



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Contribuição para o estudo de *Fasciola sp.* em bovinos

Liliana Sofia Hipólito Coimbra Martins

Orientação | Professora Ludovina Neto Padre

Professora Maria Manuela Clemente Vilhena

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

Évora, 2017

Esta dissertação não inclui as críticas e as sugestões feitas pelo júri



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Contribuição para o estudo de *Fasciola* sp. em bovinos

Liliana Sofia Hipólito Coimbra Martins

Orientação | Professora Ludovina Neto Padre

Professora Maria Manuela Clemente Vilhena

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

Évora, 2017

Esta dissertação não inclui as críticas e as sugestões feitas pelo júri

Dedico esta dissertação
ao meu avô, à minha mãe e ao meu pai,
sem eles esta não existiria.
Dedico-a também à minha avó,
muito do que sou hoje devo-lho a ela.
Onde quer que esteja,
sei que estará sempre comigo.

“Construi amigos, enfrentei derrotas, venci obstáculos,
bati na porta da vida e disse-lhe:
Não tenho medo de vivê-la.”

Augusto Cury

Resumo

A contribuição para o estudo de *Fasciola* spp. em bovinos, deve-se à sua importância como zoonose parasitária de origem alimentar, ao facto de ser uma doença tropical negligenciada e aos seus elevados prejuízos económicos. Avaliou-se a frequência de *Fasciola* spp. nos animais abatidos no matadouro de Beja de 13 de Março a 31 de Maio e estudaram-se os grupos de bovinos parasitados e não parasitados. Realizou-se estudo morfométrico dos exemplares de *Fasciola* spp. colhidos para identificação à espécie.

A frequência de *Fasciola* spp. em bovinos abatidos no matadouro de Beja no período do estudo foi de 1,74% sendo superior nas fêmeas e em animais com mais de dois anos.

Na população estudada observaram-se exemplares com características morfométricas compatíveis com valores de referência de *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica* registados noutros estudos. Os valores obtidos não se enquadraram de modo inequívoco nos intervalos padronizados para as referidas espécies.

Palavras-chave:

Fasciola sp.; bovinos; prevalência; morfometria; PCR

Abstract

Contribution to the study of *Fasciola* spp. in cattle

The contribution to the study of *Fasciola* spp. in cattle is due to its importance as food-borne parasitic zoonosis, to the fact that it is a neglected tropical disease and to its high economic losses. The frequency of *Fasciola* spp. was evaluated in animals slaughtered at the slaughterhouse in Beja from 13 March to 31 May and the groups of parasitized and non-parasitized cattle were studied. A morphometric study of the specimens of *Fasciola* spp. collected for identification of the species was carried out.

The frequency of *Fasciola* spp. in cattle slaughtered at the Beja slaughterhouse during the study period was 1.74%, being higher in females and in animals older than two years.

In the studied population specimens with morphometric characteristics compatible with reference values of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* were observed in other studies. The values obtained did not fit unequivocally in the standard intervals for said species.

Keyword:

Fasciola sp.; cattle; prevalence; morphometry; PCR

Agradecimentos

À direção do matadouro de Beja (SAPJU carnes) por me ter permitido a elaboração deste estudo, à sua equipa de inspeção sanitária, Dr. José Camacho, Dr. Nuno Neves e Eng.^a Rosa pela disponibilidade e carinho com que me receberam e apoiaram e pelos conhecimentos transmitidos. Aos funcionários do matadouro, pela simpatia e disponibilidade em ajudar.

À Prof. Doutora Ludovina Padre por aceitar ser minha orientadora, por acreditar em mim e fazer tudo para que esta dissertação se realizasse. Obrigado por despertar em mim o gosto pela parasitologia, por estar sempre presente no meu percurso na Universidade de Évora, por toda a disponibilidade e apoio prestado.

À Prof. Doutora Manuela Vilhena por aceitar ser minha coorientadora, pela disponibilidade, pelo apoio e pelos conhecimentos transmitidos, essenciais na elaboração desta dissertação.

Ao Tropical Animal Health & Production Laboratory (TAHP), da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, nomeadamente à Dra. Sara Zúquete, por acreditar em mim, por me ter recebido e por toda a ajuda prestada, que foi essencial.

À Dra. Maria João Vila-Viçosa pela simpatia, disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

À Dra. Susana Pombo pelo auxílio na descodificação das letras das marcas de exploração.

À Dra. Patrícia Baltasar pela orientação no tratamento estatístico dos dados.

Ao meu avô, à minha mãe e ao meu pai, por terem feito de mim a pessoa que sou hoje e por me apoiarem sempre.

Ao meu padrinho, à minha madrinha e à minha tia Maria por estarem sempre comigo.

À prima Angelina pela presença que marca na minha vida e na da família.

À prima Helena, ao meu afilhado Frederico, à minha tia Isaura e a toda a família que está sempre ao meu lado.

Aos meus amigos: Sara Romeiro, Ana Alface e Joana Tomás por serem os meus alicerces em Évora. À Manuela Pombo, à Diana Jorge, à Joana Almeida, à Marta Escobar, à Lisa e à Ana Bota por estarem sempre presentes na minha vida.

Ao Luís, por me encorajar na elaboração da tese e por dar um novo estímulo à minha vida.

Ao Dr. João Fragoso, por me aceitar enquanto aprendiz, por todos os conhecimentos transmitidos, pela paciência e pela amizade.

À Prof. Teresa Paiva, por todo o apoio no meu percurso académico e na minha vida.

À Dra. Júlia Costa e ao Dr. António Tomé, obrigado pela vossa amizade e por me ajudarem a “erguer” sempre que “caí”.

Agradeço a todos que não mencionei, mas que de alguma forma contribuíram para o meu percurso académico.

Índice

Resumo	III
Abstract	IV
Keyword.....	IV
Agradecimentos	V
Índice de anexos	XI
Índice de figuras	XIII
Índice de gráficos	XIV
Índice de tabelas	XVI
Listagem de abreviaturas ou siglas.....	XVII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos.....	3
2. Revisão bibliográfica <i>Fasciola</i> spp.	4
2.1. Taxonomia.....	4
2.2. Distribuição geográfica.....	4
2.3. Morfologia.....	6
2.3.1. Morfologia geral.....	6
2.3.1.1. <i>Fasciola hepatica</i>	6
2.3.1.2. <i>Fasciola gigantica</i>	6
2.3.1.3. <i>Fasciola magna</i>	6

2.3.2.	Tegumento	7
2.3.3.	Sistema digestivo	8
2.3.4.	Sistema excretor.....	8
2.3.5.	Sistema nervoso.....	8
2.3.6.	Sistema reprodutor	9
2.4.	Ciclo de vida	9
2.4.1.	Ovo	11
2.4.2.	Miracídio	11
2.4.3.	Esporocisto	12
2.4.4.	Rédia	12
2.4.5.	Cercária	13
2.4.6.	Metacercária	13
2.4.7.	Da metacercária à forma adulta	13
2.5.	Ecologia.....	14
2.5.1.	Hospedeiros intermediários.....	15
2.5.2.	Temperatura e humidade	16
2.5.3.	Alterações climáticas.....	17
2.6.	Híbridos	18
2.7.	Patogenia	19

2.7.1.	Forma aguda	19
	Fisiopatologia e sinais clínicos	19
	Lesões	20
2.7.2.	Forma subaguda	20
	Fisiopatologia e sinais clínicos	20
	Lesões	20
2.7.3.	Forma crónica.....	20
	Fisiopatologia e sinais clínicos	21
	Lesões	21
2.8.	Diagnóstico laboratorial	22
2.8.1.	Hematologia	22
2.8.2.	Coprologia	23
2.8.3.	Serologia	23
2.8.4.	Diagnóstico molecular	24
2.9.	Tratamento	25
2.9.1.	Fármacos.....	25
	Salicilanilidas	25
	Benzimidazóis	27
	Fenóis halogenados	27
2.9.2.	Resistência aos anti-helmínticos.....	28
2.9.3.	Profilaxia	29
2.10.	Fasciolose humana	30

3.	Material e métodos	34
3.1.	Colheita de material biológico e a recolha de dados	34
3.2.	Morfometria	35
3.3.	Análise genética	38
4.	Apresentação e discussão dos resultados	39
4.1.	Distribuição geográfica e pelos produtores da infeção por <i>Fasciola</i> spp.	39
4.1.1.	Distribuição geográfica	39
4.1.2.	Distribuição dos bovinos com <i>Fasciola</i> spp. pelos produtores	43
4.2.	Distribuição e frequência da infeção por <i>Fasciola</i> spp.	45
4.2.1.	Caracterização da população de bovinos em estudo	45
4.2.2.	Distribuição por idade dos bovinos com <i>Fasciola</i> spp.	48
4.2.3.	Distribuição por género dos bovinos com <i>Fasciola</i> spp.	49
4.2.4.	Relação do número de exemplares de <i>Fasciola</i> spp. com a idade e o peso	51
4.2.5.	Influência da infeção por <i>Fasciola</i> spp. na classificação das carcaças	53
4.2.6.	Custos diretos da reprovação dos fígados	55
4.3.	Morfometria	56
4.3.1.	Fundamentação para o estudo morfométrico	56
4.3.2.	Estudo comparativo	57
	Comprimento do corpo	59
	Distância entre a união das glândulas vitelinas e a extremidade posterior do corpo	61

Distância entre a ventosa ventral e a extremidade posterior do corpo.....	62
Razão entre a largura máxima do corpo e o seu comprimento	63
4.3.3. Discussão dos resultados e sua associação aos critérios de seleção dos exemplares	65
4.4. Análise genética	68
5. Conclusão.....	69
6. Perspetivas futuras.....	70
BIBLIOGRAFIA.....	71
ANEXOS.....	I

Índice de anexos

Anexo 1 – Número de animais abatidos e número de exemplares de <i>Fasciola</i> sp. recolhidos por localidade e distrito.	I
Anexo 2 – Número total de animais parasitados e seleção das amostras para o estudo morfométrico.....	III
Anexo 3 – Valores descritos nos diferentes estudos (G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R) para as medições padrão efetuadas (A, B, C, D, E, F). Informações necessárias à interpretação da Tabela 4.....	VI
Anexo 4 - Medições efetuadas em quatro exemplares de <i>Fasciola</i> spp. de cada um dos animais indicados por um número de codificação (Z): GA, GB, GC. Foi assinalado com um X na tabela seguinte sempre que essas medições se encaixavam no intervalo de valores codificados por: HA, IA, JA, KA, LA, MA, NA, OA, PA, QA, RA, HB, IB, JB, KB, LB, MB, NB, OB, PB, QB, RB, HC, IC, JC, KC, LC, MC, NC, OC, PC, QC e RC (correspondência no Anexo 3). === - Exemplares selecionados para PCR. V – Identificação do número da amostra dos exemplares enviados para PCR.	VII
Anexo 5 – Continuação inferior do Anexo 4. Medições efetuadas em quatro exemplares de <i>Fasciola</i> spp. de cada um dos animais indicados por um número de codificação (Z): GD, GE, GF. Foi assinalado com um X na tabela seguinte sempre que essas medições se encaixavam no intervalo de valores codificados por: HD, ID, JD, KD, LD, MD, ND, OD, PD, QD, RD, HE, IE, JE, KE, LE, ME, NE, OE, PE, QE, RE, HF, IF, JF, KF, LF, MF, NF, OF, PF, QF e RF (correspondência no Anexo 3). === - Fascíolas selecionadas para PCR. V – Identificação do número da amostra de <i>Fasciola</i> spp. enviada para PCR; H – exemplares do grupo A; G – exemplares do Grupo B; - -- não agrupados.	VIII
Anexo 6 - Continuação lateral do Anexo 4. Medições efetuadas em quatro exemplares de <i>Fasciola</i> spp. de cada um dos animais indicados por um número de codificação (Z): GA, GB, GC. Foi assinalado com um X na tabela seguinte sempre que essas medições se encaixavam no intervalo de valores codificados por: HA, IA, JA, KA, LA, MA, NA, OA, PA, QA, RA, HB, IB, JB, KB, LB, MB, NB, OB, PB, QB, RB, HC, IC, JC, KC, LC, MC, NC, OC, PC, QC e RC (correspondência no Anexo 3). === - Exemplares selecionados para PCR. V – Identificação do número da amostra de <i>Fasciola</i> spp. enviada para PCR.....	IX
Anexo 7 - Continuação inferior do Anexo 6. Medições efetuadas em quatro exemplares de <i>Fasciola</i> spp. de cada um dos animais indicados por um número de codificação (Z): GD, GE, GF. Foi assinalado com um X na tabela seguinte sempre que essas medições se encaixavam no intervalo de valores codificados por: HD, ID, JD, KD, LD, MD, ND, OD, PD, QD, RD, HE, IE, JE, KE, LE, ME, NE, OE, PE, QE, RE, HF, IF, JF, KF, LF, MF, NF, OF, PF, QF e RF (correspondência no Anexo 3). === - Exemplares selecionados para PCR. V – Identificação do número da amostra de <i>Fasciola</i> spp. enviada para PCR; H – exemplares do grupo A; G – exemplares do Grupo B; - -- não agrupados.	X

Anexo 8 - Continuação lateral do Anexo 6. Medições efetuadas em quatro exemplares de *Fasciola* spp. de cada um dos animais indicados por um número de codificação (Z): GA, GB, GC, GD, GE, GF. Foi assinalado com um X na tabela seguinte sempre que essas medições se encaixavam no intervalo de valores codificados por: HA, IA, JA, KA, LA, MA, NA, OA, PA, QA, RA, HB, IB, JB, KB, LB, MB, NB, OB, PB, QB, RB, HC, IC, JC, KC, LC, MC, NC, OC, PC, QC, RC, HD, ID, JD, KD, LD, MD, ND, OD, PD, QD, RD, HE, IE, JE, KE, LE, ME, NE, OE, PE, QE, RE, HF, IF, JF, KF, LF, MF, NF, OF, PF, QF e RF (correspondência no Anexo 3). **===** - Exemplares selecionados para PCR. **V** – Identificação do número da amostra de *Fasciola* spp. enviada para PCR; H – exemplares do grupo A; G – exemplares do Grupo B; --- não agrupados.XI

Índice de figuras

Figura 1-Trematodas, parasitas de fígado de ruminante: <i>Fasciola hepatica</i> , <i>Fasciola gigantica</i> , e <i>Fasciola magna</i> pertencem à família Fasciolidae. As formas mais pequenas distribuídas na imagem são <i>Dicrocoelium dendriticum</i> da família <i>Dicrocoeliidae</i> (Bowman 2014).	7
Figura 2 - Ciclo de vida <i>Fasciola hepatica</i> e <i>Fasciola gigantica</i> (Loker & Hofkin, 2015)....	10
Figura 3 – Miracídio (A), cercária (B) e metacercária (C) de <i>Fasciola hepatica</i> (Taylor, Coop & Wall, 2016)	14
Figura 4 – Fármacos para o controle de <i>Fasciola hepatica</i> em bovinos e ovinos e casos de resistência reportados em todo o mundo (Kelley <i>et al.</i> 2016).....	29
Figura 5 - Distribuição de casos reportados de fasciolose (World Health Organization 2014)	30
Figura 6 – Controlo integrado de <i>Fasciola hepatica</i> , fatores que influenciam a prevalência do parasita (Kelley <i>et al.</i> 2016).....	33
Figura 7 – A - Fígado após a incisão de todos os canais biliares cujo calibre o permitiram. B – Fígado infetado com <i>Fasciola</i> spp. (original);	34
Figura 8 - Y – Representação esquemática de uma <i>Fasciola hepatica</i> . Z - Representação esquemática de uma <i>Fasciola gigantica</i> . (Adaptado de Periago <i>et al.</i> 2008).....	37
Figura 9 – 1 – Distância entre a união das glândulas vitelinas e a extremidade posterior do corpo; 2 – Distância entre a ventosa ventral e a união das glândulas vitelinas; 3 – Largura máxima do corpo da <i>Fasciola</i> spp.	37
Figura 10 – Quatro exemplares com características morfológicas visivelmente distintas. 38	
Figura 11 - Frequência de <i>Fasciola</i> spp. em cada um dos distritos (escala de cores), tendo em conta os bovinos abatidos no matadouro de Beja no período de estudo (A) e os bovinos abatidos no matadouro de Aveiro no estudo de (Gavião 2013) (B) (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).....	41
Figura 12 - Total de bovinos abatidos com origem em cada distrito, em relação ao número total de bovinos abatidos no matadouro de Beja no período de estudo (A) e os bovinos abatidos no matadouro de Aveiro no estudo de (Gavião 2013) (B) (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).....	41
Figura 13 – Assinalado com ● os distritos de origem dos exemplares de <i>Fasciola</i> sp. cujas medidas se enquadram no intervalo de valores das populações de <i>Fasciola gigantica</i>	68

Índice de gráficos

Gráfico 1 - Frequência de parasitismo registada em matadouro em cada um dos distritos (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).	39
Gráfico 2 - Representação, por distrito, da % de bovinos abatidos, da % de casos de <i>Fasciola</i> spp. e da frequência de <i>Fasciola</i> spp. dos bovinos abatidos no matadouro de Beja com origem nos distritos apresentados. (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).	40
Gráfico 3 - Percentagem de bovinos abatidos, da % de bovinos com <i>Fasciola</i> spp. e do número médio de fascíolas recolhidas por animal de cada produtor (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).	45
Gráfico 4 - Percentagem de bovinos sem <i>Fasciola</i> spp. e % de bovinos com <i>Fasciola</i> spp. por idades em meses (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).	49
Gráfico 5 - Percentagem de machos e fêmeas nos bovinos sem e com <i>Fasciola</i> spp. (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).	50
Gráfico 6 - Frequência de bovinos com e sem <i>Fasciola</i> sp. em relação ao número total de machos e fêmeas abatidos (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).	51
Gráfico 7 - Número de exemplares colhidos em cada bovino em função da idade. (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja)	52
Gráfico 8 – Relação entre a idade (em meses) dos bovinos infetados com <i>Fasciola</i> spp. com o peso da carcaça (em Kg) e o número de exemplares de <i>Fasciola</i> sp. colhidos de cada bovino. (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja)	52
Gráfico 9 - Comparação entre a classificação das carcaças dos bovinos infetados com <i>Fasciola</i> spp. e dos bovinos sem a presença do parasita. (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja)	54
Gráfico 10 – Representação, em diagrama de caixas, do comprimento do corpo dos exemplares de <i>Fasciola</i> spp. colhidos no matadouro de Beja, do Grupo A, do Grupo B e das populações de <i>Fasciola hepatica</i> , <i>Fasciola</i> sp., e <i>Fasciola gigantica</i>	60
Gráfico 11 – Representação, em diagrama de caixas, da distância entre a união das glândulas vitelinas e a extremidade posterior do corpo dos exemplares de <i>Fasciola</i> spp. colhidos no matadouro de Beja, do Grupo A, do Grupo B e das populações de <i>Fasciola hepatica</i> , <i>Fasciola</i> sp., e <i>Fasciola gigantica</i>	62
Gráfico 12 – Representação, em diagrama de caixas, da distância entre a ventosa ventral e a extremidade posterior do corpo dos exemplares de <i>Fasciola</i> spp. colhidos no matadouro de Beja, do Grupo A, do Grupo B e das populações de <i>Fasciola hepatica</i> , <i>Fasciola</i> sp., e <i>Fasciola gigantica</i>	63

Gráfico 13 – Representação, em diagrama de caixas, da razão entre a largura máxima do corpo e o seu comprimento dos exemplares de *Fasciola* spp. colhidos no matadouro de Beja, do Grupo A, do Grupo B e das populações de *Fasciola hepatica*, *Fasciola* sp., e *Fasciola gigantica*.
..... 64

