I
Resumo - Investigação na Área das Doenças Infeciosas e Parasitárias .....	II
Abstract - Research on Infectious and Parasitic Diseases .....	III
Índice Geral .....	IV
Índice de Gráficos .....	VII
Índice de Quadros .....	VIII
Índice de Tabelas .....	IX
Índice de Figuras .....	X
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	XI
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1 Estudo de sensibilidade de amostras biológicas para avaliação do estado de infecção por <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato em aves.....	3
2.2 Estudo da ocorrência de resistências de <i>Haemonchus contortus</i> aos anti- helmínticos .....	3
3. Revisão Bibliográfica .....	4
3.1 Estudo de sensibilidade de amostras biológicas para avaliação do estado de infecção por <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato em aves.....	4
3.1.1 <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. ....	4
3.1.2 Borreliose de Lyme: situação na Europa .....	5
3.1.3 Ixodídeos .....	6
3.2 Estudo da ocorrência de resistências de <i>Haemonchus contortus</i> aos anti- helmínticos .....	8
3.2.1 Panorama da produção de ovinos em Portugal.....	8
3.2.2 Nematodes Gastrointestinais – o caso de <i>Haemonchus contortus</i> .....	10
3.2.3 Anti-helmínticos .....	15
4. Materiais e Métodos .....	22
4.1 Estudo de sensibilidade de amostras biológicas para avaliação do estado de infecção por <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato em aves.....	22

4.2	Estudo da ocorrência de resistências de <i>Haemonchus contortus</i> aos anti-helmínticos .....	26
4.2.1	Colheita e análise de fezes para determinação da redução da contagem de ovos.....	26
4.2.2	Colheita de abomasos para pesquisa e genotipagem de <i>Haemonchus contortus</i> .....	27
4.2.3	Questionário “Uso de Anti-helmínticos e o Desenvolvimento de Resistências” .....	29
5.	Resultados.....	30
5.1	Estudo de sensibilidade de amostras biológicas para avaliação do estado de infecção por <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato em aves.....	30
5.2	Estudo da ocorrência de resistências de <i>Haemonchus contortus</i> aos anti-helmínticos .....	36
5.2.1	Determinação da redução da contagem de ovos nas fezes .....	36
5.2.2	Pesquisa e genotipagem de <i>Haemonchus contortus</i> .....	41
5.2.3	Resultados do questionário “Uso de Anti-helmínticos e o Desenvolvimento de Resistências” .....	43
6.	Discussão .....	47
6.1	Estudo de sensibilidade de amostras biológicas para avaliação do estado de infecção por <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato em aves.....	47
6.2	Estudo da ocorrência de resistências de <i>Haemonchus contortus</i> aos anti-helmínticos .....	48
7.	Conclusão.....	52
8.	Bibliografia.....	54
9.	Anexos.....	i
	Anexo 1: Protocolo de extração de ADN das penas pelo método de Chelex.....	ii
	Anexo 2: Protocolo de Extração de ADN de carraças de corpo duro (Qiagen - Dneasy Blood & Tissue Kit) .....	iii
	Anexo 3: Protocolo de extração de ADN de sangue e fluidos corporais - QIAamp DNA Mini .....	iv
	Anexo 4: PCR nested dirigido ao gene <i>flaB</i> .....	v
	Anexo 5: PCR em tempo real dirigido ao gene 23S rRNA .....	vi
	Anexo 6: PCR em tempo real dirigido ao gene <i>flaB</i> .....	vii



Anexo 7: Técnica de McMaster modificada .....	viii
Anexo 8: Protocolo de extração de ADN: NZY Tissue gDNA Isolation Kit .....	ix
Anexo 9: Questionário: “Uso de Anti-helmínticos e o Desenvolvimento de Resistências” ...	x
Anexo 10: Concentração de ADN nas amostras de sangue total após extração, medida com recurso ao NanoDrop™ .....	xiii
Anexo 11: Concentração de ADN nas amostras de biópsias de pele após extração, medida com recurso ao NanoDrop™ .....	xvi
Anexo 12: Concentração de ADN nas amostras de penas após extração, medida com recurso ao NanoDrop™. ....	xviii

## Índice de Gráficos

Gráfico 1: Produção de carne e de leite de ovinos em função do número de cabeças, no período entre 2013 e 2017 (FAO, 2017). .....	9
Gráfico 2: Número de cabeças de ovinos abatidos no período entre Março de 2017 e Março de 2019 [adaptado de (INE, 2019)]. .....	10
Gráfico 3: Utilização de anti-helmínticos na área de atuação da OPP da Moita. ....	39
Gráfico 4: Utilização de anti-helmínticos na área de atuação da OPP de Sintra. ....	39
Gráfico 5: Comparação dos resultados obtidos acerca dos níveis de infeção e possíveis indícios de desenvolvimento de resistências nas áreas de atuação das duas OPP. ....	41
Gráfico 6: Práticas de desparasitação realizadas nas OPP questionadas. ....	45
Gráfico 7: Representação da utilização dos diferentes anti-helmínticos nas OPP questionadas. ....	45

## Índice de Quadros

Quadro 1: Efetivo Ovino em Portugal nos anos de 2015, 2016 e 2017 (INE,2019).....	8
Quadro 2: Sequências de primers usados no PCR para diagnóstico molecular de resistência em Haemonchus contortus [adaptado de (Coles et al., 2006)].....	28
Quadro 3: Dados relativos à avaliação da ocorrência de resistências através do FECRT, na área de atuação da OPP da Moita (distrito de Setúbal).....	38
Quadro 4: Dados relativos à avaliação da ocorrência de resistências através do FECRT, na zona de atuação da OPP de Sintra (distrito de Lisboa).....	40

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Quantificação das amostras colhidas. ....	24
Tabela 2: Estado de infecção por <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. em <i>Turdus merula</i> e <i>Parus major</i> detetada através de xenodiagnóstico e análise de penas. ....	30
Tabela 3: Estado de infecção por <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. de <i>Turdus merula</i> e <i>Erithacus rubecula</i> através da análise de carrças xenodiagnóstico, sangue e biópsias de pele aquando da captura (T0). ....	32
Tabela 4: Estado de infecção por <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. de <i>Turdus merula</i> e <i>Erithacus rubecula</i> através da análise de carrças xenodiagnóstico, sangue e biópsias de pele após o protocolo de stress (T1). ....	34
Tabela 5: Valores de sensibilidade e especificidade das amostras de sangue e de biópsias de pele em relação ao método standard (xenodiagnóstico) consoante o período da experiência (T0 ou T1). ....	35

## Índice de Figuras

Figura 1: Distribuição geográfica de <i>Ixodes ricinus</i> na Europa em Janeiro de 2019 (in <a href="https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/ixodes-ricinus-current-known-distribution-january-2019">https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/ixodes-ricinus-current-known-distribution-january-2019</a> , consultado em Maio de 2019) .....	7
Figura 2: Ciclo de vida dos nematodes gastrointestinais (ordem Strongylida), adaptado de (Roeber et al., 2013). .....	12
Figura 3: Efeito das alterações climáticas na relação parasita-hospedeiro [adaptado de (Skuce et al., 2013)]......	14
Figura 4: Cronograma que ilustra as diferentes etapas da experiência. ....	22
Figura 5: Referências anatómicas das aves. (in <a href="http://www.oocities.org/zedias/A_morfologia_aves.htm">http://www.oocities.org/zedias/A_morfologia_aves.htm</a> , consultado em Novembro de 2018) ...	23
Figura 6: Representação da curva sigmóide referente a uma reação de PCR em tempo real - “CP” é o crossing point (indica o número do ciclo em que a fluorescência ultrapassa o “threshold”); “LP” é fase linear; “TP” é a fase de transição; “PP” é a fase plateau [adaptado de (Mackay, 2004)]. .....	25
Figura 7: Localização das explorações onde foram realizadas as colheitas de fezes. ....	37
Figura 8: Extremidade terminal do macho <i>Haemonchus contortus</i> . ....	42
Figura 9: Apêndice vulvar da fêmea <i>Haemonchus contortus</i> .....	42
Figura 10: Exemplo do resultado obtido em todas as amostras testadas. Poço 1: marcador de pesos moleculares Hyperladder IV, Bioline; Poço 2: fragmento não específico, com 750 pb; Poço 3: fragmento específico de suscetibilidade, com 550 pb; Poço 4: bandas inespecíficas. ....	42
Figura 11: Concelhos abrangidos pelas OPP que participaram no questionário “Uso de Antihelmínticos e o Desenvolvimento de Resistências” .....	43

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ADN - Ácido desoxirribonucleico

AH - Anti-helmíntico

C - Colheita

CP - *Crossing point* (ponto de cruzamento)

dB - Decibéis

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilendiamino tetra-acético)

FECRT - Fecal Egg Count Reduction Test (teste de redução de contagem de ovos nas fezes)

Fla - Gene que codifica a flagelina

GIN - Gastrointestinal Nematodes (nematodes gastrointestinais)

INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

mM - Millimolar

OPG - Ovos por grama de fezes

OPP - Organização de Produtores Pecuários

Osp - *Outer surface proteins* (proteínas da membrana externa)

pb - Pares de bases

PCR - *Polimerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

pM - Picomolar

qPCR - *Quantitative Polimerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase, em tempo real)

QTL - *Quantitative trait loci* (loci de característica quantitativa)

Rpm - Rotações por minuto

SE - *Standard error* (erro padrão)

s.l. - *Sensu lato*

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism* (polimorfismo nucleótido singular)

s.s. - *Sensu stricto*

T0 - Tempo de amostragem anterior à exposição ao protocolo de stress crónico

T1/2 - Tempo de amostragem considerado entre T0 e T1

T1 - Tempo de amostragem posterior à exposição ao protocolo de stress crónico

TBE - Tris-Borato-EDTA

U - Unidades

$\mu$ l - Microlitro

$\mu$ M - Micromolar

V - Volts

VIsE - *Variable major protein like sequence expressed*

## 1. Introdução

O papel fundamental da investigação veterinária no que toca à interligação que promove entre a saúde humana e a saúde animal, ao desenvolver trabalho na prevenção, controlo, diagnóstico e tratamento de doenças, contribuindo para uma melhoria na qualidade de vida de ambos, é muitas vezes pouco entendido e subvalorizado (National Research Council (US), 2005).

A investigação veterinária é uma área de pesquisa que envolve diferentes espécies e patologias, possuindo sempre como principal objetivo o desenvolvimento e a progressão do conhecimento no que concerne à saúde pública e segurança alimentar, saúde animal e medicina comparativa. O estudo realizado em cada um destes campos é fundamental para o avanço científico contínuo que permite, diariamente, produzir novas conclusões que vão originar melhorias nos métodos de proteção da saúde humana e animal. Todos os animais são alvo de estudo desde os animais de companhia, aos animais de produção e aos animais selvagens. O estudo das doenças características destes últimos contribui não só para a sua saúde e conservação como também para o estudo de doenças infecciosas emergentes (DIE), sendo que muitas delas são zoonoses. As doenças infecciosas emergentes são consideradas como uma das maiores ameaças à saúde pública visto que, a espécie que afetam, a área geográfica em que se encontram e o impacto que provocam vão sofrendo alterações. O trabalho de investigação dos médicos veterinários nestas doenças é essencial visto que, muitas das vezes, as doenças são primeiro reportadas nos animais e o estudo da sua disseminação é feito por veterinários epidemiologistas, antes destas afetarem a população humana (National Research Council (US), 2005).

Para além da pesquisa associada às doenças infecciosas emergentes, como a borreliose de Lyme, a investigação veterinária está constantemente à procura de soluções para os importantes problemas da atualidade, como é o caso do desenvolvimento de resistências aos anti-helmínticos, sendo estes dois temas abordados na presente dissertação. Assim, são descritos dois estudos diferentes centrados nas componentes infecciosas e parasitárias. O primeiro estudo está relacionado com o papel dos animais selvagens, neste caso das aves, na disseminação de agentes patogénicos e a sua utilidade na avaliação do estado de infeção por *Borrelia burgdorferi* s.l., o agente etiológico da borreliose de Lyme, uma zoonose com distribuição mais acentuada no hemisfério norte. Este complexo bacteriano pertence à família Spirochaetaceae e é transmitido através de algumas espécies de carrças da família Ixodidae, sendo *Ixodes ricinus* o principal vetor na Europa (Eisen & Lane, 2002). Diversos estudos já evidenciaram a importância das aves no ciclo enzoótico de *B. burgdorferi* s.l. visto que estas podem atuar como reservatório (Humair et al., 1998) (Hasle et al., 2011) (Norte et al., 2013).



*Borrelia burgdorferi* s.l. não é encontrada em grande número na corrente sanguínea dos hospedeiros vertebrados, o que dificulta o seu diagnóstico molecular, permanecendo frequentemente num estado de latência nos tecidos ou na pele, sendo que, mesmo nesta, a distribuição pode ser muito localizada, o que dificultará a sua pesquisa. A utilização de amostras biológicas pouco invasivas para o diagnóstico do estado de infeção de vertebrados selvagens, nomeadamente das aves, incluindo amostras de sangue total, biópsias de pele ou penas (Tilly et al., 2008) seria um método conveniente e prático para melhor entender a sua contribuição para a manutenção do ciclo enzoótico desta bactéria, o que foi investigado neste trabalho. Este estudo foi realizado no Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas Doutor Francisco Cambournac (CEVDI), que se trata de um centro de diagnóstico e investigação científica na área das doenças infecciosas transmitidas por vetores (laboratório de referência nesta temática) e com interesse para a saúde pública, pertencendo ao Departamento de Doenças Infeciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA).

O segundo estudo foi concretizado em animais de produção, mais precisamente em ovinos, abordando a temática atual da ocorrência de resistências aos anti-helmínticos, com incidência particular em *Haemonchus contortus*.

O parasitismo gastrointestinal teve desde sempre um grande impacto na produção animal, implicando alterações no desenvolvimento normal dos animais e, subsequentemente, na produção de carne e leite. Trata-se de uma das infeções mais comuns em ovinos e pode manifestar-se através da diminuição da condição corporal até ao desenvolvimento de anemia, ocorrência de diarreias graves e perda de proteína (Puhg & Baird, 2012, referido por Mavrot et al., 2015). O controlo parasitário é essencialmente realizado com recurso a anti-helmínticos, porém, o uso indevido destes produtos tem originado um aparecimento crescente de genótipos resistentes aos diversos princípios ativos regularmente usados, o que atualmente representa um grave problema que acarreta consequências a nível económico, da produção e da saúde animal.

Através deste trabalho pretendeu-se estudar a ocorrência de resistências aos anti-helmínticos em duas zonas distintas, Sintra e Setúbal, através da realização do teste de redução da contagem de ovos presentes nas fezes e de métodos moleculares para deteção de genótipos resistentes de *Haemonchus contortus*, para além da realização de um questionário a nível nacional que teve como população alvo os veterinários coordenadores das OPP (Organizações de Produtores Pecuários) de Norte a Sul do território Português.

A resistência aos anti-helmínticos é um problema à escala global que carece cada vez mais de investimento da parte comunidade científica, de forma a encontrar soluções sustentáveis para o tratamento de infeções parasitárias que têm deixado de responder, progressivamente, aos tratamentos até aqui praticados. Este estudo foi realizado no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), o laboratório nacional de referência em saúde animal, segurança alimentar, conformidade de fertilizantes, sanidade vegetal e organismos geneticamente modificados.

## 2. Objetivos

### 2.1 Estudo de sensibilidade de amostras biológicas para avaliação do estado de infeção por *Borrelia burgdorferi* sensu lato em aves

Ao tornar-se necessária a validação da utilização de amostras biológicas para o diagnóstico do estado de infeção por *B. burgdorferi* s.l. nas aves, os objetivos deste trabalho incluíram:

- i. Comparação da sensibilidade e especificidade de diferentes amostras biológicas recolhidas de aves para diagnóstico do estado de infeção por *Borrelia burgdorferi* s.l.;
- ii. Determinação da técnica de amostragem mais fiável, não invasiva e fácil de executar, para realizar em qualquer contexto.

### 2.2 Estudo da ocorrência de resistências de *Haemonchus contortus* aos anti-helmínticos

Os objetivos deste trabalho foram:

- i. Determinar a ocorrência de parasitismo gastrointestinal em explorações de ovinos na área de atuação da OPP de Sintra (distrito de Lisboa) e na área de atuação da OPP da Moita (distrito de Setúbal);
- ii. Averiguar pelo Teste da Redução da Contagem de Ovos Fecais (FECRT) a existência de indícios de resistência aos anti-helmínticos, nas regiões de Sintra e Península de Setúbal;
- iii. Registrar a possível ocorrência de génotipos resistentes de *Haemonchus contortus* em exemplares recolhidos de abomasos de ovinos jovens, no matadouro de Montijo;
- iv. Conhecer as práticas de desparasitação realizadas nas OPP (Organizações de Produtores Pecuários) de Portugal Continental.

### 3. Revisão Bibliográfica

#### 3.1 Estudo de sensibilidade de amostras biológicas para avaliação do estado de infecção por *Borrelia burgdorferi* sensu lato em aves

##### 3.1.1 *Borrelia burgdorferi* s.l.

*Borrelia burgdorferi* s.l. é um complexo de espiroquetas Gram-negativas pertencente ao filo Spirochaetes, ordem Spirochaetales e família Spirochaetaceae (Karami, 2012).

Atualmente, este complexo abrange vinte e uma genoespécies com afinidades para hospedeiros diferentes. Deste grupo de genoespécies pelo menos quatro são patogênicas para o Homem: *B. afzelii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* e *B. lusitaniae* (Gylfe et al., 2000) (Franca et al., 2005) (de Carvalho et al., 2008).

*Borrelia garinii* e *B. valaisiana* são as genoespécies mais encontradas em aves e *B. lusitaniae* está associada a lagartixas e roedores (Lopes de Carvalho, 2010). Para se conseguir distinguir as diferentes genoespécies é necessário recorrer a técnicas moleculares uma vez que não é possível fazê-lo através de técnicas serológicas.

*Borrelia burgdorferi* s.l. possui uma temperatura ótima de crescimento *in vitro* entre os 34°C-37°C e é cultivada em meio líquido *Barbour-Stoner-Kelly* (BSK), em ambiente microaerófilo, multiplicando-se por divisão transversal (Revuelta, 1994). Como a maioria das espiroquetas são invisíveis ao microscópio ótico pois o seu diâmetro transversal é menor que o poder de resolução do mesmo (Revuelta, 1994), a sua observação é feita através da microscopia de fundo escuro.

OspA e OspB são as proteínas mais conhecidas dentro das vinte proteínas que caracterizam o complexo *B. burgdorferi* s.l.. Estas proteínas estão presentes na membrana externa da bactéria, atuando como antigénios de superfície e são codificadas por um plasmídeo (com 49Kb) que nunca foi encontrado em mais nenhum organismo procariota (Revuelta, 1994). Para além deste, *B. burgdorferi* s.l. possui mais plasmídeos lineares e circulares de ADN e crê-se que é nestes que se encontram os fatores de virulência (Casjens et al., 2012).

OspA e OspB estão envolvidas na adesão e penetração nas células de hospedeiros que atuam como reservatório (Gray et al., 2002). OspA transforma-se em OspC aquando da saída do interior do vetor e posterior entrada no hospedeiro (Fritz & Kjemtrup, 2003).

Estas duas proteínas, juntamente com a VlsE, são essenciais para o processo de infecção (Patrício, 2017). A VlsE é uma lipoproteína que sofre uma variação antigénica de forma a que *B. burgdorferi* s.l. consiga maximizar o tempo de permanência no hospedeiro (Gray et al., 2002).

Esta espiroqueta possui flagelos constituídos por duas classes de proteínas: FlaA e FlaB. A FlaB é uma das proteínas mais abundantes, ao contrário do que acontece com a FlaA, que é

expressa em menores quantidades (Gray et al., 2002). Os anticorpos IgG e IgM são formados contra estas proteínas, podendo ser detetados alguns dias após o contacto com o agente infeccioso (Grodzicki & Steere, 1988)(Goldman & Green, 2009).

### **3.1.2 Borreliose de Lyme: situação na Europa**

A borreliose de Lyme é uma zoonose cujo número de casos tem vindo a aumentar no continente Europeu, com maior incidência na Europa central, ocupando o primeiro lugar como a doença mais comum transmitida por carraças (ECDC & WHO, 2014). As alterações climáticas que se têm verificado estão a ter impacto no aumento do número de casos na medida em que influenciam a distribuição geográfica dos vetores devido às variações de humidade e temperatura.

No homem, uma das apresentações mais características de borreliose de Lyme e que se apresenta como sinal patognomónico é o eritema migratório, uma lesão circular na pele (ECDC & WHO, 2014), o que não acontece nos animais de companhia. Na maioria das vezes estes animais domésticos permanecem assintomáticos apesar de infetados. A doença é considerada como subdiagnosticada na prática veterinária, não pela falta de sintomas, mas sim, pelo facto de, na maior parte das vezes, estes serem inespecíficos (Patrício, 2017). A maior parte dos casos reportados em animais domésticos ocorreram em canídeos e equinos (Gray et al., 2002). O sinal clínico mais comum em cães é a claudicação. Nos equinos poderá desenvolver-se laminite, contratura muscular generalizada e inflamação das articulações (Gray et al., 2002).

No homem a doença pode apresentar-se em três estados: 1) estado de infeção inicial representado pelo aparecimento do eritema migratório e acompanhado frequentemente de fadiga, cefaleia e dores musculares; 2) doença disseminada em fase inicial: aparecimento de múltiplas lesões na pele, meningite, miocardite, artrite, radiculopatia e bloqueio átrio-ventricular; 3) infeção persistente, que ocorre meses a anos após a exposição inicial (Lopes de Carvalho, 2010). No caso de se dar evolução da doença sem que tenha sido diagnosticada e/ou sem que ocorra tratamento, as espiroquetas podem infetar o sistema nervoso e causar neuroborreliose (Lopes de Carvalho, 2010). Se o tratamento for iniciado atempadamente não são esperadas quaisquer complicações futuras para o doente (ECDC & WHO, 2014).

O tratamento é feito maioritariamente com recurso à doxiciclina, tanto na medicina veterinária como na medicina humana (Parola & Raoult, 2001) (Littman et al., 2006).

A melhor forma de prevenção é evitar a picada das carraças, recorrendo a várias medidas de prevenção como: a utilização de roupas adequadas para o tipo de atividade que se vai realizar em áreas consideradas endémicas para este tipo de vetores (ECDC & WHO, 2014). No caso dos animais de companhia, deve-se recorrer à utilização de coleiras apropriadas. Para que a transmissão de *Borrelia* entre o ixodídeo e o hospedeiro seja eficaz, a refeição sanguínea deve ocorrer durante 12-48 horas pois é após este intervalo de tempo que as espiroquetas se

multiplicam, se apresentam nas glândulas salivares e são inoculadas no hospedeiro através da saliva (Patrício, 2017). Assim, no contexto da saúde humana e animal, as carrças devem ser removidas do hospedeiro assim que detetadas de forma a evitar uma possível infeção. Se for encontrada uma carrça agarrada na pele do hospedeiro deve proceder-se à sua remoção o mais rápido possível e, se não houver meios para o fazer deve recorrer-se a um profissional de saúde para que o execute com segurança.

### 3.1.3 Ixodídeos

A ordem Acarina, subordem Ixodides (Ixodoidea) inclui as famílias Argasidae (carrças sem escudo dorsal) e Ixodidae (carrças com escudo dorsal). A espécie *Ixodes ricinus* faz parte desta última família sendo definida pelas seguintes características: as fêmeas só se alimentam na Primavera e/ou Outono e apenas durante um período de 30 dias (Lapage, 1968); *Ixodes ricinus* precisa de três hospedeiros diferentes para completar o seu ciclo de vida, necessitando de um para cada fase do ciclo (fase larvar, fase ninfa e fase adulta), ou seja, é necessário que seja feita uma refeição sanguínea num hospedeiro vertebrado para que haja transição entre estados ou postura de ovos (Gray, 1998) (Hofmeester et al., 2016).

Os ixodídeos alimentam-se em diferentes hospedeiros vertebrados consoante a fase de vida em que se encontram. Na fase larvar alimentam-se mais em roedores, de seguida em membros da família Turdidae e, por último, em aves mais pequenas (Hofmeester et al., 2016). Já na fase de ninfa a maior parte da alimentação é feita com base na família Turdidae, e só depois em roedores, aves mais pequenas, répteis e ungulados (Mannelli et al., 2011). Estes últimos contribuem na sua maioria para a alimentação da fase adulta (Hofmeester, et al., 2016).

O ciclo de vida de *I. ricinus* pode ser mantido por várias espécies de hospedeiros vertebrados que se encontram por todo o continente europeu, o que, somado a condições climáticas e habitats ideais, podem explicar a ampla distribuição geográfica deste ixodídeo (Hofmeester et al., 2016) como se pode observar na figura 1.