Índice de tabelas

Tabela 1- Hospedeiros e Microbiótoto de <i>Fasciola hepatica</i> e <i>Fasciola gigantica</i> , adaptado de Taylor, Coop & Wall (2016).	4
Tabela 2 – Fármacos usados no tratamento de <i>Fasciola</i> sp.	25
Tabela 3 – Apresentação dos fármacos com closantel («medvet.dgav» 2017).	26
Tabela 4 – Apresentação dos fármacos com albendazol («medvet.dgav» 2017).	27
Tabela 5 – Critérios considerados para selecionar cada uma das amostras (assinalados a azul), Z- número de referência para identificação das amostras.	36
Tabela 6 - Bovinos abatidos, bovinos com <i>Fasciola</i> sp. e número médio de fascíolas recolhidas por animal de cada produtor. (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).	44
Tabela 7 – Distribuição dos machos e fêmeas em relação ao peso e idade (n=3276) (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).	46
Tabela 8 - Distribuição dos machos e fêmeas não parasitados em relação ao peso e idade (n=3219) (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).	47
Tabela 9 - Distribuição dos machos e fêmeas parasitados em relação ao peso e idade (n=57) (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).	48
Tabela 10 – Classificação das carcaças dos animais parasitados e não parasitados (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).	54
Tabela 11 – Valores referentes ao comprimento do corpo (mm) dos exemplares de <i>Fasciola</i> spp. colhidos no matadouro de Beja, do Grupo A, do Grupo B e das populações de <i>Fasciola hepatica</i> , <i>Fasciola</i> sp., e <i>Fasciola gigantica</i>	60
Tabela 12 - Valores referentes à distância entre a união das glândulas vitelinas e a extremidade posterior do corpo (mm) dos exemplares de <i>Fasciola</i> spp. colhidos no matadouro de Beja, do Grupo A, do Grupo B e das populações de <i>Fasciola hepatica</i> , <i>Fasciola</i> sp., e <i>Fasciola gigantica</i>	61
Tabela 13 - Valores referentes à distância entre a ventosa ventral e a extremidade posterior do corpo (mm) dos exemplares de <i>Fasciola</i> spp. colhidos no matadouro de Beja, do Grupo A, do Grupo B e nas populações de <i>Fasciola hepatica</i> , <i>Fasciola</i> sp., e <i>Fasciola gigantica</i>	63
Tabela 14 - Valores referentes à razão entre a largura máxima do corpo e o seu comprimento dos exemplares de <i>Fasciola</i> spp. colhidos no matadouro de Beja, do Grupo A, do Grupo B e nas populações de <i>Fasciola hepatica</i> , <i>Fasciola</i> sp., e <i>Fasciola gigantica</i>	64
Tabela 15 – Relação entre os critérios de seleção dos exemplares em estudo (a azul) e a sua categorização em: H - exemplares cujas medidas se enquadram no intervalo de valores para <i>Fasciola hepatica</i> ; G - exemplares cujas medidas se enquadram no intervalo de valores para <i>Fasciola gigantica</i>	67

Listagem de abreviaturas ou siglas

TAHP - Tropical Animal Health & Production Laboratory

OMS – Organização Mundial de Saúde

NTD - Doença tropical negligenciada

URSS - União das Repúblicas Socialistas Soviéticas

CIAS - Sistema de análise de imagem do computador

GOT - Transaminase glutâmica oxalacética

GGT - Gama glutamil transferase

OPG - Ovos por grama

ELISA – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”

IgG – Imunoglobulina G

ATP – Adenosina trifosfato

COI - Citocromo oxidase I

ANOVA – Análise de variância

ADN – Ácido desoxirribonucleico

PCR – “Polymerase Chain Reaction” ou reação em cadeia da polimerase

1. INTRODUÇÃO

A presente dissertação de mestrado é realizada no âmbito da conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária pela Universidade de Évora.

Os dados e material biológico (exemplares de *Fasciola* spp.) foram colhidos de 13 de Março a 31 de Maio do presente ano, durante o acompanhamento dos abates e inspeção de bovinos realizados no matadouro de Beja (SAPJU carnes).

A importância de uma contribuição para o estudo da *Fasciola* sp. em bovinos, deve-se à sua relevância como zoonose, aos prejuízos económicos que esta doença provoca e à necessidade de mais estudos em Portugal.

A sua relevância como zoonose é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) ao referir a fasciolose como uma doença emergente, que infeta pessoas em mais de 71 países, havendo 180 milhões de pessoas em risco de infeção no ano de 2013 (WHO, 2013). Atualmente, o peso global subestimado da doença é de aproximadamente 35 a 72 milhões de pessoas infetadas (Nyindo & Lukumbagire, 2015). A fasciolose humana está atualmente classificada como uma zoonose parasitária de origem alimentar e como uma doença tropical negligenciada (NTD) (Nyindo & Lukumbagire, 2015). As NTD são doenças que geralmente afetam um número significativamente grande de indivíduos atingidos pela pobreza, habitualmente em regiões com recursos limitados (CDC, 2013; Tolan, 2011).

A classificação global de parasitas transmitidos por alimentos e doenças associadas abrange qualquer tipo de parasita que possa ser transmitido pelo consumo de alimentos contaminados (carne, leite, etc.). Numa lista de 24 parasitas a *Fasciola* sp. encontra-se em 12º lugar, revelando assim o seu grau de importância em segurança alimentar (Aspöck, 2016).

Em animais, nomeadamente em ruminantes, a fasciolose provoca perdas económicas substanciais. Os prejuízos advêm da morte de animais infetados, da rejeição de fígados afetados, das perdas de produção associadas à redução na eficiência da conversão alimentar (reduções nos pesos de carcaça entre 0,5% e 2%) e diminuição da produção de leite (cerca de 3%) (Mas-Coma, Valero & Bargues, 2009; Aspöck, 2016). Para a comunidade agrícola global, as perdas económicas em relação à produção animal, são estimadas em aproximadamente 3,2 biliões de dólares americanos por ano considerando 600 milhões de animais infetados (Dalton, 1999).

A fasciolose é um problema de saúde animal grave em todo o mundo, contudo, em países tropicais é considerada a doença parasitária mais importante pela dimensão dos problemas socioeconómicos que causa (Mas-Coma, Valero & Bargues, 2009). De acordo com o Relatório da Academia Egípcia de Pesquisa Científica e Tecnológica, as perdas devidas a fasciolose no Egito foram associadas à rejeição de 190 milhões de fígados por ano (Shaldoum *et al.*, 2015).

Com as alterações climáticas, o impacto da fasciolose tende a aumentar. No Bangladesh, estas alterações estão a afetar a fauna local de gastrópodes aquáticos, aumentando o risco de infeção humana por *Fasciola* sp. (Ahasan *et al.*, 2016).

Esta dissertação está organizada em três partes: a primeira parte é uma revisão bibliográfica referente ao tema *Fasciola* spp., a segunda contempla o material e métodos e a terceira a apresentação e discussão dos resultados.

No que se refere à segunda e terceira partes, estas contemplam a identificação do local de origem dos bovinos e informações respeitantes à idade, sexo, peso e classificação da carcaça dos animais abatidos, pretendendo-se comparar e caracterizar os animais parasitados e não parasitados com *Fasciola* spp.. Incluem o estudo morfométrico dos exemplares de *Fasciola* spp. tendo como objetivo a identificação à espécie. A diferenciação e identificação das populações de *Fasciola* spp. é importante no controlo da doença, tendo em conta as diferentes características de transmissão, epidemiologia e patologia de *Fasciola hepatica* e de *Fasciola gigantica* (Ahasan *et al.* 2016).

Diferentes estudos determinaram intervalos de valores para caracterizar atributos morfológicos de populações de *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* e de híbridos (classificados como *Fasciola* sp.). Deste modo, temos como objetivos identificar as características morfológicas dos espécimes colhidos e fazer uma análise comparativa entre os valores obtidos e os dados dos referidos estudos.

De modo a ter uma identificação mais precisa dos exemplares colhidos, será necessária a sua análise genética.

1.1. Objetivos

Objetivos gerais

Como objetivo geral pretende-se avaliar a frequência de *Fasciola* spp. nos animais abatidos no matadouro de Beja de 13 de Março a 31 de Maio, avaliar o grupo de bovinos parasitados em relação aos não parasitados e caracterizar os exemplares de *Fasciola* spp. colhidos.

Objetivos específicos:

- Determinar a frequência de *Fasciola* spp. em bovinos abatidos no matadouro de Beja no período do estudo e a sua distribuição pelos distritos de origem dos animais.
- Determinar o número de fascíolas colhidas em cada animal e aceder às informações acerca da idade, sexo, peso de carcaça e classificação da carcaça dos animais abatidos.
- Analisar os parâmetros obtidos, entre animais com e sem *Fasciola* spp..
- Estudar as características morfológicas dos espécimes adultos de *Fasciola* spp. colhidos e realizar uma análise comparativa entre os valores obtidos e os registados em artigos de referência.
- Análise genética para identificação à espécie de exemplares colhidos.

2. Revisão bibliográfica *Fasciola* spp.

A presente revisão bibliográfica irá incidir essencialmente em duas espécies: *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica*.

2.1. Taxonomia

Reino: Animalia

Filo: Platyhelminthes

Classe: Trematoda

Sub-classe: Digenea

Ordem: Echinostomatida

Família: Fasciolidae

Género: *Fasciola*

(Taylor, Coop & Wall, 2016)

Tabela 1- Hospedeiros e Microbiótoto de *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica*, adaptado de Taylor, Coop & Wall (2016).

	Espécies	
	<i>Fasciola hepatica</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Fasciola gigantica</i>
Hospedeiros definitivos	Ovinos, bovinos, caprinos, cavalos, veados, coelhos, humanos e outros mamíferos	Bovinos, búfalos, ovelhas, cabras, porcos, camelos, cervos, humanos
Órgão parasitado	Fígado e canais biliares	Fígado e canais biliares
Hospedeiros intermediários	Caracóis da família Lymnaeidae (<i>Galba</i> , <i>Lymnaea</i> , <i>Radix</i> , <i>Stagnicola</i>)	Caracóis da família Lymnaeidae (<i>Lymnaea</i> , <i>Radix</i> , <i>Austropelea</i>)

2.2. Distribuição geográfica

A espécie *Fasciola hepatica* tem uma distribuição geográfica mais ampla em comparação à distribuição de *Fasciola gigantica*, sendo predominante em quase todas as regiões temperadas e mais frias nos cinco continentes onde haja produção de ruminantes (Ahasan *et al.*, 2016). A espécie *Fasciola gigantica* ocorre principalmente em áreas tropicais como África, América do Sul, Sudeste Asiático, Europa do Sul e Havaí. Ambas as espécies se sobrepõem em zonas

subtropicais de África e Ásia onde aparecem formas intermediárias (Mas-Coma, Valero & Bargues, 2009; Shaldoum *et al.*, 2015).

A espécie *Fasciola hepatica*, com origem no continente europeu, gradualmente migrou para outros continentes (Shaldoum *et al.* 2015). Encontra-se em regiões temperadas e subtropicais da Europa, América, Ásia central e Ásia do norte, Oceania, África e também em grandes ilhas, incluindo Nova Zelândia, Tasmânia, Reino Unido, Islândia, Chipre, Córsega, Sardenha, Sicília, Japão, Papua Nova Guiné, Filipinas e várias ilhas das Caraíbas (Mas-Coma, Valero & Bargues, 2009).

A espécie *Fasciola gigantica* está presente em África, desde o Delta do Nilo até às Províncias do Cabo na África do Sul e ainda nas ilhas de Cabo Verde, Zanzibar e Madagáscar. Na Ásia, as principais áreas de endemia são as zonas tropicais, o sudeste asiático e as regiões do Pacífico, incluindo a antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS), Irão, Iraque, China, Coreia, Japão, Índia, Paquistão, Vietnam, Tailândia, Laos e também no Pacífico, Malásia, Filipinas e Havaí. A infeção por *Fasciola gigantica* é uma das doenças mais importantes que ameaçam as populações de gado da Índia, Paquistão, Indonésia, Indochina e Filipinas. As zonas endémicas menos importantes são as áreas do Sudeste da Europa, incluindo a Turquia, o Próximo Oriente e alguns países do Cáucaso, como a Arménia, o Azerbaijão e a Geórgia (Mas-Coma, Valero & Bargues, 2009).

À medida que o número de espécies exóticas aumenta, a facilidade com que essas e outras espécies exóticas se estabelecem também aumenta. Pode surgir porque uma espécie introduzida facilita, em vez de antagonizar o estabelecimento de outra. Essa vantagem pode ser particularmente relevante para os parasitas, onde a introdução de uma espécie hospedeira, ou a introdução de múltiplas espécies hospedeiras, pode favorecer a introdução de um parasita dependente desses hospedeiros. Um exemplo é a *Fasciola hepatica* na região Altiplano da Bolívia, cuja introdução provavelmente ocorreu pelos colonizadores espanhóis, uma vez que os isolados da referida região são muito semelhantes aos isolados obtidos na Península Ibérica. Contudo, também foi descoberto que o hospedeiro intermediário responsável pela eficiente transmissão de *Fasciola hepatica* no Altiplano é *Galba truncatula*, também ela uma espécie europeia provavelmente introduzida pelos colonialistas europeus. Dado que as ovelhas e os bovinos são os maiores reservatórios vertebrados da infeção e que essas duas espécies também foram introduzidas pelos europeus na América do Sul, a colonização da área foi acompanhada do necessário para que a *Fasciola hepatica* se desenvolvesse. Uma das consequências no Altiplano foi o surgimento de *Fasciola hepatica* como uma doença humana com taxas de infeção e intensidades de infeção maiores do em qualquer outra localidade (Loker & Hofkin, 2015).

2.3. Morfologia

Os parasitas pertencentes à subclasse Digenea, família Fasciolidae são geralmente largos, em forma de folha e achatados, embora alguns, como a *Fasciola magna*, sejam espessos e musculados.

São mais largos na região anterior do que na região posterior, possuem uma projeção em forma de cone na região anterior que é seguida por um par de ombros proeminentes e lateralmente direcionados. O ceco tem diversos divertículos e o ovário e os testículos são dendríticos (Hendrix & Robinson, 2012; Bowman, 2014).

2.3.1. Morfologia geral

2.3.1.1. *Fasciola hepatica*

Os espécimes adultos são achatados e com forma foliácea, medindo aproximadamente 30mm de comprimento e 13mm de largura. São mais largas na região anterior do que na região posterior, apresentando na região anterior uma projeção em forma de cone que é seguida por um par de ombros proeminentes e lateralmente direcionados. A morfologia interna não se distingue facilmente. São castanhas avermelhadas quando frescas e quando conservadas adquirem uma aparência acinzentada (Hendrix & Robinson, 2012).

2.3.1.2. *Fasciola gigantica*

As formas adultas são maiores que as de *Fasciola hepatica*, atingindo 7,5cm de comprimento e 1,5cm de largura, com o corpo mais transparente. Apresenta uma forma mais foliácea, a extremidade cônica anterior é mais curta e os ombros, característicos de *Fasciola hepatica*, na *Fasciola gigantica* são pouco perceptíveis. Os cecos são mais ramificados do que os de *Fasciola hepatica* (Taylor, Coop & Wall, 2016).

2.3.1.3. *Fasciola magna*

As formas adultas medem até 10cm de comprimento e 2,5cm de largura e tem 3 a 4mm de profundidade (são espessas). Apresentam forma oval, com uma extremidade posterior arredondada, não possuem projeção do cone anterior e, quando frescas, são de cor avermelhada (Taylor, Coop & Wall, 2016).



Figura 1-Trematodas, parasitas de fígado de ruminante: *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, e *Fasciola magna* pertencem à família Fasciolidae. As formas mais pequenas distribuidas na imagem são *Dicrocoelium dendriticum* da família Dicrocoeliidae (Bowman 2014).

2.3.2. Tegumento

O tegumento da *Fasciola hepatica* é um tecido vivo complexo, metabolicamente ativo e especializado, que desempenha as seguintes funções: síntese e secreção de várias substâncias, absorção de nutrientes, osmorregulação, proteção contra enzimas digestivas do hospedeiro e do parasita, proteção contra a biliar e resposta imunitária do hospedeiro. Exibe recetores sensoriais à superfície, desempenhado também um papel sensorial (Dalton, 1999; Goater, Goater & Gerald, 2014). A absorção de nutrientes ocorre especificamente pela absorção de pequenas moléculas por transporte passivo, os aminoácidos são absorvidos por difusão e os monossacarídeos são absorvidos por difusão facilitada (Dalton, 1999).

A proteção contra o sistema imunitário do hospedeiro ocorre por «mimetismo molecular», ou seja, o parasita usa substâncias do hospedeiro, inserindo-as no revestimento da sua superfície de modo a que o sistema imunitário do hospedeiro não a reconheça (Mehlhorn, 2016). Também é referido por Taylor, Coop & Wall (2016) que os eosinófilos libertados pelo hospedeiro se ligam a partes do tegumento das formas jovens de *Fasciola hepatica*, contudo o parasita parece ter a capacidade de libertar a sua camada superficial de modo a evitar a resposta imunitária.

O tegumento superficial destes parasitas é coberto por numerosos espinhos, que os auxiliam na fixação aos canais biliares (Mehlhorn, 2016).

Na extremidade anterior, na face ventral e próximo do poro genital, localiza-se o acetábulo ou ventosa ventral, um órgão muscular cuja função é a de fixação (Hendrix & Robinson, 2012). Tanto a ventosa oral como a ventosa ventral são cobertas por tegumento (Goater, Goater & Gerald, 2014).

2.3.3. Sistema digestivo

Na extremidade anterior ou próximo dela, situa-se a boca, rodeada por uma ventosa muscular designada por ventosa oral. A boca está ligada a uma faringe muscular e na sua continuação encontra-se um curto esófago que se bifurca em dois ramos intestinais tubulares e cegos (cecos) (Romero, 1990; Hendrix & Robinson, 2012).

Os cecos estendem-se até à proximidade da extremidade posterior do parasita pelas suas bordas laterais, e terminam sob a forma de divertículos (ramificações com aspeto arboriforme) (Campillo & Vázquez, 2001; Bowman, 2014; Mehlhorn, 2016). As células que revestem o intestino têm capacidade de secreção e de absorção, variando estruturalmente conforme a fase em que se encontrem (Campillo & Vázquez, 2001). Não possuem ânus, libertam os alimentos digeridos regurgitando os seus conteúdos intestinais. Em histopatologia estes conteúdos são frequentemente observados (Hendrix & Robinson, 2012).

2.3.4. Sistema excretor

O sistema excretor ou de osmorregulação permite a remoção de resíduos metabólicos que pode ser feita por difusão, através da superfície externa, através do lúmen intestinal e por um sistema protonefrídico (células excretoras localizadas no parênquima). Os resíduos azotados são principalmente na forma de amónia. O padrão de organização das células excretoras é bilateral e específico de espécie. Os ductos coletores fundem-se e confluem numa vesícula excretora posterior, que pode ou não ser revestida com epitélio. A vesícula excretora liga-se ao exterior através de um poro na extremidade posterior do corpo. Há evidências que sugerem que o sistema protonefrídico pode ter também uma função osmorreguladora (Goater, Goater & Gerald, 2014).

2.3.5. Sistema nervoso

O sistema nervoso central inclui um cérebro primitivo anterior a partir do qual se estende pelo menos um par de cordas nervosas longitudinais ligadas em intervalos por comissuras laterais. Há também um sistema periférico organizado, ligado ao tegumento e camadas musculares, intestino e sistema reprodutivo. Os neurotransmissores incluem os que estão normalmente associados aos animais vertebrados, como por exemplo, acetilcolina,

noradrenalina, dopamina e serotonina. As funções dos órgãos sensoriais externos incluem mecanorrecepção, quimiorrecepção e osmorrecepção.

A existência de olhos e a evidência experimental do comportamento fototático sugerem fortemente, capacidades fotorrecetoras tanto para os miracídios como para as cercárias (Goater, Goater & Gerald, 2014).

2.3.6. Sistema reprodutor

Os representantes do género *Fasciola* são hermafroditas, possuindo conjuntos completos de órgãos reprodutores masculinos e femininos. O poro genital pode ser identificado pela convergência dos ductos reprodutivos masculinos e femininos. Normalmente, a presença do cirro ajuda a identificar o ducto masculino e uma fileira de ovos de cor bronze o ducto feminino (Hendrix & Robinson, 2012; Bowman, 2014).

Os espermatozoides são produzidos em dois testículos localizados na porção posterior do corpo, o esperma é conduzido através dos vasos eferentes, que se fundem para formar o canal deferente, ou o ducto de esperma. A porção terminal do sistema masculino geralmente termina no cirro (órgão copulador), ao qual estão associados a glândula prostática e a vesícula seminal. Durante a cópula, o cirro é inserido no gonosporo da fêmea e o esperma é conduzido pelo trato reprodutor feminino até ao recetáculo seminal onde é armazenado. Os óvulos são produzidos num único ovário, seguem pelo oviduto e, à medida que passam pela abertura do recetáculo seminal, são fecundados. O zigoto diploide segue para o oótipo, o qual é cercado pela glândula de Mehlis. O ducto vitelino liga as glândulas vitelinas, dispersas ao longo de ambas as extremidades laterais do corpo, ao oótipo. As glândulas vitelinas produzem o vitelum e substâncias que participam na formação da casca de ovo. As enzimas libertadas pela glândula Mehlis promovem o endurecimento da casca do ovo enquanto passa do oótipo para o útero. Um elevado número de ovos é armazenado no útero, sendo excretados através do poro genital e eliminados para o ambiente juntamente com as fezes do hospedeiro (Hendrix & Robinson, 2012; Bowman, 2014; Goater, Goater & Gerald, 2014).

É mais frequente a autofecundação, no entanto, a fecundação cruzada entre trematodas adultos também ocorre (Hendrix & Robinson, 2012).

2.4. Ciclo de vida

Os representantes do género *Fasciola* apresentam um ciclo de vida heteroxeno, ou seja, desenvolvem-se em mais do que um hospedeiro durante o seu ciclo de vida (Loker & Hofkin, 2015).

Conforme representado na Figura 2, os parasitas adultos de *Fasciola* spp. desenvolvem-se nos canais biliares de mamíferos infetados, eliminam ovos não embrionados nos ductos biliares que são transportados para o exterior nas fezes do hospedeiro. Os ovos embrionam e em

contacto com a água, o miracídio liberta-se e invade o hospedeiro intermediário adequado, um gastrópode aquático. Em condições ótimas, o processo de desenvolvimento no gastrópode completa-se em 5 a 7 semanas, passando o parasita pelas diferentes fases de desenvolvimento larvar (esporocisto, rédia e cercária). A cercária liberta-se do caracol e enquista na vegetação aquática sob a forma de metacercária (forma infecciosa). Em contraste com as cercárias, as metacercárias são envoltas por uma parede externa dura do quisto e podem sobreviver por períodos longos em ambientes húmidos. Os mamíferos adquirem a infeção ingerindo a vegetação contendo metacercárias. Os seres humanos podem-se infetar ingerindo plantas de água doce contendo metacercárias, nomeadamente agrião. Após a ingestão, as metacercárias desenquistam no duodeno, migram através da parede intestinal para a cavidade peritoneal, para o parênquima hepático até aos ductos biliares, onde se desenvolvem em parasitas adultos (Hendrix & Robinson, 2012; Bowman, 2014; Mehlhorn, 2016).

O ciclo de vida de *Fasciola hepatica* e de *Fasciola gigantica* são semelhantes, sendo uma das principais diferenças o período pré patente. Na espécie *Fasciola hepatica* os parasitas imaturos migram através do parênquima hepático, os adultos atingem os ductos biliares 6 a 8 semanas pós infeção enquanto em *Fasciola gigantica* ocorre 12 semanas após a infeção. O período pré patente de *Fasciola hepatica* é de 10 a 12 semanas enquanto que em *Fasciola gigantica* é de 13 a 16 semanas (Taylor, Coop & Wall, 2016).

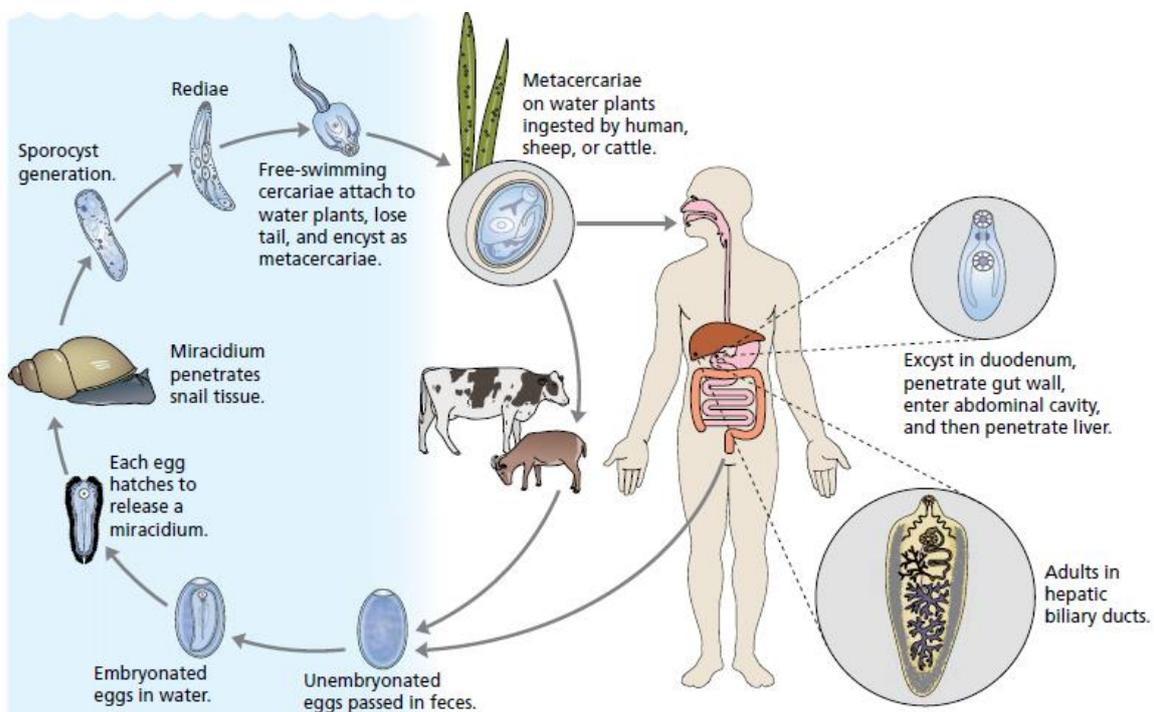


Figura 2 - Ciclo de vida *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica* (Loker & Hofkin, 2015).

2.4.1. Ovo

Os ovos podem permanecer dentro da vesícula biliar por várias semanas ou serem conduzidos para o lúmen intestinal juntamente com a bÍlis, sendo eliminados para o exterior através das fezes (Hendrix & Robinson, 2012; Bowman, 2014; Mehlhorn, 2016).

A *Fasciola hepatica* é capaz de produzir mais de 20 000 ovos por dia (Loker & Hofkin, 2015). Os ovos de *Fasciola hepatica* são ovais, operculados amarelo-castanho e medem 130 a 150µm de comprimento e 60 a 90 µm de largura (Hendrix & Robinson, 2012). Os ovos de *Fasciola gigantica* são semelhantes aos de *Fasciola hepatica*, mas de maiores dimensões, medindo 150 a 190µm de comprimento e 90 a 100µm de largura (Aspöck, 2016).

No momento da eliminação, cada um desses ovos é uma cápsula operculada que contém no seu interior um óvulo fecundado e um conjunto de células vitelinas (Bowman, 2014).

Os ovos recentemente eliminados de *Fasciola hepatica* podem ser mantidos no escuro até um ano. Quando expostos à luz do comprimento de onda correto embrionam em poucos minutos (Goater, Goater & Gerald, 2014). No ambiente externo, os ovos embrionam, em contato com a água eclodem libertando o primeiro estado larvar móvel designado por miracÍdio (Hendrix & Robinson, 2012; Bowman, 2014).

A incubação dos ovos de *Fasciola hepatica* é estimulada por luz azul-violeta (450-550nm) e após esse estímulo o miracÍdio liberta enzimas proteolÍticas que digerem a substância que segura o opérculo. O coloide que se encontra dentro do ovo na forma de gel é convertido numa solução coloidal, duplicando o seu volume, levando a um aumento de pressão, dessa forma o opérculo é afastado e o miracÍdio liberta-se (Goater, Goater & Gerald, 2014).

2.4.2. MiracÍdio

O miracÍdio (Figura 3 – A) é a primeira forma larvar, atinge um comprimento de 130µm, não se alimenta, tem sistema nervoso, um sistema excretor rudimentar e um conjunto de células germinativas (Mehlhorn, 2016). É coberto por cílios que lhe conferem mobilidade dentro de água, possui um par de ocelos, recetores de luz, que facilitam o encontro com o primeiro hospedeiro intermediário. Na extremidade anterior possuem uma papila cónica armada com um complexo enzimático que promove a penetração no hospedeiro (Bowman, 2014; Mehlhorn, 2016).

O miracÍdio desenvolve-se no ovo entre 9 a 10 dias a temperaturas entre 22 a 26 °C, havendo um desenvolvimento reduzido a temperaturas abaixo de 10 °C (Taylor, Coop & Wall, 2016).

Ao eclodir afasta o opérculo do ovo e deverá encontrar o gastrópode aquático adequado nas 20 a 30 horas seguintes. Durante esse período utiliza as suas reservas de glicogénio e após o consumo destas morre. (Bowman, 2014; Mehlhorn, 2016). Para outros autores, a vida útil do miracÍdio é de apenas 3 horas (Taylor, Coop & Wall, 2016).

Assim, é possível dividir a interação do miracídio com o seu hospedeiro em três fases. Em cada uma dessas fases, a seleção natural favoreceu a evolução de um conjunto complexo de adaptações comportamentais que contribuem para o sucesso no seu desenvolvimento.

A primeira fase abrange as respostas comportamentais aos estímulos físicos que orientam os miracídios para a proximidade do seu hospedeiro. O miracídio de *Fasciola hepatica*, é fototático positivo e geotático negativo, respostas que o posicionam ao longo da interface terra/água, onde o hospedeiro intermediário, *Lymnaea truncatula*, é mais comum. O miracídio de *Fasciola gigantica* é fototático negativo e geotático positivo, respostas comportamentais que o posicionam em águas mais profundas, onde a probabilidade de contato com os hospedeiros intermediários é superior.

A segunda fase inicia-se no habitat do hospedeiro quando o miracídio o procura, com um movimento intitulado como «varredura aleatória». É um movimento progressivo, longo, rápido, com poucas voltas e acompanhado com rotações de aproximadamente 90 graus ao longo do eixo mais longo do corpo.

A terceira fase do comportamento do miracídio é a sua penetração no gastrópode aquático, envolve o contato, o reconhecimento e finalmente a penetração. Quando o miracídio está a poucos milímetros do seu hospedeiro, o movimento progressivo da segunda fase dá lugar a um comportamento frenético e caótico. Acentuam-se as mudanças de direção que passam a ser abruptas e de 180 graus (Goater, Goater & Gerald, 2014).

Após o contato físico com o hospedeiro, com o auxílio de enzimas proteolíticas, as larvas perfuram o tecido deste dirigindo-se para os hepatopâncreas. O miracídio perde o seu epitélio ciliado à medida que a penetração prossegue, transforma-se num longo tubo alongado com cerca de 0,5mm de comprimento denominado esporocisto (Carrada-bravo, 2003; Goater, Goater & Gerald, 2014; Mehlhorn, 2016).

2.4.3. Esporocisto

O esporocisto encontra-se na região periesofágica do gastrópode, tem a forma de bolsa e é o local de desenvolvimento de um número elevado de rédias. (Hendrix & Robinson, 2012; Mehlhorn, 2016).

2.4.4. Rédia

As rédias desenvolvem-se e rompem a parede do esporocisto, libertando-se para os tecidos do gastrópode. Em 15 dias surge uma primeira geração de rédias que podem produzir rédias de segunda geração, atingem um tamanho de 1,5 a 2mm e já possuem uma ventosa oral, uma faringe e um intestino cilíndrico não ramificado (Campillo & Vázquez, 2001; Mehlhorn, 2016). Dentro de cada uma desenvolvem-se várias cercárias que migram nos tecidos do caracol (Hendrix & Robinson, 2012; Bowman, 2014).

2.4.5. Cercária

As cercárias (Figura 3 – B) são larvas do tipo girino, com um corpo discóide, medem entre 200 a 400µm e libertam-se do gastrópode cerca de 5 a 8 semanas após a infeção pelo miracídio (Bowman, 2014; Mehlhorn, 2016). Nesta fase larvar já se encontram desenvolvidas as seguintes estruturas: ventosa oral, ventosa ventral, boca, faringe, intestino, órgãos reprodutores primitivos e células secretoras especiais com os respetivos canais excretores (Bowman, 2014).

No ambiente, as cercárias movimentam-se na água com o auxílio de uma cauda com cerca de 1mm de comprimento. Em poucos minutos encontram plantas que se estejam próximas do nível da água, perdem a cauda e, através de células secretoras que se localizam ao lado da faringe, libertam mucoproteínas (Bowman, 2014; Mehlhorn, 2016). Essas mucoproteínas formam uma fina parede de quisto em torno da cercária, enquistando-a, passando a designar-se por metacercária (Hendrix & Robinson, 2012; Mehlhorn, 2016).

O gastrópode aquático serve como amplificador. Estima-se que um miracídio possa produzir mais de 600 metacercárias, estando presente um fenómeno de poliembrionia (Urquhart *et al.* 1996).

2.4.6. Metacercária

Tem um diâmetro de 200 a 300µm e encontra-se aderente e enquistada à vegetação até à ingestão pelo hospedeiro definitivo (Bowman, 2014; Mehlhorn, 2016).

Apresenta elevada sobrevivência em ambiente húmido e pouca resistência à dessecação (Carrada-bravo 2003). Em ensilagem, as metacercárias perdem rapidamente a capacidade infetante, contudo ingestão de ensilagem de má qualidade pode potenciar a infeção. Nos bovinos existem descrições de transmissão placentária (Urquhart *et al.*, 1996; Campillo & Vázquez, 2001; Carrada-bravo, 2003).

2.4.7. Da metacercária à forma adulta

Após a ingestão da metacercária (Figura 3 – C) pelo mamífero, o contacto desta com o baixo pH do estômago promove o início do desenquistamento. Já no duodeno, a larva desenquistada, responde à presença da biliar com espasmos violentos, ocorrendo assim a total libertação da larva (apenas a biliar provoca esta resposta). Os espasmos referidos, em conjunto com a secreção de enzimas líticas permitem à larva penetrar através da parede intestinal para a cavidade peritoneal. Aí a larva não se alimenta e através da ventosa oral e da ventosa ventral adere ao endotélio que reveste a cavidade peritoneal. De seguida, movimenta-se ao longo do endotélio peritoneal até ao fígado. Uma vez no parênquima hepático, inicia o processo de histofagia (Loker & Hofkin, 2015). Neste momento a forma jovem mede entre 1,0 a 2,0mm de comprimento e tem a forma de lanceta (Urquhart *et al.* 1996).

Desde a ingestão das metacercárias pelo hospedeiro definitivo, a larva necessita de 24h para penetrar na parede intestinal, mais 24h até atingir a cavidade peritoneal e quatro a sete dias

para penetrar no fígado (Mehlhorn 2016). Após cerca de seis a oito semanas de permanência no parênquima hepático, as formas jovens entram nos canais biliares, migram para os ductos maiores, ocasionalmente para a vesícula biliar e atingem a forma adulta. Começam a eliminar ovos cerca de um mês e meio depois da infecção (Urquhart *et al.*, 1996; Bowman, 2014; Taylor, Coop & Wall, 2016).

A recetividade dos hospedeiros definitivos é variável, sendo classificados em três grupos: o primeiro grupo inclui aqueles que reagem rapidamente à infecção e previnem o seu desenvolvimento, como o porco, o javali, o cão; o segundo inclui os bovinos, equídeos e homem, que reagem mais tarde, quando o parasita já está implantado no fígado e em último lugar, os mais recetivos, em que há alta produtividade parasitária e patogenicidade marcada, como no caso dos ovinos, caprinos e lagomorfos (Urquhart *et al.*, 1996; Campillo & Vázquez, 2001).

A vida útil de *Fasciola* spp. é de oito a doze meses e o seu ciclo de vida completo em condições favoráveis é de três a quatro meses (Bowman, 2014; Mehlhorn, 2016).



Figura 3 – Miracídio (A), cercaria (B) e metacercária (C) de *Fasciola hepatica* (Taylor, Coop & Wall, 2016)

2.5. Ecologia

Fatores importantes para manter os focos enzoóticos:

- Ampla gama de hospedeiros suscetíveis assegura a dispersão dos ovos, aumentando a infecção da população de hospedeiros intermediários;
- Longevidade prolongada de ovos, metacercárias e adultos ajuda a manter a população parasitária na ausência de transmissão;
- Poliembrião dentro dos hospedeiros intermediários, a elevada produção de ovos pelos adultos, aumenta a probabilidade de infecção;
- Aumento da suscetibilidade de bovinos jovens e ovelhas proporciona acesso a uma grande população de hospedeiros nativos;
- Áreas agrícolas aumentam o potencial de transmissão devido à presença de água parada, habitats favoráveis para os gastrópodes e hospedeiros definitivos (principalmente bovinos).

- A hibernação e estivação dos gastrópodes permitem a sua sobrevivência assim como das formas larvares em condições adversas (Samuel, Pybus & Kocan, 2001).

2.5.1. Hospedeiros intermediários

A ecologia das diferentes espécies de *Fasciola* spp. está intimamente relacionada com a dos gastrópodes que servem como hospedeiros intermediários. Uma vez que os trematodos digenéticos são muito específicos em relação aos seus hospedeiros intermediários, a distribuição geográfica das espécies é determinada pela distribuição geográfica dos últimos (Bowman, 2014). A distribuição dos parasitas *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica* é universal sendo justificada pela distribuição igualmente universal dos hospedeiros intermediários adequados. As espécies *Galba truncatula*, *Lymnaea rubiginosa* e seu parasita associado, *Fasciola hepatica*, são encontrados em zonas de clima temperado e a uma altitude superior a 2500m acima do nível do mar. Já *Lymnaea rupestris* e *Lymnaea natalensis* associadas à *Fasciola gigantica* têm uma distribuição mais tropical/subtropical em altitudes mais baixas, inferiores a 2000m (Nyindo & Lukambagire, 2015).

Em vários países de África e da Ásia, as espécies *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica* coexistem, nomeadamente nas áreas de drenagem do rio Nilo, nas cordilheiras dos grandes lagos e nos braços do vale do Rift. As altitudes alternadas e as condições climáticas aí presentes favorecem a existência dos gastrópodes associados a ambos os parasitas. Em Portugal e Espanha, em áreas onde não existe a *Galba truncatula*, provou-se experimentalmente que *Lymnaea limosa* e *Lymnaea palustris* também podem ser hospedeiros compatíveis e assim terem significado epidemiológico (Campillo & Vázquez, 2001; Nyindo & Lukambagire, 2015).