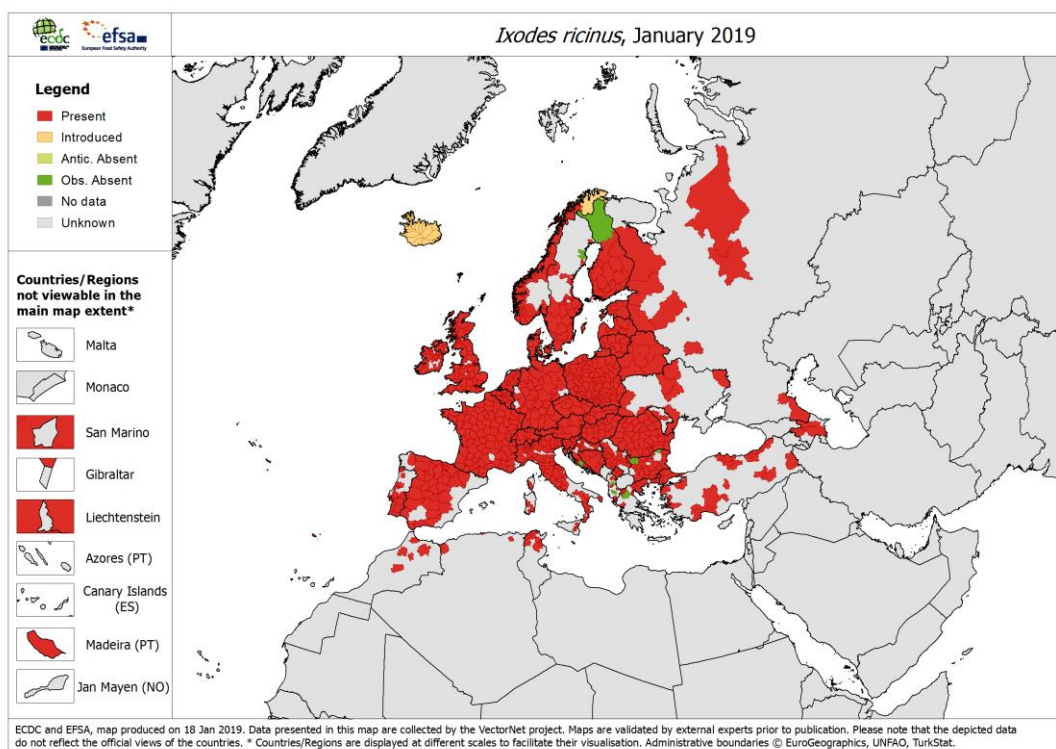


Figura 1: Distribuição geográfica de *Ixodes ricinus* na Europa em Janeiro de 2019 (in <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/ixodes-ricinus-current-known-distribution-january-2019>, consultado em Maio de 2019)

Nas aves concluiu-se que as espécies com maior massa corporal alimentam a maior parte dos *I. ricinus*, qualquer que seja a fase em que se encontrem (Hofmeester et al., 2016). Assim, na Europa, uma das espécies de aves que contribui mais para a alimentação destes ixodídeos é o melro-preto (*Turdus merula*) [Cramp & Perrins, 1984, referido por Hofmeester et al., 2016]. Esta espécie, tal como o pisco-de-peito-ruivo (*Erithacus rubecula*), é abundante e passa muito tempo no solo, procurando alimento em níveis de vegetação baixos (Cramp & Perrins, 1984, referido por Hofmeester et al., 2016) o que poderá justificar o número elevado de *I. ricinus* encontrados a parasitar estas aves (Norte et al., 2012) (Hofmeester et al., 2016).

*Ixodes ricinus* é o principal vetor de borreliose de Lyme na Europa. Este ixodídeo só se infeta ao realizar uma refeição de sangue num mamífero, ave ou réptil infetado, o que é comprovado pelo baixa taxa de infeção das larvas de ixodídeos que ainda não realizaram uma refeição sanguínea (Norte et al., 2013). A transmissão das espiroquetas nos ixodídeos é maioritariamente transtádial, sendo que a transmissão ovárica é rara (Núncio & Lopes de Carvalho, 2014).

Neste trabalho os hospedeiros em estudo são as aves, mais especificamente as espécies *T. merula*, *E. rubecula* e *Parus major* (chapim-real), todas muito comuns nos parques e bosques europeus (Heylen et al., 2014) (Heylen et al., 2017). As espécies *T. merula* e *P. major*

são consideradas reservatórios competentes de algumas genoespécies de *Borrelia*, incluindo *B. valaisiana*, *B. garinii* e *B. turdi* (Humair et al., 1998) (Heylen et al., 2014) (Norte et al., 2016), contribuindo para a disseminação geográfica deste agente através dos seus movimentos de dispersão. *Borrelia turdi* é uma das vinte e uma genoespécies do complexo *Borrelia burgorferi* s.l. mais encontrada em carraças em alimentação nas aves em Portugal, podendo ser transmitida por *I. frontalis* (ixodídeo ornitófilo) ou *I. ricinus*. Esta última espécie, sendo uma carraça generalista, atua provavelmente como o vetor entre aves e mamíferos, pois consegue transmitir espiroquetas de *B. turdi* e outras genoespécies adquiridas nas aves, aumentando a probabilidade de exposição de outros hospedeiros, como os mamíferos, a estas genoespécies (Heylen et al., 2017).

### 3.2 Estudo da ocorrência de resistências de *Haemonchus contortus* aos anti-helmínticos

#### 3.2.1 Panorama da produção de ovinos em Portugal

O efetivo ovino em Portugal encontrava-se em regressão desde 2006. Passados dez anos, em 2016, registou-se uma ligeira subida mas o efetivo voltou a decrescer no ano seguinte (quadro 1), devido ao menor abate de borregos, justificado pelo aumento das exportações de animais vivos e por uma diminuição da produtividade, tendo esta sido prejudicada pelo período de seca que se fez sentir em 2017 (INE, 2018). O efetivo é constituído maioritariamente por fêmeas reprodutoras não leiteiras (62,7%), sendo o Alentejo a principal região produtora de ovinos, representando mais de metade do total do efetivo (GPP, 2017).

Quadro 1: Efetivo Ovino em Portugal nos anos de 2015, 2016 e 2017 (INE,2019).

Localização geográfica (NUTS - 2013) (1)	Efetivo ovino (N.º) por Localização geográfica (NUTS - 2013) e Categoria (efetivo ovino); Anual (2)		
	Período de referência dos dados		
	2017	2016	2015
	Categoria (efetivo ovino)		
	Total		
	N.º (milhares)	N.º (milhares)	N.º (milhares)
<b>Portugal</b>	2 225	2 249 *	2 043

Efetivo ovino (N.º) por Localização geográfica (NUTS - 2013) e Categoria (efetivo ovino); Anual - INE, Inquérito aos efectivos animais

Nota(s):

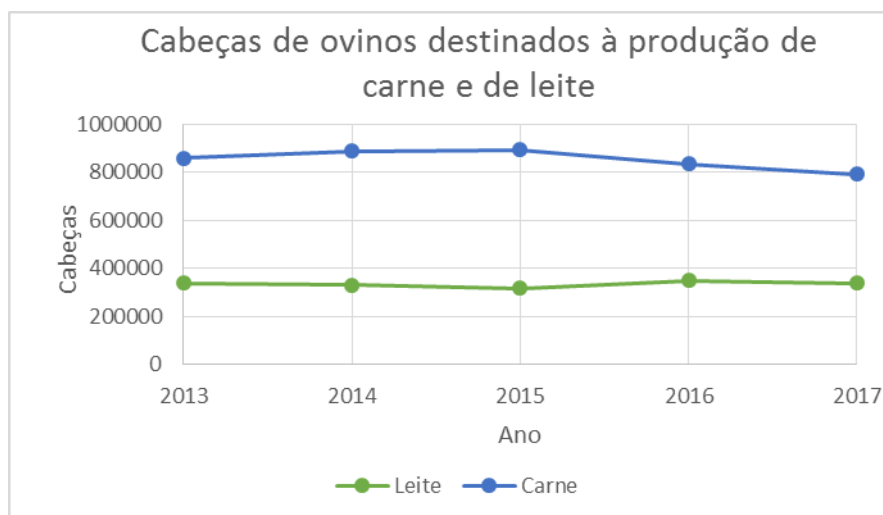
(1) A partir de 1 de janeiro de 2015 entrou em vigor uma nova versão das NUTS (NUTS 2013). Ao nível da NUTS II ocorreu apenas uma alteração de designação em "Lisboa" que passou a ser designada por "Área Metropolitana de Lisboa". A localização do incêndio reporta-se à origem do ponto de ignição.

(2) Por razões de arredondamento os totais podem não corresponder à soma das parcelas.

Portugal é o 10º país com a maior população de ovinos na Europa (Miranda Vítor, 2018) e a maioria das explorações caracteriza-se por um sistema de produção extensivo ou semi-extensivo.

Um dos indicadores económicos da produção de ovinos em Portugal é o número de cabeças destinadas tanto para a produção de carne como para a produção de leite. Como se pode observar no gráfico 1, a produção de carne apresenta um maior impacto, envolvendo uma média de 853 144 animais em relação aos 335 800 animais destinados à produção de leite.

Gráfico 1: Produção de carne e de leite de ovinos em função do número de cabeças, no período entre 2013 e 2017 (FAO, 2017).



No ano de 2016, o valor da produção animal em Portugal correspondeu a 37,9% do valor da Produção do Ramo Agrícola, segundo o Instituto Nacional de Estatística. A produção de leite representou maior impacto, seguindo-se a produção de carne bovina, aves de capoeira, suínos e, por fim, a produção de ovinos e caprinos (5.1 %) (GPP, 2017).

O consumo de carne de ovino e caprino tem vindo a diminuir desde 2008, sendo que em 2016 era de 2,2 kg por pessoa. O grau de aprovisionamento aumentou de 2015 (79,2%) para 2016 (82,6%) (GPP, 2017).

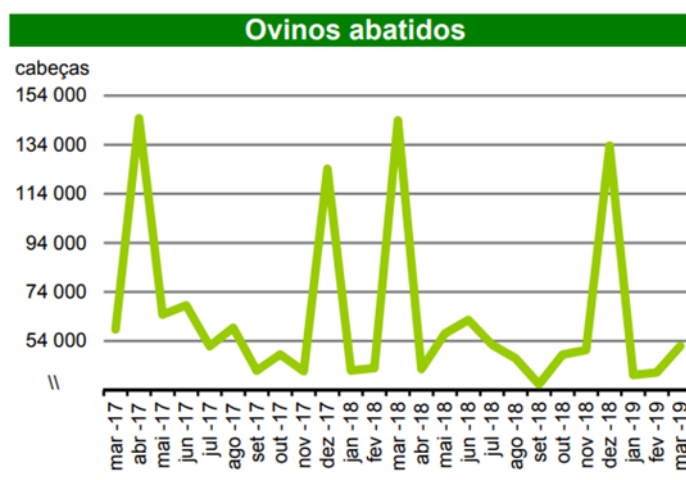
No nosso país existem 16 raças autóctones de ovinos: Merina da Beira Baixa; Merina Branca; Merina Preta; Churra Galega Mirandesa; Churra Galega Bragançana Branca; Churra Galega Bragançana Preta; Saloia; Churra do Minho; Bordaleira entre Douro e Minho; Churra Mondegueira; Churra Algarvia; Serra da Estrela; Campaniça; Churra Badana; Churra da Terra Quente; Churra do Campo (em [https://anidop.iniav.pt/index.php/index.php/racas-autoctones/ovinos?os\\_image\\_id-606](https://anidop.iniav.pt/index.php/index.php/racas-autoctones/ovinos?os_image_id-606) consultado a 15/03/19). As raças autóctones são por regra mais resistentes que as raças importadas pois estão mais adaptadas às condições que caracterizam o país, tanto a nível topográfico como climático. Além da importância associada à produção de carne e de lã, algumas destas raças destacam-se pela maior aptidão para a



produção leiteira, como é o caso das seguintes: Churra da Terra Quente, Mondegueira, Saloia e Serra da Estrela. A salvaguarda deste património genético é essencial, apesar de poder estar condicionada pelo aumento do êxodo rural e um crescente abandono da atividade agrícola.

O pico de abates de ovinos coincide com as épocas festivas da Páscoa e Natal, que correspondem aos meses de Março-Abril e Dezembro, respetivamente, como se pode verificar no gráfico 2.

Gráfico 2: Número de cabeças de ovinos abatidos no período entre Março de 2017 e Março de 2019 [adaptado de (INE, 2019)].



### 3.2.2 Nematodes Gastrointestinais – o caso de *Haemonchus contortus*

Os nematodes são organismos de corpo cilíndrico, sendo que alguns deles estabelecem relações de parasitismo com diversas espécies animais. Dentro da classe Nematoda encontram-se 6 ordens, sendo uma delas a ordem Strongylida. Esta ordem caracteriza-se pelo seguinte: muitas das espécies possuem cápsula bucal e algumas delas têm vesícula cefálica; a extremidade posterior dos machos possui uma bolsa copuladora; o ciclo de vida destes parasitas é monoxeno ou heteroxeno. Por sua vez, esta ordem engloba três superfamílias: Strongyloidea (parasitas com cápsula bucal desenvolvida e ciclo monoxeno), Trichostrongyloidea e Metastrongyloidea (parasitas com ciclo de vida heteroxeno). A superfamília Trichostrongyloidea é constituída por parasitas de ciclo monoxeno, visíveis macroscopicamente, de espessura diminuída, com uma bolsa copuladora bem desenvolvida e cápsula bucal ausente ou rudimentar. Nesta superfamília está incluída a família Trichostrongylidae, cujos membros partilham as seguintes semelhanças: a realização de hipobiose (depende de fatores ambientais ou imunológicos e ocorre na transição da fase L4 para a fase adulta); a elevação nas contagens de ovos que se verifica no peri-parto; L3 com bainha é a forma infetante. Em medicina veterinária, mais especificamente nos pequenos ruminantes, os géneros com maior importância são:

*Trichostrongylus* spp., *Haemonchus* spp., *Teladorsagia* spp., *Nematodirus* spp. e *Cooperia* spp. Todas estas espécies são responsáveis pelo desenvolvimento de infeções gastrointestinais que, geralmente, são mistas, sendo rara a ocorrência de infeções causadas por uma única espécie parasitária (Ueno & Gonçalves, 1998). No caso dos ovinos, estas infeções têm maior impacto na produção de leite e na produção de carne (ocorre diminuição da condição corporal do animal) do que na produção de lã (Mavrot et al., 2015).

A espécie *Haemonchus contortus* é o nematode que apresenta maior patogenicidade nos pequenos ruminantes e um dos mais estudados até aos dias de hoje devido à sua importância a nível zootécnico e económico. Pertence à superfamília Trichostrongyloidea e família Trichostrongylidae e diferencia-se pelas seguintes características morfológicas: papilas cervicais proeminentes; as fêmeas apresentam um apêndice vulvar muito desenvolvido e o seu útero está enrolado em torno do intestino, o que cria um aspeto visual de uma espiral vermelha (intestino) e branca (útero) - este parasita é conhecido como “barber’s pole worm” devido à sua aparência; cada fêmea pode fazer postura de até 10000 ovos por dia (Abbott et al., 2012); o macho possui uma coloração rosada, uma bolsa copuladora com um lobo dorsal assimétrico e duas espículas; hábitos estritamente hematófagos: tanto as larvas como os adultos são hematófagos sendo que estes últimos podem ingerir 0,05 ml de sangue por dia (Abbott et al., 2012); penetração na mucosa associada a inflamação. Este parasita pode ser encontrado no abomaso juntamente com *Trichostrongylus* spp. e *Teladorsagia* spp.

O ciclo de vida (monoxeno) de *Haemonchus contortus* contempla as seguintes etapas: 1) ingestão de L3 com bainha pelo ovino; 2) desembainhamento da larva (no rúmen) após a ingestão; 3) migração das larvas para o abomaso, onde vão penetrar na mucosa antes de evoluírem para L4 (Hoste et al., 2012); 4) realização de postura por parte das fêmeas, cujos ovos são excretados nas fezes; 5) eclosão dos ovos, originando L1; 6) transformação de L1 em L2 no ambiente; 7) evolução de L2 para L3 e repetição do ciclo, de volta ao passo 1 (Hoste et al., 2012). Estas etapas encontram-se ilustradas na figura 2.

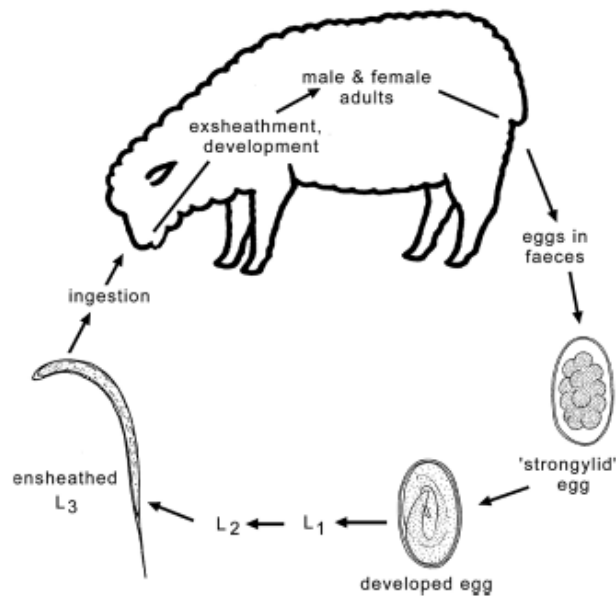


Figura 2: Ciclo de vida dos nematodos gastrointestinais (ordem Strongylida), adaptado de (Roeber et al., 2013).

As larvas L1, L2 e L3 são formas livres no ambiente enquanto que L4 e as formas adultas são encontradas no trato gastrointestinal do hospedeiro. A doença é causada por formas L4 e/ou adultos e depende de alguns fatores: espécie do nematode que infeta o hospedeiro; intensidade da infecção; espécie, idade e estado imunológico do hospedeiro; resposta do hospedeiro contra o parasita; aspetos relacionados com a produção e manejo (Roeber et al., 2013). Os adultos podem ser encontrados no abomaso durante a necrópsia e podem atingir dimensões entre os 10 e os 30 mm (Foreyt, 2001). O período pré-patente corresponde a um intervalo de 17-21 dias, tendo início quando o hospedeiro ingere a forma infecciosa do parasita e terminando quando os ovos deste são excretados para o ambiente.

As pastagens podem ser classificadas consoante a presença de formas livres de nematodes como: “contaminadas” se estiverem presentes ovos e larvas; “infetantes” se estiverem presentes formas L3 em condições climáticas adequadas, ou seja, se os dias se fizerem sentir quentes e húmidos (Abbott et al., 2012). Tanto a temperatura como a pluviosidade afetam a infetividade dos terrenos, sendo que a transição para L3 depende da temperatura e, a humidade decorrente da pluviosidade, contribui para a migração da forma L3 para a vegetação (Abbott et al., 2012). Tendo em conta esta informação, os registos da pluviosidade no Reino Unido são usados para prever o pico do número de larvas de nematodes na pastagem (Abbott et al., 2012).

A infecção por *Haemonchus contortus* pode apresentar-se na forma aguda ou na forma crónica. Esta última causa perda de condição corporal, atraso no desenvolvimento e anemia. A forma mais comum é a aguda, em que a anemia é facilmente detetável através da alteração da coloração das conjuntivas e provoca repercussões como caquexia e letargia. O edema sub-

mandibular, conhecido como “bottle jaw”, característico de infecção crônica por fasciola e não de hemoncose, pode surgir como consequência da anemia e consequente hipoproteinemia, em infecções sub-agudas. Eventualmente ocorrerá a morte, dependendo do grau de infecção e caso os animais não sejam submetidos atempadamente ao tratamento apropriado (Foreyt, 2001).

Os borregos e as fêmeas em peri-parto representam os grupos de ovinos mais suscetíveis às infecções por nematodes gastrointestinais [de acordo com Shubber *et al.* 1981, Bishop & Stear, 2001, referido por Idris *et al.*, 2012]. Ocorre uma diminuição da imunidade das fêmeas adultas nesta altura, que persiste durante algumas semanas da lactação. A consequência desta alteração na imunidade fará com que as fêmeas adultas de *H. contortus* produzam mais ovos, não sendo excretadas para o exterior. Assim, o número de parasitas adultos aumenta juntamente com as contagens de ovos nas fezes. Quando a lactação termina, a imunidade da fêmea retorna ao estado normal (Abbott *et al.*, 2012).

Quando as fêmeas lactantes são afetadas poderá ocorrer uma grande depressão na produção de leite, causando deficiências no crescimento dos borregos e até a morte. Para sobreviverem, os borregos passam a depender somente da pastagem para se alimentarem, o que fará com que eles próprios fiquem também altamente parasitados (Abbott *et al.*, 2012).

No que toca ao diagnóstico este é realizado através de métodos coprológicos e posterior coprocultura para identificação das larvas. A suspeita clínica de uma infecção por *Haemonchus contortus* baseia-se essencialmente na deteção de anemia através da observação de alterações na coloração da membrana conjuntiva, com base no método FAMACHA (criado pelo Dr. Francois “Faffa” Malan - FAffa MAIan CHArt), e tendo em conta o contexto epidemiológico em que se insere cada exploração (Besier *et al.*, 2016). Neste método, a coloração da membrana conjuntiva dos animais é comparada com as cinco cores *standard* já definidas, que variam entre o vermelho-rosado (cor normal) e o branco (anemia terminal) (Besier *et al.*, 2016). Este sistema foi criado de forma a selecionar os animais que necessitam de tratamento individual ao invés do tratamento ser aplicado a todo o efetivo, de forma a reduzir a pressão de seleção associada ao tratamento com anti-helmínticos que favorece o desenvolvimento de resistências (Besier *et al.*, 2016). A confirmação do diagnóstico é realizada no *post mortem* ao serem encontrados exemplares de *H. contortus* no abomaso (Besier *et al.*, 2016).

### **3.2.2.1 O impacto das alterações climáticas**

Nos últimos anos a incidência e o número de casos reportados de infecções por *Haemonchus contortus* registaram um crescimento, provavelmente como consequência das alterações climáticas (Papadopoulos *et al.*, 2012) (Skuce *et al.*, 2013).

*H. contortus* é um nematode típico de regiões tropicais/subtropicais mas tem sido cada vez mais encontrado em regiões com condições muito diferentes daquelas que são habituais nestes locais. Um exemplo desta situação é a presença de *H. contortus* numa localização tão

extrema como o Círculo Polar Ártico (Lindqvist et al., 2001). As explicações possíveis para esta ocorrência podem estar relacionadas com o aumento global da temperatura, alterações nos padrões de precipitação, com a realização de más práticas de desparasitação e com o desenvolvimento de resistências aos anti-helmínticos (Waller et al., 2006).

Enquanto que no Norte da Europa, a distribuição de *H. contortus* no Inverno está limitada pelas baixas temperaturas que levam à ocorrência de hipobiose, no sul do continente Europeu, as altas temperaturas e baixos valores de humidade sentidos no período de Verão condicionam o desenvolvimento de infeções. Os nematodes gastrointestinais (GIN) são vulneráveis a estas condições climáticas, visto que parte do seu ciclo de vida é completado fora do hospedeiro e o desenvolvimento das formas livres depende diretamente do clima (Anderson, 2000).

O aumento da temperatura e os períodos caracterizados por chuva intensa influenciam a quantidade de alimento que um animal ingere (Skuce et al., 2013). Ao consumir menos alimento do que é suposto, há um menor aporte de energia e proteína, o que irá prejudicar o sistema imunitário do animal [de acordo com Sargison *et al.*, 2002 e Houdjik, 2008, referido por Skuce et al., 2013], tornando-o mais suscetível ao desenvolvimento de infeções parasitárias. O efeito das alterações climáticas na relação parasita-hospedeiro encontra-se representado na figura 3.

Se os produtores não conseguirem responder de forma eficaz a estas mudanças, o impacto no bem-estar animal, produtividade e lucro pode ser significativo, o que acabará por representar uma ameaça à sustentabilidade a longo prazo da produção de ovinos na Europa (Rose et al., 2016).