A especificidade entre o trematoda e o hospedeiro intermediário é um fenómeno biológico complexo relacionado com conceitos como efetividade, suscetibilidade, resistência, imunidade, compatibilidade, localização do hospedeiro, reconhecimento e atração do hospedeiro, filogenia e variabilidade genética. A ampla informação adquirida ao longo de décadas indica uma clara preferência de *Fasciola hepatica* para *Galba* sp. e de *Fasciola gigantica* para *Radix* sp., no entanto os limites do espectro do hospedeiro vetorial para cada espécie de fasciola não parecem ser claros (Mas-Coma, Valero & Bargues, 2009).

Foi realizado um estudo que indica que tanto *Fasciola hepatica* como *Fasciola gigantica* podem infectar os mesmos hospedeiros intermediários, *Radix natalensis* e *Galba truncatula*. É referido por Dar *et al.* (2003) que há um efeito das espécies de gastrópodes aquáticos no crescimento da rédia, resultando numa suscetibilidade individual de cada espécie de *Lymnaea* às infeções por *Fasciola* spp.. A capacidade do hospedeiro intermediário para manter o desenvolvimento larvar de *Fasciola hepatica* ou *Fasciola gigantica* variou com as espécies de gastrópodes utilizados nos ensaios.

A disponibilidade de habitats adequados, atendendo a características como a composição do solo e fatores climáticos como temperatura e humidade, determina a taxa de reprodução de

Lymnaea sp. e, conseqüentemente, a dinâmica epidemiológica (Carrada-bravo, 2003; Urquhart *et al.*, 1996). Os gastrópodes que servem como hospedeiros intermediários das diferentes espécies de *Fasciola* spp. requerem solos neutros e que permaneçam razoavelmente húmidos ao longo do ano (Bowman 2014). Relativamente à *Galba truncatula*, um ambiente com pH levemente ácido é ideal para o seu desenvolvimento, contudo, níveis de pH excessivamente ácidos tornam-se prejudiciais, como ocorre em pântanos de turfas e áreas de musgo (Urquhart *et al.* 1996). As características do solo podem variar muito em distâncias curtas e é comum em zonas de pastagem haver locais com gastrópodes e metacercárias de *Fasciola hepatica* e a restante pastagem ser segura (Bowman 2014).

Relativamente ao habitat dos gastrópodes, são considerados focos primários e áreas de extensão. Os focos primários são locais permanentemente húmidos, margens de rios com pouco caudal, lagos, lagoas e regueiros, locais onde se reproduzem constantemente. Além dos referidos, os solos húmidos, como os argilosos, constituem outro tipo de reservatório natural. Nestes biótopos, a população de gastrópodes permanece uniforme e em quantidade geralmente reduzida (Urquhart *et al.*, 1996; Carrada-bravo, 2003). Surgem focos de extensão dos focos primários quando ocorrem inundações, surgindo nessas zonas grandes concentrações de moluscos, transportados pelas águas.

Áreas pantanosas ou qualquer depressão que possa armazenar um pouco de água por algum tempo pode servir como fonte de infeção durante períodos com chuvas em quantidade apropriada, surgindo os habitats temporários (Carrada-bravo, 2003; Bowman, 2014). Deste modo, os habitats temporários ou de extensão em áreas de pastagem são as zonas enzoóticas onde ocorrem surtos graves de fasciolose. As epidemias de fasciolose aguda em climas temperados são raras durante o inverno e ocorrem geralmente após o final das chuvas de verão e outono, subsequentes a um período seco (Carrada-bravo 2003).

Os surtos de fasciolose durante os períodos de seca aparentemente são uma antítese, mas existem e podem ser explicados. As chuvas ou a irrigação após um período seco criam condições favoráveis nos campos para a reprodução de gastrópodes que sobreviveram durante o período de seca. Durante o período de seca, a vegetação verde ainda pode ser encontrada em zonas de acumulação de água e os animais tendem a pastorear essa vegetação. O intenso pastoreio dessas zonas por animais infetados, aumenta a probabilidade dos gastrópodes se infetarem. As plantas aí localizadas são suscetíveis de estar fortemente contaminadas por metacercárias e surge assim um importante foco de infeção levando a que o pastoreio concentrado nessas zonas possa resultar em elevados níveis de infeção (Urquhart *et al.*, 1996; Carrada-bravo, 2003).

2.5.2. Temperatura e Humidade

Tanto os ovos como as metacercárias de *Fasciola hepatica* podem sobreviver durante o inverno. A população de parasitas sobrevive à estação mais extrema, tanto no hospedeiro intermediário como no ambiente (Urquhart *et al.*, 1996; Bowman, 2014).

Para que os gastrópodes se reproduzam e para que haja o desenvolvimento das formas larvares no seu interior, é necessária uma temperatura diurna/noturna média igual ou superior a 10 °C, uma vez que a atividade destes cessa a 5 °C. A temperatura necessária ao desenvolvimento do hospedeiro intermediário é também a adequada ao desenvolvimento e eclosão dos ovos de *Fasciola hepatica*. Contudo, só quando as temperaturas atingem valores de 15 °C ou superiores, é que ocorre uma multiplicação significativa do hospedeiro intermediário e dos estados larvares do trematoda (Urquhart *et al.* 1996). Relativamente a *Fasciola gigantica*, a temperatura mínima de desenvolvimento é de 16 °C (Mas-Coma, Valero & Bargues, 2009).

A sobrevivência de metacercárias é baixa em condições de elevadas temperaturas e de seca, contudo, podem sobreviver vários meses no feno. A infeção de ruminantes pode ocorrer por ingestão de feno cultivado em prados infestados, surgindo casos de fasciolose longe do local de origem de um surto (Urquhart *et al.*, 1996; Carrada-bravo, 2003).

Quando as chuvas excedem a evaporação e se atinge a saturação do meio ambiente, surgem condições ideais de humidade para a reprodução dos gastrópodes, o desenvolvimento dos ovos no ambiente e para que as cercárias abandonem o hospedeiro intermediário (Urquhart *et al.* 1996).

Os meses em que as condições climáticas são favoráveis para o desenvolvimento do parasita são de maio a outubro na maior parte do oeste da Europa, em Portugal ocorrem em todos os meses, exceto nos meses de verão, mais quentes e mais secos (Caminade *et al.* 2015).

2.5.3. Alterações climáticas

O clima atual e as mudanças globais parecem afetar cada vez mais a distribuição dos gastrópodes. Como consequência de vários fenómenos relacionados com as mudanças climáticas, ambientais e com fatores socioeconómicos, a fasciolose é uma doença parasitária emergente/reemergente em muitos países (Nyindo & Lukumbagire, 2015).

O clima europeu nas últimas quatro décadas parece ser adequado ao desenvolvimento do parasita e dos seus hospedeiros intermediários, coincidindo as áreas mais favoráveis com regiões com grande densidade de bovinos e pequenos ruminantes. A adequação climática simulada por Caminade *et al.* (2015) para a fasciolose, indicou um aumento significativo durante a década de 2000 no centro e noroeste da Europa, confirmado com o aumento das infeções observadas em ruminantes nesse período. Neste estudo, as mudanças climáticas estimadas para o norte da Europa, poderão aumentar até quatro meses, o período de tempo favorável ao desenvolvimento do parasita no ambiente. Já no sul da Europa, diminuirá o risco nos meses de verão devido às condições mais secas e aumentará o risco durante os meses de inverno, uma vez que as mudanças projetadas de temperatura e humidade irão favorecer o desenvolvimento dos estados de vida livre e o do gastrópode entre novembro e março. Na Europa central e a noroeste, prevê-se que o risco diminua durante os meses de verão devido às condições mais secas, enquanto se espera um aumento nos meses de primavera e outono (abril-maio e outubro-novembro) devido às temperaturas mais favoráveis sobre as regiões húmidas.

Por exemplo, Caminade *et al.* (2015) refere um estudo recente sobre o impacto das futuras alterações climáticas no risco de fasciolose no Reino Unido, o qual prevê que, apesar do risco simulado aumentar a longo prazo na maioria das regiões, algumas poderão sofrer uma diminuição nas infeções de verão devido à restrição de água disponível esperada para a década de 2040. Atualmente, as recentes alterações climáticas podem ter favorecido a propagação da fasciolose neste país, observando-se um aumento da sua prevalência.

2.6. Híbridos

Nas áreas onde as espécies de *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica* coexistem, podem surgir duas situações de sobreposição diferentes. Uma sobreposição local, quando as características climáticas ao longo do ano permitem a coexistência de espécies de *Galba* sp. e *Radix* sp. no mesmo local (em cursos de água próximos ou até no mesmo curso de água), possibilitando assim a transmissão e conseqüente infeção por ambas as espécies. Uma sobreposição zonal, quando ocorre em regiões com altitudes diferentes. Os locais de altitude elevada têm condições climatéricas favoráveis ao desenvolvimento de *Galba truncatula* e *Fasciola hepatica* e as regiões de altitude mais baixa, com temperaturas mais elevadas, favorecem o desenvolvimento de *Radix* sp. e *Fasciola gigantica*. A infeção dos hospedeiros definitivos com ambas as espécies nestas regiões ocorre pela deslocação destes de locais de menor altitude para locais de altitude superior nas proximidades e vice-versa (Mas-Coma, Valero & Bargues, 2009).

Em 2008, Periago *et al.*, estudaram as espécies de fasciola no delta do rio Nilo e os resultados indicaram a presença de *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* e de formas intermédias (a designar por *Fasciola* sp.). Este é considerado um caso típico de sobreposição local onde *Galba truncatula* e *Radix natalensis cailliaudi* são encontrados em diferentes cursos de água próximos uns dos outros e em redor da mesma localidade, onde animais e humanos apresentam a infeção por ambas as espécies. Nesta situação é referida uma sazonalidade na infeção por *Fasciola* sp. uma vez que no Delta do Nilo as temperaturas mais suaves no inverno, início da primavera e final do outono são favoráveis ao desenvolvimento de *Galba truncatula* e de *Fasciola hepatica*, enquanto as temperaturas quentes do final da primavera, verão e início do outono parecem apropriadas para *Radix natalensis cailliaudi* e *Fasciola gigantica*. O longo período de vida útil das formas adultas permite que indivíduos das duas espécies e híbridos sejam transmitidos por uma ou várias espécies de *Lymnaea* e se encontrem no mesmo hospedeiro definitivo (Mas-Coma, Valero & Bargues, 2009).

A hibridação cruzada interespecífica entre *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica* foi também descrita no Japão onde foram encontrados exemplares de *Fasciola* sp. com sequências de DNA ribossômico idêntico às de *Fasciola hepatica* e, simultaneamente, sequências de DNA

mitocondrial próximas às de *Fasciola gigantica* (M. Adela Valero *et al.* 2009). Os espécimes considerados formas intermédias permanecem classificadas como *Fasciola* sp. uma vez que é difícil atribuí-las a uma espécie determinada (Ashrafi *et al.* 2006).

2.7. Patogenia

A patogenia varia de acordo com a fase de desenvolvimento parasitário no fígado e a espécie de hospedeiro envolvida (Urquhart *et al.* 1996). A fasciolose pode surgir de forma aguda ou crónica. As manifestações patológicas associadas à presença de *Fasciola* spp. no fígado diferem consoante o número de metacercárias ingeridas, o estado de desenvolvimento do parasita e a presença ou ausência de *Clostridium novyi* (Bowman, 2014; Aspöck, 2016). A patogenicidade depende também da capacidade infetante da metacercária. Foi comprovado experimentalmente que a temperatura ambiental durante o desenvolvimento larvar no gastrópode tem influência, as cercárias com maior poder infetante formam-se entre os 22 a 23°C (Campillo & Vázquez, 2001).

A migração dos estados juvenis do intestino para a cavidade peritoneal pode ocasionar lesões de peritonite, podendo desenvolver-se de forma aguda ou crónica (Aspöck, 2016; Mehlhorn, 2016).

2.7.1. Forma aguda

A fasciolose aguda é menos comum que a fasciolose crónica sendo quase sempre observada em ovelhas (Aspöck, 2016). Manifesta-se cerca de seis semanas após a infeção com mortes súbitas, maioritariamente durante o outono e início do inverno. Surge por ingestão de grandes quantidades de metacercárias, em geral acima das 2000 (Urquhart *et al.* 1996).

Podem ocorrer grandes infeções associadas ao quadro agudo quando, por exemplo, borregos são transportados para pastagens com áreas pantanosas que foram fortemente contaminadas na estação anterior (Bowman, 2014).

Fisiopatologia e sinais clínicos

A fasciolose aguda é essencialmente uma hepatite traumática com hemorragias graves provocadas pela migração simultânea de um grande número de formas jovens provenientes de metacercárias recentemente ingeridas (Urquhart *et al.*, 1996; Bowman, 2014; Aspöck, 2016).

Quando ocorre esta migração, pode também surgir a "doença negra", causada pela bactéria *Clostridium novyi* tipo B (Aspöck, 2016). Um grau de parasitismo inferior, com traumas de menores dimensões, pode ser suficiente para que os tecidos danificados e mal oxigenados favoreçam a entrada e desenvolvimento da bactéria que, devido às suas toxinas, é rapidamente fatal (Bowman, 2014).

Os animais ficam imóveis, anoréticos e apresentam ascite, tendo o abdómen distendido e doloroso ao toque. A morte pode ocorrer rapidamente ou após vários dias (Urquhart *et al.*, 1996; Aspöck, 2016).

Lesões

No exame *post-mortem* observa-se um exsudado sanguinolento na cavidade abdominal. Existe hepatomegalia, o fígado encontra-se friável, hemorrágico e apresenta zonas cobertas por fibrina. São visíveis os trajetos parasitários e aquando da incisão, observa-se um elevado número de formas jovens de *Fasciola* spp. (Urquhart *et al.*, 1996; Bowman, 2014).

2.7.2. Forma Subaguda

Esta forma da doença ocorre entre as seis e dez semanas após a ingestão de aproximadamente 500 a 1500 metacercárias, ingeridas por um período mais longo. Ocorre essencialmente no final do outono e no inverno (Urquhart *et al.* 1996).

Fisiopatologia e sinais clínicos

Há formas jovens de *Fasciola hepatica* que já atingiram os ductos biliares, onde causam colangite, enquanto outras ainda se encontram na fase migratória no fígado. As lesões hepáticas nesta fase são menos graves, mas semelhantes às da fase aguda.

Os animais têm hepatomegalia e uma anemia hemorrágica grave com hipoalbuminemia. Apresentam mucosas pálidas, podem apresentar edema submandibular, observando-se também perda de condição corporal (Urquhart *et al.* 1996).

Lesões

Quando não tratada, os animais podem apresentar sintomatologia clínica uma a duas semanas antes da morte, sendo esta menos precoce comparativamente com a ocorrida na forma aguda da doença. Verifica-se a existência de hepatomegalia e na superfície e no parênquima hepático pode haver hemorragias e lesões necróticas (Urquhart *et al.* 1996).

2.7.3. Forma crónica

É a forma de fasciolose mais comum, não apresentando sinais clínicos específicos (Aspöck, 2016). É observada principalmente do final do inverno ao início da primavera e ocorre quatro a cinco meses após a ingestão de quantidades moderadas de metacercárias (200 a 500) (Urquhart *et al.*, 1996).

Fisiopatologia e sinais clínicos

A doença crónica está associada à presença de parasitas adultos nas vias biliares e caracteriza-se pelos sinais clínicos clássicos de uma hepatite (Bowman, 2014). Dependendo da quantidade de parasitas, os sintomas da doença podem variar de leves a graves, podendo até ocorrer a morte (Mehlhorn, 2016).

Os animais apresentam perda de apetite, há uma redução na eficiência da conversão de alimentos com redução do ganho de peso ou mesmo perda de condição corporal. Ficam progressivamente mais fracos, podendo apresentar distúrbios digestivos inespecíficos. Há um efeito negativo na produção de leite e ocorre perda de pelo. As mucosas encontram-se pálidas como consequência da anemia instalada. Ocorre hipoproteinémia, pelo que os animais podem apresentar edema subcutâneo, especialmente no espaço intermandibular e sob o abdómen (consultar 2.8.1) (Bowman, 2014; Aspöck, 2016; Mehlhorn, 2016).

A icterícia raramente é sinal no animal vivo. Em ovelhas sem sintomas aparentes de fasciolose, pode ocorrer redução na produção de lã e diminuição da taxa de concepção e/ou influenciar a implantação do feto (Aspöck, 2016).

Lesões

Quando as formas juvenis do parasita se libertam no duodeno e no jejuno do hospedeiro, ao migrar pela parede do intestino não provocam lesões significativas, contudo surgem focos necróticos e fibrosos no peritoneu relacionados com a migração larvar. Podem ocorrer lesões ectópicas e parasitas com localizações erráticas nos vasos sanguíneos pulmonares e nos ventrículos cerebrais. Quando as formas jovens perfuram a cápsula de Glisson, surge um infiltrado de leucócitos (Carrada-bravo, 2003). Quando penetram no parênquima hepático ocorre necrose provocada pelo trauma decorrente da migração e pode surgir hepatite intersticial e fibrose perilobular induzidas por metabolitos tóxicos (Carrada-bravo, 2003; Aspöck, 2016). O fígado geralmente apresenta-se pálido, fibrótico e com contorno irregular (Urquhart *et al.*, 1996).

A invasão dos canais biliares pelos parasitas está associada a inflamação (há colangite e colangiectasia) por lesão da mucosa biliar provocada pelos espinhos presentes no tegumento dos parasitas (Urquhart *et al.*, 1996; Aspöck, 2016). Por Loker & Hofkin, (2015) é referida uma resposta hiperplásica com proliferação de células epiteliais do ducto biliar que servirão de alimento às formas de *Fasciola* spp.. Esta hiperplasia por sua vez está associada à excreção de grandes quantidades do aminoácido prolina pelo parasita (Bowman, 2014).

A maioria dos organismos usa o glutamato como substrato para a síntese de prolina, contudo *Fasciola hepatica* usa a arginina oriunda do hospedeiro. As grandes quantidades de prolina produzidas por este trematoda correlacionam-se com uma via da prolina extremamente ativa. As enzimas envolvidas nesta via no género *Fasciola* são muitas vezes mais ativas do que nos tecidos dos mamíferos, o que, juntamente com a ausência de prolina oxidase, ajuda a

explicar os níveis excessivos de prolina produzidos e que estão implicados na patogénese das infeções por este parasita, nomeadamente na hiperplasia do ducto biliar (Aspöck, 2016).

A necropsia de bovinos cronicamente infetados por *Fasciola hepatica* revela ductos biliares distendidos, espessos (devido à proliferação excessiva de tecido fibrótico), calcificados e com presença de parasitas adultos no seu lúmen (Bowman, 2014; Aspöck, 2016). A presença de numerosos parasitas, a inflamação e a extensa proliferação celular poderá levar à oclusão do lúmen do ducto biliar (Aspöck, 2016).

2.8. Diagnóstico laboratorial

2.8.1. Hematologia

Quando as formas juvenis do parasita são libertadas no duodeno e no jejuno do hospedeiro e migram pela parede intestinal para a cavidade peritoneal surge uma eosinofilia importante (Carrada-bravo, 2003). Há alterações nas proteínas séricas e ocorre diminuição da albumina em comparação com as outras globulinas. Estas alterações ocorrem em duas fases. A primeira ocorre no período de migração das formas de *Fasciola* spp. no fígado e é caracterizada por uma hipoalbuminemia progressiva, mas geralmente leve, motivada por uma síntese reduzida de albumina e pela expansão do volume plasmático. Ocorre também uma hiperglobulinemia, que é variável, e surge por um aumento da síntese de imunoglobulinas em resposta aos antígenos parasitários. A segunda fase está associada à presença de parasitas adultos nas vias biliares, ocorre perda adicional de proteínas plasmáticas por extravasamento, pela mucosa biliar hiperplásica. Nesta fase a gravidade da hipoalbuminemia está relacionada com a perda de albumina pelo intestino e com as taxas de síntese e de catabolismo da albumina. Estas, por sua vez, estão relacionadas com os níveis de nutrição, apetite e carga parasitária. O aumento da síntese de albumina, provavelmente utiliza os aminoácidos disponíveis do metabolismo de outras proteínas (músculo, leite e lã), responsável pelos baixos níveis de produtividade observados nos animais infetados com *Fasciola hepatica* (Urquhart *et al.*, 1996; Aspöck, 2016).

A anemia é do tipo normocrômica normocítica, embora tenha sido relatada alguma macrocitose, que pode ser explicada por diversos fatores. Na fase migratória ocorrem hemorragias pela destruição dos vasos hepáticos e quando os parasitas adultos atingem os ductos biliares há lesões da mucosa e ocorrem hemorragias intrabiliares. É sugerido por Aspöck (2016) que a anemia pode ter origem na produção de prolina pelo parasita, ao usar a arginina como substrato, uma vez que este tem atividade hematófaga (Urquhart *et al.* 1996). O último grau de anemia não está relacionado com a gravidade da hemorragia biliar, mas sim com a capacidade eritropoética do animal que é influenciada pelos níveis de proteína e ferro da dieta (Aspöck, 2016).

Em ovinos, os testes indicados para avaliar a função hepática são o teste de excreção de bromossulfaleína, a determinação sérica da transaminase glutâmica oxalacética (GOT) e da gama glutamil transferase (GGT) (Aspöck, 2016).

2.8.2. Coprologia

Tradicionalmente, é aceite que a presença de ovos de trematoda nas fezes indica a presença de parasitas adultos (Lamann, 2010). Deste modo, o diagnóstico de *Fasciola* spp. é possível por observação e contagem de ovos nas fezes doze semanas após a infeção no caso da *Fasciola hepatica* e treze a catorze semanas após a infeção por *Fasciola gigantica* (Yildirim *et al.*, 2007). São usados métodos de flutuação, técnicas de sedimentação tradicionais e o FLOTAC®. O diagnóstico de fasciolose crónica por estes métodos é possível, contudo, por uma baixa produtividade de ovos ou por estes serem excretados de forma errática, aumenta a possibilidade de falsos negativos (Campillo & Vázquez, 2001; Lamann, 2010). As semelhanças entre os ovos de *Fasciola* sp. e de *Paramphistomum* sp. dificulta o diagnóstico diferencial entre ambas as patologias, sendo por isso uma desvantagem destes métodos (Lamann, 2010).

Os métodos de flutuação têm como princípio a utilização de soluções hipertónicas de alta densidade como o cloreto de sódio ou o sulfato de zinco. Tem como principal desvantagem a deformação e colapso dos ovos por fenómenos osmóticos e é ineficaz em eliminações menores que 10 ovos por grama (OPG). É então recomendado o método de sedimentação, uma vez que os ovos de trematoda têm densidade superior aos detritos nas fezes. Através de lavagens sucessivas é possível concentrar o sedimento. Em bovinos, 100 a 200 OPG indicam uma infeção provavelmente patogénica que justifica a administração de anti-helmíntico (Campillo & Vázquez, 2001).

O aparelho FLOTAC® foi projetado para realizar a flutuação numa centrífuga, seguindo-se uma transferência da porção apical da suspensão flutuante. A técnica FLOTAC® permite a quantificação de ovos e/ou larvas de nematodas e trematodas, bem como quistos e oocistos de protozoários intestinais até 1 g de fezes (Lamann, 2010).

2.8.3. Serologia

Para diagnóstico da fasciolose têm sido descritas técnicas serológicas de precipitação, aglutinação, imunofluorescência, ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e de fixação do complemento. A técnica mais difundida em infeções experimentais é a de ELISA com diferentes modelos, utilizando antigénios somáticos de excreção/secreção do parasita (Campillo & Vázquez, 2001). Deste modo, são detetados anticorpos contra os parasitas produzidos pelo sistema imunitário do hospedeiro. As técnicas imunoenzimáticas não apresentam as desvantagens dos exames coprológicos, nomeadamente no que respeita à precocidade na deteção da infeção. É um método útil para o diagnóstico de fasciolose no período pré patente da infeção, na avaliação de um tratamento anti-helmíntico ou mesmo na realização de um estudo

epidemiológico (Campillo & Vázquez, 2001; Lamann, 2010). Podem ser processados vários soros ao mesmo tempo e os reagentes têm preços «acessíveis» (Lamann, 2010).

Foram desenvolvidos ensaios ELISA para a detecção de antígenos parasitários no sangue, leite ou fezes de animais naturalmente infetados, com base no uso de anticorpos monoclonais e policlonais. É um método viável e fiável de diagnóstico de fasciolose usando amostras séricas ou fecais (Lamann, 2010).

A presença de anticorpos nem sempre se correlaciona com a existência de infeção ativa, mas apenas com a exposição ao parasita, sendo a diminuição dos níveis de anticorpos lenta após a cura. A persistência de anticorpos (IgG) por longos períodos dificulta a interpretação dos resultados (Lamann, 2010).

A biologia molecular, através da evolução dos métodos de purificação, permitiu a caracterização de genes que codificam antígenos específicos cuja expressão num sistema heterólogo permitiu a sua obtenção em quantidade suficiente para aumentar a especificidade e sensibilidade da prova (Campillo & Vázquez, 2001).

2.8.4. Diagnóstico molecular

A biologia molecular é usada em muitas áreas das ciências biomédicas e o número de aplicações na parasitologia veterinária tem apresentado um rápido crescimento (Lamann, 2010).

As técnicas de biologia molecular possibilitaram a identificação e, em particular, a diferenciação entre espécies de parasitas que estão intimamente relacionadas e que são de difícil distinção morfológica como é o caso de *Fasciola hepatica* e de *Fasciola gigantica*.

A aplicação do conhecimento adquirido de uma espécie a uma espécie intimamente relacionada é uma abordagem válida, deste modo o conhecimento previamente adquirido de *Fasciola hepatica* tem sido aplicado ao estudo de *Fasciola gigantica*. No que se refere à caracterização do material genético, os estudos de biologia molecular do parasita são utilizados na sua filogenia e taxonomia. Como é relatado com a identificação de uma população de *Fasciola* sp. do Japão como uma provável estirpe de *Fasciola gigantica* (Dalton, 1999).

As técnicas moleculares são também utilizadas para a caracterização da resistência/susceptibilidade do parasita à resposta imunitária do hospedeiro, para identificação de estirpes resistentes a antimicrobianos (Dalton, 1999). No caso da fasciolose, a genética molecular também tem sido aplicada na investigação de uma vacina eficiente para a sua prevenção (Lamann, 2010).

2.9. Tratamento

2.9.1. Fármacos

Na Tabela 2 estão representados alguns dos fármacos usados no tratamento de *Fasciola* sp., da sua análise verifica-se que triclabendazol, rafoxanida e closantel são os que apresentam uma maior eficácia.

Tabela 2 – Fármacos usados no tratamento de *Fasciola* sp.

xxx = alta eficácia contra algumas fases de desenvolvimento e diversas espécies; xx = parcialmente efetivo (em relação às fases de desenvolvimento e diversidade de espécies); x = ligeiramente efetivo; adaptado de (Campillo & Vázquez, 2001; Aspöck, 2016; medvet.dgav, 2017).

Princípio ativo	Apresentação	Dose (mg/Kg)	Eficácia global	Adultos	6-12 semanas	1 - 5 semanas	Uso na lactação
Salicilanilidas							
Bitionol	NC	60	X	+	-	-	+
Rafoxanida	NC	7,5	XX	+			
Oxiclozanida	Distocur®	10	X	+	-	-	-
Closantel	Tabela 3	10	XX	+	+	-	-
Benzimidazóis							
Albendazol	Tabela 4	10	X	+	-	-	+
Triclabendazol	Cydectin TriclaMox 5 mg/ml+200 mg/ml®	12	XXX	+	+	+	-
Sulfonamidas							
Clorsulon	Página 26	7	X	+	+	-	+
Fenóis halogenados							
Nitroxinil	Dovenix®	10	X	+	+	-	-

Salicilanilidas

Dos salicilanilidas faz parte rafoxanida, oxiclozanida, closantel e bitionol. Este grupo de anti-helmínticos atua por interrupção da fosforilação oxidativa havendo uma maior formação de succinato (32%) e uma diminuição na síntese de adenosina trifosfato (ATP) (29%). Há um aumento da necessidade de glúcidos, um aumento da atividade da ATPase mitocondrial, alterações no rácio oxaloacetato/malato, diminuem as reservas de glicogénio e consequentemente os níveis de ATP (Aspöck, 2016). Foi apresentado um mecanismo de ação alternativo para o closantel, indiciando que o efeito inicial não é sobre a fosforilação oxidativa, mas sim sobre a glicólise, especificamente pela acumulação de glicose-6-fosfatos, uma vez que a sua diminuição precede uma diminuição dos níveis de ATP. A diminuição de glicose-6-fosfato pode estar associada à acidificação do tegumento por ação do closantel (Dalton, 1999). Este

processo leva a uma disfunção neuromuscular, resultando de alterações na permeabilidade iónica que levam a uma paralisia espástica, que tem como consequência o desprendimento do parasita, que deixa de se alimentar, aumenta as necessidades energéticas, é interrompida a fosforilação oxidativa e ocorre morte dos parasitas associada aos baixos níveis de ATP (Aspöck, 2016). Está provado que tem atividade contra parasitas adultos das espécies *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica* (Aspöck, 2016).

O bitionol e a rafoxanida não estão disponíveis em Portugal. A oxiclozanida é comercializada como Distocur 34 mg/ml®, é apresentada sob a forma de suspensão oral e tem como espécie alvo os bovinos. O intervalo de segurança para carne e vísceras é de catorze dias e para o leite de quatro dias e meio («medvet.dgav» 2017).

O closantel é comercializado em Portugal sob as seguintes apresentações:

Tabela 3 – Apresentação dos fármacos com closantel («medvet.dgav» 2017).

Apresentação	Substâncias ativas	Espécies alvo	Forma farmacêutica	Intervalo de Segurança
Closamectin FF 5 mg/ml + 125 mg/ml®	Ivermectina Closantel	ovinos bovinos	Solução injetável	Carne e vísceras 49 dias
Closamectin FF 5 mg/ml + 200 mg/ml®	Ivermectina Closantel	bovinos	Solução para unção contínua	Carne e Vísceras 28 dias
Flukiver 50 mg/ml®	Closantel	ovinos bovinos	Solução injetável	Carne e Vísceras 77 dias
Flukiver 50 mg/ml®	Closantel	bovinos ovinos	Suspensão oral	Carne e Vísceras 28 dias

Sulfonamidas

Clorsulon é uma sulfonamida, cuja atividade é a inibição de duas enzimas glicolíticas, a fosfoglicerato quinase e fosfogliceromutase, inibindo a utilização dos carboidratos e, consequentemente a sua utilização para produção de ATP (Lamann, 2010). Ocorre diminuição dos níveis de ATP, a motilidade dos parasitas é gradualmente eliminada, terminando numa paralisia flácida, justificada pelo gradual esgotamento das reservas energéticas e pela cessação da alimentação (Aspöck, 2016).

Só é comercializado em combinação com a ivermectina. Existem várias formulações disponíveis: Alverin Plus 10/100 mg/ml®; Animec Super 10 mg/ml + 100 mg/ml®; Bimectin Plus 10/100 mg/ml®; Clormec Plus®; Clovertin Plus®; Ivomec F® e Virbamec F® («medvet.dgav» 2017).

Benzimidazóis

O albendazol e o triclabendazol pertencem à classe dos benzimidazóis e atuam por inibição dos microtúbulos. O albendazol liga-se à beta-tubulina intracelular nos parasitas e evita a formação de microtúbulos para a divisão celular. Deste modo não é mantida a integridade da membrana superficial do tegumento. Para o triclabendazol, para além deste mecanismo foi descrita atividade do seu metabolito sulfóxido que inclui inibição da síntese proteica e interrupção da fosforilação oxidativa (Lamann, 2010; Aspöck, 2016).

O febendazol, pertence à mesma classe de anti-helmínticos, contudo não é efetivo contra *Fasciola hepatica*, mas mostrou eficácia para *Fasciola gigantica*, em ovelhas (Papich e Riviere, 2009).

O triclabendazol é ativo contra fascíolas com dois dias de idade (Campillo & Vázquez, 2001). Como acontece com outras espécies de fascíola, o triclabendazol tem elevada eficácia contra formas *Fasciola gigantica* adultas e imaturas, numa variedade de hospedeiros. A eficácia do mesmo diminui após seis a oito semanas se ocorrer reinfeção em pastagens contaminadas após o tratamento (Samuel, Pybus & Kocan, 2001).

É comercializado em Portugal associado à moxidectina como Cydectin TriclaMox 5 mg/ml + 200 mg/ml®, tem como espécie alvo os bovinos e é apresentado sob a forma de solução para unção contínua. O intervalo de segurança para carne e vísceras é 143 dias («medvet.dgav» 2017).

O albendazol não deve ser utilizado um mês antes e um mês depois da cobrição (Campillo & Vázquez, 2001). O albendazol é comercializado em Portugal sob as seguintes apresentações:

Tabela 4 – Apresentação dos fármacos com albendazol («medvet.dgav» 2017).

Apresentação	Substâncias ativas	Espécies alvo	Forma farmacêutica	Intervalo de Segurança
Albendavet 100 mg/ml®	Albendazol	bovinos	Suspensão oral	Carne e Vísceras 14 dias Leite - 4 dias
Valben 25 mg/ml®	Albendazol	ovinos bovinos	Suspensão oral	Carne e Vísceras 14 dias Leite - 4 dias

Fenóis halogenados

Os fenóis halogenados, nomeadamente o nitroxinil, produz uma paralisia espástica rápida por lesão do tegumento. Embora o mecanismo intrínseco da ação do nitroxinil no parasita não

esteja esclarecido, mostrou-se que o tegumento é um alvo importante para a droga (Papich, 2016).

Está disponível como Dovenix®, tendo como espécies alvo os bovinos e ovinos, apresenta-se sob a forma de solução injetável e tem intervalo de segurança para carne e vísceras de 60 dias («medvet.dgav», 2017).

2.9.2. Resistência aos anti-helmínticos

Os compostos de salicilanilida, nomeadamente rafoxanida e closantel, são usados há muito tempo e de forma regular, particularmente para o tratamento da fasciolose em ovelhas, o que selecionou estirpes resistentes de *Fasciola hepatica* em áreas endêmicas de Nova Gales do Sul. Estes dois compostos também são usados para o controle do nematoda *Haemonchus contortus* no qual também há evidências de resistência. As populações resistentes mantiveram-se em várias gerações de ovelhas. Em cerca de 60% das propriedades e de diferentes regiões geográficas de Nova Gales do Sul, os parasitas apresentaram resistência ao rafoxaneto nas doses recomendadas para *Fasciola hepatica* e paralelamente foi evidente resistência ao closantel. A resistência aos salicilanilideos também foi relatada no oeste da Inglaterra e País de Gales. As populações de *Fasciola hepatica* resistentes ao rafoxaneto e ao closantel não apresentam resistência lateral à oxiclozanida, o que se pode justificar pelas diferenças de suscetibilidade relacionada com a idade do parasita e os fármacos ou às suas características farmacocinéticas. Foi assinalada resistência cruzada ao nitroxinil, a qual se manifesta na forma imatura e raramente no adulto. (Dalton, 1999).

O triclabendazol é um dos principais fármacos utilizados para tratar a fasciolose, tinha alta eficácia (> 98%) e é a formulação que atua em formas imaturas do parasita. Posto isto, o triclabendazol tornou-se o fármaco de eleição para o tratamento de infeções por *Fasciola* sp., especialmente em ovelhas. Pela sua segurança e pela sua eficácia, os produtores não precisavam de testar os animais para confirmar a eliminação do parasita. A dependência excessiva do triclabendazol resultou na seleção de populações resistentes ao mesmo (Kelley *et al.*, 2016).

Na Figura 4 podemos observar os fármacos para o controle de *Fasciola hepatica* em bovinos e ovinos que têm casos de resistência reportados.

A aparente resistência ao closantel, clorsulon e nitroxinil enfatiza a importância de proteger a eficácia dos anti-helmínticos existentes (Kelley *et al.*, 2016).

Um estudo realizado em ovelhas na província de Leon, Espanha, revelou o primeiro caso de resistência ao albendazol no país (Alvarez-Sánchez *et al.*, 2006).

Flukicidas: Active Compound(s)	Method of Administration Available	Age of <i>F. hepatica</i> Killed ^a	Reports of Resistance On-Farm	Refs
TCBZ and TCBZ-based combinations	Oral, pour-on	From early immature	30 cases	Table 2
Albendazole	Oral, intraruminal	From adult	3 cases	[76,90,91]
Clorsulon	Injectable, oral	From adult; from late immature for oral	3 cases	[36,76,91]
Closantel	Pour-on, injectable, oral	From late immature	1 case	[75]
Nitroxyril	Injectable	From adult	1 case	[4]
Nitroxyril + clorsulon	Injectable	From early immature	No reports to date	
Oxyclozanide	Oral	From adult	No reports to date	

^aLabel claims for efficacy of products containing each compound can vary as a result of differences in formulation and regulatory systems in different countries.

^bAge of parasites: early immature, 1–4 weeks, parenchyma migration stage; late immature, 6–8 weeks, prepatent stage in bile ducts; adult, 12–14 weeks, bile duct stage [18].

Figura 4 – Fármacos para o controle de *Fasciola hepatica* em bovinos e ovinos e casos de resistência reportados em todo o mundo (Kelley *et al.* 2016).

2.9.3. Profilaxia

Na profilaxia da infecção por *Fasciola* spp. é importante combinar o tratamento dos animais infetados com medidas higiênicas e de controlo das formas infetantes na pastagem. A eliminação dos parasitas no hospedeiro definitivo infetado diminui a possibilidade de infecção do gastrópode, reduzindo assim o número de molúsculos infetados e a pressão de infecção nas pastagens (Campillo & Vázquez, 2001).

Nas áreas endémicas são recomendados dois tratamentos: um antes do envio dos animais para a pastagem para evitar a sua contaminação e outro no final do outono se, entretanto, não forem registados casos agudos da doença. É importante drenar as zonas alagadas onde existe o hospedeiro intermediário ou como alternativa vedar o acesso dos animais a essas zonas e construir bebedouros (Campillo & Vázquez, 2001; Mehlhorn, 2016).

O controlo das populações do hospedeiro intermediário pode ser feito por destruição química ou mecânica. Os moluscicidas têm eficácia variável, dependendo das características do terreno e da época do ano. A sua utilidade prática é discutível dado o elevado potencial biótico dos caracóis e o seu impacto ambiental negativo. Deste modo, o controlo dos gastrópodes geralmente não é recomendado devido ao grande número de fontes de água, ao seu potencial reprodutivo e à mão-de-obra necessária para garantir o controlo de todas as populações. A rotação sazonal de pastagens ou de espécies em pastoreio também são importantes para reduzir o risco de infecção (Campillo & Vázquez, 2001; Samuel, Pybus & Kocan, 2001; Mehlhorn, 2016).

→ Casos autóctones, isolados e não constantes: a infecção é adquirida na área onde vivem e onde a fasciolose animal está presente. Os casos humanos aparecem esporadicamente, sem qualquer constância.

→ Endêmica: três tipos de cenários endêmicos podem distinguir-se de acordo com a prevalência na população humana, com base no diagnóstico coprológico (as prevalências com base em provas sorológicas podem ser um pouco maiores):

- Hipo-endêmica: prevalência inferior a 1% e eliminação média de ovos inferior a 50 OPG. A eliminação de um elevado número de ovos por grama de fezes ocorre apenas em casos esporádicos. A participação humana na transmissão é rara, estando associada a adequadas instalações e sistemas de eliminação de esgotos.