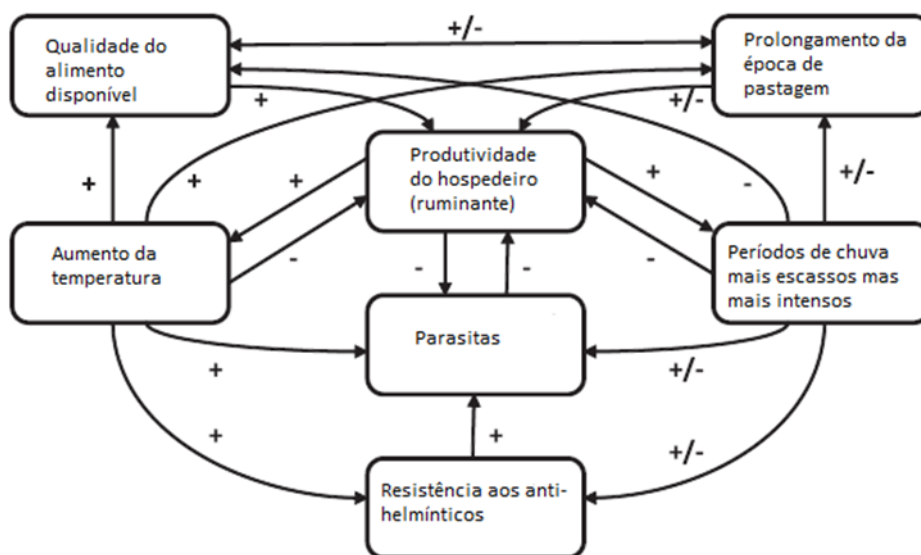


Figura 3: Efeito das alterações climáticas na relação parasita-hospedeiro [adaptado de (Skuce et al., 2013)].

### 3.2.3 Anti-helmínticos

Os anti-helmínticos são substâncias que permitem o controlo das populações parasitárias nos animais, conduzindo a um aumento do bem-estar animal, da produção e do retorno económico na indústria pecuária, o que os torna essenciais.

De acordo com a classificação ATC Vet (Veterinary Anatomical Therapeutic Chemical Code, em português, Código Veterinário Anatômico Terapêutico e Químico) os anti-helmínticos de largo espectro estão divididos em grupos diferentes, consoante o seu modo de ação e a sua composição química: derivados de Quinolina e substâncias relacionadas (Praziquantel, Oxamniquina, Epsiprantel, associações de derivados de Quinolona e substâncias relacionadas, associações de Praziquantel e associações de Epsiprantel); Compostos Organofosforados; Benzimidazóis e substâncias relacionadas; Imidazotiazóis (Levamisol, Tetramisol, associações de Imidazotiazóis, associações de Levamisol e associações de Tetramisol); Tetrahidropirimidinas (Morantel, Pirantel, Oxantel, associações de Tetrahidropirimidinas); Derivados do Fenol incluindo salicilanilidas (Diclorofeno, Hexaclorofeno, Niclosamida, Resorantel, Rafoxanida, Oxiclozanida, Bitionol, Nitroxinil e Closantel); Piperazina e derivados (Dietilcarbamazina). Existem ainda outros agentes que não pertencem aos grupos referidos, tais como: Nitroscanato, Monepantel, Emodepside + Toltrazuril, entre outros (em <http://medvet.dgav.pt/PesquisarATC>, consultado a 30 de Maio de 2019).

Os três grandes grupos mais conhecidos e usados são o grupo dos Benzimidazóis, o grupo dos Imidazotiazóis e o grupo das Lactonas Macroclínicas.

O primeiro benzimidazol a ser descoberto foi o Tiabendazol em 1961. Os benzimidazóis são eficazes contra todas formas de nematodes e seus ovos e, alguns, também são eficazes contra cestodes. Como exceção apresenta-se o Triclabendazol que apenas se destina ao tratamento da *Fasciola hepatica* e que só pertence a este grupo devido às semelhanças que partilha com os outros compostos, no que toca à estrutura química (Abbott et al., 2012). Após a administração de benzimidazóis estes sofrem libertação gradual para a circulação sistémica a partir do rúmen. O seu modo de ação baseia-se na inibição da atividade da tubulina, uma proteína constituinte dos microtúbulos, impedindo o transporte intracelular e, conseqüentemente, a sobrevivência do parasita (Abbott et al., 2012). A duração da exposição dos parasitas aos benzimidazóis é um fator essencial na eficácia de ação destes (Mckellar & Jackson, 2004).

No que toca ao grupo dos imidazotiazóis, o Tetramisol foi descoberto em 1966. Tratava-se de uma substância composta por dois isómeros, sendo que apenas o L-isómero, o Levamisol, possuía atividade anti-helmíntica (Bowman, 2014). Atualmente o Levamisol é o único anti-helmíntico disponível no mercado. Este atua como agonista colinérgico nas junções neuromusculares nicotínicas, ao bloquear os canais mediados por recetores da acetilcolina, causando paralisia (Mckellar & Jackson, 2004). Interfere também com o sistema de redução do

fumarato, que tem um papel essencial na produção de energia por parte das mitocôndrias. Não é ovicida como os benzimidazóis e é absorvido e excretado rapidamente (Abbott et al., 2012).

O grupo das lactonas macrocíclicas é constituído pelas Milbemicinas e pelas Avermectinas. Estes compostos são lipofílicos e após a administração são armazenados nos tecidos adiposos, de onde vão sendo libertados (Abbott et al., 2012). Ligam-se aos recetores de glutamato que, por sua vez, estimulam a libertação de iões de cloro que vão hiperpolarizar os neurónios dos parasitas e impedir o início da propagação dos potenciais de ação normais. Ocorre paralisia seguida de morte (Bowman, 2014).

### 3.2.3.1 Resistência aos anti-helmínticos

A resistência é definida como uma capacidade adquirida pelo parasita em que este deixa de ser sensível à dose de desparasitante que normalmente o eliminaria, quando presente na mesma espécie e no mesmo estado de desenvolvimento em que anteriormente o desparasitante atuava com eficácia (Kotze & Prichard, 2016).

Um anti-helmíntico eficaz deverá reduzir a contagem de ovos nas fezes para zero após a sua administração (Abbott et al., 2012). Assim, considera-se que existe desenvolvimento de resistência quando, após o tratamento, a percentagem da redução da contagem de ovos for inferior a 95% (com limite inferior de 95% do intervalo de confiança <90%), medida através de um teste de redução da contagem de ovos nas fezes (Kotze & Prichard, 2016).

A primeira vez em que foi detetada resistência de *Haemonchus contortus* aos anti-helmínticos foi entre o final da década de 1950 e início de 1960 (Kaplan, 2004). Após esta descoberta, os estudos acerca do desenvolvimento de resistências continuaram e, sensivelmente 10 anos depois, descobriu-se que várias espécies de nematodes eram já resistentes aos anti-helmínticos do grupo dos benzimidazóis e que esta situação não se restringia apenas a uma zona, acontecendo em todo o mundo (Kaplan, 2004).

A base molecular da resistência aos benzimidazóis é conhecida e está relacionada com uma mutação no isotipo 1 da  $\beta$ -tubulina. (Tiwari et al., 2007). Trata-se dum *SNP* (*Single Nucleotide Polymorphism*) em que há substituição de um único nucleótido numa posição específica do genoma que, até agora, já foi detetada em três localizações diferentes: 1) no codão 167 (TTC converte-se em TAC); 2) no codão 198 (GAA converte-se em GCA); 3) no codão 200, o SNP mais comum (TTC converte-se em TAC).

Foi verificado que ocorre uma fraca ligação dos benzimidazóis às proteínas dos nematodes quando existem mutações no isotipo 1 da  $\beta$ -tubulina (Lubega & Prichard, 1991) (Kwa et al., 1994), o que nos leva a concluir que estas mutações podem ser usadas como marcadores de resistências para *H. contortus*.

O FECRT (teste de redução da contagem de ovos nas fezes, do inglês *Fecal Egg Count Reduction Test*) é um teste *in vivo* para diagnóstico de resistência aos anti-helmínticos.

Estão descritos vários métodos *in vitro* para determinar a resistência: o *Egg Hatch Assay* (teste/ensaio da eclosão de ovos), o *Larval Development Assay* (teste/ensaio do desenvolvimento de larvas) e o *Larval Motility/Migration Assay* (teste/ensaio da motilidade/migração das larvas). A sensibilidade destes testes *in vitro* é baixa por só permitirem a detecção da resistência em populações com pelo menos 25% de indivíduos resistentes (Samson-Himmelstjerna et al., 2009).

O *Egg Hatch Assay* foi descrito pela primeira vez em 1979, por Le Jambre. Trata-se um teste em que se determina a concentração mínima de desparasitante que consegue inibir a eclosão de 99% dos ovos de indivíduos suscetíveis da espécie *Haemonchus contortus*, numa determinada população. O uso sustentável de anti-helmínticos requer uma monitorização regular da sua eficácia em cada exploração, sendo que este é o teste mais usado para este fim (Coles et al., 2006).

Em termos da distinção de ovos, só a conformação dos ovos de *Nematodirus* spp. se diferencia dos ovos das outras espécies da ordem Strongylida, o que gerou a necessidade de criar uma técnica que permitisse pelo menos detetar os ovos de *Haemonchus contortus*, a espécie mais patogénica da família (Jurasek et al., 2010). Desta forma, é usada uma técnica em que a aglutinina do amendoim conjugada com isotiocianato de fluoresceína se liga especificamente a determinados carboidratos presentes na superfície dos ovos de *H. contortus*, o que não acontece com as outras espécies da família Trichostrongylidae, evitando a necessidade de realizar coprocultura para a identificação da espécie das larvas (Jurasek et al., 2010). Com esta técnica, os ovos de *Haemonchus contortus* apresentam uma fluorescência verde brilhante sob luz ultravioleta (Jurasek et al., 2010). Esta técnica é relativamente fácil, barata e rápida de executar comparativamente à realização de PCR ou coprocultura para obtenção de larvas, podendo estimar-se a quantidade de ovos de *H. contortus* numa amostra fecal (Jurasek et al., 2010).

O *Larval Development Assay* mede o efeito dos desparasitantes na fase de transição do ovo para o estado de larva infetante (L3). Este tipo de ensaio consegue diferenciar *H. contortus* sensíveis dos resistentes às três grandes classes de desparasitantes (Kotze & Prichard, 2016).

O *Larval Motility/Migration Assay* avalia o efeito dos anti-helmínticos na motilidade de parasitas como *Haemonchus contortus* (Kotze & Prichard, 2016).

Os produtores só se apercebem do desenvolvimento de resistência aos anti-helmínticos usados no seu efetivo quando o teste da redução da contagem de ovos nas fezes atinge os 80% ou menos (Abbott et al., 2012). A partir deste ponto, as perdas na produção já são significativas e o nível de resistência aumentará cada vez mais se o mesmo anti-helmíntico continuar a ser usado. Os anti-helmínticos pertencentes à mesma classe atuam da mesma forma, o que significa que quando se verifica resistência a um anti-helmíntico de uma determinada classe, todos os outros produtos da mesma classe também já não serão eficazes (Abbott et al., 2012).



O desenvolvimento de resistências parece ser inevitável, mas a sua progressão poderá ser alvo de “abrandamento”. Diversos fatores influenciam a taxa a que a resistência se desenvolve numa população parasitária: 1) A dimensão da população “*in refugia*” - não exposta (quanto maior for esta população em comparação com a população exposta, mais devagar irá ocorrer o desenvolvimento de resistências); 2) A frequência da desparasitação: quanto mais frequente, mais rápido será o desenvolvimento de resistência; 3) A reinfeção após a desparasitação (a rapidez com que ocorre reinfeção após a desparasitação influencia a “diluição” da eventual população resistente já existente, pela população de parasitas presentes na pastagem, não exposta aos anti-helmínticos); 4) O cálculo das doses (a subdosagem influencia a quantidade de parasitas eliminados) (Abbott et al., 2012). O estado de resistência dura até ao fim da vida do parasita pois a suscetibilidade parece não ser reversível (Kaplan, 2004).

Existem algumas formas de prevenir o desenvolvimento de resistências: administrar os anti-helmínticos na dose correta, tendo em conta o animal mais pesado do grupo; não mudar os animais de pasto logo a seguir à desparasitação - o número de dias recomendado para fazer a mudança de pastagem após o tratamento depende da infetividade desta e das condições climáticas. Se a pastagem se apresenta como altamente infetante e os animais tiverem menos de 1 ano de idade, é aconselhável um período de 4 a 7 dias para realizar a mudança para uma pastagem menos contaminada (Abbott et al., 2012).

A nível da profilaxia, os tratamentos devem ser dirigidos aos possíveis períodos de risco identificados (Abbott et al., 2012) ao invés de se realizarem desparasitações sem qualquer tipo de necessidade ou indicação óbvia. Devem também considerar-se as várias técnicas de gestão e manutenção das pastagens (Abbott et al., 2012). A suplementação com proteína também deve ser considerada, na medida em que melhora a resposta imune e o estado de saúde geral dos animais, pois é usada na reconstrução dos tecidos danificados pelos parasitas internos (Hoste et al., 2005).

A deteção de resistência numa exploração depende da estação do ano e das espécies de parasitas presentes na altura da realização dos testes. Assim, não se deve assumir que se conhece o panorama completo da situação naquele local com base em apenas um teste realizado num dia aleatório (Abbott et al., 2012).

A produção animal com o objetivo de obter animais resistentes aos parasitas é possível e a sua adoção deve ser cada vez mais considerada, na medida em que as estratégias atuais são cada vez menos sustentáveis e eficazes. Tendo em conta que os indivíduos dentro do mesmo efetivo possuem diferenças no que toca à intensidade da resistência adquirida e que estas devem-se a alterações genéticas, podemos concluir que é possível selecionar ovinos para reprodução que sejam mais resistentes aos parasitas. Nestes ovinos irá ocorrer uma diminuição do impacto da infeção, o que irá contribuir para uma redução das perdas ao nível da produção de carne, leite e lã e para uma diminuição dos custos associados aos tratamentos anti-helmínticos (Dominik, 2005). A pesquisa de QTL (*Quantitative Trait Loci*) tem sido o centro da

investigação do desenvolvimento de resistências aos nematodes na indústria pecuária (Dominik, 2005). O QTL é uma secção de ADN que está relacionada com a variação de uma característica quantitativa do fenótipo de uma população, neste caso, com o desenvolvimento de resistências.

O indicador mais usado para determinar a resistência dos animais aos GIN é a contagem de ovos nas fezes (Aguerre et al., 2018). Num estudo em França, os machos reprodutores de uma determinada raça foram submetidos a infeções experimentais por *H. contortus* e aqueles que revelaram menores contagens de ovos nas fezes foram posteriormente selecionados para reprodução, originando descendência feminina 50% mais resistente às infeções parasitárias que aquela resultante da reprodução de machos suscetíveis (Aguerre et al., 2018).

Um conceito considerado cada vez mais importante no panorama do desenvolvimento de resistências é a população *in refugia*, como já foi referido anteriormente. Trata-se de uma população de parasitas que não foi exposta a anti-helmínticos, ou seja, a quem foi dado “refúgio”, de forma a que ocorra redução da pressão de seleção para a resistência ao tratamento, causada pelo desparasitante (Kaplan, 2004). A sua prática deve ser estimulada a nível da classe veterinária e dos produtores pecuários, através da desparasitação apenas dos animais que verdadeiramente necessitam de tratamento juntamente com a apropriada gestão de movimentos e mudanças de pastagens após o mesmo.

### **3.2.3.2 Etnoveterinária**

Cada vez mais se torna necessária a implementação de métodos alternativos ao invés do uso de anti-helmínticos de origem sintética, visto que estes têm vindo a apresentar cada vez menos eficácia devido ao rápido desenvolvimento de resistências. Como exemplos de métodos alternativos apresentam-se os seguintes: nutrição adequada; produção de animais resistentes ao parasitismo gastrointestinal; gestão apropriada da pastagem; prática da etnoveterinária [de acordo com LeJambre et al., 2008, referido por Zeineldin et al., 2018].

A etnoveterinária é um segmento da medicina veterinária que defende a utilização de compostos de origem natural provenientes de plantas medicinais como método de tratamento, em alternativa aos produtos de origem industrial utilizados atualmente.

A utilização de plantas medicinais é vista como uma terapia alternativa, pois estas já provaram ser eficazes, seguras e vantajosas em termos zootécnicos e económicos (Hossen et al., 2016). As plantas podem ser usadas na totalidade ou podem ser usadas apenas as suas raízes, caules, folhas, sementes ou flores. Na prática médica, usa-se a planta não processada ou opta-se pelo uso de um concentrado do princípio ativo – ambas as formas podem ser constituídas por ácidos gordos, alcaloides, esteroides, flavonoides, glicosídeos, saponinas, taninos e terpenos. Todos estes são compostos de baixo peso molecular sintetizados pelas

plantas, denominados metabolitos secundários. A produção de metabolitos secundários é afetada pelo tipo de solo, clima e estação do ano (Waller & Thamsborg, 2004).

Recentemente, tem crescido o interesse em alimentar os animais com plantas constituídas por taninos condensados, de forma a reduzir o impacto que as infeções gastrointestinais por nematodes causam (Chafton, 2006). Os taninos condensados têm origem na polimerização dos 3-flavanóis monoméricos, cuja natureza afeta a sua estrutura, variando também de acordo com o seu grau de polimerização, influenciando a eficácia da atividade anti-helmíntica das plantas ricas nestes compostos (Williams et al., 2014).

Diferentes estudos *in vivo* indicaram que o consumo de alimentos rico em taninos está associado a três potenciais efeitos no ciclo de vida dos nematodes: 1) baixo nível de infeção com L3 no hospedeiro, aquando da alimentação simultânea com forragem constituída por taninos (Paolini et al., 2003); 2) diminuição da excreção de ovos nas fezes em animais infetados, após o consumo de forragens ricas em taninos, conduzindo a uma diminuição da contaminação das pastagens (Lange et al., 2006); 3) intervenção no desenvolvimento normal de ovos para L3, o que se traduz num impacto direto a nível da redução de possíveis novas infeções (Hoste et al., 2012).

Diversos tipos de plantas possuem taninos condensados na sua composição: *Nelumbo nucifera* (conhecida como flor de lótus, pertencente à família Nelumbonaceae), *Rumex obtusifolius* (conhecido como labaçol ou azeda-de-folha-larga, pertencente à família Polygonaceae), *Hedysarum coronarium* (conhecida como sanfeno), *Onobrychis viciifolia*, *Lespedeza cuneata* e *Dorycnium rectum*, todas pertencentes à família Fabaceae (Waghorn & McNabb, 2003).

Os taninos condensados exercem diferentes tipos de benefícios consoante a concentração que possuem na espécie de planta em que se encontram. O consumo de plantas com altas concentrações de taninos (>7% da matéria seca) está associado a efeitos negativos nos ruminantes, como a diminuição da ingestão de alimentos e interferência na atividade proteolítica dos microrganismos ruminais (Min et al., 2003) (Waghorn & McNabb, 2003). Por outro lado, o consumo de alimentos com baixas ou moderadas concentrações de taninos (<6% da matéria seca) traduz-se em efeitos positivos nos ruminantes (Hoste et al., 2006), como foi demonstrado em ovinos, através do aumento da concentração de proteína no leite (Wang et al., 1996), aumento da prolificidade (Min et al., 1999), e redução das infeções por nematodes gastrointestinais (Niezen et al., 1995, referido por Hoste et al., 2006). Segundo Athanasiadou et al., 2000, os taninos condensados possuem a capacidade de reduzir a carga parasitária em ovinos. Apesar de apresentarem esta valência, a sua utilização não é tão eficaz como a desparasitação oral com anti-helmínticos mas poderá ser considerada como uma “adição” ou complemento a outros métodos de controlo (Waghorn & McNabb, 2003).

No caso específico de *H. contortus*, os resultados obtidos no estudo de (Hoste et al., 2012) sugerem que as plantas ricas em taninos prejudicam a nutrição, motilidade e

possivelmente até a reprodução desta espécie. O anti-coagulante contortina impede a coagulação do sangue, o que torna possível a alimentação de *H. contortus* sem que ocorra um bloqueio a nível intestinal (Hoste et al., 2012). A contortina possui duas proteínas, a Hc-PCP1 e a Hc-PCP2, possuindo esta última um terminal-C específico hidrofóbico e rico em prolina (Geldhof & Knox, 2008). Os taninos poderão ligar-se à contortina, impedindo a sua atividade anti-coagulante, o que resulta em bloqueio do lúmen intestinal e consequente morte do parasita (Hoste et al., 2012).

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Estudo de sensibilidade de amostras biológicas para avaliação do estado de infecção por *Borrelia burgdorferi sensu lato* em aves

Neste trabalho recolheram-se amostras de 16 *E. rubecula* e 10 *T. merula* provenientes de focos enzoóticos de *B. burgdorferi* s.l. com o objetivo de avaliar a presença de ADN de *B. burgdorferi* s.l. nestes hospedeiros. As aves foram capturadas com redes de neblina, anilhadas por anilhadores credenciados e transportadas e instaladas em cativeiro.

As amostras incluíram sangue total e tecidos, recolhidas aquando da captura das aves [e antes da exposição a um protocolo de stress crónico (“T0”)], e após a exposição a este mesmo protocolo (“T1”), sendo o objetivo a extração de ADN. De referir também a existência de uma amostragem realizada entre T0 e T1 em que foram colhidas amostras de sangue de *T. merula*, denominada (“T1/2”).

Enquanto a experiência decorreu, as aves foram mantidas em cativeiro, com água e alimento *ad libitum*, exposição à luz natural e temperatura ambiente variável (entre os 14°C e os 20°C) de acordo com as condições ambientais exteriores.

A experiência envolveu diversas etapas: numa primeira etapa, as aves foram capturadas e foi colhido sangue da veia braquial das aves da espécie *T. merula* (dia 0 - “sangue total T0”); no dia 1 foram colhidas as biópsias de pele (“T0”) da zona cervical e iniciou-se o primeiro xenodiagnóstico (esta técnica é usada para avaliar a capacidade de reservatório e infetividade em contexto de laboratório), que decorreu entre os dias 1 e 6; no dia 7 iniciou-se o protocolo de stress crónico que durou até ao dia 15; no dia 15 foram colhidas amostras de sangue (imediatamente após exposição ao protocolo de stress “T1/2”) apenas de *T. merula*; no dia 16 iniciou-se o segundo xenodiagnóstico e colheram-se novamente biópsias de pele (“T1”); no dia 22 terminou a segunda fase de xenodiagnóstico e procedeu-se à colheita de amostras de sangue (“T1”); no dia 23 as aves foram libertadas. Todas estas etapas estão ilustradas na figura 4.

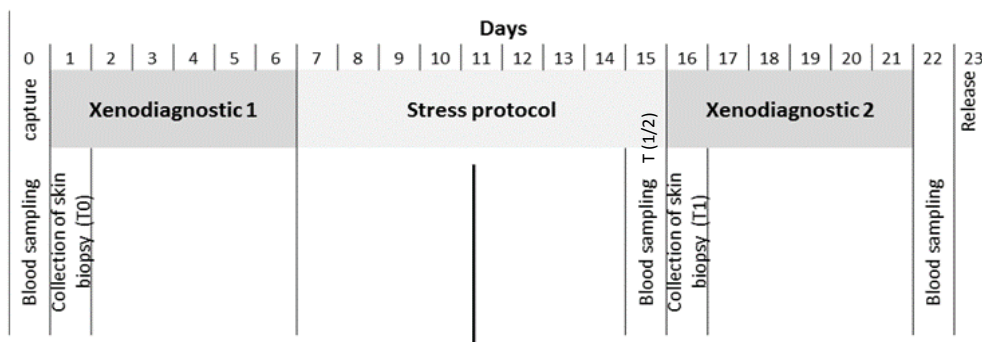


Figura 4: Cronograma que ilustra as diferentes etapas da experiência.

No protocolo de stress crónico foram usados quatro “stressors” (entenda-se como ações ou objetos que induzem stress) que iam mudando de ordem (dois de manhã e dois à tarde): 60 minutos de música alta (aproximadamente 80-100dB) proveniente de um rádio (“stressor suave”); 60 minutos de restrição num saco de pano (“stressor moderado”); 30 minutos em que foram colocadas 3 a 5 *E. rubecula* na mesma gaiola (“stressor suave”) que, no caso dos *T. merula* foi substituído por movimentar bruscamente a gaiola sobre rodas; 30 minutos em que foi causado distúrbio batendo nas grades da gaiola durante 15 segundos a cada 2 minutos (“stressor suave”).

Considerou-se que ocorreu reativação de uma infeção nos casos de aves que na primeira parte da experiência (período “T0”) não tinham tecidos ou xenodiagnóstico positivos e que acabaram por apresentar um resultado positivo, quer seja no xenodiagnóstico, sangue total ou nas biópsias de pele, no período “T1”.

Foram também colhidas amostras de penas da cabeça de 24 *T. merula* e de 7 *P. major* eutanasiados no âmbito de trabalhos de investigação anteriores (Heylen et al., 2014) (Heylen et al., 2017), e que haviam sido expostos a ninfas infetadas com *B. burgdorferi* s.l, extraíndo-se posteriormente o ADN do calamus das penas (base da secção central tubular da pena que se insere no fólculo da pele) através do método Chelex (descrito no anexo 1). O estado de infeção foi avaliado através da análise das penas e foi comparado com os resultados do xenodiagnóstico a que estas aves foram submetidas.

Os procedimentos de colheita das variadas amostras são explicados de seguida: as biópsias de pele foram sempre colhidas da mesma zona, entre a parte de baixo do bico e o início do pescoço, sendo este o local escolhido por ser mais propício (pois os ixodídeos costumam fixar-se nesta zona) e menos invasivo; o sangue foi colhido da veia basílica/ulnar cutânea, também chamada vulgarmente de veia da asa, e foi-lhe adicionado EDTA como anticoagulante; as penas foram colhidas de cinco regiões anatómicas: parte central da coroa; zona da coroa perto dos olhos; loro; zona auricular e queixo (figura 5).

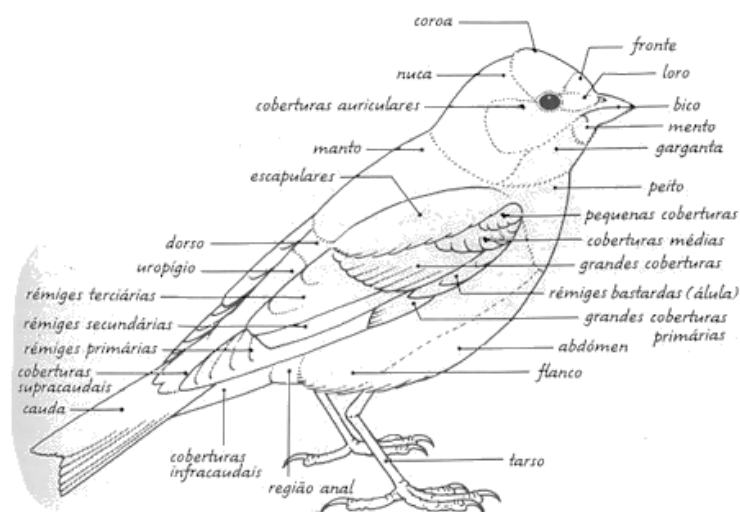


Figura 5: Referências anatómicas das aves. (in [http://www.oocities.org/zedias/A\\_morfologia\\_aves.htm](http://www.oocities.org/zedias/A_morfologia_aves.htm), consultado em Novembro de 2018)

Nos indivíduos *E. rubecula* não foi colhido sangue nos períodos “T0” e “T1/2” pois, devido à sua pequena dimensão, não é possível a recolha de um volume elevado de sangue num curto período de tempo. Assim, os resultados apresentados na tabela 1, referentes a este intervalo de tempo, pertencem apenas a *T. merula*.

Tabela 1: Quantificação das amostras colhidas.

	<b>Sangue Total</b>	<b>Biópsias de Pele</b>	<b>Penas (5 por indivíduo)</b>
<b>T0</b>	10	25	0
<b>T1/2</b>	10	0	0
<b>T1</b>	26	26	0
<b>Necrópsia</b>	0	0	130
<b>Total</b>	46	51	130

Posteriormente foi extraído o ADN dos ixodídeos utilizados no xenodiagnóstico (segundo o protocolo descrito no anexo 2) com o objetivo de testar a infetividade das aves e comparar os resultados com os obtidos através da análise dos tecidos recolhidos. O protocolo de extração de ADN do sangue e biópsias de pele encontra-se no anexo 3.

De forma a verificar se as extrações de ADN de todas as amostras tinham sido realizadas com sucesso foram efetuadas quantificações no espectrofotómetro Nanodrop™. O Nanodrop™ é um aparelho que mede a quantidade de ADN presente numa amostra de 2 µl, por espectrofotometria. Nele é feita a quantificação de todo o ADN presente na amostra, quer seja o do hospedeiro, o de *B. burgdorferi* s.l. ou de ADN com outra origem diferente.

A Lei de Beer-Lambert Law ( $A=\epsilon cl$ , onde  $A$ =absorvância,  $\epsilon$ =coeficiente de extinção,  $c$ =concentração e  $l$ =comprimento do trajeto) representa uma correlação direta entre a absorvância e a concentração. Os ácidos nucleicos absorvem em diversos comprimentos de onda, apresentando um pico de absorvância aos 260 nm. Assim, a quantidade de luz absorvida nesta região pode ser usada para determinar a concentração de ADN em solução.

Contudo, a equação de Beer-Lambert só é linear para absorvâncias entre 0.1 e 1, o que se traduz em concentrações de ADN entre 10.0 ng/uL e 3700 ng/uL, quando se trabalha com o Nanodrop ND-1000™. As amostras que se incluam fora deste intervalo devem ser diluídas de forma a produzirem resultados de espectrofotometria mais exatos.

Neste trabalho foram realizadas duas técnicas de diagnóstico molecular para a deteção de ADN de *B. burgdorferi* s.l.: PCR *nested* e PCR em tempo real (qPCR).

O PCR *nested* envolve duas ampliações sequenciais de ADN e dois pares de *primers* específicos. Esta técnica possui uma elevada sensibilidade quando comparada com o PCR convencional (EUCALB, 2016, referido por Patrício, 2017).

No protocolo de PCR *nested* foram utilizados os *primers* descritos por Johnson et al. (1992) e a *master mix* da Applied Biosystems (Foster, CA, USA). Este protocolo foi usado para detetar ADN de *Borrelia burgdorferi* s.l. em ixodídeos (anexo 4).

Para a execução do qPCR foram usados dois protocolos consoante o tipo de amostras: para o sangue e para as biópsias de tecido - 23S rRNA qPCR adaptado de (Courtney et al., 2004); e para as amostras de penas - *flaB* qPCR adaptado de (Venczel et al., 2015).

Ambos os protocolos são constituídos por três passos, que se encontram descritos nos anexos 5 e 6, respetivamente.

A interpretação dos resultados do PCR em tempo real dispensa a leitura no gel de agarose, ao contrário do que acontece no PCR convencional, pois os resultados são ilustrados no computador à medida que a reação ocorre, na forma de curvas, sendo que um resultado ideal é representado por uma curva sigmóide, como representado na figura 6. Nesta técnica, a amplificação do ADN está associada a uma emissão de fluorescência que é diretamente proporcional à quantidade de ADN amplificado.

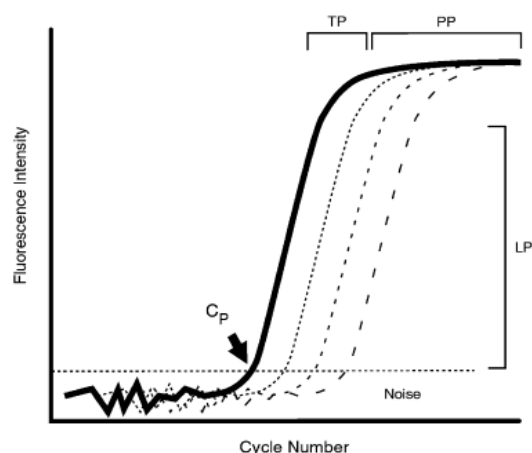


Figura 6: Representação da curva sigmóide referente a uma reação de PCR em tempo real - “CP” é o crossing point (indica o número do ciclo em que a fluorescência ultrapassa o “threshold”); “LP” é fase linear; “TP” é a fase de transição; “PP” é a fase plateau [adaptado de (Mackay, 2004)].



## **4.2 Estudo da ocorrência de resistências de *Haemonchus contortus* aos anti-helmínticos**

### **4.2.1 Colheita e análise de fezes para determinação da redução da contagem de ovos**

O estudo iniciou-se com a colheita e processamento de amostras de fezes de ovinos, obtidas em 17 explorações na área da atuação da OPP de Sintra (distrito de Lisboa), e em 12 explorações na área de atuação da OPP da Península de Setúbal, situado na Moita. A maior parte das amostras foram obtidas em explorações de ovinos cruzados, cuja dimensão dos efetivos variou entre os 15 e os 500 animais, com uma média de 38 animais por exploração.

Foram colhidas amostras de fezes diretamente da ampola retal de 10 animais escolhidos aleatoriamente (dentro de machos e fêmeas com mais de um ano de idade) em cada uma das explorações, no dia da desparasitação do efetivo, tendo estas sido visitadas consoante a agenda dos veterinários que colaboraram connosco neste projeto. As amostras foram colhidas e reservadas em luvas que, por sua vez, foram refrigeradas a 4°C até serem processadas no laboratório.

O teste de redução da contagem de ovos nas fezes é considerado como o “gold standard” para determinar a possibilidade de ocorrência de resistência numa exploração (Guelph, 2012). Trata-se de um teste *in vivo*. Para a sua realização é necessário que se cumpram os seguintes requisitos: possuir uma amostra de 10-15 animais por exploração (Ploeger & Everts, 2018); a contagem de ovos nas fezes destes animais tem de ser superior a 150 ovos por grama de fezes, antes de serem desparasitados, de forma a que possam ser incluídos no estudo para que depois se consiga detetar uma efetiva redução na contagem após o tratamento; a segunda amostra tem de ser colhida 10-14 dias após a primeira colheita. Os períodos de colheita variam consoante os desparasitantes usados: 3-7 dias quando o desparasitante usado for Levamisol, 14-17 dias no caso das Lactonas Macroclínicas (Ploeger & Everts, 2018). Porém, devido a questões logísticas foi estabelecido o período já referido em cima, como foi feito no estudo de (Ploeger & Everts, 2018).

Foram distinguidos os seguintes intervalos de referência para a avaliação das infeções consoante a contagem de OPG: nível baixo ( $\leq 500$  OPG); nível moderado ( $500 \leq \text{OPG} \leq 1000$ ); nível severo ( $\geq 1000$  OPG) (Guelph, 2012).

É considerada como um possível caso de resistência aos anti-helmínticos uma situação em que a contagem feita a partir das amostras oriundas da segunda colheita (após desparasitação do efetivo) não sofreu uma redução de 95% em relação ao valor inicial.

O processamento das amostras fecais foi feito em pool e em duplicado. Realizou-se a técnica de Willis (técnica de flutuação com solução saturada de cloreto de sódio) para a

observação de ovos e a contagem de ovos nas fezes foi determinada recorrendo à técnica de McMaster modificada (ver descrição da técnica no anexo 7), usando igualmente a solução saturada de NaCl como líquido de flutuação, que possui uma densidade de 1.18-1.20, o que permite a flutuação dos ovos e dos oocistos. Foram pesadas três gramas de fezes de cada um dos 10 animais de cada exploração e, de seguida, procedeu-se à homogeneização das fezes, removendo três gramas desta mistura para a realização da contagem de ovos. A sensibilidade associada à contagem de ovos é de 50 ovos por grama de fezes.

Para a execução da técnica de Willis misturaram-se três gramas de fezes com uma quantidade de solução saturada de NaCl suficiente para as cobrir; de seguida, filtrou-se o conteúdo obtido para um tubo de ensaio, com o auxílio de um coador metálico e de um funil de vidro; aguardou-se um minuto e colocou-se uma lamela no topo do tubo. Aguardou-se mais 15 minutos de forma a que os ovos e/ou oocistos, ao flutuarem, ficassem aderidos à lamela para que depois fosse possível identificá-los ao microscópio.

Os dados obtidos foram registados e procedeu-se a uma segunda colheita 14 dias após a realização da primeira. De um modo geral, as primeiras colheitas foram sempre feitas pelo veterinário da OPP e as segundas colheitas foram feitas por nós ou novamente pelo mesmo veterinário, mediante a disponibilidade de cada parte na data estipulada para a colheita.

Foi também realizada coprocultura para obtenção, identificação e testagem de larvas por PCR. Após a realização da contagem de ovos, adicionou-se sensivelmente a mesma quantidade de vermiculite à quantidade de fezes que restava (cerca de 20g), procedeu-se à homogeneização do conteúdo e este ficou a incubar durante 12 dias à temperatura ambiente, idealmente situada entre os 21 e 26°C (Crook et al., 2016). Após o tempo estipulado terminar, perfez-se com água o volume do recipiente onde as formas larvares se encontravam e inverteu-se o mesmo em cima de uma placa de Petri com um pouco de água, aguardando 1 a 2 horas até as larvas migrarem para a água, sendo depois recolhidas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Algumas formas larvares foram identificadas (a identificação dos géneros das larvas é laboriosa, além de que requer muito treino e experiência) e congeladas a -18°C de modo a poderem ser testadas por métodos moleculares.

#### **4.2.2 Colheita de abomasos para pesquisa e genotipagem de *Haemonchus contortus***

Entre 29 de Janeiro de 2019 e 16 de Abril de 2019 foram colhidos 128 abomasos de ovinos com idade inferior a um ano para pesquisa de *Haemonchus contortus*. As colheitas ocorreram num matadouro localizado no Montijo cujos ovinos eram provenientes de uma exploração no Alentejo onde eram reunidos, apesar de serem originários de diferentes explorações dentro desta região.

Após a colheita, os abomasos foram transportados para as instalações do INIAV onde foram abertos pela curvatura menor, foi removido o conteúdo e realizou-se uma lavagem de forma a se poder observar de forma clara a eventual presença de parasitas na mucosa. Os parasitas encontrados foram identificados e separados por sexos. A cada *Haemonchus contortus* macho encontrado foi extraído o ADN seguindo o protocolo de extração de ADN “NZY Tissue gDNA Isolation Kit” (descrito no anexo 8), congelado e submetido a PCR para determinação da resistência ou suscetibilidade aos benzimidazóis.

O tipo de PCR que realizámos neste trabalho foi o PCR Alelo-Específico (AS-PCR). Este PCR requer dois tipos de reações que têm em comum dois tipos de *primers* não-específicos: Ph1 - *primer forward* e Ph2 - *primer reverse*. O terceiro *primer* é específico e difere entre as duas reações: uma das reações irá incluir o *primer* específico associado à resistência (Ph3) e a outra irá incluir o *primer* específico associado à suscetibilidade (Ph4). As sequências destes *primers* são apresentadas no quadro 2.

Quadro 2: Sequências de primers usados no PCR para diagnóstico molecular de resistência em *Haemonchus contortus* [adaptado de (Coles et al., 2006)].

<i>Haemonchus contortus</i>	Ph1 forward primer	5' ggA ACg ATg gAC TCC TTT Cg 3'
	Ph2 reverse primer	5' ggg AAT CgA Agg CAg gTC gT 3'
	Ph3 resistant allele primer	5' CTg gTA gAg AAC ACC gAT gAA ACA TA 3'
	Ph4 susceptible allele primer	5' ATA CAg AgC TTC gTT gTC AAT ACA gA 3'

O protocolo de PCR usado para a identificação dos indivíduos homozigóticos resistentes (rr), homozigóticos suscetíveis (SS) e heterozigóticos (Sr) é baseado no protocolo de Coles *et al*, 2006. As reações de PCR para o gene da Resistência e para o gene da Suscetibilidade foram realizadas em separado. As misturas de amplificação foram efetuadas num volume de 25 µl contendo: 12.85 µl de água, 5 µl de tampão, 0.75 µl de cloreto de magnésio (25mM), 0.5 µl de oligonucleótidos (10mM), 0.85 µl de Ph1 (10 µM), 0.85 µl de Ph2 (10 µM), 2.5 µl de Ph3 (10 µM) ou Ph4 (10 µM) consoante a reação e 0.2 µl de Taq polimerase (5U/µl).

Este programa de amplificação de ADN foi realizado no termociclador MJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad) e é constituído pelas seguintes etapas: um ciclo de pré-desnaturação a 94 °C durante 5 minutos; 33 ciclos de: desnaturação a 94 °C durante 55 segundos, emparelhamento a 55 °C durante 55 segundos e extensão a 72 °C durante 55 segundos; um ciclo final de extensão a 72 °C durante 10 minutos.

Os produtos obtidos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1.5% em tampão TBE, durante 60 minutos a 90V. Os resultados foram visualizados com o auxílio do programa Image Lab Software da Bio-Rad.

### **4.2.3 Questionário “Uso de Anti-helmínticos e o Desenvolvimento de Resistências”**

Com o objetivo de tentar perceber a situação atual em Portugal no que toca ao desenvolvimento de resistências aos anti-helmínticos, foi elaborado um questionário que inclui 15 questões, divididas em três partes: 1) informação geral acerca dos efetivos de ovinos (dimensão, tipos de raças e localização geográfica); 2) práticas de desparasitação (critérios de desparasitação, tipos de anti-helmínticos usados e razão para a sua escolha, uso de pistolas de administração, cálculo da dose de anti-helmíntico a administrar, estratégias de quarentena e manejo/gestão das pastagens); 3) conhecimento geral acerca do desenvolvimento de resistências aos anti-helmínticos.

Este questionário foi realizado por telefone e foi enviado por mensagem eletrónica a 105 Organizações de Produtores Pecuários (OPP), sendo direccionado ao veterinário coordenador de cada uma das organizações. Em Portugal existem 105 OPP: 44 no Norte, 30 no Centro, 17 na região de Lisboa e Vale do Tejo, 11 no Alentejo e 3 no Algarve. As OPP cumprem as normas estabelecidas pelo Plano Nacional de Saúde Animal (PNSA).

A estrutura deste questionário é baseada no questionário realizado por McMahon et al., 2013, na Irlanda do Norte e encontra-se representada no anexo 9.

Em cento e cinco contatos realizados recebemos respostas de 21 OPP. Os dados foram tratados estatisticamente com recurso ao programa IBM SPSS.

## 5. Resultados

### 5.1 Estudo de sensibilidade de amostras biológicas para avaliação do estado de infecção por *Borrelia burgdorferi* sensu lato em aves

Os resultados da concentração de ADN obtida a partir das amostras de sangue, biópsias de pele e penas são apresentados nos anexos 10, 11 e 12, respetivamente.

Todas as penas testadas por qPCR foram negativas para a presença de *B. burgdorferi* s.l, apesar de vinte e duas das vinte cinco aves (das quais foram colhidas as penas testadas) estarem infetadas com *B. burgdorferi* s.l. (taxa de infeção de 88%), o que foi provado através de xenodiagnóstico (tabela 2).

Tabela 2: Estado de infeção por *Borrelia burgdorferi* s.l. em *Turdus merula* e *Parus major* detetada através de xenodiagnóstico e análise de penas.

Espécie de ave	Identificação da ave	Xenodiagnóstico				Estado de infeção - penas
		Estado de infeção da ave	Nº ixodídeos infetados	Nº ixodídeos testados	Prevalência de infeção nas carraças de xenodiagnóstico (%)	
<i>Turdus merula</i>	K4	Positivo	15	16	93.7	Negativo
<i>Turdus merula</i>	K6	Positivo	11	30	36.6	Negativo
<i>Turdus merula</i>	K8	Positivo	17	20	85	Negativo
<i>Turdus merula</i>	K9	Positivo	25	31	80.6	Negativo
<i>Turdus merula</i>	K10	Positivo	5	32	15.6	Negativo
<i>Turdus merula</i>	K11	Positivo	31	36	86.1	Negativo
<i>Turdus merula</i>	K13	Positivo	14	21	66.6	Negativo
<i>Turdus merula</i>	K17	Positivo	15	20	75	Negativo

<i>Turdus merula</i>	K18	Positivo	16	23	69.5	Negativo
<i>Turdus merula</i>	K20	Positivo	2	20	10	Negativo
<i>Turdus merula</i>	K22	Positivo	32	32	100	Negativo
<i>Turdus merula</i>	K25	Positivo	8	11	72.7	Negativo
<i>Turdus merula</i>	K26	Positivo	34	35	97.1	Negativo
<i>Turdus merula</i>	K3	Positivo	0	22	0	Negativo
<i>Turdus merula</i>	K7	Positivo	0	20	0	Negativo
<i>Turdus merula</i>	K1	Negativo	0	21	0	Negativo
<i>Turdus merula</i>	K27	Negativo	0	41	0	Negativo
<i>Turdus merula</i>	K23	Negativo	0	20	0	Negativo
		<b>Prevalência (%; N° indivíduos infectados/ N° testados): 88.9 (16/18)</b>	<b>N° total: 225</b>	<b>N° total: 451</b>	<b>Prevalência média ± SE: 49.36 ± 9.45</b>	<b>Prevalência (%; N° indivíduos infectados/ N° testados): 0 (0/18)</b>
<i>Parus major</i>	V16	Positivo	25	29	86.2	Negativo
<i>Parus major</i>	V28	Positivo	18	25	72	Negativo
<i>Parus major</i>	V18	Positivo	20	30	66.6	Negativo
<i>Parus major</i>	V24	Positivo	21	30	70	Negativo
<i>Parus major</i>	V14	Positivo	25	42	59.5	Negativo
<i>Parus major</i>	V15	Positivo	15	28	60	Negativo
<i>Parus major</i>	V94	Positivo	12	21	57.1	Negativo
		<b>Prevalência (%): 100 (7/7)</b>	<b>N° total: 136</b>	<b>N° total: 205</b>	<b>Prevalência média ± SE: 67.34 ± 3.79</b>	<b>Prevalência (%): 0 (0/7)</b>

Das 51 biópsias de pele testadas, duas das vinte cinco amostras correspondentes a “T0” foram positivas, assim como três das vinte seis amostras correspondentes a “T1”. Assim 5/51 das biópsias revelaram ser positivas, o que corresponde a 9.8%.

Das 46 amostras de sangue total testadas, nenhuma das dez amostras de “T0” foi positiva, o que ocorreu também nas dez amostras de “T1/2”. No entanto, onze das vinte seis amostras “T1” revelaram-se positivas, o que corresponde a 23.91%.

A compilação destes resultados encontra-se nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Estado de infecção por *Borrelia burgdorferi* s.l. de *Turdus merula* e *Erithacus rubecula* através da análise de carraças xenodiagnóstico, sangue e biópsias de pele aquando da captura (T0).

T0							
Espécie de ave	Identificação da ave	Estado de infecção da ave	Xenodiagnóstico			Tecidos	
			Nº ixodídeos infetados	Nº ixodídeos testados	Prevalência de infecção nas carraças de xenodiagnóstico (%)	Sangue total	Biópsia de pele
<i>E. rubecula</i>	A387220	Negativo	0	7	0	na	Positivo
<i>E. rubecula</i>	A387221	Negativo	0	7	0	na	Negativo
<i>E. rubecula</i>	A387222	Negativo	0	7	0	na	Negativo
<i>E. rubecula</i>	A387224	Negativo	0	7	0	na	Negativo
<i>E. rubecula</i>	A387225	Negativo	0	7	0	na	Negativo
<i>E. rubecula</i>	A387227	Negativo	0	7	0	na	Negativo
<i>E. rubecula</i>	A387229	Negativo	0	7	0	na	Negativo
<i>E. rubecula</i>	A387243	Negativo	0	7	0	na	Negativo
<i>E. rubecula</i>	A387245	Negativo	0	7	0	na	Negativo
<i>E. rubecula</i>	A387246	Negativo	0	7	0	na	Negativo
<i>E. rubecula</i>	A387250	Negativo	0	7	0	na	Negativo
<i>E. rubecula</i>	A387254	Negativo	0	7	0	na	Negativo
<i>E. rubecula</i>	A387255	Negativo	0	7	0	na	Negativo
<i>E. rubecula</i>	A387256	Negativo	0	7	0	na	Negativo
<i>E. rubecula</i>	A387257	Positivo	1	7	14.3	na	Negativo

<i>E. rubecula</i>	A387258	Negativo	0	7	0	na	Negativo
		<b>Prevalência (%; Nº de indivíduos infetados/ Nº testados): 6.25 (1/16)</b>	<b>Nº total: 1</b>	<b>Nº total: 112</b>	<b>Prevalência média ± SE = 0.89 ± 0.89</b>		<b>Prevalência (%; Nº indivíduos infetados/ Nº testados): 6.25 (1/10)</b>
<i>T. merula</i>	F34767	Positivo	7	7	100	Negativo	Negativo
<i>T. merula</i>	F34768	Negativo	0	7	0	Negativo	Negativo
<i>T. merula</i>	F34770	Negativo	0	7	0	Negativo	Positivo
<i>T. merula</i>	F34771	Positivo	6	7	85.7	Negativo	Negativo
<i>T. merula</i>	F34772	Positivo	1	7	14.3	Negativo	Negativo
<i>T. merula</i>	F34774	Positivo	2	7	28.5	Negativo	Negativo
<i>T. merula</i>	F34776	Positivo	1	7	14.3	Negativo	Negativo
<i>T. merula</i>	F34779	Positivo	6	7	85.7	Negativo	Negativo
<i>T. merula</i>	F34781	Positivo	6	7	85.7	Negativo	Negativo
<i>T. merula</i>	RF34743	Positivo	1	7	14.3	Negativo	Negativo
		<b>Prevalência (%; Nº de indivíduos infetados/ Nº testados): 80.0 (8/10)</b>	<b>Nº total: 30</b>	<b>Nº total: 70</b>	<b>Prevalência média ± SE = 42.85 ± 12.95</b>	<b>Prevalência (%; Nº de indivíduos infetados/ Nº testados): 0 (0/10)</b>	<b>Prevalência (%; Nº de indivíduos infetados/ Nº testados): 6.25 (1/10)</b>



Tabela 4: Estado de infecção por *Borrelia burgdorferi* s.l. de *Turdus merula* e *Erithacus rubecula* através da análise de carraças xenodiagnóstico, sangue e biópsias de pele após o protocolo de stress (T1).