- Meso-endêmica: prevalência entre 1% e 10% com eliminação média de ovos de 50-300 OPG. As crianças dos cinco aos quinze anos de idade podem apresentar prevalências mais altas. Pode haver transmissão entre humanos, associada a situações de deficiente eliminação de esgotos.

- Hiper-endêmica: prevalência superior a 10% com eliminação média de ovos superior a 300 OPG, sendo frequente encontrar indivíduos com eliminações superiores a 1000 OPG. Crianças dos cinco aos quinze anos geralmente apresentam maiores prevalências. Os indivíduos humanos participam significativamente na transmissão sendo locais onde não há saneamento e é praticada a defecação no ambiente.

Nas epidemias em áreas endêmicas humanas podem estar envolvidos diversos fatores na ocorrência de surtos, como por exemplo, condições climáticas favoráveis ao ciclo de vida do parasita e do gastrópode. Nas áreas endêmicas, prevalências elevadas em seres humanos (mais de 70% por coprologia e até 100% por serologia) não parecem estar relacionadas a altas prevalências em animais domésticos. Em áreas endêmicas para animais, mas não para humanos, ocorrem surtos, mas sempre de forma isolada e esporádica. Normalmente surge um número reduzido de indivíduos infetados, associados à mesma fonte de contaminação (Mas - Coma, Esteban & Bargues, 1999; Mas-Coma, Valero & Bargues, 2009).

A prevalência de fasciolose humana pode ser negligenciável em áreas onde ocorre a forma animal da doença, variando amplamente nas áreas onde é endêmica. Por exemplo, ocorrem prevalências muito baixas na Baixa Normandia, França com $0,34 \pm 3,1$ casos por 100 000 habitantes, na Córsega com $0,83 \pm 1,16$ casos por 100 000 habitantes e uma prevalência de 0,7% (41 casos por 5861 indivíduos estudados) na VII região do Chile. Níveis médios de prevalência são registados na região interior do Porto, Portugal, com prevalências de 3,2%; no delta do Nilo, Egito com 7,3%; em Cajamarca, Peru com 8,7%; em Corozal, Porto Rico com 10,9%. Exemplos de altas prevalências são registados na região de Puno com 15,64% e 34,2% no vale do Mantaro, ambas no Peru.

Em Portugal, no Porto um estudo prospetivo verificou um nível de eliminação média de ovos de 233 OPG (Mas - Coma, Esteban & Bargues, 1999). A incidência em Portugal varia consoante os autores, contudo parece haver consenso no que respeita à distribuição geográfica a nível

nacional, com casos registados em quase todos os distritos do Continente e na Madeira, sendo o norte do país a região com maior número. No serviço de Medicina III dos Hospitais da Universidade de Coimbra, entre Janeiro de 1987 e Dezembro de 2001 ocorreram seis casos, representando uma incidência de 0,29‰ nos internamentos (Calretas & Carvalho, 2003).

A transmissão do parasita é facilitada pelas altas densidades de populações humanas e animais, que vivem em proximidade. Como fatores importantes na transmissão da infeção, são referidos: cadeia de frio limitada, níveis baixos de inspeção sanitária, falta de medidas de biossegurança, consumo generalizado de vegetais crus, utilização para uso doméstico de fontes de água não tratadas ou de águas residuais não tratadas, assim como a emissão de esgotos para a agricultura (Nyindo & Lukumbagire, 2015).

Estudos recentes demonstraram que muitas espécies de plantas de água doce, além do agrião, podem participar na infeção humana, dependendo das regiões geográficas e dos seus hábitos alimentares. Por exemplo, em França são citadas *Taraxacum dens leonis* (dente de leão), *Valerianella olitor* (alface da terra) e *Mentha viridis* (hortelã) (Mas - Coma, Esteban & Bargues, 1999). A lavagem dos vegetais em água corrente durante dez minutos elimina apenas 50% das metacercárias. O vinagre e o permanganato de potássio parecem eliminar 100% das metacercárias, após dez minutos de exposição (Calretas & Carvalho, 2003).

O estabelecimento de medidas de controle para a fasciolose humana é difícil pela heterogeneidade das características epidemiológicas e dos padrões de transmissão em situações significativamente diferentes, como: a presença de apenas uma espécie (*Fasciola hepatica* ou *Fasciola gigantica*), ou ambas as espécies, ou as duas espécies mais híbridos; a presença de apenas uma espécie ou várias espécies de *Lymnaea*, que transmitem uma ou duas espécies de *Fasciola*, ou ainda, que transmitem espécies em áreas onde estas se sobrepõem; uma ou mais espécies de animais desempenham um papel reservatório, como por exemplo os mamíferos selvagens; transmissão sazonal ou permanente; situações endémicas estáveis ou emergentes; áreas endémicas uniformes ou heterogêneas; uma ou mais fontes de infeção humana; problemas com métodos de diagnóstico.

A heterogeneidade é tão grande que os esquemas de controle não parecem viáveis. Para muitas áreas ou países, recomendam-se medidas básicas de controle que devem incluir medidas específicas para essa área ou país (Mas-Coma, Valero & Bargues, 2009)

Devem ser implementados programas de vigilância e rastreio nas áreas endémicas com o envolvimento interdisciplinar (Figura 6). A consciência global e uma abordagem “One health” para as zoonoses deverá ser mais abrangente no que se refere à fasciolose. No respeitante à saúde animal são necessários esforços contínuos, incluindo medidas de controle para o comércio e viagens, de modo a reduzir a passagem de animais infetados de um país para outro. Nos países em desenvolvimento, um dos componentes importantes dos programas de controle é assegurar a higiene da água e dos alimentos. O envolvimento das partes interessadas e a vontade política de apoiar essas estratégias são cruciais para a aplicação efetiva dessas medidas (Nyindo & Lukumbagire, 2015).

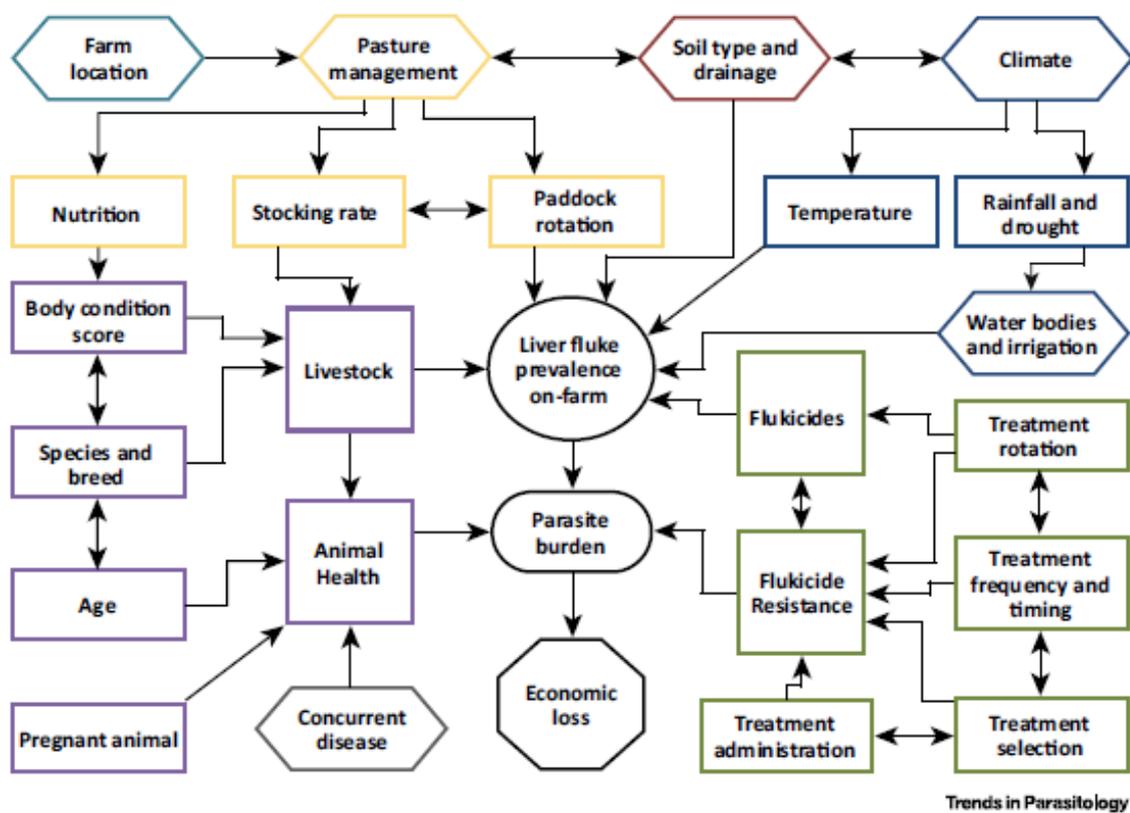


Figura 6 – Controlo integrado de *Fasciola hepatica*, factores que influenciam a prevalência do parasita (Kelley *et al.* 2016).

3. Material e métodos

O material e métodos é apresentado em três partes, uma vez que a metodologia inerente a cada uma delas é distinta. Deste modo, serão consideradas nesta secção, a colheita de material biológico e recolha de dados, estudo morfométrico e a análise genética.

3.1. Colheita de material biológico e a recolha de dados

A população de bovinos sujeita ao estudo foi constituída por bovinos provenientes de diferentes regiões do país e que foram abatidos no matadouro de Beja (SAPJU carnes) entre 13 de Março e 31 de Maio do presente ano. Foram identificados os animais infetados e colhidos espécimes adultos de *Fasciola* spp.,.

A identificação dos animais infetados realizou-se do seguinte modo: os fígados infetados foram identificados pelo inspetor sanitário oficial durante a inspeção, através da incisão da superfície gástrica do fígado e da base do lobo caudado para exame dos canais biliares. Após a identificação dos fígados afetados procedeu-se à incisão longitudinal, com uma faca ou tesoura, de todos os canais biliares cujo calibre o permitiam; com o auxílio de uma pinça recolheram-se cuidadosamente todos os exemplares de *Fasciola* spp. encontrados (Figura 7).

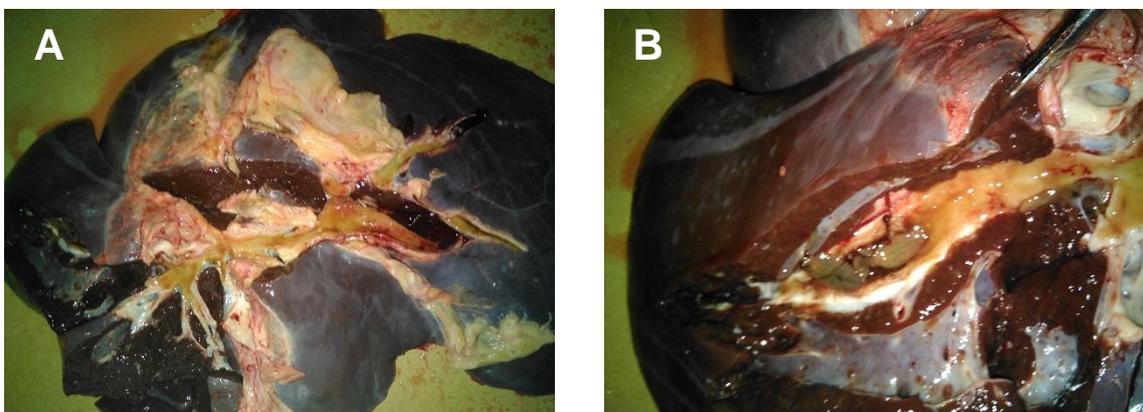


Figura 7 – **A** Fígado após a incisão de todos os canais biliares cujo calibre o permitiram. **B** – Fígado infestado com *Fasciola* spp. (original);

Os exemplares colhidos foram colocados em recipientes contendo água da rede pública e identificados com a data e número de ordem do animal na linha de abate. Foram transportados para o laboratório e mantidos em água à temperatura de refrigeração (4 °C) de modo a morrerem por extensão. Após a sua morte, foram contabilizados e conservados em álcool a 70°.

Para a caracterização dos bovinos foram consultados os mapas de abate, cedidos pela SAPJU, de onde foi possível retirar informação sobre a idade e sexo dos animais abatidos, bem como a classificação da carcaça e respetivo peso.

Para contabilizar a origem dos animais abatidos, foram consultados todos os registos da inspeção *ante-mortem* recolhendo-se as letras correspondentes às marcas de exploração que codificam a localização da exploração e o número de animais que daí provinham. A descodificação da localização das explorações foi possível consultando uma lista disponibilizada pelos serviços oficiais. Para identificação da exploração de proveniência dos animais com *Fasciola* spp., recorreu-se ao número de ordem de abate do animal, identificando-se nos mapas de abate o número da guia de transporte e, através dele, o registo da inspeção *ante-mortem*.

Para o tratamento dos dados recolhidos e apresentação dos resultados usaram-se diferentes ferramentas de dois programas de análise estatística, o Microsoft® Excel® 2016 e o IBM® SPSS® Statistics versão 24.

3.2. Morfometria

De todas as amostras contituidas pelos exemplares de *Fasciola* sp. colhidos em cada um dos bovinos parasitados, foram selecionadas as infra populações com mais de quatro exemplares de *Fasciola* spp.. Entre estes, selecionaram-se 25 animais com base nos seguintes critérios: local de origem dos animais, idade dos animais e o número de exemplares de *Fasciola* spp. recolhidos no animal. Também foi utilizado como critério a relação entre o número total de animais enviados para abate pelo produtor e o número de animais infetados.

Para identificação das amostras será usado um número de referência (z) que codificará o número de ordem e data de abate do animal. Na Tabela 5 são sintetizados os critérios considerados na seleção de cada uma das amostras (assinalados a azul), contudo aconselha-se a consulta do Anexo 2.

Colocaram-se os exemplares de *Fasciola* spp. numa placa de Petri e após a sua observação à lupa selecionaram-se quatro exemplares de cada bovino selecionado para o estudo. Os critérios de seleção dos exemplares para estudo e dos parâmetros morfométricos a utilizar, seguiram artigos de referência na área (Ashrafi *et al.* 2006; Periago *et al.* 2006, 2008).

O critério de seleção dos espécimes adultos foi a presença de ovos no útero, de acordo com Periago *et al.* (2006).

O critério de seleção dos parâmetros morfométricos teve por base a análise dos estudos realizados por Ashrafi *et al.* (2006) e Periago *et al.* (2006, 2008), tendo sido eleitos os parâmetros não sobreponíveis de *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica*, apresentados na Figura 8.

Tabela 5 – Critérios considerados para selecionar cada uma das amostras (assinalados a azul), Z-número de referência para identificação das amostras.

Z	Idade (meses)	Distrito origem	Produtor	Nº fascíolas colhidas	Animais Parasitados Animais abatidos	
3	134	Viseu (Castro d'Aire)	A	69	3/85	Mesmo distrito 2 localidades diferentes
22	73		A	140		
2	170	Viseu	C	31	1/57	
1	192	Coimbra (Soure)	D	46	2/74	
12	113	Santarém (Chamusca)	F	15	2/9	Mesmo distrito 2 localidades diferentes
4	193	Santarém (Cartaxo)	G	7	1/6	
5	54	Portalegre	K	12	4/188	
19	76		K	12		
6	134		K	10		
9	167	Portalegre (Avis)	L	12	5/6	2 produtores diferentes na mesma localidade
10	242		L	10	2/5	
7	78		M	40		
8	176		M	91		
14	206	Portalegre (Avis)	N	37	5/20 (com origem em 2 explorações com localizações diferentes)	
15	147		N	11		
16	206	Portalegre (Arronches)	N	23		
17	112		N	46		
18	156		N	18		
23	129	Évora (Arraiolos)	P	109	8/40	Mesmo distrito 2 localidades diferentes
24	75		P	41		
25	133		P	5		
11	12	Évora	R	12	4/33	
21	10		R	27		
13	201	Setúbal (Alcácer do Sal)	S	7	3/7	
20	96	Beja (Serpa)	X	7	6/6	

À lupa e com o auxílio de uma pinça, colocou-se o espécime de *Fasciola* spp. numa lâmina com a face da ventosa ventral para cima e, utilizando uma régua com precisão de 0,5mm efetuaram-se as medições esquematizadas na Figura 8.

Assim, mediu-se a distância entre a união das glândulas vitelinas e a extremidade posterior do corpo (Figura 8 - C e Figura 9 – 1), a distância entre a ventosa ventral e a união das glândulas vitelinas (Figura 8 - B e Figura 9 – 2), a soma dos valores obtidos nestes dois parâmetros resultou na distância entre a ventosa ventral e a extremidade posterior do corpo (Figura 8 - D). Uma vez

que a maioria dos espécimes excedia o campo ótico da lupa, para a obtenção do comprimento total (Figura 8 - A), somaram-se a distância entre a união das glândulas vitelinas e a extremidade do cone cefálico (Figura 9 - X) e a distância entre a união das glândulas vitelinas e a extremidade posterior do corpo (C) (Figura 8 - A). A largura máxima do corpo (E) foi obtida no ponto em que esta apresentava a sua largura máxima (Figura 8 - E e Figura 9 – 3).

O procedimento foi repetido para cada um dos exemplares seleccionados, havendo o cuidado de os hidratar com álcool a 70° sempre que se mostrasse necessário.

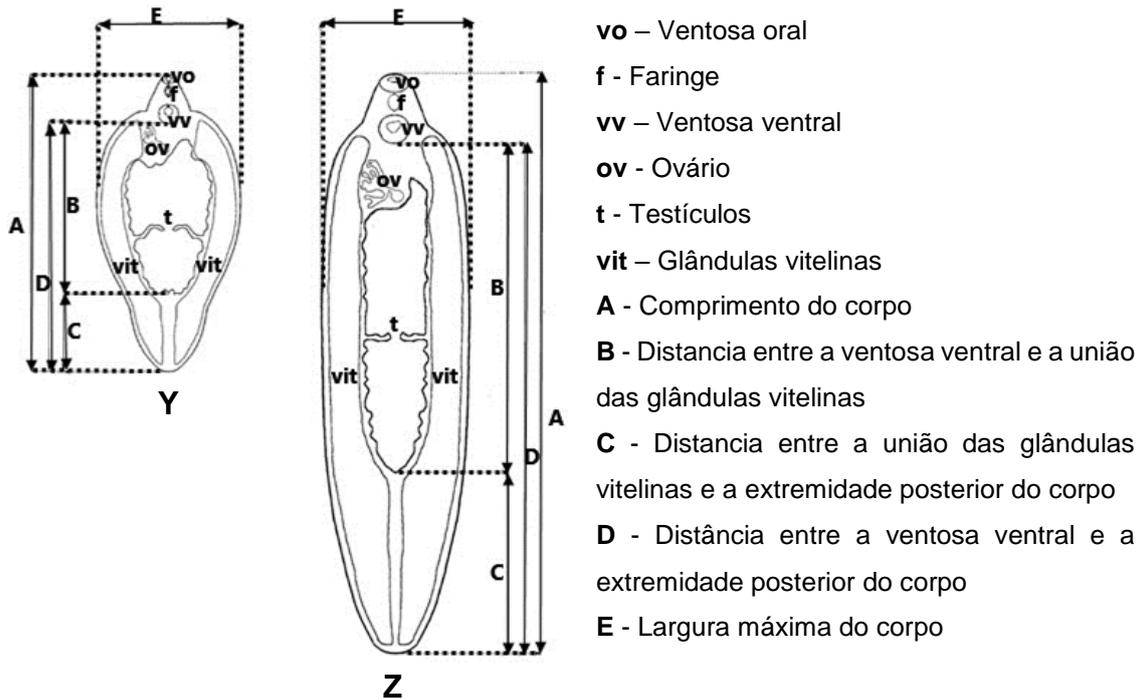


Figura 8 - **Y** – Representação esquemática de uma *Fasciola hepatica*. **Z** - Representação esquemática de uma *Fasciola gigantica*. Adaptado de (Periago *et al.* 2008)

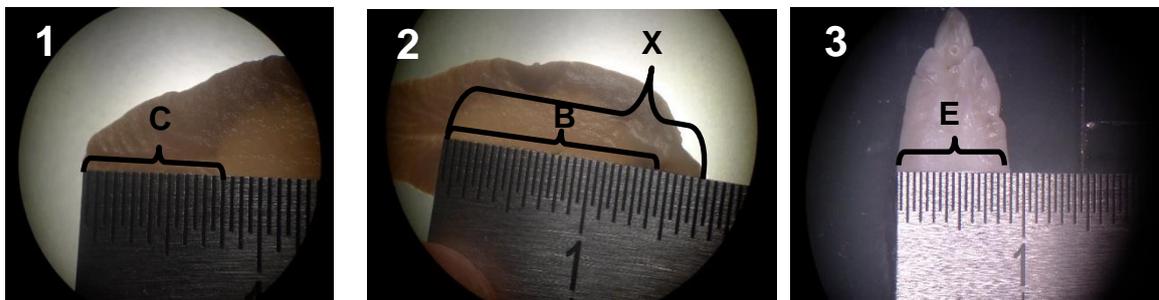


Figura 9 – 1 – Distância entre a união das glândulas vitelinas e a extremidade posterior do corpo; 2 – Distância entre a ventosa ventral e a união das glândulas vitelinas; 3 – Largura máxima do corpo da *Fasciola* spp.