T1							
Espécie de ave	Identificação da ave	Xenodiagnóstico				Tecidos	
		Estado de infecção da ave	Nº de ixodídeos infetados	Nº de ixodídeos testados	Prevalência de infecção nas carraças de xenodiagnóstico (%)	Sangue total	Biópsia de pele
<i>E.rubecula</i>	A387220	Negativo	0	7	0	Negativo	Negativo
<i>E.rubecula</i>	A387221	Negativo	0	7	0	Positivo	Negativo
<i>E.rubecula</i>	A387222	Negativo	0	7	0	Positivo	Negativo
<i>E.rubecula</i>	A387224	Negativo	0	7	0	Positivo	Negativo
<i>E.rubecula</i>	A387225	Negativo	0	7	0	Negativo	Negativo
<i>E.rubecula</i>	A387227	Negativo	0	7	0	Negativo	Negativo
<i>E.rubecula</i>	A387229	Negativo	0	7	0	Negativo	Negativo
<i>E.rubecula</i>	A387243	Negativo	0	7	0	Negativo	Negativo
<i>E.rubecula</i>	A387245	Negativo	0	7	0	Negativo	Negativo
<i>E.rubecula</i>	A387246	Positivo	1	7	14.3	Positivo	Negativo
<i>E.rubecula</i>	A387250	Negativo	0	7	0	Positivo	Positivo
<i>E.rubecula</i>	A387254	Negativo	0	7	0	Negativo	Negativo
<i>E.rubecula</i>	A387255	Negativo	0	7	0	Negativo	Negativo
<i>E.rubecula</i>	A387256	Positivo	1	7	14.3	Negativo	Negativo
<i>E.rubecula</i>	A387257	Negativo	0	7	0	Negativo	Negativo
<i>E.rubecula</i>	A387258	Positivo	0	7	0	Negativo	Negativo
		<b>Prevalência (%; Nº de indivíduos infetados/ Nº testados): 12.5 (2/16)</b>	<b>Nº total: 2</b>	<b>Nº total: 112</b>	<b>Prevalência média ± SE = 1.78 ± 1.22</b>	<b>Prevalência (%; Nº de indivíduos infetados/ Nº testados): 31.25 (5/16)</b>	<b>Prevalência (%; Nº de indivíduos infetados/ Nº testados): 6.25 (1/10)</b>
<i>T.merula</i>	F34767	Negativo	7	7	100	Negativo	Negativo
<i>T.merula</i>	F34768	Negativo	0	7	0	Positivo	Negativo
<i>T.merula</i>	F34770	Negativo	0	7	0	Positivo	Positivo
<i>T.merula</i>	F34771	Positivo	7	7	100	Positivo	Positivo
<i>T.merula</i>	F34772	Positivo	2	7	28.5	Positivo	Negativo
<i>T.merula</i>	F34774	Positivo	3	7	42.8	Negativo	Negativo
<i>T.merula</i>	F34776	Positivo	1	7	14.3	Negativo	Negativo
<i>T.merula</i>	F34779	Positivo	7	7	100	Positivo	Negativo
<i>T.merula</i>	F34781	Positivo	5	7	71.4	Positivo	Negativo
<i>T.merula</i>	RF34743	Negativo	0	7	0	Negativo	Negativo
		<b>Prevalência (%; Nº de indivíduos infetados/ Nº testados): 70.0 (7/10)</b>	<b>Nº total: 32</b>	<b>Nº total: 70</b>	<b>Prevalência média ± SE = 44.28 ± 14.19</b>	<b>Prevalência (%; Nº de indivíduos infetados/ Nº testados): 60.0 (6/10)</b>	<b>Prevalência (%; Nº de indivíduos infetados/ Nº testados): 20.0 (2/10)</b>

Tanto em T0 como em T1, só nove das vinte e seis aves originaram ixodídeos que foram validados como positivos, através da técnica de xenodiagnóstico. A comparação da prevalência de infecção nas aves obtida por xenodiagnóstico entre T0 e T1 revelou que a sua infetividade não diferiu entre períodos, ou seja, a probabilidade de um ixodídeo ficar infetado ao alimentar-se de uma ave foi igual quer em T0 como em T1 (Fisher's exact test  $P = 1$ ).

Em seis dos dezasseis *E. rubecula* ocorreu reativação (ou seja, em 37.5% dos indivíduos) enquanto que nos indivíduos *T. merula* houve reativação em 5 dos 10 (em 50% da população amostrada).

Quando se comparou a prevalência de infecção obtida por xenodiagnóstico entre espécies de aves dentro de cada período da experiência, concluiu-se que há diferenças estatisticamente significativas na probabilidade de infecção quando uma carraça se alimenta num *T. merula* ou num *E. rubecula* (T0:  $X_1^2 = 14.78$ ,  $P < 0.05$ ; T1:  $X_1^2 = 8.98$ ,  $P < 0.05$ ), sendo esta maior no primeiro. Como os resultados de xenodiagnóstico são dependentes da espécie de ave, as aves apresentam diferentes capacidades de reservatório consoante a sua espécie.

A nível da determinação da utilidade das amostras biológicas para avaliação da infetividade dos hospedeiros foram calculados os valores de sensibilidade e especificidade, apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Valores de sensibilidade e especificidade das amostras de sangue e de biópsias de pele em relação ao método standard (xenodiagnóstico) consoante o período da experiência (T0 ou T1).

	T0			T1		
	Xenodiagnóstico	Sangue Total	Biópsia de Pele	Xenodiagnóstico	Sangue Total	Biópsia de Pele
Nº amostras positivas/Nº amostras testadas	9/26	0/10	2/25	9/26	11/26	3/26
Sensibilidade	-	0	0	-	0.55	0.11
Especificidade	-	1	0.88	-	0.64	0.88
Teste de McNemar ( $\chi^2$ ; P) <sup>a</sup>	-	-	4.45; 0.04	-	0.40; 0.53	3.6; 0.06

a = Um valor estatisticamente significativo indica que as metodologias em comparação não foram consistentes.

Através do Teste de McNemar constatou-se que o sangue e as biópsias de pele não possuem a mesma validade que o xenodiagnóstico a nível da determinação do estado de

infecção. Apesar de haver concordância através da análise de biópsias de pele ou sangue e xenodiagnóstico em T1, não houve concordância entre a análise de biópsias de pele e xenodiagnóstico em T0. Para além disso, embora a análise de sangue e especialmente das biópsias de pele possuam valores de especificidade elevados, apresentaram valores de sensibilidade muito baixos (entre 0 e 0.55) em relação ao teste standard de xenodiagnóstico.

Assim, apesar das limitações logísticas, o xenodiagnóstico acaba por se revelar o método mais sensível para detetar o estado de infeção de uma ave.

## **5.2 Estudo da ocorrência de resistências de *Haemonchus contortus* aos anti-helmínticos**

### **5.2.1 Determinação da redução da contagem de ovos nas fezes**

Foram feitas 31 primeiras colheitas de fezes. Destas, apenas 28 foram válidas, pois a quantidade de amostra nas restantes foi considerada insuficiente. Posteriormente, nos mesmos animais, foram efetuadas apenas 8 segundas colheitas. Em 14 amostras não foram realizadas as segundas colheitas devido ao facto das contagens das primeiras colheitas serem inferiores a 150 OPG ou por terem corrido falhas no planeamento logístico das mesmas (em 7 amostras ocorreram imprevistos associados às datas previstas de colheita). Por cada amostra (pool de fezes) foi realizado um teste de flutuação e duas contagens de ovos pela técnica de McMaster, perfazendo no total 39 testes de flutuação Willis e 78 contagens de ovos.

Nos testes Willis foram encontrados frequentemente: ovos do tipo estrangilo, ovos de *Strongyloides papillosus* e oocistos de *Eimeria* spp.. Raramente foram encontrados ovos de *Moniezia expansa* e *Nematodirus* spp. Apenas foi observada uma vez a presença de ovos de *Trichuris ovis*.

Fizeram parte integrante do estudo 12 explorações da Península de Setúbal e 16 da zona de Sintra. Para efeitos de confidencialidade e proteção de dados, as designações oficiais das explorações foram substituídas por códigos, em que M = Moita e S = Sintra, o que faz com que M1 seja a primeira exploração em que se realizaram colheitas na zona da OPP da Península de Setúbal (localizado na Moita) e S1 seja a primeira exploração em que se realizaram colheitas na zona de Sintra, e assim sucessivamente, como se pode ver na figura 7. A exploração S17 consta do mapa pois foram realizadas colheitas na mesma mas não fará parte integrante dos resultados por motivos associados à falta de dados da exploração.

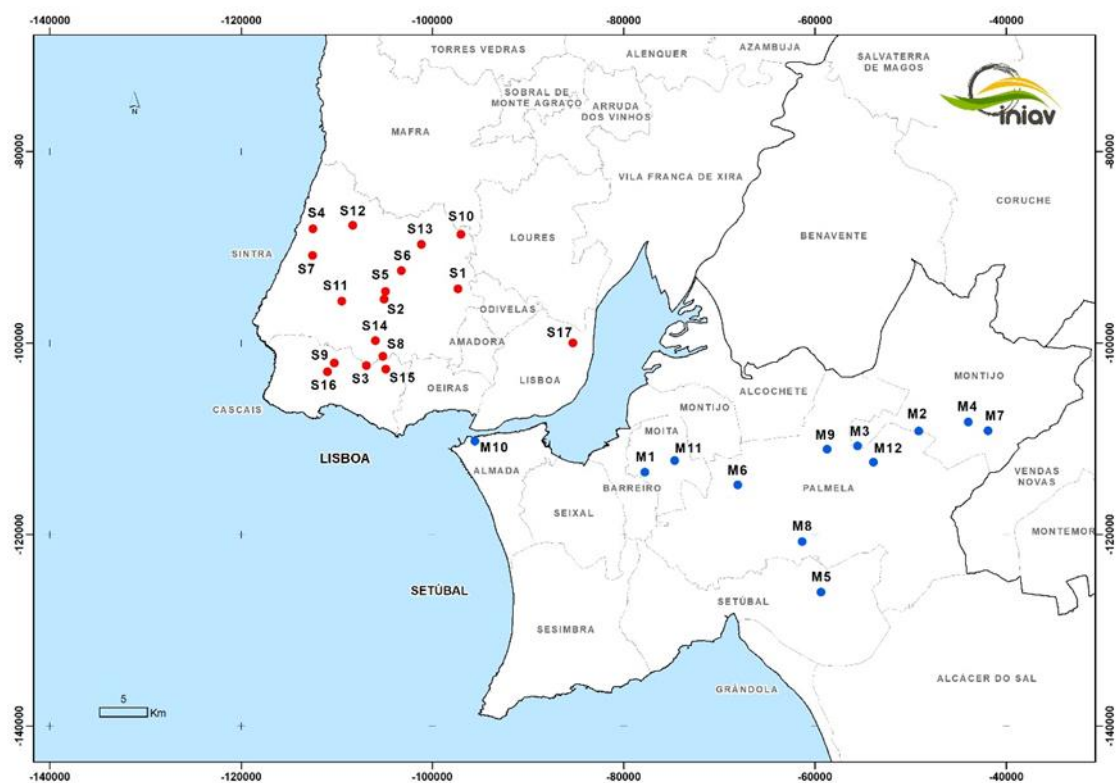


Figura 7: Localização das explorações onde foram realizadas as colheitas de fezes.

A cada exploração está associado um conjunto de informação, como o anti-helmítico usado, as datas da primeira e segunda colheitas e os valores obtidos na contagem dos ovos por grama de fezes. Esta informação pode ser consultada nos quadros 3 e 4, consoante a zona de colheita.

Quadro 3: Dados relativos à avaliação da ocorrência de resistências através do FECRT, na área de atuação da OPP da Moita (distrito de Setúbal).

Exploração	Freguesia	Concelho	Data 1ªC	AH	OPG	Data 2ªC	OPG
M1	Moita	Moita	29/01/2019	Cidectin-Triclamox	0	-	-
M2	Santo Isidro de Pegões	Montijo	29/01/2019	Cidectin-Triclamox	100	-	-
M3	Poçoirão	Palmela	05/02/2019	Cidectin-Triclamox	100	-	-
M4	Pegões	Montijo	05/02/2019	Cidectin-Triclamox	50	-	-
M5	Mourisca	Setúbal	06/02/2019	Cidectin-Triclamox	125	-	-
M6	Pinhal Novo	Palmela	18/02/2019	Cidectin-Triclamox	50	-	-
M7	Pegões	Montijo	25/02/2019	Ivomec F	375	18/03/2019	25
M8	Algeruz	Setúbal	28/02/2019	Cidectin-Triclamox	1125	18/03/2019	25
M9	Poçoirão	Setúbal	28/03/2019	Cidectin-Triclamox	300	12/04/2019	0
M10	Trafaria	Almada	10/04/2019	Ivomec F	575	25/04/2019	100
M11	Moita	Moita	08/04/2019	Cidectin-Triclamox	200	-	-
M12	Poçoirão	Palmela	08/04/2019	Seponver Plus	100	-	-

Em todas as explorações foram usadas associações de dois anti-helmínticos, de forma a eliminar os nematodes e também os trematodes como a *Fasciola hepatica*, que tende a ocorrer nesta zona. A taxa de utilização de cada um deles pode ser verificada no gráfico 3.

Em doze explorações, dez possuíam um baixo nível de infeção ( $\leq 500$  OPG), a exploração M10 possuía um nível de infeção moderado (575 OPG) ( $500 \leq \text{OPG} \leq 1000$ ) e, por último, na exploração M8 foi determinado um nível de infeção severo (1125 OPG) ( $\geq 1000$  OPG).

Nesta zona, apenas se registou a existência de um possível indício de resistência aos anti-helmínticos, na exploração M10, em que não se verificou uma redução de 95% na contagem de ovos nas fezes, mas sim de 82.6%. Nesta exploração, o anti-helmíntico usado foi Ivomec F (associação de ivermectina com clorsulon).

Relativamente aos dados correspondentes à zona de atuação da OPP de Sintra, estes são apresentados no quadro 4. Nesta zona, os anti-helmínticos foram utilizados como princípios ativos isolados e/ou em associação, dependendo da ocorrência de *Fasciola hepatica*. A taxa de utilização de cada um deles pode ser verificada no gráfico 4.

Gráfico 3: Utilização de anti-helmínticos na área de atuação da OPP da Moita.

Anti-helmínticos usados nas explorações da área de atuação da OPP da Moita

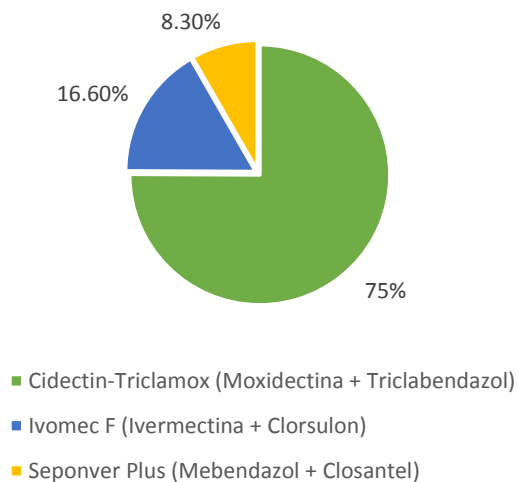
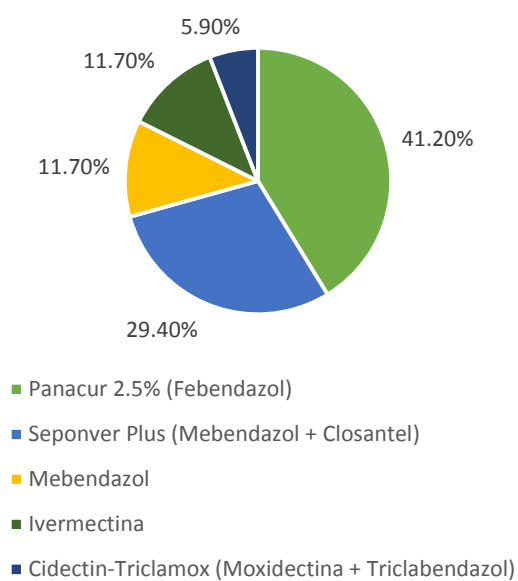


Gráfico 4: Utilização de anti-helmínticos na área de atuação da OPP de Sintra.

Anti-helmínticos usados nas explorações da área de atuação da OPP de Sintra



Quadro 4: Dados relativos à avaliação da ocorrência de resistências através do FECRT, na zona de atuação da OPP de Sintra (distrito de Lisboa).

Exp.	Lugar	Freguesia	Conc.	Data 1ªC	AH	OPG	Data 2ªC	OPG
S1	Algueirão	Algueirão	Sintra	16/01/19	Ivermectina	275	18/02/19	275
S2	Barrundal	S. Pedro	Sintra	16/01/19	Panacur 2.5%	250	-	-
S3	Magoito - Molembre	S. J. Lampas	Sintra	21/01/19	Panacur 2.5%	125	-	-
S4	Sacotes	Algueirão/M. Martins	Sintra	25/01/19	Panacur 2.5%	50	-	-
S5	Cortegaça	P. Pinheiro	Sintra	31/01/19	Panacur 2.5%	450	16/02/19	150
S6	Gouveia	S. J. Lampas	Sintra	11/02/19	Panacur 2.5%	575	27/02/19	25
S7	Cabra Figa	Rio Mouro	Sintra	07/02/19	Panacur 2.5%	250	-	-
S8	Atrozela	Alcabideche	Cascais	07/02/19	Panacur 2.5%	125	-	-
S9	Covas de Ferro	Almargem Bispo	Sintra	20/02/19	Mebendazol	150	-	-
S10	Qt. Castanhais	S. Martinho	Sintra	19/02/19	Mebendazol	25	-	-
S11	Ameixoeira	Lumiar	Lisboa	25/02/19	Seponver Plus	0	-	-
S12	D. Maria	Almargem Bispo	Sintra	28/02/19	Seponver Plus	350	22/03/19	100
S13	Albarraque	Rio Mouro	Sintra	07/03/19	Seponver Plus	25	-	-
S14	Trafouce	S. Dom. Rana	Cascais	08/03/19	Seponver Plus	0	-	-
S15	Manique	Alcabideche	Cascais	11/04/19	Ivermectina	175	-	-
S16	-	Olivais	Lisboa	01/04/19	Seponver Plus	150	-	-

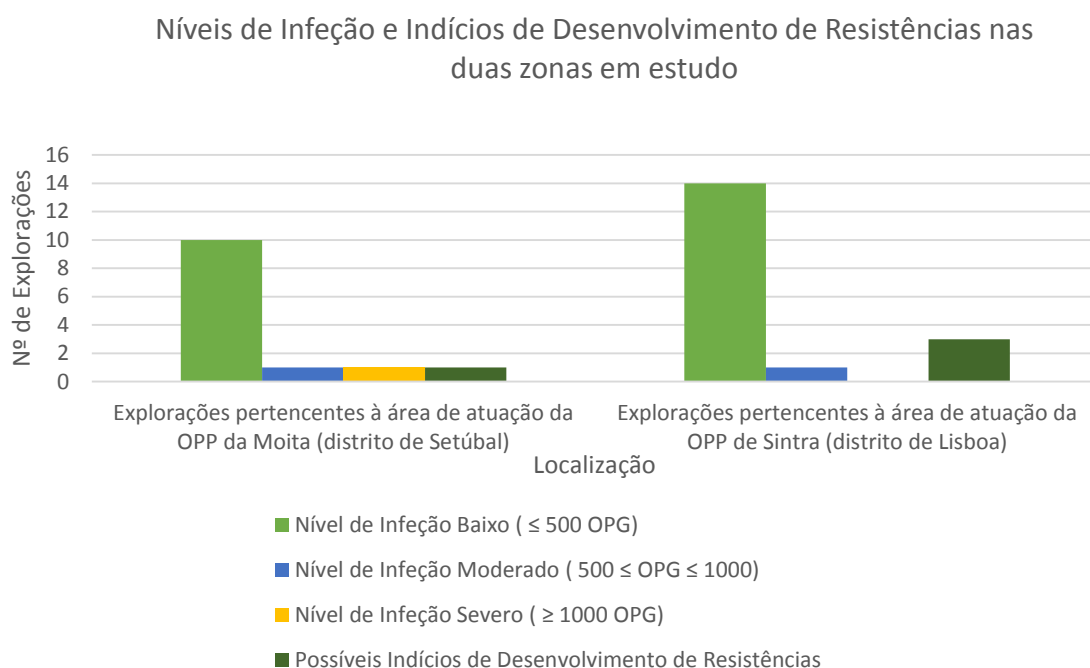
Em dezasseis explorações, quinze possuíam um nível de infeção baixo ( $\leq 500$  OPG). A exploração S6 foi identificada como possuindo um nível de infeção moderado (575 OPG) ( $500 \leq \text{OPG} \leq 1000$ ).

Nesta zona registou-se a existência de possíveis indícios de resistência aos anti-helmínticos, ao não se verificar uma redução de 95% na contagem de ovos nas fezes, nas explorações seguintes: S1 (o anti-helmíntico usado foi a ivermectina e não se verificou qualquer tipo de redução), S5 (o anti-helmíntico usado foi o febendazol e a redução verificada correspondeu a 66.7%) e S12 (o anti-helmíntico usado foi Seponver Plus, uma associação de mebendazol e closantel, e a redução ocorrida foi de 71.4%).

Ao analisarmos os resultados podemos concluir que em 89.3% das explorações de ambas as áreas de atuação das OPP, os níveis de infeção verificados são baixos. Uma

exploração em cada zona foi classificada com um nível de infeção moderado enquanto que o nível de infeção severo só se verificou numa exploração na área de atuação da OPP da Moita (distrito de Setúbal). Estes resultados são representados no gráfico 5.

Gráfico 5: Comparação dos resultados obtidos acerca dos níveis de infeção e possíveis indícios de desenvolvimento de resistências nas áreas de atuação das duas OPP.



### 5.2.2 Pesquisa e genotipagem de *Haemonchus contortus*

Em 128 abomasos colhidos foram encontradas formas parasitárias em 38. A carga parasitária variou consideravelmente entre 5 a mais de 500 parasitas adultos, com uma média de 58 parasitas encontrados por abomaso. Foram recolhidos cerca de 1300 adultos exemplares da família Trichostrongyloidae, entre eles *Haemonchus contortus* e *Teladorsagia spp.* Após análise microscópica de uma amostra retirada de cada abomaso concluiu-se que existiam *H. contortus* em baixo número, com prevalência de fêmeas sobre machos. Os machos e as fêmeas foram distinguidos através das suas características morfológicas: a extremidade terminal e o apêndice vulvar, como se pode verificar nas figuras 8 e 9, respetivamente.



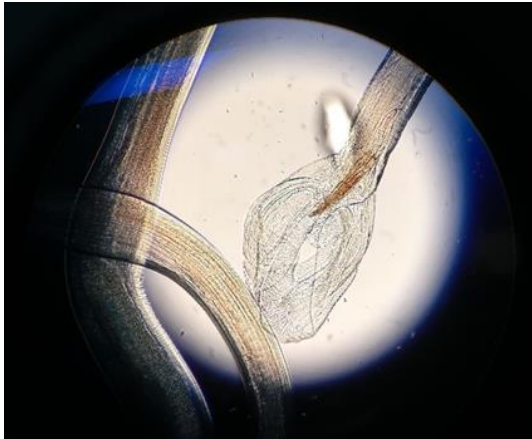


Figura 8: Extremidade terminal do macho *Haemonchus contortus*.



Figura 9: Apêndice vulvar da fêmea *Haemonchus contortus*.

Assim, dezassete *H. contortus* adultos machos, provenientes de abomasos diferentes, foram testados seguindo o protocolo já referido anteriormente na secção Materiais e Métodos. Todos revelaram suscetibilidade aos benzimidazóis e foram classificados como homozigóticos suscetíveis (“SS”, ao apresentarem uma banda não específica de 750 pares de bases e uma banda de suscetibilidade com 550 pares de bases, como se pode ver no exemplo na figura 10).

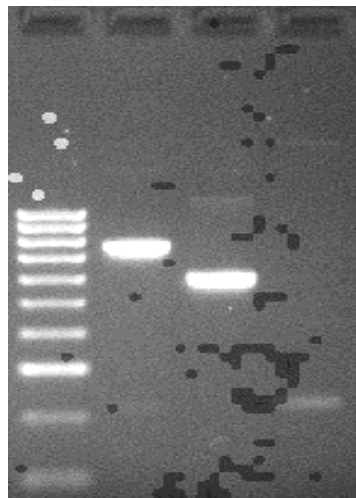


Figura 10: Exemplo do resultado obtido em todas as amostras testadas. Poço 1: marcador de pesos moleculares Hyperladder IV, Bioline; Poço 2: fragmento não específico, com 750 pb; Poço 3: fragmento específico de suscetibilidade, com 550 pb; Poço 4: bandas inespecíficas.

### 5.2.3 Resultados do questionário “Uso de Anti-helmínticos e o Desenvolvimento de Resistências”

As vinte e uma respostas recebidas aos questionários provêm de Organizações de Produtores Pecuários cuja área de intervenção inclui as zonas representadas na figura 11.

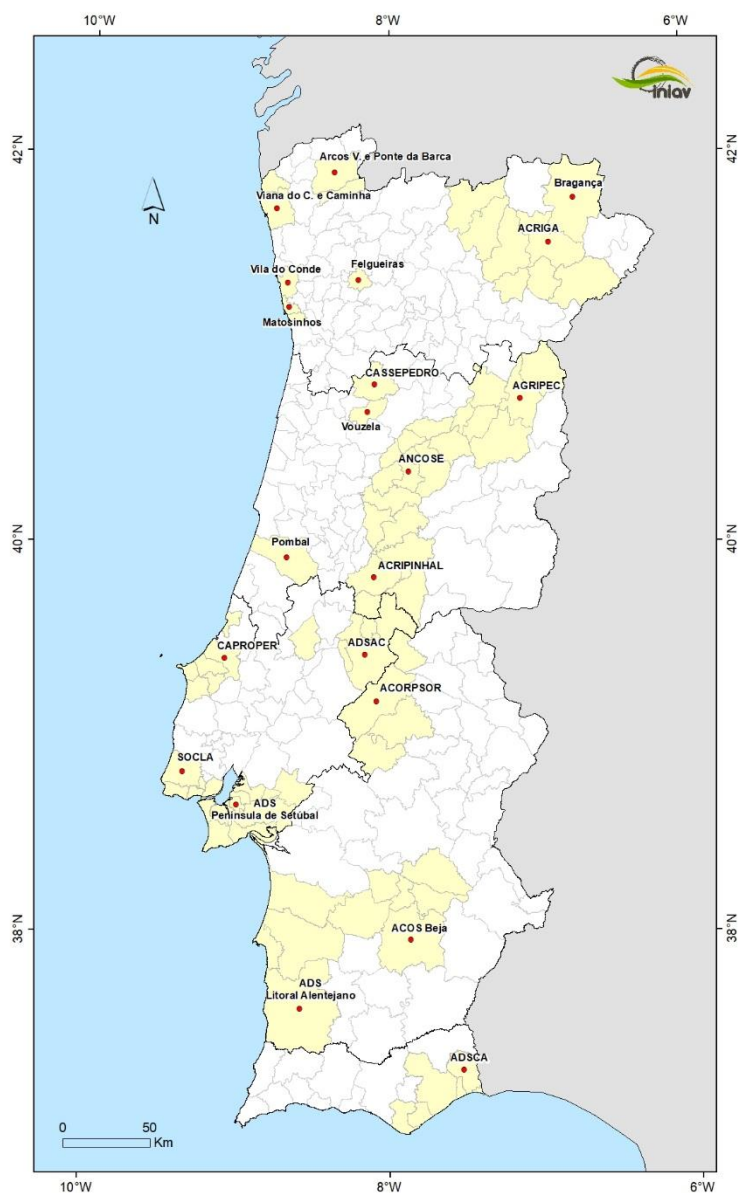


Figura 11: Concelhos abrangidos pelas OPP que participaram no questionário “Uso de Anti-helmínticos e o Desenvolvimento de Resistências”.

### **5.2.3.1 Parte I - Caracterização das OPP participantes**

Das vinte e uma respostas obtidas, sete correspondem à região do Norte (16% das OPP da região), seis à região do Centro (20% das OPP da região), quatro à região de Lisboa e Vale do Tejo (23,5% das OPP da região), três à região do Alentejo (27,3% das OPP da região) e 1 à zona do Algarve (33,3% das OPP da região).

A constituição das OPP participantes variou entre um veterinário e 55 veterinários, sendo este último número correspondente a OPP com zonas de intervenção maiores e que se dividem por brigadas de forma a abranger toda a zona pela qual são responsáveis.

O número total de explorações abrangidas por estas OPP corresponde a 25524, sendo que 15507 são explorações mistas (ovinos e caprinos) enquanto o número total de explorações exclusivamente com ovinos é de 9017. O número médio de animais por exploração é de 31 na região Norte, 33 na região Centro, 23 na região de Lisboa e Vale do Tejo, 104 no Alentejo e 30 na região do Algarve. Assim, a dimensão média das explorações ronda os 39 animais.

Os efetivos cruzados de diferentes raças representam mais de metade da população de ovinos em Portugal. As raças autóctones são encontradas em número variável consoante os distritos e as raças importadas como Île-de-France, Suffolk, Romanov e Assaf representam uma reduzida parte do efetivo.

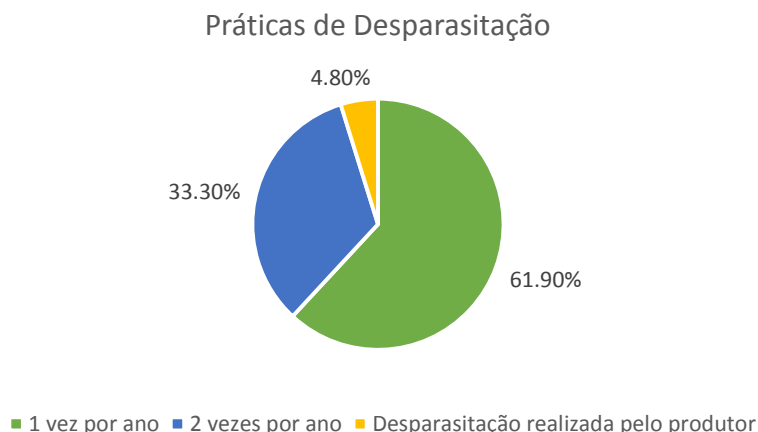
No que toca ao tipo de produção, 61,9% das explorações caracterizam-se como mistas, cuja finalidade é a produção de carne e leite, com predominância da carne; 9,5% dedicam-se somente à produção de carne e 28,5% apenas produzem leite.

O regime extensivo predomina ao ser praticado em 71,4% das explorações. 23,8% das explorações praticam o regime semi-extensivo e apenas 4,7% se integram num regime intensivo.

### **5.2.3.2 Parte II - Práticas de desparasitação**

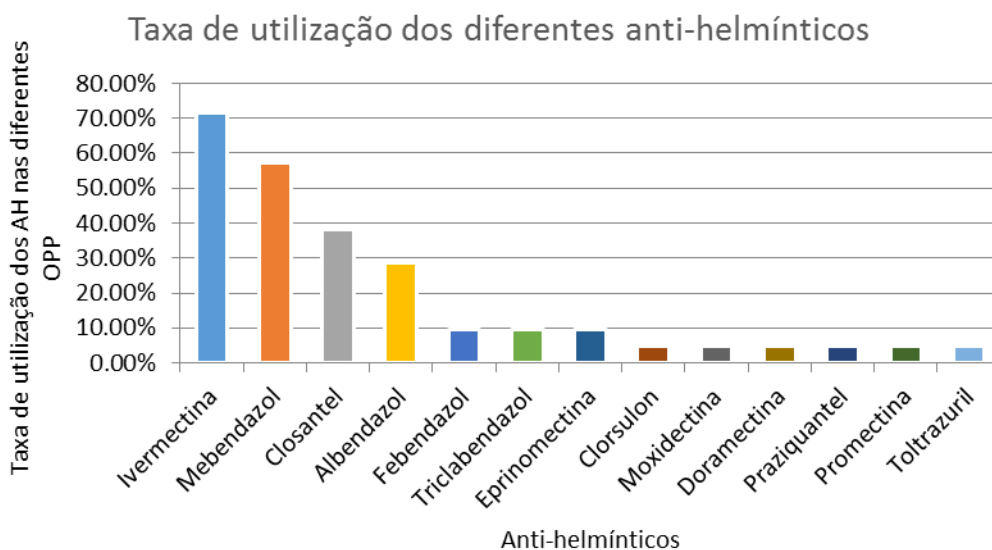
Nas questões relacionadas com as práticas de desparasitação, 61,9% das OPP realizam a desparasitação do efetivo uma vez por ano, aquando da visita às explorações na campanha de saneamento, 33,3% realizam a desparasitação duas vezes por ano e 4,8% afirmam ser o produtor/responsável pela exploração a fazê-la sem a intervenção do veterinário, como se pode verificar no gráfico 6.

Gráfico 6: Práticas de desparasitação realizadas nas OPP questionadas.



São usados diferentes anti-helmínticos na mesma exploração consoante a época do ano e a suspeita de ocorrência de determinadas espécies. A ivermectina é o anti-helmíntico com maior representação pois é usado em 71,4% das explorações. De seguida, apresenta-se o mebendazol com uma taxa de utilização de 57,1%, closantel com 38,1%, albendazol com 28,6%, febendazol, triclabendazol e eprinomectina, cada um com uma representação de 9,5%. O clorsulon, moxidectina, doramectina, praziquantel, promectina e toltrazuril são usados em apenas 4,8% das explorações. Estes resultados encontram-se representados no gráfico 7. O cálculo da dose por animal é feita pela estimativa de peso médio através da observação visual em 61,9% das explorações e pelo peso do animal mais pesado em 23,8% das explorações. 14,3% dos inquiridos não responderam a esta questão.

Gráfico 7: Representação da utilização dos diferentes anti-helmínticos nas OPP questionadas.



Relativamente à dosagem, 71,4% dos veterinários crê que possa ocorrer sobredosagem, 19% acredita que a dose aplicada é sempre a correta, 4,8% considera que raramente ocorre subdosagem e os restantes 4,8% não responderam.

Os aparelhos de administração (pistolas doseadoras) de anti-helmínticos orais são calibrados diariamente em 28,6% dos casos. Outros são calibrados com regularidade não especificada, mas mais do que uma vez por ano, alguns apenas uma vez por ano. A calibração é necessária para que não decorram falhas na administração da quantidade correta de anti-helmíntico a cada animal. Só 38,1% dos veterinários afirma ter a certeza de que os animais ingerem sempre a totalidade da dose, enquanto outros consideram que isto nem sempre ocorre.

Como estratégias alternativas a serem aplicadas como forma de controlo parasitário sem recorrer a fármacos, a rotação de pastagens foi a mais mencionada (52,4%), seguida do controlo de animais selvagens em redor da exploração (4,7%), a monitorização das contagens de ovos por grama de fezes (9,5%) e a limpeza das camas após a desparasitação dos animais (4,7%). 28,6% dos inquiridos não responderam.

A mudança de pastagem após a desparasitação de um efetivo é aconselhada em 76,2% das explorações. A quarentena dos ovinos que entram numa exploração nova é recomendada pela maior parte dos médicos veterinários.

### **5.2.3.3 Parte III - Ocorrência de resistência aos anti-helmínticos**

Todos os médicos veterinários inquiridos afirmaram estar a par da temática do desenvolvimento de resistências aos anti-helmínticos. 42,9% já duvidaram em alguma circunstância da eficácia dos anti-helmínticos e 28,6% têm conhecimento de casos suspeitos através de colegas. Mais de metade (52,4%) nunca realizou um teste de contagem da redução de ovos nas fezes.

No que diz respeito ao facto dos produtores já terem pedido conselhos ou terem demonstrado algum tipo de preocupação acerca do desenvolvimento de resistências aos anti-helmínticos, 57,1% dos médicos veterinários negaram que tal tenha acontecido. Os produtores tendem a seguir, na maioria das vezes, os conselhos prestados pelos médicos veterinários no que toca aos métodos de controlo parasitário.

## 6. Discussão

### 6.1 Estudo de sensibilidade de amostras biológicas para avaliação do estado de infecção por *Borrelia burgdorferi* sensu lato em aves

Este trabalho demonstrou que a capacidade de reservatório, ou seja a infetividade para as carraças vetor, avaliada por xenodiagnóstico, diferiu entre espécies de ave analisadas, sendo maior na espécie *T. merula* em comparação com a espécie *E. rubecula*. Este resultado está de acordo com outros estudos já realizados, tanto em Portugal como em outros países europeus, o que se deve a algum motivo fisiológico ou até relacionado com o sistema imunitário que ainda precisa de ser investigado. Considerando o risco de infecção com *B. burgdorferi* s.l. entre as diferentes espécies de aves, a prevalência tende a ser maior nas aves que procuram alimento no solo relativamente aos outros grupos de aves que possuem diferentes hábitos alimentares (Comstedt et al., 2006), o que está de acordo com os resultados obtidos neste estudo relativamente ao *T. merula*.

Esta experiência dividiu-se em dois períodos de tempo principais, T0 e T1, sendo que o único fator que os diferenciou foi a aplicação de um protocolo de stress crónico. A experiência foi delineada desta forma, pois considerou-se que o stress poderia ter efeitos na reativação da infecção por *B. burgdorferi* s.l. após a exposição a este mesmo protocolo (refletindo-se apenas nas amostras T1/2 ou T1). Porém, deve ter-se em conta que a própria captura e cativoiro possivelmente induziram também algum nível de stress nas aves em estudo. Sabe-se que o stress é imunossupressor visto que, a regulação hormonal deste sistema, particularmente pelo aumento de glucocorticoides em circulação, pode afetar a imunocompetência e ativar infeções latentes (Gylfe et al., 2000). Tendo isto em consideração, esperava-se que a capacidade de reservatório das aves fosse potenciada pela aplicação do protocolo referido. Em termos de infetividade para as carraças vetor, que é em última instância o aspeto mais importante para a manutenção do ciclo enzoótico de *Borrelia burgdorferi* s.l., isto não se verificou. No entanto, houve alguns indícios de reativação, principalmente no sangue.

Como as amostras de sangue foram recolhidas após a maioria das carraças do segundo xenodiagnóstico se terem alimentado, é possível que a reativação de infecção possa ter ocorrido mais tarde, após ter sido realizado o segundo xenodiagnóstico e, só depois deste período de espiroquetemia no sangue, as espiroquetas viriam a ser detetadas na pele e nos ixodídeos de alguns indivíduos. Não se deve, no entanto, descartar as hipóteses de que estas infeções detetadas no sangue podem ter sido causadas por genoespécies sem afinidade para a pele (dermatropismo) ou para com a espécie *I. ricinus*. Na pele, para além da distribuição de espiroquetas ser muito localizada, torna-se difícil a deteção quando as taxas de infecção são baixas ou em latência. Quanto às penas, todas se revelaram negativas para a presença de *B.*

*burgdorferi* s.l. apesar de maior parte das aves estarem infetadas, o que nos poderá indicar que não atuam como reservatório de espiroquetas e, que por isso, o seu estudo não reflete o estado de infeção das aves.

## **6.2 Estudo da ocorrência de resistências de *Haemonchus contortus* aos anti-helmínticos**

Este estudo permitiu obter informação não só sobre a ocorrência de parasitismo gastrointestinal em explorações de ovinos de duas regiões, mas também sobre o possível desenvolvimento de resistência aos anti-helmínticos por parte de *Haemonchus contortus* e as práticas de algumas OPP no que concerne à desparasitação dos efetivos ovinos no nosso país.

Entre as vinte e oito explorações incluídas no estudo de ocorrência de parasitismo em ovinos, duas revelaram possuir um estado de infeção parasitária moderado e apenas uma revelou possuir um estado de infeção parasitária severo. As restantes vinte e cinco (89,3% das explorações) caracterizaram-se por um estado de infeção parasitária baixo, o que, em princípio, se traduz como um indicador da eficácia dos tratamentos executados ou também poderá indicar que não ocorreu reinfeção posterior aos tratamentos.

Possíveis indícios de resistência aos anti-helmínticos foram detetados em 8,33% das explorações pertencentes à zona de atuação do ADS da Moita. Nas explorações pertencentes à zona de atuação do ADS de Sintra a percentagem foi mais elevada, correspondendo a 18,75%, em que 12,5% dos efetivos foram tratados com benzimidazóis, o que suporta estudos já realizados que defendem o crescente desenvolvimento de resistências a este grande grupo de anti-helmínticos (Papadopoulos et al., 2012). S1 foi uma das explorações em que se detetaram possíveis indícios de resistência. Porém, estes indícios carecem de fiabilidade visto que o intervalo entre a primeira e a segunda colheita foi maior do que deveria, ultrapassando as duas semanas e estendendo-se por um mês. Assim S1 não pode ser avaliada juntamente com as outras explorações pois não foi submetida às mesmas condições de estudo.

No decorrer da análise da informação relativa às práticas de desparasitação, nas explorações, verificou-se que alguns efetivos foram submetidos a tratamentos anti-helmínticos apesar das contagens de ovos nas fezes serem baixas, como aconteceu no caso da exploração M1 em que OPG = 0. De uma forma geral, os tratamentos devem ser realizados em períodos de risco previamente identificados ao invés de serem postos em prática através de métodos supressivos que conduzem ao desenvolvimento de resistências, ao favorecerem a ocorrência de pressão de seleção. Contudo, deve ser tido em conta que estes estão muitas vezes dependentes de razões económicas e logísticas que, não só estão relacionadas com o médico veterinário mas também com o produtor, e com as decisões que este toma no que concerne à gestão do seu efetivo.

Um tratamento anti-helmíntico frequente e supressivo não representa uma forma sustentável de controlo dos nematodes gastrointestinais. O tratamento deve ser baseado em métodos de monitorização contínua do estado do efetivo, como a realização de testes de contagem de ovos nas fezes. Previamente ao ato de desparasitação, a composição do efetivo deve ser sempre avaliada no que toca às idades dos diferentes animais, focando a atenção nos animais com idade inferior a um ano, e ao eventual estado de lactação das fêmeas, pois o sistema imunitário de ambos sofre flutuações a nível da capacidade de proteção e defesa do organismo contra infeções.

Como já é sabido, as condições climáticas influenciam os ciclos de vida dos parasitas, o que se repercute na intensidade e impacto das infeções parasitárias ao longo do ano. Deve ser tido em conta o facto deste estudo ter decorrido durante o Inverno e o início da Primavera, entre os meses de Janeiro e Abril. Nesta altura, caracterizada pelas baixas temperaturas e pela pluviosidade, os parasitas não encontram as melhores condições para o seu desenvolvimento, apesar de este ano se terem feito sentir temperaturas anormalmente quentes para a época do ano em questão. Segundo o Instituto Português do Mar e da Atmosfera, no Inverno de 2018/2019 (Dezembro de 2018 a Fevereiro de 2019) o valor médio da temperatura máxima do ar foi 1,57 °C superior ao normal e o valor médio da temperatura mínima do ar foi 0,74 °C inferior ao normal. Em relação à precipitação, este foi considerado o quarto Inverno mais seco desde o ano 2000, contribuindo assim para uma situação de seca em todo o território continental. No mês de Fevereiro foram registados elevados valores da temperatura máxima do ar: no dia 24 deste mês os termómetros marcaram 21,9 °C, mais 7,3 °C do que o valor normal para esta altura do ano (IPMA, 2019b). Em Março o valor médio da temperatura máxima do ar foi o mais alto a ser registado desde o ano de 2000, ocorrendo um agravamento da seca relativamente ao fim de Fevereiro (IPMA, 2019a). Estas variações climáticas poderiam ter contribuído para o aparecimento de surtos ou pelo menos para uma prevalência anormal de parasitismo para esta época.

Em relação às técnicas disponíveis para a realização da contagem de ovos de nematodes em espécies pecuárias, estas apresentam diferentes níveis de sensibilidade. Ao compararmos o FLOTAC com a técnica de McMaster, esta última apresenta menor sensibilidade, provavelmente devido ao facto de ser usado um grande fator de multiplicação para obter a contagem de ovos por grama de fezes (Bosco et al., 2014). No entanto esta foi a técnica utilizada neste trabalho devido ao facto de ser simples e prática (Levecke et al., 2012), tendo em conta o número de amostras em estudo.

Quanto à genotipagem todos os exemplares de *Haemonchus contortus* testados demonstraram ser suscetíveis aos benzimidazóis. Apenas 13,3% dos 128 abomasos recolhidos estavam parasitados por esta espécie. Dos exemplares recolhidos, testaram-se 17 *Haemonchus contortus* machos adultos. Foram usados machos adultos de forma a evitar a possibilidade de ADN dos ovos das fêmeas contaminarem a amostra (Beech et al., 1994, referido por Tiwari et



al., 2007). Como os animais dos quais foram recolhidos os abomasos provieram de diferentes explorações e, só a determinada altura do seu crescimento é que foram reunidos na mesma exploração, não nos é possível saber se as infeções por *Haemonchus contortus* foram adquiridas na exploração de origem ou na exploração final. Adicionalmente também não temos conhecimento das práticas de desparasitação destas explorações, o que não nos permite extrapolar que a suscetibilidade aos benzimidazóis se poderá dever a boas práticas ou simplesmente ao facto deste resultado representar apenas uma pequena amostra da população, não sendo estatisticamente significativo.

O tratamento anti-helmíntico elimina os parasitas suscetíveis, o que impossibilita que o genótipo associado à suscetibilidade seja transmitido à descendência, enquanto que os parasitas resistentes sobrevivem e conseguem fazê-lo. A taxa de seleção para a resistência depende assim da intensidade e frequência do tratamento e da “diluição” dos alelos da suscetibilidade por parte dos alelos da resistência, mantidos pelos parasitas que não são eliminados pelo tratamento. A diversidade genética de *Haemonchus contortus* pode ocorrer dentro de uma população ou entre várias populações diferentes, quer separadas geograficamente ou selecionadas pelo uso de diferentes anti-helmínticos (Prichard, 2001).

Na Europa é cada vez mais comum o desenvolvimento de resistência por parte de espécies de nematodes dia após dia, sendo que as mais comuns continuam a ser *Teladorsagia* spp, *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp. Inúmeros casos de resistência aos benzimidazóis por parte de *H. contortus* já foram reportados em países como a Grécia, Suécia e Suíça (Papadopoulos et al., 2012). Em Portugal, o estudo de Mateus et al., 2018, sugere a existência de resistência aos anti-helmínticos em ovinos no Norte de Portugal, principalmente também aos benzimidazóis.

No que concerne aos questionários, apesar de termos recebido apenas 20% das respostas desejadas (relativamente aos 105 contatos realizados), estas são originárias de diversas zonas do país que acabam por representar de forma razoável o território continental, permitindo obter informações acerca das práticas realizadas em diferentes regiões. Uma análise geral levou a concluir que os pontos mais críticos são aqueles relacionados com a dosagem e a administração de anti-helmínticos, mais concretamente no que toca à determinação do peso dos animais e à calibração das pistolas doseadoras, ambos fatores essenciais para que a desparasitação seja eficaz. Para além disto, a ausência do hábito de realizar testes de redução de contagens de ovos nas fezes de forma a avaliar o estado geral dos efetivos no que toca à carga parasitária e a falta de monitorização do modo de ação dos anti-helmínticos, são frequentes. Em mais de metade das explorações a desparasitação é efetuada uma vez por ano, na altura que coincide com a deslocação à exploração para a realização do saneamento, e o anti-helmíntico mais usado é a ivermectina.

A mudança de pastagem após a desparasitação é recomendada pelos médicos veterinários mas, em muitos casos, esta medida não se aplica pois a dimensão dos terrenos é

reduzida ou a topografia não o permite. A quarentena de novos animais introduzidos numa exploração é veemente recomendada porém, muitas vezes, não se consegue pôr em prática pois os produtores adquirem novos animais sem notificar o médico veterinário ou não têm possibilidade de ter zonas na exploração que permitam a separação e isolamento dos mesmos.

Todos os médicos veterinários estão a par do desenvolvimento de resistências, mas é estimado que maior parte dos produtores desconheçam do que se trata e da gravidade que lhe está associada.

## 7. Conclusão

Relativamente ao estudo de sensibilidade de amostras biológicas para avaliação do estado de infecção por *Borrelia burgdorferi* s.l. em aves, os resultados sugerem que, em oposição ao *T. merula*, *E. rubecula* tem uma contribuição negligenciável para o ciclo enzoótico de *B. burgdorferi* s.l., mesmo em condições de exposição a stress.