3.3. Análise genética

Foi estabelecida uma colaboração com o *Tropical Animal Health & Production Laboratory* (TAHP), da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, no sentido de se proceder ao estudo genético de uma amostra de dez exemplares da coleção de espécimes colhidos durante os trabalhos do atual estudo. Os exemplares analisados neste pequeno estudo foram selecionados com base nas suas características morfológicas. Incluíram-se espécimes com dimensões características de ambas as espécies colhidos em animais diferentes e, exemplares colhidos num mesmo animal com dimensões e características morfológicas visivelmente distintas (Figura 10).



Figura 10 – Quatro exemplares com características morfológicas visivelmente distintas.

O estudo genético começou pela amplificação de uma porção de dois genes, um gene mitocondrial (mt DNA), o Citocromo oxidase I (COI) e um gene nuclear (rDNA), o 28S, selecionados mediante pesquisa bibliográfica. Para a amplificação das regiões nucleotídicas de interesse foram utilizados pares de iniciadores (do Inglês: *primers*), desenhados em estudos comparativos destas mesmas espécies aqui em análise, onde são comparados espécimes com proveniências geograficamente distintas. Os pares de iniciadores foram selecionados através de pesquisa bibliográfica em revistas da especialidade e para a análise genética do COI foram utilizados os pares Ita 8_Fw (5' -ACGTTGGATCATAAGCGTGT-3') e o Ita 9_Rv (5' -CCTCATCCAACATAACCTCT-3'), para a amplificação de uma sequência parcial com cerca de 438 pares de base (Itagaki, 2005); a amplificação parcial do gene 28S utilizou os pares 28F1_Fw (5' -ACGTGATTACCCGCTGAACT-3') e o 28R600_Rv (5' -CTGAGAAAGTGCACTGACAAG-3'), para o qual se esperavam amplificados com cerca de 618 pares de base (Marcela *et al.*, 2012).

4. Apresentação e discussão dos resultados

4.1. Distribuição geográfica e pelos produtores da infeção por *Fasciola* spp.

De 13 de março a 31 de maio foram abatidos 3276 bovinos no matadouro de Beja, dos quais 57 estavam parasitados por *Fasciola* spp. (1,74%). Resultado próximo de outro estudo realizado em Portugal, por Gavião (2013) no matadouro de Aveiro entre Novembro de 2012 e Fevereiro de 2013, em 3253 bovinos foram identificados 64 com *Fasciola* spp. (1,97%).

As frequências de bovinos com a presença do parasita em ambos os estudos foram muito semelhantes, apesar da localização geográfica do local de colheita ser diferente e de terem sido realizados num período temporal distinto.

Na análise dos dados que se segue foram realizados testes de independência estatística, não se verificando qualquer relação significativa entre as variáveis em estudo.

4.1.1. Distribuição geográfica

Os distritos de proveniência dos animais foram catorze (14), com maior relevância para os de Beja, Évora e Portalegre (Gráfico 2 e Figura 11 - A). Em relação aos animais parasitados, estes provinham de nove (9), com destaque para os distritos de Portalegre, Évora e Beja (Gráfico 2, Figura 11 - A e Anexo 2).

Foi avaliada a distribuição geográfica da infeção por *Fasciola* spp. através da frequência de animais parasitados em matadouro, por distrito de origem (Gráfico 1).

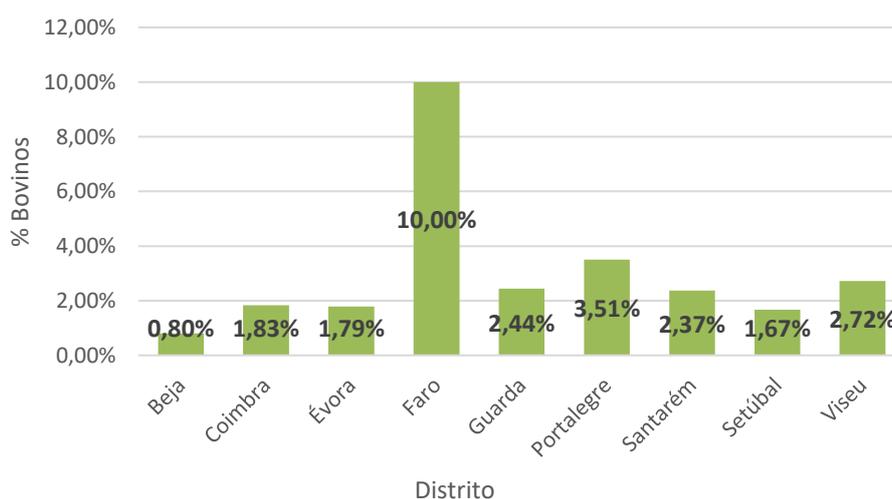


Gráfico 1 - Frequência de parasitismo registada em matadouro em cada um dos distritos (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).

De referir que a frequência da infeção por *Fasciola* spp. por distrito, foi condicionada por fatores como o número de animais provenientes de cada local. A título de exemplo, nos gráficos 1 e 2, observa-se que a frequência de *Fasciola* spp. nos bovinos provenientes de Faro e abatidos no matadouro de Beja foi de 10%, o que se deve ao facto de serem provenientes 10 animais do distrito de Faro (0,31% do total de bovinos abatidos) e ser registado um animal com a presença do parasita (1,75% dos casos registados). Deste modo, considera-se que o parâmetro referido para o distrito de Faro não é relevante dado o reduzido número de animais daí provenientes.

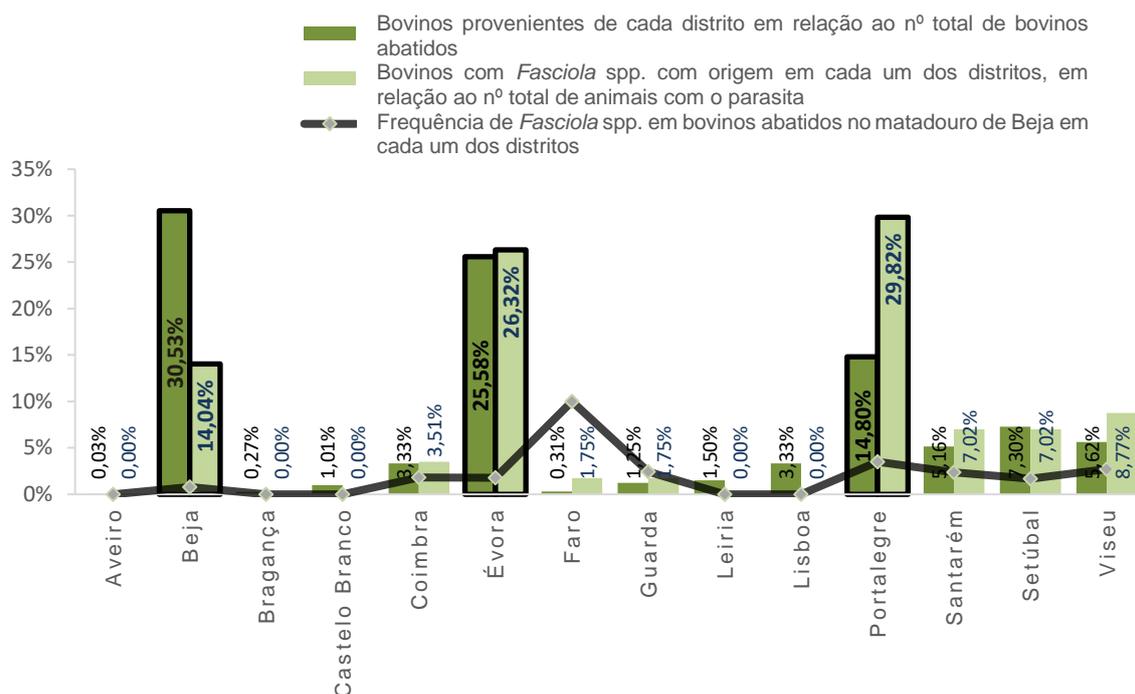


Gráfico 2 - Representação, por distrito, da % de bovinos abatidos, da % de casos de *Fasciola* spp. e da frequência de *Fasciola* spp. dos bovinos abatidos no matadouro de Beja com origem nos distritos apresentados. (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).

Os distritos de Beja, Évora, Portalegre, Setúbal, Viseu e Santarém, representam no seu conjunto 89% dos animais abatidos, com uma frequência de animais com *Fasciola* spp. de 0,80%, 1,79%, 3,51%, 1,67%, 2,72% e 2,37%, respetivamente, e sendo que os bovinos provenientes destes distritos representam 93% total dos bovinos com *Fasciola* spp.

No estudo realizado por Gavião (2013), a maioria dos animais recebidos no matadouro de Aveiro eram provenientes de Portalegre, Aveiro e Coimbra. Os animais com *Fasciola* spp. tiveram origem em diferentes localidades do país, contudo a maioria dos casos pertenceram aos distritos de Aveiro, Coimbra e Viseu.

Representa-se esquematicamente na Figura 11 a frequência de bovinos com *Fasciola* spp. em cada um dos distritos, através da escala de cores apresentada na mesma, tendo em conta os dados da presente análise (Figura 11 - A) e do estudo referido anteriormente (Figura 11 - B).

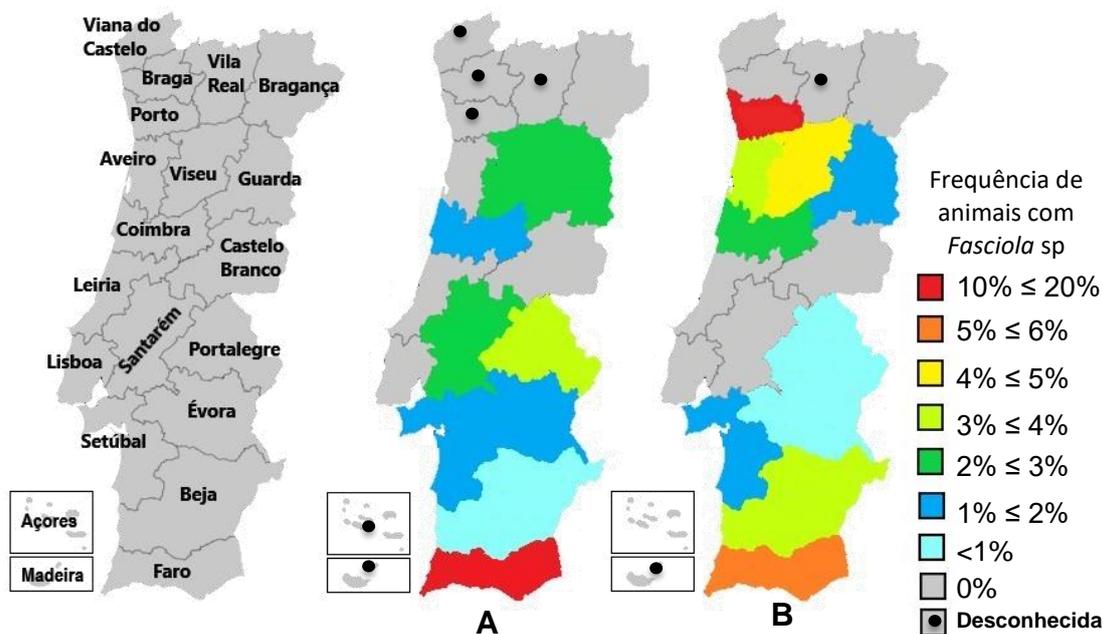


Figura 11 - Frequência de *Fasciola* spp. em cada um dos distritos (escala de cores), tendo em conta os bovinos abatidos no matadouro de Beja no período de estudo (A) e os bovinos abatidos no matadouro de Aveiro no estudo de (Gavião 2013) (B) (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).

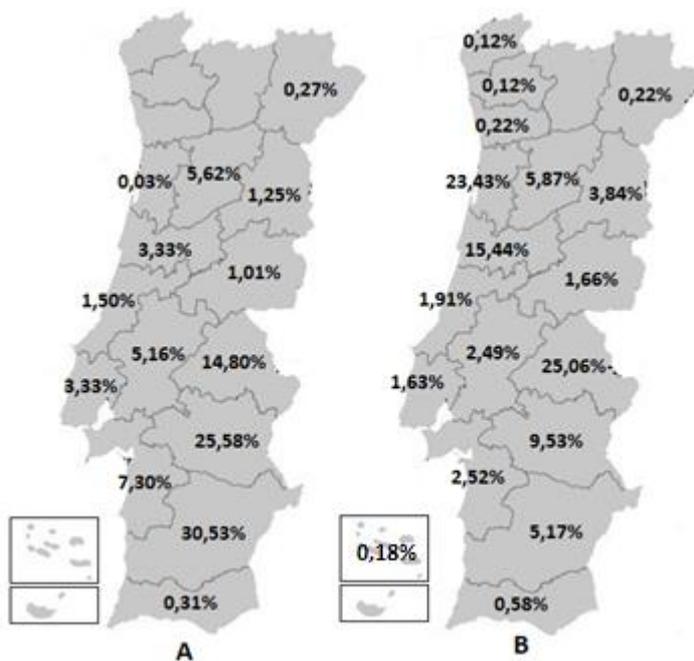


Figura 12 - Total de bovinos abatidos com origem em cada distrito, em relação ao número total de bovinos abatidos no matadouro de Beja no período de estudo (A) e os bovinos abatidos no matadouro de Aveiro no estudo de (Gavião 2013) (B) (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).

Dado que as frequências de animais com *Fasciola* spp. foram calculadas tendo em conta o número total de animais abatidos provenientes desses mesmos distritos, as percentagens a preto representadas na Figura 11 indicam o total de bovinos abatidos com origem em cada um dos distritos, em relação ao número total de bovinos abatidos em cada um dos referidos matadouros.

Para a análise da frequência de *Fasciola* spp., representada na Figura 11, são selecionados para comparação os distritos da Figura 12 com uma percentagem de animais abatidos em ambos os matadouros superior a 5%.

Ao longo desta análise continuará a ser usado para comparação o estudo de Gavião (2013) que, apesar de ter sido realizado num local e período de tempo diferentes, é o único que apresenta parâmetros semelhantes aos que se pretendem avaliar na presente investigação.

Apesar da elevada percentagem de animais abatidos no matadouro de Aveiro com origem no distrito de Portalegre (25,06%), a frequência de animais com *Fasciola* spp. nesse distrito foi de 0,49%. Contudo, na presente análise, os bovinos desse distrito representaram 14,80% dos bovinos abatidos no matadouro de Beja e a frequência do parasita foi de 3,51%. Relativamente ao distrito de Évora, este representava 25,58% dos bovinos abatidos no matadouro de Beja, já no matadouro de Aveiro eram 9,53%. A frequência de *Fasciola* spp. foi respetivamente de 1,79% e 0,32%. Os bovinos abatidos no matadouro de Beja com origem neste distrito representaram 30,53% dos animais abatidos e tiveram uma frequência do parasita de 0,80%. No matadouro de Aveiro representavam 5,17% dos bovinos abatidos e tiveram uma frequência de 3,57%. Tanto o matadouro de Beja como o matadouro de Aveiro abateram uma percentagem semelhante de bovinos com origem no distrito de Viseu, respetivamente, 5,62% e 5,87%, com uma frequência de *Fasciola* spp. de 2,72% e 4,19%.

É referido por Gavião (2013) que seria esperado que os distritos com maior frequência de animais com *Fasciola* spp. fossem os mesmos distritos dos quais se abateram mais animais, uma vez que a amostra era maior. Contudo, refere que tal não se verificou e justificou estes resultados com a localização geográfica dos distritos.

Nas observações realizadas no presente estudo também se constatou, de forma genérica, que os distritos de onde foram provenientes menos animais para abate foram os que tiveram uma maior frequência de *Fasciola* spp. e que para o mesmo distrito, entre estudos, quando se aumentava a percentagem de bovinos abatidos diminuía a frequência de *Fasciola* spp. Quando temos uma amostra reduzida basta haver um pequeno número de animais positivos para originar uma frequência elevada. Deste modo, tendo poucos animais com origem nesses distritos, as frequências calculadas podem não refletir a realidade do distrito. Seriam necessários mais estudos com um maior número de animais com origem nesses locais.

É importante referir que para conhecimento do distrito de proveniência dos bovinos foi considerada a informação referente à última exploração em que permaneceram. Os animais podem ter estado em mais do que uma exploração e não ter sido considerada aquela em que permaneceram por mais tempo.

De fevereiro de 2007 a janeiro de 2009, foi realizado, num matadouro localizado em Lugo (noroeste da Espanha), um estudo com 776 bovinos (jovens e adultos) provenientes do norte de Portugal e do noroeste da Espanha. Nesse estudo foi detetada por Arias *et al.*, (2011) uma prevalência de *Fasciola* spp. de 28%.

Em suma, tendo em conta o presente estudo e as observações feitas por Gavião (2013) e Grácio *et al.* (2011) podemos afirmar que existe referência a animais infetados com *Fasciola* spp. nos distritos de Porto, Aveiro, Coimbra, Viseu, Guarda, Castelo Branco, Portalegre, Leiria, Lisboa, Santarém, Setúbal, Évora, Beja e Faro.

4.1.2. Distribuição dos bovinos com *Fasciola* spp. pelos produtores

Os 3276 bovinos abatidos no matadouro de Beja no período de estudo foram provenientes de 245 produtores. Destes, 26 produtores (10,61%) apresentaram animais com *Fasciola* spp. (Tabela 6). Estes 26 produtores enviaram para abate um total de 922 bovinos, representando 28,14% do número total de bovinos abatidos. Verificou-se que houve produtores que enviaram para abate um reduzido número de animais, apresentando-se a maioria infetada com *Fasciola* spp. Deste modo, considerou-se relevante analisar o número total de bovinos abatidos por cada produtor que apresentou animais infetados, a percentagem dos infetados e a média do número de exemplares de *Fasciola* spp. colhidos por animal (Gráfico 3).

Da análise do Gráfico 3, os produtores B, F, G, J, L, M, N, O, Q, S, U, V, W, X e Z, apresentaram um reduzido número de bovinos para abate e entre todos os produtores estes representam apenas 12,36%, com 0,35% dos bovinos em relação ao total de animais abatidos neste período. No entanto, apesar de representarem um reduzido número quer de produtores, quer de bovinos, estes apresentam 52,63% dos bovinos infetados com *Fasciola* spp. o que enviesa muito os presentes resultados.