Através da comparação da sensibilidade e especificidade das diferentes amostras biológicas provenientes de aves, podemos afirmar que as amostras biológicas estudadas (penas, sangue total e biópsias de pele) apresentam nula ou baixa sensibilidade, mas alta especificidade relativamente à determinação do estado de infecção das aves por *B. burgdorferi* s.l. na natureza.

No que concerne ao estudo da ocorrência de resistências de *Haemonchus contortus* aos anti-helmínticos, conclui-se que a realização de uma inspeção periódica para detetar sinais de anemia nos ovinos, as contagens regulares de ovos nas fezes e a inspeção *post-mortem* fazem parte de um conjunto de medidas importantes para o controlo contínuo das infeções parasitárias.

Estas medidas devem ser implementadas de forma a minimizar as práticas que contribuem para a seleção para a resistência como é o caso da frequência elevada de tratamentos que se pratica atualmente, que aumenta o risco da ocorrência de infeções por *Haemonchus contortus*. Os anti-helmínticos devem ser sempre selecionados consoante o efetivo a tratar e com base no conhecimento do possível desenvolvimento de resistências.

A gestão de pastagens, o tratamento direcionado apenas aos indivíduos afetados, com especial atenção aos ovinos mais novos e às fêmeas durante o peri-parto, e o uso da nutrição (suplementação com taninos condensados e fungos nematófagos) e da genética no combate às infeções parasitárias, devem ser cada vez mais consideradas como ferramentas alternativas a serem colocadas em prática no dia-a-dia das explorações. A implementação da vacinação como forma de tratamento ao invés do uso de anti-helmínticos comporta um potencial evidente apesar de ainda carecer de mais investigação.

O conceito de população "in refugia" deve ser aplicado de forma a manter uma população parasitária que continue a ser suscetível aos anti-helmínticos, o que se pode conseguir através do tratamento seletivo do efetivo deixando alguns animais por desparasitar (aqueles que demonstrarem menor necessidade de tratamento, diagnosticados pelo método FAMACHA, por exemplo). Esta técnica é idealmente aplicável em efetivos pequenos, pois exige inspeção periódica do estado dos animais, o que requer tempo e mão-de-obra disponível, ambos condicionados num contexto de produção intensiva devido ao investimento necessário.

Anualmente, deve ser estabelecido um padrão de risco e devem ser delineados programas preventivos com base em dados epidemiológicos de forma a evitar surtos e as suas graves consequências. No nosso clima mediterrânico, as alturas propícias à ocorrência de surtos são os meses de Outono e Primavera, em que as condições ideais de temperatura e humidade

se reúnem. Contudo, as condições climáticas atípicas que se têm feito sentir devido às alterações climáticas contribuem para o aparecimento de surtos fora das épocas esperadas.

Os indícios de resistência observados nas explorações incluídas neste estudo levam-nos a concluir que a resistência aos anti-helmínticos poderá representar cada vez mais um problema, o que torna essencial a mudança de hábitos e a aplicação das medidas alternativas já referidas no combate às infeções parasitárias.

Numa análise global, maior parte dos objetivos foram cumpridos. No primeiro estudo, o primeiro objetivo foi atingido, pois conseguiu-se realizar a comparação da sensibilidade e da especificidade das diferentes amostras biológicas em causa; já o segundo objetivo, que passava pela determinação da melhor técnica de amostragem, não invasiva e fácil de executar, não foi possível de alcançar, excluindo apenas a recolha das penas para este fim. No segundo estudo, o primeiro e o segundo objetivo, que se baseavam na determinação da ocorrência de parasitismo gastrointestinal em duas zonas do país e na averiguação da existência de indícios de resistência aos anti-helmínticos, foram cumpridos. O terceiro objetivo não foi atingido pois não se conseguiu comprovar a existência de genótipos resistentes de *Haemonchus contortus* em amostras provenientes de abomasos de ovinos jovens, colhidas em matadouro. O conhecimento das práticas de desparasitação nas OPP de Portugal Continental era o quarto objetivo - este foi apenas parcialmente cumprido pois não foram obtidas a totalidade das respostas ao questionário realizado.

Todo o trabalho realizado em laboratório, tanto ao nível das doenças infecciosas como das doenças parasitárias, contribuiu para a aquisição de competências essenciais em técnicas de diagnóstico e permitiu perceber a dinâmica que está implicada desde a receção das amostras à emissão dos resultados. A importância do laboratório para o conhecimento da transmissão de doenças e no apoio aos médicos veterinários e produtores é notória.

É importante sublinhar o papel da investigação veterinária como área essencial para o progresso científico, tanto a nível da saúde humana como da saúde animal, sendo merecedora de destaque e investimento. A cooperação entre a saúde humana, animal e o ambiente é denominada de “*One Health*” (uma só saúde), um conceito que está cada vez mais presente no nosso dia-a-dia e que destaca a interligação existente entre estas três áreas e a colaboração que deve ser posta em prática de forma a serem alcançados avanços na saúde pública global.

## 8. Bibliografia

- Abbott, K A, Taylor, P M, & Stubbings, L A (2012) Sustainable Worm Control Strategies for Sheep (4th ed.). SCOPS, pp. 58.
- Aguerre, S, Jacquiet, P, Brodier, H, Bournazel, J P, Grisez, C, Prévot, F, & Michot, L (2018) Resistance to gastrointestinal nematodes in dairy sheep : Genetic variability and relevance of artificial infection of nucleus rams to select for resistant ewes on farms. Doi 10.1016/j.vetpar.2018.04.004
- Anderson, R C (2000) Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission (2nd ed.). CABI Publishing, ISBN 0851994210, pp. 672.
- Athanasiadou, S, Kyriazakis, I, Jackson, F, & L Coop, R (2000) Effects of short-term exposure to condensed tannins on adult *Trichostrongylus colubriformis*. Doi 10.1136/vr.146.25.728
- Besier, R B, Kahn, L P, Sargison, N D, & Wyk, J A Van (2016) Diagnosis , Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. Doi 10.1016/bs.apar.2016.02.024
- Bosco, A, Rinaldi, L, Maurelli, M P, Musella, V, Coles, G C, & Cringoli, G (2014) The comparison of FLOTAC , FECPAK and McMaster techniques for nematode egg counts in cattle. Doi 10.2478/s11686-014-0282-7
- Bowman, D D (2014) Georgis Parasitology for Veterinarians (10th ed.). Elsevier, EUA, ISBN: 978-1-4557-4006-2, pp. 289-315.
- Casjens, S R, Mongodin, E F, Qiu, W, Luft, B J, Schutzer, S E, Gilcrease, E B, Fraser, C M (2012) Genome Stability of Lyme Disease Spirochetes : Comparative Genomics of *Borrelia burgdorferi* Plasmids. Doi 10.1371/journal.pone.0033280
- Chafton, L (2006) The effect of a condensed tannin containing forage , sericea lespedeza on existing and challenge infections of *Haemonchus contortus* in sheep. Tese de Mestrado, Louisiana State University, EUA, pp. 40.
- Coles, G C, Jackson, F, Pomroy, W E, Prichard, R K, Samson-himmelstjerna, G V, & Silvestre, A (2006) The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Doi 10.1016/j.vetpar.2005.11.019
- Comstedt, P, Bergström, S, Olsen, B, Garpmo, U, Marjavaara, L, Mejlön, H, Bunikis, J (2006) Migratory Passerine Birds as Reservoirs of Lyme Borreliosis in Europe. Doi 10.3201/eid1207.060127

- Courtney, J W, Kostelnik, L M, Zeidner, N S, & Massung, R F (2004) Multiplex Real-Time PCR for Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. Doi 10.1128/JCM.42.7.3164
- de Carvalho, I L, Fonseca, J E, & Marques, J G (2008) Vasculitis-like syndrome associated with *Borrelia lusitaniae* infection. Doi 10.1007/s10067-008-1012-z
- Dominik, S (2005) Quantitative trait loci for internal nematode resistance in sheep : a review. Doi 10.1186/1297-9686-37-S1-S83
- FAO. (2017). FAOSTAT - Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database Consultado a 23 de Maio de 2019, disponível em <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>
- Foreyt, W J (2001) Veterinary Parasitology Reference Manual (5th ed.). Blackwell Publishing, EUA, ISBN 0813824192, pp. 69-109.
- Franca, I, Santos, L, Mesquita, T, Collares-Pereira, M, Baptista, S, Vieira, L, Viana, I, Vale, E, Prates, C (2005) Lyme borreliosis in Portugal caused by *Borrelia lusitaniae*? Clinical report on the first patient with a positive skin isolate. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 117(11–12): 429–432.
- Fritz, C L, & Kjemtrup, A M (2003) Lyme borreliosis. Doi 10.2460/javma.2003.223.1261
- Geldhof, P, & Knox, D (2008) The intestinal contortin structure in *Haemonchus contortus*: An immobilised anticoagulant. Doi 10.1016/j.ijpara.2008.05.002
- Goldman, E, & Green, L H (2009) Practical Handbook of Microbiology (2nd ed.). CRC Press, EUA, ISBN 9780849393655, pp. 630-632.
- GPP - Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral (2017). Informação de mercados: Produtos Animais. Disponível em [http://www.gpp.pt/images/GPP/O\\_que\\_disponibilizamos/Publicacoes/Periodicos/Produtos\\_Animais\\_2.pdf](http://www.gpp.pt/images/GPP/O_que_disponibilizamos/Publicacoes/Periodicos/Produtos_Animais_2.pdf) (República Portuguesa - Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural).
- Gray, J (1998) The ecology of ticks transmitting Lyme borreliosis. *Experimental & Applied Acarology*, 22 (5): 249–258.
- Gray, J, Kahl, O, Lane, R, & Stanek, G (2002) Molecular and celular biology of *Borrelia burgdorferi*. *Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control*. CABI Publishing, EUA, ISBN 9780851996325, pp. 47-73.
- Grodzicki, R L, & Steere, A C (1988) Comparison of Immunoblotting and Indirect Enzyme-Linked

Immunosorbent Assay Using Different Antigen Preparations for Diagnosing Early Lyme Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 157 (4): 790–797.

Guelph University (2012) Handbook for the the Control of Internal Parasites in Sheep and Goats. Disponível em [https://www.uoguelph.ca/~pmenzies/Handbook\\_Home.html](https://www.uoguelph.ca/~pmenzies/Handbook_Home.html) (Guelph, Canadá).

Gylfe, A, Bergström, S, Lundström, J, & Olsen, B (2000) Reactivation of *Borrelia* infection in birds. Doi 10.1038/35001663

Hasle, G, Aksel, G, Midthjell, L, Håkon, K, & Petter, H (2011) Transport of *Ixodes ricinus* infected with *Borrelia* species to Norway by northward-migrating passerine birds. Doi 10.1016/j.ttbdis.2010.10.004

Heylen, D, Krawczyk, A, Lopes de Carvalho, I, Nuncio, M S, Sprong, H, & Norte, A C (2017) Bridging of cryptic *Borrelia* cycles in European songbirds. Doi 10.1111/1462-2920.13685

Heylen, D, Matthysen, E, Fonville, M, & Sprong, H (2014) Songbirds as general transmitters but selective amplifiers of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genotypes in *Ixodes ricinus* ticks. Doi 10.1111/1462-2920.12304

Hofmeester, T R, Coipan, E C, Van Wieren, S E, Prins, H H T, Takken, W, & Sprong, H (2016) Few vertebrate species dominate the *Borrelia burgdorferi* s.l. Life cycle. Doi 1088/1748-9326/11/4/043001

Hossen, M J, Uddin, M B, Sayeem, S, Ahmed, U, Yu, Z L, & Cho, J Y (2016) Traditional Medicine / Plants for the Treatment of Reproductive Disorders in Asia Nations. *Pakistan Veterinary Journal*, 36 (2): 127–133.

Hoste, H, Torres-Acosta, J F, Paolini, V, & Aguilar-Caballero, A (2005) Interactions between nutrition and gastrointestinal infections with parasitic nematodes in goats. Doi 10.1016/j.smallrumres.2005.06.008

Hoste, H, Jackson, F, Athanasiadou, S, Thamsborg, S, & Hoskin, S (2006) The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. Doi 10.1016/j.pt.2006.04.004

Hoste, H, Martinez-Ortiz-de-Montellano, C, Manolaraki, F, Brunet, S, Ojeda-Robertos, N, Fourquaux, I, Sandoval-Castro, C A (2012) Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. Doi 10.1016/j.vetpar.2011.11.042

Humair, P F, Postic, D, Wallich, R, & Gern, L (1998) An Avian Reservoir (*Turdus merula*) of the

Lyme Borreliosis Spirochetes. Doi 10.1016/S0934-8840(98)80194-1

Idris, A, Moors, E, & Sohnrey, B (2012) Gastrointestinal nematode infections in German sheep. Doi 10.1007/s00436-011-2648-1

INE - Instituto Nacional de Estatística (2018). *Boletim Mensal da Agricultura e Pescas - Maio*. Lisboa. Disponível em [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_publicacoes&PUBLICACOESTipo=ea&PUBLICACOEScolecao=107700&selTab=tab0&xlang=pt](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESTipo=ea&PUBLICACOEScolecao=107700&selTab=tab0&xlang=pt)

INE - Instituto Nacional de Estatística (2019). *Boletim Mensal da Agricultura e Pescas - Maio*. Lisboa. Disponível em [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_publicacoes&PUBLICACOESTipo=ea&PUBLICACOEScolecao=107700&selTab=tab0&xlang=pt](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESTipo=ea&PUBLICACOEScolecao=107700&selTab=tab0&xlang=pt)

IPMA - Instituto Português do Mar e da Atmosfera (2019a). *Boletim Climatológico: Março 2019*. Lisboa. Disponível em <http://www.ipma.pt/pt/publicacoes/boletins.jsp?cmbDep=cli&cmbTema=pcl&idDep=cli&idTema=pcl&curAno=-1>

IPMA - Instituto Português do Mar e da Atmosfera (2019b). *Boletim Climatológico Sazonal: Inverno 2018/2019*. Lisboa. Disponível em <http://www.ipma.pt/pt/publicacoes/boletins.jsp?cmbDep=cli&cmbTema=pcl&idDep=cli&idTema=pcl&curAno=-1>

Jurasek, M E, Bishop-stewart, J K, Storey, B E, & Kaplan, R M (2010) Modification and further evaluation of a fluorescein-labeled peanut agglutinin test for identification of *Haemonchus contortus* eggs. Doi 10.1016/j.vetpar.2009.12.003

Kaplan, R M (2004) Drug resistance in nematodes of veterinary importance : a status report. Doi 10.1016/j.pt.2004.08.001

Karami, A. (2012). *Molecular Biology of Borrelia burgdorferi*. In *Lyme Disease* ed. Karami, A, InTech, ISBN 9789535100577, pp. 1-26.

Kotze, A C, & Prichard, R K (2016) Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus* : History, Mechanisms and Diagnosis. Doi 10.1016/bs.apar.2016.02.012

Kwa, M S G, Veenstra, J G, & Roos, M H (1994) Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in  $\beta$ -tubulin isotype 1. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 63 (2): 299–303.



- Lange, K C, Olcott, D D, Miller, J E, Mosjidis, J A, & Terrill, T H (2006) Effect of sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) fed as hay , on natural and experimental *Haemonchus contortus* infections in lambs. Doi 10.1016/j.vetpar.2006.06.001
- Lapage, G (1968) *Veterinary Parasitology* (2nd ed.). Oliver and Boyd, United Kingdom, ISBN 9780050016688, pp.1182.
- Levecke, B, Rinaldi, L, Charlier, J, Maurelli, M P, Bosco, A, Vercruysse, J, & Cringoli, G (2012) The bias , accuracy and precision of faecal egg count reduction test results in cattle using McMaster,Cornell-Wisconsin and FLOTAC egg counting methods. Doi 10.1016/j.vetpar.2012.03.017
- Lindqvist, B Å, Ljungström, B, Nilsson, O, & Waller, J (2001) The Dynamics , Prevalence and Impact of Nematode Infections in Organically Raised Sheep in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 42 (3): 377–389.
- Littman, M P, Goldstein, R E, Labato, M A, Lappin, M R, & Moore, G E (2006) ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20 (2): 422–434.
- Lopes de Carvalho, I (2010) *Borrelia lusitaniae* and Lyme borreliosis in Portugal: A contribution to the study of an emerging bacterial zoonosis with an impact on Public Health. Tese de Doutouramento em Biologia, Universidade de Lisboa, Portugal, pp. 9-140.
- Lubega, W, & Prichard, R (1991) Beta-tubulin and benzimidazole resistance in the sheep nematode *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 47 (1): 129–137.
- Mannelli, A, Bertolotti, L, Gern, L, & Gray, J (2011) Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. Doi 10.1111/j.1574-6976.2011.00312.x
- Mateus, T, Ruano, Z, Gandra, F, & Cortes, H (2018) Preliminar data suggest resistance to anthelmintics in sheep in northern Portugal. Disponível em [https://www.researchgate.net/publication/329029624\\_Preliminar\\_data\\_suggest\\_resistance\\_to\\_anthelmintics\\_in\\_sheep\\_in\\_northern\\_Portugal](https://www.researchgate.net/publication/329029624_Preliminar_data_suggest_resistance_to_anthelmintics_in_sheep_in_northern_Portugal)
- Mavrot, F, Hertzberg, H, & Torgerson, P (2015) Effect of gastro-intestinal nematode infection on sheep performance : a systematic review and meta-analysis. Doi 10.1186/s13071-015-1164-z
- Mckellar, Q A, & Jackson, F (2004) *Veterinary anthelmintics: old and new*. Doi

10.1016/j.pt.2004.08.002

McMahon, C, McCoy, M, Ellison, S E, Barley, J P, Edgar, H W J, Hanna, R E B, Fairweather, I (2013) Veterinary Parasitology Anthelmintic resistance in Northern Ireland ( III ): Uptake of ‘ SCOPS ’ (Sustainable Control of Parasites in Sheep) recommendations by sheep farmers. Doi 10.1016/j.vetpar.2012.11.032

Min, B R, Barry, T N, Attwood, G T, & McNabb, W C (2003) The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. Doi 10.1016/S0377-8401(03)00041-5

Miranda Vítor, A C M (2018) Sistemas de Produção Ovina de Carne e Leite no Baixo Alentejo - Caracterização do concelho de Mértola. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal, pp.1-6.

National Research Council (US). (2005). Critical Needs for Research in Veterinary Science. Doi 10.17226/11366

Norte, A C, Araújo, P M, da Silva, L P, Tenreiro, P Q, Ramos, J A, Nuncio, M S, de Carvalho, I L (2016) Characterization Through Multilocus Sequence Analysis of *Borrelia turdi* Isolates from Portugal. Doi 10.1007/s00248-015-0660-1

Norte, A C, Lopes de Carvalho, I, Nuncio, M S, Ramos, J A, & Gern, L (2013) Blackbirds *Turdus merula* as competent reservoirs for *Borrelia turdi* and *Borrelia valaisiana* in Portugal: Evidence from a xenodiagnostic experiment. Doi 10.1111/1758-2229.12058

Norte, A C, Ramos, J A, Lopes de Carvalho, I, Nuncio, M S, Gonçalves, M, & Gern, L (2012) Diversity and seasonal patterns of ticks parasitizing wild birds in western Portugal. Doi 10.1007/s10493-012-9583-4

Nuncio, M, & Lopes de Carvalho, I (2014) Doenças associadas a carraças: Borreliose de Lyme. In *Doenças associadas a artrópodes vetores e roedores*, ed. Nuncio, M, Alves M J, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge IP, Lisboa, ISBN 9789728643904, pp. 87-96.

Paolini, V, Bergeaud, J P, Grisez, C, Prevot, F, Dorchies, P, & Hoste, H (2003) Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. Doi 10.1016/S0304-4017(03)00064-5

Papadopoulos, E, Gallidis, E, & Ptochos, S (2012) Anthelmintic resistance in sheep in Europe : A selected review. Doi 10.1016/j.vetpar.2012.03.036

Parola, P, & Raoult, D (2001) Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging

infectious threat. *Clinical Infectious Diseases*, 32 (6): 897–928.

Patrício, C (2017) Borreliose de Lyme em cães e cavalos : caracterização serológica e molecular em animais assintomáticos. Tese de Mestrado em Ciências Biomédicas, Universidade Nova de Lisboa, Portugal, pp. 88.

Ploeger, H W, & Everts, R R (2018) Alarming levels of anthelmintic resistance against gastrointestinal nematodes in sheep in the Netherlands. Doi 10.1016/j.vetpar.2018.09.007

Prichard, R K (2001) Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends in Parasitology*, 17 (9): 445–453.

Revuelta, J A (1994) Borreliosis de Lyme. Junta de Castilla y León, Espanha, ISBN 8460617270, pp 94.

Roeber, F, Jex, A R, & Gasser, R B (2013) Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep , and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. Doi 10.1186/1756-3305-6-153.

Rose, H, Caminade, C, & Bolajoko, M B (2016) Climate-driven changes to the spatio-temporal distribution of the parasitic nematode *Haemonchus contortus* in sheep in Europe. Doi 10.1111/gcb.13132

Samson-Himmelstjerna, G Von (2006) Molecular diagnosis of anthelmintic resistance. Doi 10.1016/j.vetpar.2005.12.005

Samson-Himmelstjerna, G Von, Walsh, T K, Donnan, A A, Carrie, S, Jackson, F, Skuce, P J, Wolstenholme, A J (2009) Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing. Doi 10.1017/S003118200800543X

Schwaiger, M, Cassinotti, P, & Peter, O (2001) Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) infections using a real-time PCR assay. *Clinical Microbiology and Infection*, 7 (9): 461-469.

Skuce, P J, Morgan, E R, Dijk, J Van, & Mitchell, M (2013) Animal health aspects of adaptation to climate change : beating the heat and parasites in a warming Europe. Doi 10.1017/S175173111300075X

Tilly, K, Rosa, P A, & Stewart, P E (2008) Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. Doi 10.1016/j.idc.2007.12.013

Tiwari, J, Kolte, A, Kumar, S, Swarnkar, C P, Singh, D, & Pathak, K M L (2007) Diagnosis of

- Benzimidazole Resistance in *Haemonchus contortus* of Sheep by Allele Specific PCR. Doi 10.5713/ajas.2007.7
- Ueno, H, & Gonçalves, P (1998) Manual para Diagnóstico das Helmintoses de Ruminantes (4th ed.). Japan International Cooperation Agency, Tokyo, pp. 143.
- Venczel, R, Pavlovic, L K M, & Vaculova, E D T (2015) A novel duplex real - time PCR permits simultaneous detection and differentiation of *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Doi 10.1007/s15010-015-0820-8
- Waghorn, G C, & McNabb, W C (2003) Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62 (2): 383–392.
- Waller, P J, Rydzik, A, Ljungström, B L, & Törnquist, M (2006) Towards the eradication of *Haemonchus contortus* from sheep flocks in Sweden. Doi 10.1016/j.vetpar.2005.11.017
- Waller, P J, & Thamsborg, S M (2004) Nematode control in 'green' ruminant production systems. Doi 10.1016/j.pt.2004.07.012
- Williams, A R, Fryganas, C, Ramsay, A, Mueller-harvey, I, & Thamsborg, S M (2014) Direct Anthelmintic Effects of Condensed Tannins from Diverse Plant Sources against *Ascaris suum*. Doi 10.1371/journal.pone.0097053
- Zeineldin, M, Abdelmegeid, M, Barakat, R, & Ghanem, M (2018) A Review : Herbal Medicine as an Effective Therapeutic Approach for Treating Digestive Disorders in Small Ruminants. Doi 10.5455/ajvs.286678

## 9. Anexos

## **Anexo 1: Protocolo de extração de ADN das penas pelo método de Chelex**

1. Selecionar 5 penas (escolher uma mistura de 5 tipos de penas diferentes, correspondentes a 5 áreas de colheita diferentes – topo da cabeça, perto dos olhos, ouvidos, queixo e na região entre os olhos e as narinas).
2. Cortar o calamus de cada pena para dentro de um tubo identificado de 1.5ml. Esterilizar a tesoura e pinça com hipoclorito de sódio a 10% e álcool entre as amostras.
3. Preparar 5% da solução Chelex (0.5g de Chelex em 10ml de água destilada livre de DNase/RNase) usando uma espátula esterilizada com hipoclorito de sódio a 10%.
4. Fazer vórtex da solução Chelex e pipetar 50µl 5% de Chelex para o tubo que contém as penas.
5. Adicionar 5µl de proteinase K (20µg/µl) em cada tubo.
6. Incubar a 56°C durante 2h.
7. Ferver durante 8 minutos (100°C).
8. Vórtex.
9. Centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm.
10. Remover 30µl do sobrenadante para um novo tubo identificado de 1.5ml. Descartar o pellet.

Armazenar a -20°C ou a - 80°C.

Após o armazenamento deve-se ferver novamente, fazer vórtex e centrifugar.

143-2832, Chelex 100, Resin, from Biorad.

## **Anexo 2: Protocolo de Extração de ADN de carraças de corpo duro (Qiagen - Dneasy Blood & Tissue Kit)**

1. Colocar a carraça num tubo de 1.5ml e adicionar 180µl de buffer ATL.
2. Adicionar 20µl de Proteinase K. Vórtex. Incubar a 56°C, 1-3 horas (ou overnight) até o tecido estar completamente lisado.
3. Adicionar 200µl de AL e incubar a 70°C, 10min.
4. Adicionar 200µl de etanol (96-100%). Vórtex.
5. Transferir a mistura para uma coluna (num tubo de 2ml). Centrifugar 1 minuto a 8000 rpm. Descartar o filtrado e o tubo.
6. Colocar a coluna num novo tubo de 2ml. Adicionar 500µl de buffer AW1. Centrifugar 1 minuto a 8000 rpm. Descartar o filtrado e o tubo.
7. Colocar a coluna num novo tubo de 2ml. Adicionar 500µl de buffer AW2. Centrifugar 3 minutos a 14000rpm. Descartar o filtrado e o tubo.
8. Fazer nova centrifugação durante 1min a 14000rpm. (passo importante)
9. Colocar a coluna num tubo de 1.5ml (final). Adicionar 80µl de buffer AE. Incubar 1 minuto a RT (room temperature - temperatura ambiente). Centrifugar 1 minuto a 8000 rpm.

(nota: foi usado este mesmo protocolo para a extração de ADN das biópsias de pele.)

### **Anexo 3: Protocolo de extração de ADN de sangue e fluidos corporais - QIAamp DNA Mini**

1. Pipetar 20 µl de proteinase K para um tubo de 1.5 ml;
2. Adicionar 10 µl de amostra (neste caso, sangue) ao tubo anterior;
3. Adicionar 200 µl de buffer AL à amostra e fazer vortex de 15 segundos;
4. Incubar a 56°C durante 10 minutos;
5. Adicionar 200 µl de etanol (96-100%) à amostra e fazer novo vortex durante 15 segundos;
6. Colocar a mistura do passo 5 numa coluna QIAamp Mini spin e centrifugar a 8000 rpm durante 60 segundos. De seguida colocar a coluna num tubo limpo de 2 ml e descartar o tubo que contém o filtrado;
7. Adicionar 500 µl de buffer AW1 e centrifugar a 8000 rpm durante 60 segundos. De seguida colocar a coluna num tubo limpo de 2 ml e descartar o tubo que contém o filtrado;
8. Adicionar 500 µl de buffer AW2 e centrifugar a 13400 rpm durante 3 minutos;
9. Centrifugar novamente a 13400 rpm mas desta vez durante 60 segundos;
10. Colocar a coluna QIAamp Mini spin num tubo de 1.5 ml e descartar o tubo que contém o filtrado; Adicionar 80 µl de buffer AE, incubar à temperatura ambiente (15-25°C) durante 1 minuto e posteriormente centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
11. Armazenar as amostras a -20°C.

Rpm = rotações por minuto



#### Anexo 4: PCR nested dirigido ao gene *flaB*

Primers (6 pM):

Fla Outer 1: 5' AAG TAG AAA AAG TCT TAG TAA GAA TGA AGG A 3'

Fla Outer 2: 5' AAT TGC ATA CTC AGT ACAT ATT CTT TAT AGA T 3'

Fla Inner 1: 5' CAC ATA TTC AGA TGC AGA CAG AGG TTC TA 3'

Fla Inner 2: 5' GAA GGT GCT GTA GCAVGGT GCT GGC TGT 3'

Tabela 1: Descrição das condições em que ocorreram as reações no PCR nested.

Passos	Tempo	Temperatura (°C)
1)	1 minuto	94°C
2)	30 segundos	94°C
3)	1 minuto	52°C
4)	2 minutos (após esta fase, voltar ao passo 2)	72°C
5)	5 minutos	72°C
6)	Pausa (infinito)	12°C

Mix Applied Biosystems

	1ªR	2ªR
Buffer (Tampão)	5 µl	5 µl
DNTP's	1 µl	1 µl
Primer 1	2 µl	2 µl
Primer 2	2 µl	2 µl
MgCl <sup>2</sup>	3 µl	-
Taq	0.25 µl	0.15 µl
Água	31.75 µl	34.85 µl
	45 µl mix + 5 µl ADN	45 µl mix + 5 µl produto 1ªR

Taq = Polimerase de ADN termoestável

DNTP = Deoxiribonucleótido trifosfato

MgCl<sup>2</sup> = Cloreto de magnésio

## Anexo 5: PCR em tempo real dirigido ao gene 23S rRNA

Forward primer Bb23SF: 5' – CGA GTC TTA AAA GGG CGA TTT AGT – 3'

Reverse primer Bb23SR: 5' – GCT TCA GCC TGG CCA TAA ATA G – 3'

Probe Bb23S1: FAM 5' – AGA TGT GGT AGA CCC GAA GCC GAG TG – 3'

MIX (volume total: 10µl):

Master: 1 µl

MgCl<sup>2</sup>: 1.6 µl

Bb23SF (10 pM): 0.5 µl

Bb23SR (10 pM): 0.5 µl

Probe Bb23S1: 0.2 µl

H<sub>2</sub>O: 4.7 µl

ADN: 1.5 µl

Conditions: Absolute quantification (visto que são utilizadas sondas de hidrólise tem de ser feita quantificação absoluta.)

Channel: Fam (530nm)

Tabela 2: Programação do PCR em tempo real dirigido ao gene *flaB*.

Passos	Tempo	Temperatura
Desnaturação	1 ciclo de 10 minutos	95°C
Amplificação	45 ciclos de 15 segundos e 45 ciclos de 1 minuto	95°C e 60°C, respetivamente
Arrefecimento	1 ciclo de 30 segundos	40°C

[Probe e primers: (Courtney et al., 2004); Mix e protocolo: (Venczel et al., 2015)]

## Anexo 6: PCR em tempo real dirigido ao gene *flaB*

Forward primer FlaF1A: 5' – AGC AAA TTT AGG TGC TTT CCA A – 3'

Reverse primer FlaR1: 5' – GCA ATC ATT GCC ATT GCA GA – 3'

Probe Flaprobe1:

FAM 5' – TGC TAC AAC CTC ATC TGT CAT TGT AGC ATC TTT TAT TTG – 3'

MIX (volume total: 20µl):

Master: 2 µl

MgCl<sub>2</sub>: 2 µl

FlaR1 (10 pM): 2.25 µl

FlaF (10 pM): 0.75 µl

Probe Flaprobe1 (20 pM): 0.5 µl

H<sub>2</sub>O: 7.5 µl

ADN: 5 µl

Conditions: Absolute quantification /Channel:Fam

Tabela 3: Programação do PCR em tempo real dirigido ao gene *flaB*.

<b>Passos</b>	<b>Tempo</b>	<b>Temperatura</b>
Desnaturação	1 ciclo de 10 minutos	95°C
Amplificação	45 ciclos de 15 segundos e 45 ciclos de 1 minuto	95°C e 60°C, respetivamente
Arrefecimento	1 ciclo de 30 segundos	40°C

[Probe e primers: (Schwaiger et al., 2001); Mix e protocolo: (Venczel et al., 2015)]

## **Anexo 7: Técnica de McMaster modificada**

- 1) Misturar 3g de fezes com 42 ml de água da torneira;
- 2) Homogeneizar e filtrar o conteúdo obtido com o auxílio de um funil de vidro e gaze;
- 3) Recolher o filtrado e passar 14-15 ml do mesmo para um tubo novo;
- 4) Centrifugar durante 2 minutos, a 2000rpm;
- 5) Descartar o sobrenadante e adicionar solução saturada de NaCl ao pellet até atingir a marcação dos 14 ml;
- 6) Agitar e pipetar a quantidade necessária para a câmara de McMaster com uma pipeta de Pasteur;
- 7) Aguardar 30 segundos e proceder à contagem dos ovos em cada área quadrada da câmara. Somar o número total de ovos contados nas duas áreas e multiplicar esse valor por 50 – o resultado obtido representa o número de ovos por grama de fezes. (o volume de cada zona quadrada é 0.15 ml pois esta possui as seguintes medidas: 1 cm X 1 cm X 0.15 cm).

[em <http://cal.vet.upenn.edu/projects/parasit06/website/mcmaster.htm> consultado a 05/01/19) e (Foreyt, 2001)]

## **Anexo 8: Protocolo de extração de ADN: NZY Tissue gDNA Isolation Kit**

1. Preparação da amostra: colocar a amostra num tubo Eppendorf;
2. Pré-lise da amostra: adicionar 180 µl de Buffer NT1 e 25 µl de proteínase K à amostra. Centrifugar com o auxílio do vortex e incubar a 56°C durante 1-3 horas.
3. Lise da amostra: fazer vortex da amostra, adicionar 200 µl de Buffer NL e voltar a fazer vortex, durante 10 segundos;
4. Adição de etanol: adicionar 210 µl de etanol a 100% à amostra e fazer vortex logo de seguida.
5. Ligação do ADN: transferir a mistura do passo 4 para uma coluna NZY Spin Tissue, colocada num tubo colector de 2 ml. Centrifugar por 1 min a 11.000 g. Descartar o sobrenadante e colocar a coluna num novo tubo colector;
6. Membrana de lavagem de sílica: adicionar 500 µl de Buffer NW1 à coluna. Centrifugar por 1 min a 11.000 g. Descartar o sobrenadante e colocar a coluna num novo tubo colector; Adicionar 600 µl de Buffer NW2 à coluna e centrifugar por 1 min a 11.000 g. Descartar o sobrenadante e colocar a coluna num novo tubo colector;
7. Membrana de sílica seca: colocar a coluna NZY Spin Tissue num tubo colector e centrifugar durante 2 minutos a 11.000 g.
8. Eluição do ADN: colocar a coluna num tubo Eppendorf novo e adicionar 100 l de Buffer NE. Incubar 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugar durante 2 minutos a 11.000 g. O ADN obtido pode ser armazenado a 4°C ou -20°C.

Buffer = tampão

## **Anexo 9: Questionário: “Uso de Anti-helmínticos e o Desenvolvimento de Resistências”**

### **Parte I – Identificação**

1. Identificação do ADS:
2. Concelhos (de atuação; onde se encontram a maioria dos associados):
3. Nº veterinários pertencentes ao ADS:
4. Nº explorações a que presta assistência e caracterização das mesmas:
  - a. Nº explorações de ovinos:
  - b. Nº explorações mistas (ovinos e caprinos):
  - c. Dimensão média (nº animais/exploração):
  - d. Raças:
  - e. Tipo de produção (carne/leite):
  - f. Maneio/regime intensivo e extensivo?

### **Parte II - Desparasitação**

5. Desparasitação
  - a. Quais os critérios pelos quais se rege para proceder à desparasitação de um efetivo? [(ex: Altura/estação do ano; Idade; Carga parasitária/OPG(...)] Com que regularidade o faz? (ex: só tem oportunidade de o fazer quando se desloca a uma exploração para realizar o saneamento?)

- b. Quais os desparasitantes usados? (nome comercial ou princípio ativo)
  - c. Quais os critérios para a escolha/uso de determinado desparasitante?
6. Como calcula a dose de desparasitante a administrar num determinado rebanho? Considera que nas explorações às quais presta assistência exista a possibilidade de ocorrência de sub/sobre dosagem?
7. Com que frequência verifica se os aparelhos de administração (drenching guns) estão “calibrados”? Consegue ter a certeza de que o animal ingere a totalidade da dose?
8. Quais as estratégias que costuma adoptar/adoptaria (se necessitasse) como forma de controlo parasitário sem recorrer a fármacos?
9. Quando realiza a desparasitação de um rebanho aconselha a mudança/rotação de pastagem?
10. Costuma fazer quarentena aos ovinos novos que entram numa exploração?

### **Parte III – Resistências**

11. Está a par da temática do desenvolvimento de resistências aos anti-helmínticos?
12. Já alguma vez suspeitou da eficácia dos anti-helmínticos em alguma exploração pela qual é responsável? Tem conhecimento de algum caso através dos seus colegas do ADS?

12. Já alguma vez realizou FECRT (Fecal Egg Count Reduction Test = teste de redução da contagem de ovos presentes nas fezes)
  
13. Os produtores já lhe pediram conselhos ou mostraram preocupação em relação aos anti-helmínticos e ao desenvolvimento de resistências?
  
14. Sente que os produtores seguem os seus conselhos no que toca aos métodos de controlo parasitário? (ex: respeitam as alturas que sugere para realizar a desparasitação? Querem usar os desparasitantes que recomenda ou acham que há outros melhores e “insistem” em usar esses?)

Muito obrigada pela participação.



**Anexo 10: Concentração de ADN nas amostras de sangue total após extração, medida com recurso ao NanoDrop™.**

<b>Sangue Total T0</b>			
<b>Amostra</b>	<b>Concentração de ADN (ng/ul)</b>	<b>Rácio de absorvância 260/280 (nm) <sup>a</sup></b>	<b>Rácio de absorvância 260/230 (nm) <sup>b</sup></b>
A387220		não colhido	
A387221		não colhido	
A387222		não colhido	
A387224		não colhido	
A387225		não colhido	
A387227		não colhido	
A387229		não colhido	
A387243		não colhido	
A387245		não colhido	
A387246		não colhido	
A387250		não colhido	
F34767	7.5	1.84	24.32
F34768	5.7	1.91	0.26
A387254		não colhido	
A387255		não colhido	
A387256		não colhido	
A387257		não colhido	
A387258		não colhido	
F34770	10	1.91	42.14
F34771	14	1.97	4.52
F34772	9.1	1.62	8.22
F34774	8.5	1.86	0.87
F34776	9.3	1.76	-1.62
F34779	13.7	1.83	0.52
F34781	17.3	1.79	0.68
RF34743	4.8	1.44	-1

a = este rácio permite avaliar a pureza do ADN. Se o rácio de absorvância rondar o valor 1.8, o ADN obtido a partir da amostra é considerado puro.

b = este rácio é usado como medida secundária da pureza dos ácidos nucleicos. Os valores esperados rondam 2.0-2.2. Caso os valores obtidos sejam mais baixos isso poderá indicar contaminação da amostra.

(Continuação do Anexo 10)

<b>Sangue Total T1/2</b>			
<b>Amostra</b>	<b>Concentração de ADN (ng/ul)</b>	<b>Rácio de absorvância 260/280 (nm)<sup>a</sup></b>	<b>Rácio de absorvância 260/230 (nm)<sup>b</sup></b>
<b>A387220</b>		não colhido	
<b>A387221</b>		não colhido	
<b>A387222</b>		não colhido	
<b>A387224</b>		não colhido	
<b>A387225</b>		não colhido	
<b>A387227</b>		não colhido	
<b>A387229</b>		não colhido	
<b>A387243</b>		não colhido	
<b>A387245</b>		não colhido	
<b>A387246</b>		não colhido	
<b>A387250</b>		não colhido	
<b>F34767</b>	29	2	1
<b>F34768</b>	4.7	1.91	5.38
<b>A387254</b>		não colhido	
<b>A387255</b>		não colhido	
<b>A387256</b>		não colhido	
<b>A387257</b>		não colhido	
<b>A387258</b>		não colhido	
<b>F34770</b>	7.6	2.01	4.27
<b>F34771</b>	24.2	1.86	0.73
<b>F34772</b>	10.7	2.1	0.48
<b>F34774</b>	16.9	2.08	1.48
<b>F34776</b>	6.5	1.87	0.45
<b>F34779</b>	6.2	1.98	-3.03
<b>F34781</b>	7.4	1.92	0.68
<b>RF34743</b>	5.8	1.78	0.5

a = este rácio permite avaliar a pureza do ADN. Se o rácio de absorvância rondar o valor 1.8, o ADN obtido a partir da amostra é considerado puro.

b = este rácio é usado como medida secundária da pureza dos ácidos nucleicos. Os valores esperados rondam 2.0-2.2. Caso os valores obtidos sejam mais baixos isso poderá indicar contaminação da amostra.

(Continuação do anexo 10)

<b>Sangue Total T1</b>			
<b>Amostra</b>	<b>Concentração de ADN (ng/ul)</b>	<b>Rácio de absorvância 260/280 (nm) <sup>a</sup></b>	<b>Rácio de absorvância 260/230 (nm) <sup>b</sup></b>
<b>A387220</b>	20.1	2.03	1.56
<b>A387221</b>	11.5	2.19	1.45
<b>A387222</b>	20.6	1.94	0.83
<b>A387224</b>	7	1.66	0.66
<b>A387225</b>	25	1.97	1.65
<b>A387227</b>	15	1.86	0.71
<b>A387229</b>	30.8	1.78	0.99
<b>A387243</b>	18.9	1.75	0.62
<b>A387245</b>	23.2	1.58	0.98
<b>A387246</b>	11.9	1.87	0.49
<b>A387250</b>	19.6	1.86	0.96
<b>F34767</b>	33.1	1.96	1.1
<b>F34768</b>	36.8	1.91	1.12
<b>A387254</b>	12.1	1.97	1.23
<b>A387255</b>	9.7	1.65	0.34
<b>A387256</b>	12.8	1.86	0.49
<b>A387257</b>	10	1.71	1.12
<b>A387258</b>	10.4	2.01	0.4
<b>F34770</b>	24.8	1.86	1.57
<b>F34771</b>	48.5	1.96	1.47
<b>F34772</b>	46.7	1.96	1.85
<b>F34774</b>	34.1	1.95	1.53
<b>F34776</b>	19.6	2.01	0.98
<b>F34779</b>	35.8	1.94	1.2
<b>F34781</b>	44.9	1.89	1.55
<b>RF34743</b>	26	1.93	0.94

a = este rácio permite avaliar a pureza do ADN. Se o rácio de absorvância rondar o valor 1.8, o ADN obtido a partir da amostra é considerado puro.

b = este rácio é usado como medida secundária da pureza dos ácidos nucleicos. Os valores esperados rondam 2.0-2.2. Caso os valores obtidos sejam mais baixos isso poderá indicar contaminação da amostra.

**Anexo 11: Concentração de ADN nas amostras de biópsias de pele após extração, medida com recurso ao NanoDrop™.**

<b>Biópsias de Pele T0</b>			
<b>Amostra</b>	<b>Concentração de ADN (ng/ul)</b>	<b>Rácio de absorvância 260/280 (nm)<sup>a</sup></b>	<b>Rácio de absorvância 260/230 (nm)<sup>b</sup></b>
<b>A387220</b>	6.8	2.06	1.97
<b>A387221</b>	4.1	2.71	0.92
<b>A387222</b>	10.1	1.68	1.73
<b>A387224</b>	4.8	0.7	-0.11
<b>A387225</b>	2.8	-7.01	-2.54
<b>A387227</b>	8.2	1.85	0.55
<b>A387229</b>	31.2	1.88	0.92
<b>A387243</b>	não foi colhida		
<b>A387245</b>	10.1	1.7	0.76
<b>A387246</b>	15.3	1.74	1.81
<b>A387250</b>	17.2	1.82	1.85
<b>F34767</b>	10.1	1.98	0.77
<b>F34768</b>	18.9	1.79	1.55
<b>A387254</b>	10.1	1.63	0.89
<b>A387255</b>	10.9	1.56	0.78
<b>A387256</b>	2.5	0.5	-0.05
<b>A387257</b>	4.5	0.75	-0.1
<b>A387258</b>	10.3	1.64	1.26
<b>F34770</b>	11.5	1.56	0.49
<b>F34771</b>	9.7	1.92	0.4
<b>F34772</b>	5.2	0.9	-0.11
<b>F34774</b>	7.6	0.97	-0.17
<b>F34776</b>	13.6	1.79	1.51
<b>F34779</b>	7.4	1.77	0.85
<b>F34781</b>	11.1	1.51	0.47
<b>RF34743</b>	4.9	0.79	-0.11

a = este rácio permite avaliar a pureza do ADN. Se o rácio de absorvância rondar o valor 1.8, o ADN obtido a partir da amostra é considerado puro.

b = este rácio é usado como medida secundária da pureza dos ácidos nucleicos. Os valores esperados rondam 2.0-2.2. Caso os valores obtidos sejam mais baixos isso poderá indicar contaminação da amostra.

(Continuação do Anexo 11)

<b>Biópsias de Pele T1</b>			
<b>Amostra</b>	<b>Concentração de ADN (ng/ul)</b>	<b>Rácio de absorvância 260/280 (nm)<sup>a</sup></b>	<b>Rácio de absorvância 260/230 (nm)<sup>b</sup></b>
<b>A387220</b>	6.9	1.61	1.21
<b>A387221</b>	1.8	1.58	-0.3
<b>A387222</b>	14.6	1.69	2.59
<b>A387224</b>	2.6	2.99	-1.36
<b>A387225</b>	8.7	1.7	-14.24
<b>A387227</b>	3.5	1.94	0.45
<b>A387229</b>	10.5	1.59	-19.16
<b>A387243</b>	0.6	0.15	-0.01
<b>A387245</b>	18.7	2.74	-7.92
<b>A387246</b>	12.9	2.06	0.74
<b>A387250</b>	14.4	1.39	3
<b>F34767</b>	12	1.62	1.3
<b>F34768</b>	20.1	1.96	5.5
<b>A387254</b>	7.3	1.9	6.89
<b>A387255</b>	13.1	1.68	1.4
<b>A387256</b>	15.2	1.58	5.56
<b>A387257</b>	7.1	0.85	-0.16
<b>A387258</b>	3.9	1.75	-2.71
<b>F34770</b>	5.1	0.74	-0.11
<b>F34771</b>	7.5	1.97	0.32
<b>F34772</b>	8.6	1.29	3.76
<b>F34774</b>	4.5	1.65	0.7
<b>F34776</b>	3.6	2.52	-1.63
<b>F34779</b>	7.3	2.22	0.92
<b>F34781</b>	17.2	1.75	2.73
<b>RF34743</b>	3.8	2.67	4.3

a = este rácio permite avaliar a pureza do ADN. Se o rácio de absorvância rondar o valor 1.8, o ADN obtido a partir da amostra é considerado puro.

b = este rácio é usado como medida secundária da pureza dos ácidos nucleicos. Os valores esperados rondam 2.0-2.2. Caso os valores obtidos sejam mais baixos isso poderá indicar contaminação da amostra.

**Anexo 12: Concentração de ADN nas amostras de penas após extração, medida com recurso ao NanoDrop™.**

<b>Amostra</b>	<b>Concentração de ADN (ng/μl)</b>	<b>Rácio de absorvância 260/280 (nm) <sup>a</sup></b>	<b>Rácio de absorvância 260/230 (nm) <sup>b</sup></b>
<b><i>E. rubecula</i></b>			
<b>V16 - GT016</b>	61.2	0.74	0.2
<b>V28</b>	sem volume suficiente		
<b>V18 - GT018</b>	194.1	0.71	0.28
<b>V24 - GT024</b>	169.2	0.57	0.25
<b>V14 - GT014</b>	91.5	0.79	0.25
<b>V15 - GT015</b>	67.3	0.67	0.2
<b>V94</b>	sem volume suficiente		
<b><i>T. merula</i></b>			
<b>K4</b>	126.3	1.61	0.82
<b>K6</b>	196.1	1.21	0.54
<b>K8</b>	136.6	0.66	0.28
<b>K9</b>	93.4	0.7	0.25
<b>K10</b>	96.6	0.69	0.23
<b>K11</b>	72.9	0.62	0.2
<b>K13</b>	182.5	0.89	0.36
<b>K17</b>	218.9	1.18	0.56
<b>K18</b>	262.4	1.03	0.53
<b>K20</b>	423.1	1.29	0.65
<b>K22</b>	205.1	0.76	0.36
<b>K25</b>	94.6	0.7	0.23
<b>K26</b>	sem volume suficiente		
<b>K3</b>	619.2	1.04	0.49
<b>K7</b>	112.4	0.71	0.28
<b>K5</b>	470.8	1.18	0.64
<b>K1</b>	500.1	1.22	0.68
<b>K27</b>	340.8	1.03	0.52
<b>K2</b>	345.5	1.13	0.59

a = este rácio permite avaliar a pureza do ADN. Se o rácio de absorvância rondar o valor 1.8, o ADN obtido a partir da amostra é considerado puro.

b = este rácio é usado como medida secundária da pureza dos ácidos nucleicos. Os valores esperados rondam 2.0-2.2. Caso os valores obtidos sejam mais baixos isso poderá indicar contaminação da amostra.