O verificado em relação a este grupo de produtores leva a inferir que podem ser animais provenientes de zonas endémicas, animais não desparasitados ou em que houve uma falha generalizada na desparasitação, como por exemplo, dose inadequada ou uso de um produto sem eficácia (por exemplo por falha no armazenamento), sendo admissível ponderar também a existência de casos de resistência ao anti-helmíntico.

Quando verificamos que há produtores que enviaram um elevado número de bovinos para abate e apresentaram um número reduzido de animais com *Fasciola* spp. podemos suspeitar que houve uma falha pontual na desparasitação (como por exemplo, aqueles animais não terem recebido desparasitante) ou ainda casos pontuais de resistência aos anti-helmínticos.

É inevitável fazer referência à utilidade de um estudo retrospectivo para avaliação e caracterização ecológica dos locais de proveniência dos animais, o tipo de manejo alimentar, o tipo de abeberamento, frequência de desparasitações e produto desparasitante.

Tabela 6 - Bovinos abatidos, bovinos com *Fasciola* sp e número médio de fasciolas recolhidas por animal de cada produtor. (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).

Produtor	Total animais abatidos	Total animais Com <i>Fasciola</i> spp.	Exemplares <i>Fasciola</i> spp. por animal
A	85	3	81
B	1	1	1
C	57	1	31
D	74	2	24
E	27	1	7
F	9	2	8
G	6	1	7
H	64	1	1
I	127	1	1
J	2	1	1
K	188	4	8,75
L	6	5	6,4
M	5	2	65,5
N	20	5	27
O	4	1	11
P	40	8	28,32
Q	7	1	3
R	33	4	10,5
S	7	3	3,33
T	41	1	4
U	10	1	4
V	9	1	2
W	16	1	1
X	6	4	7,25
Y	72	1	3
Z	6	1	2
Total	922/3276	57	

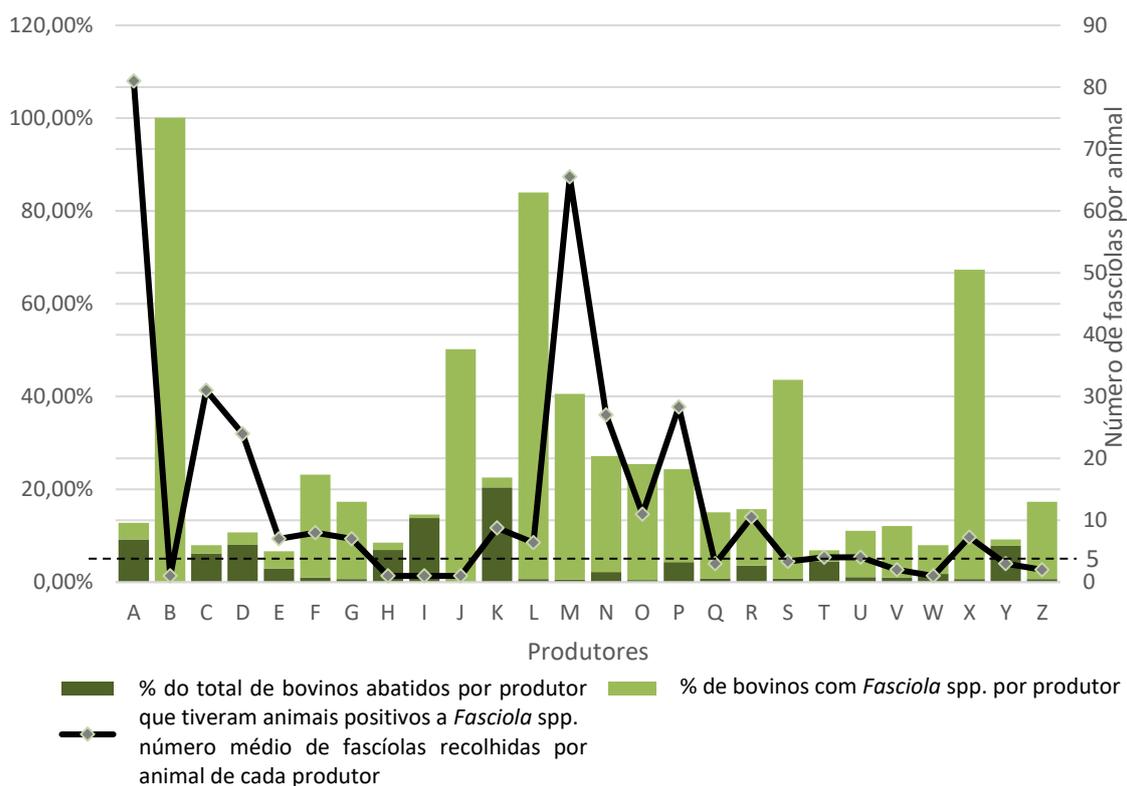


Gráfico 3 - Percentagem de bovinos abatidos, da % de bovinos com *Fasciola* spp. e do número médio de fascíolas recolhidas por animal de cada produtor (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).

4.2. Distribuição e frequência da infeção por *Fasciola* spp.

4.2.1. Caracterização da população de bovinos em estudo

Na Tabela 7 é caracterizado o número total de bovinos abatidos no matadouro de Beja no período de estudo, relativamente ao peso da carcaça, sexo e idade.

Foram considerados os seguintes intervalos de idades: inferior a 13 meses, entre os 13 e os 24 meses, dos 24 aos 72 meses e animais com mais de 72 meses de idade.

A avaliação do peso da carcaça ao longo desta análise é subjetiva, uma vez que são animais provenientes de diversos produtores. Deste modo é expectável que existam oscilações de peso decorrentes dos animais serem de diferentes raças, terem diferentes aptidões, planos alimentares, planos de profilaxia médica e sanitária e diferentes estados de saúde. As motivações dos produtores para o envio dos animais para abate também serão variáveis.

Dos 3276 bovinos abatidos, 2539 (77,5%) eram fêmeas, a maioria (n=1573) com mais de 72 meses de idade (48%), o que leva a inferir que sejam animais de refugo.

Importante referir que 334 (10,20%) dos animais eram fêmeas com mais de 72 meses de idade e com peso de carcaça inferior a 225 Kg, o que pode indicar que eram animais magros ou

carcaças com algumas partes rejeitadas (por exemplo, rejeição de um membro posterior por existência de um abscesso localizado).

Dos machos abatidos (736), a maioria (n=689) tinha idade inferior a 24 meses, sendo possivelmente animais de engorda, como seria esperado.

Tabela 7 – Distribuição dos machos e fêmeas em relação ao peso e idade (n=3276) (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).

		Fêmeas 77,50% n=2539				Macho Castrado 0,03% n=1	Machos 22,47% n=736			
		Peso (Kg)				Peso (Kg)	Peso (Kg)			
		42-224,99 20,15% n=660	225-261,99 22,80% n=747	262-311,99 21,86% n=716	312-629 12,70% n=416	312-629 0,03% n=1	42-224,99 4,73% n=155	225-261,99 1,74% n=57	262-311,99 3,82% n=125	312-629 12,18% n=399
Idade (meses)	≤ 13 13,34% n=437	3,51% n=115	1,65% n=54	0,61% n=20	0,06% n=2	0,00% n=0	2,69% n=88	0,61% n=20	1,71% n=56	2,50% n=82
	5,83% n=191					7,51% n=246				
	>13 ≤24 22,68% n=743	3,17% n=104	3,91% n=128	1,83% n=60	0,24% n=8	0,00% n=0	1,89% n=62	1,04% n=34	1,95% n=64	8,64% n=283
	9,16% n=300					13,52% n=443				
24<72 15,54% n=509	3,27% n=107	3,24% n=106	3,69% n=121	4,30% n=141	0,03% n=1	0,15% n=5	0,09% n=3	0,12% n=4	0,64% n=21	
14,53% n=475					0,89% n=33					
≥72 48,44% n=1587	10,20% n=334	14,01% n=459	15,72% n=515	8,09% n=265	0,00% n=0	0,00% n=0	0,00% n=0	0,03% n=1	0,40% n=13	
48,02% n=1573					0,43% n=14					

Ao analisar a Tabela 8 verificamos que dos 3219 bovinos abatidos sem presença de *Fasciola* spp., 2490 (77,35%) eram fêmeas, a maioria (n=1530) com mais de 72 meses de idade (47,53% dos animais abatidos não parasitados). Dos machos abatidos (728), a maioria (n=682) tinha idade inferior a 24 meses. O grupo de bovinos não parasitados por *Fasciola* spp. é muito semelhante à população considerada neste estudo uma vez que os bovinos parasitados são apenas 57 (57/3276).

Tabela 8 - Distribuição dos machos e fêmeas não parasitados em relação ao peso e idade (n=3219)
(Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).

		Fêmeas				Macho Castrado	Machos			
		77,35% n=2490				0,03% n=1	22,62% n=728			
		Peso (Kg)				Peso (Kg)	Peso (Kg)			
		42-224,99 20,22% n=651	225-261,99 22,93% n=738	262-311,99 21,59% n=695	312-629 12,61% n=406	312-629 0,03% n=1	42-224,99 4,78% n=154	225-261,99 1,77% n=57	262-311,99 3,82% n=123	312-629 12,24% n=394
Idade (meses)	≤ 13 13,48% n=434	3,57% n=115	1,68% n=54	0,62% n=20	0,06% n=2	0,00% n=0	2,73% n=88	0,62% n=20	1,71% n=55	2,49% n=80
		5,93% n=191					7,55% n=243			
	>13 ≤24 22,86% n=736	3,23% n=104	3,95% n=127	1,83% n=59	0,22% n=7	0,00% n=0	1,89% n=61	1,06% n=34	1,96% n=63	8,73% n=281
		9,23% n=297					13,64% n=439			
	24<72 15,72% n=506	3,32% n=107	3,29% n=106	3,73% n=120	4,32% n=139	0,03% n=1	0,16% n=5	0,09% n=3	0,12% n=4	0,65% n=21
		14,66% n=472					1,03% n=33			
	≥72 47% n=1543	10,10% n=325	14,01% n=451	15,41% n=496	8,01% n=258	0,00% n=0	0,00% n=0	0,00% n=0	0,03% n=1	0,37% n=12
		47,53% n=1530					0,40% n=13			

Relativamente ao grupo de animais parasitados (Tabela 9) verificamos que 49 (85,96%) eram fêmeas e maioritariamente com mais de 72 meses de idade (75,44% dos animais com *Fasciola* spp.). Dos oito machos parasitados (14,04%), sete tinham idade inferior a 24 meses.

Tabela 9 - Distribuição dos machos e fêmeas parasitados em relação ao peso e idade (n=57) (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).

Idade (meses)		Fêmeas 85,96% n=49				Machos 14,04% n=8		
		Peso (Kg)				Peso (Kg)		
		42-224,99 15,79% n=9	225-261,99 15,79% n=9	262-311,99 36,84% n=21	312-629 17,54% n=10	42-224,99 1,75% n=1	262-311,99 3,51% n=2	312-629 8,77% n=5
≤ 13 5,26% n=3	0,00% n=0	0,00% n=0	0,00% n=0	0,00% n=0	0,00% n=0	1,75% n=1	3,51% n=2	
	0% n=0				5,26% n=3			
> 13 ≤ 24 12,28% n=7	0,00% n=0	1,75% n=1	1,75% n=1	1,75% n=1	1,75% n=1	1,75% n=1	3,51% n=2	
	5,26% n=3				7,02% n=4			
24 < 72 5,26% n=3	0,00% n=0	0,00% n=0	1,75% n=1	3,51% n=2	0,00% n=0	0,00% n=0	0,00% n=0	
	5,26% n=3				0% n=0			
≥ 72 77,19% n=44	15,79% n=9	14,04% n=8	33,33% n=19	12,28% n=7	0,00% n=0	0,00% n=0	1,75% n=1	
	75,44% n=43				1,75% n=1			

4.2.2. Distribuição por idade dos bovinos com *Fasciola* spp.

Para a elaboração do Gráfico 4 foram considerados dois grupos: os animais com *Fasciola* spp. e os animais sem o parasita. Da análise desse mesmo gráfico verifica-se que existe uma maior percentagem de animais infetados a partir dos 24 meses de idade. Em relação aos animais sem o parasita, esse facto também se verifica, uma vez que foi a faixa etária em que foram abatidos mais bovinos. De referir que nos animais com idade superior a 24 meses, ao relacionarmos ambos os grupos (parasitados e não parasitados), observou-se que os animais com *Fasciola* spp. apresentavam percentagem superior em relação aos não parasitados.

No estudo de Gavião (2013), o autor identificou uma maior percentagem de *Fasciola* spp. em animais entre os 24 e 72 meses de idade (52%) referindo ser o resultado esperado, uma vez que foi a faixa etária com maior número de animais abatidos. Na presente análise foi identificada uma maior percentagem de infeção em animais com idade superior a 72 meses (77,19%), sendo que também foi a faixa etária com maior número de bovinos abatidos (48,45%).

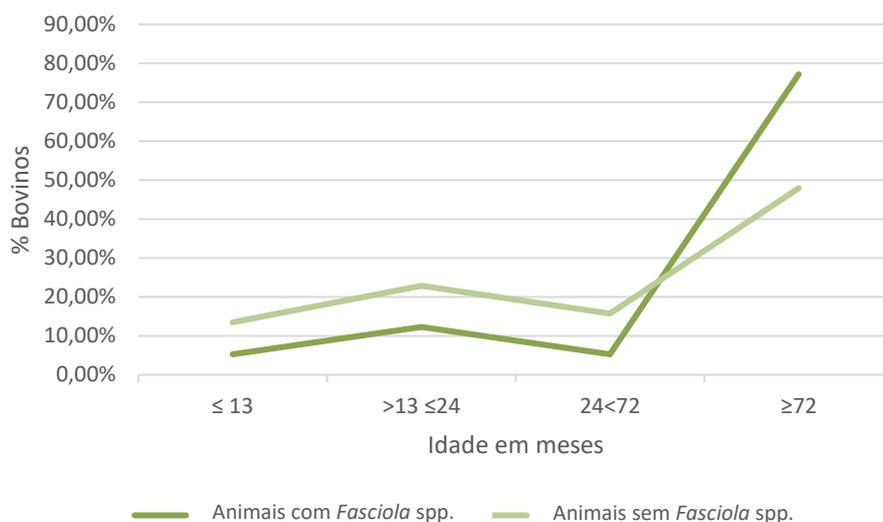


Gráfico 4 - Percentagem de bovinos sem *Fasciola* spp. e da % de bovinos com *Fasciola* spp. por idades em meses (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).

Segundo Yildirim *et al.* (2007), na análise de outros estudos, a prevalência de *Fasciola hepatica* era superior em animais com mais de dois anos de idade. Estes autores justificam a maior incidência em bovinos mais velhos pelo pastoreio mais frequente de pastagens, aumentando assim a possibilidade de ingestão de metacercárias. Também Sánchez-Andrade *et al.* (2002) referem que animais com idades iguais e inferiores a dois anos pastoreiam menos frequentemente do que os animais mais velhos, reduzindo a possibilidade de infeção por *Fasciola hepatica*.

Tanto os resultados da presente análise como os citados por (Gavião 2013) estão de acordo com estas observações.

4.2.3. Distribuição por género dos bovinos com *Fasciola* spp.

Para a elaboração do Gráfico 5 foram considerados dois grupos: os animais com *Fasciola* spp. e os animais sem o parasita. No grupo de animais que não apresentavam *Fasciola* spp. (n=3219), 77,35% eram fêmeas e 22,62% eram machos e entre animais que estavam infetados (n=57), 85,96% eram fêmeas e 14,04% eram machos. A proporção de fêmeas parasitadas com *Fasciola* sp. é ligeiramente superior à proporção de fêmeas não parasitadas.

Dos 3276 bovinos abatidos, apenas 22,50% eram machos. O facto de o número de machos na amostra ser reduzido pode justificar a proposição anterior, uma vez que a probabilidade de encontrar animais infetados diminui.

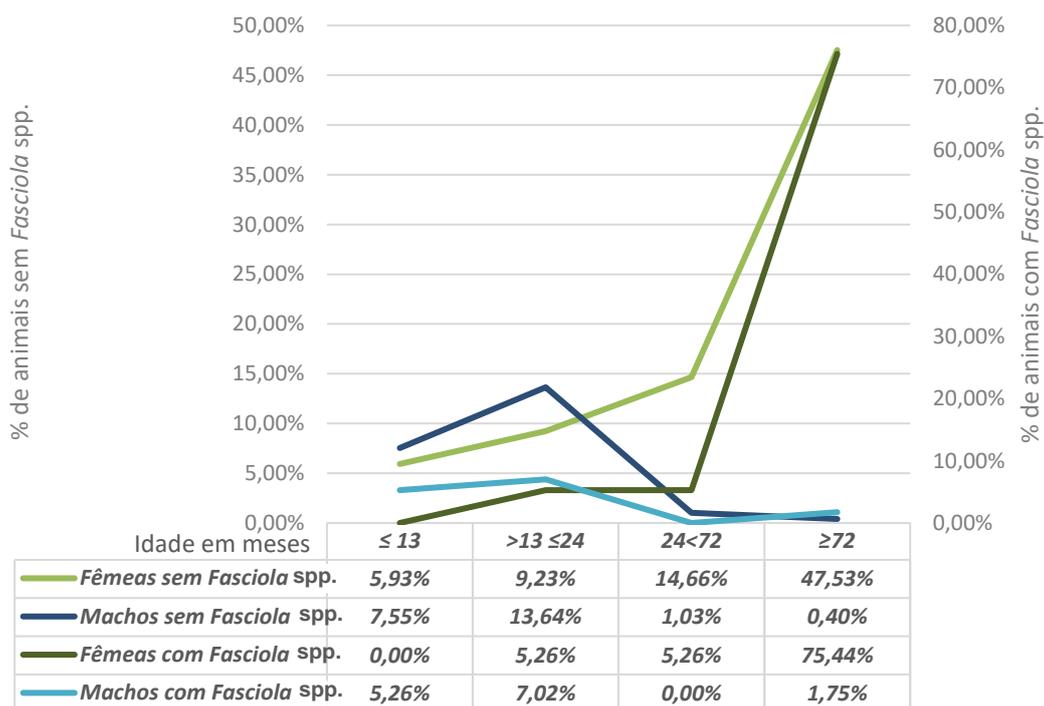


Gráfico 5 - Percentagem de machos e fêmeas nos bovinos sem e com *Fasciola* spp. (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).

É referido por Yildirim *et al.* (2007), que diferentes estudos exibem resultados contraditórios relativamente à prevalência de *Fasciola* spp. consoante o género dos animais. Há os que referem não haver diferenças significativas entre géneros e outros que consideram existir prevalências significativamente maiores nas fêmeas. No mesmo estudo citado, houve uma prevalência de *Fasciola hepatica* significativamente maior em fêmeas do que em machos e essa observação é por eles justificada pelo facto de a maioria das fêmeas serem selecionadas para reprodução e produção de leite e sendo os machos abatidos mais precocemente. A proposição anterior é confirmada no Gráfico 5, onde se verifica que há uma maior percentagem de machos que são abatidos até aos 24 meses de idade. Em antítese, há uma maior percentagem de fêmeas a serem abatidas com idade superior a 72 meses.

Da análise do Gráfico 5 também se observa que dentro do grupo de bovinos com *Fasciola* spp. até aos 24 meses há uma maior percentagem de machos com *Fasciola* spp. em relação às fêmeas. A partir dos 24 meses, ocorre a situação oposta, ou seja, há uma maior percentagem de fêmeas com *Fasciola* spp. em relação aos machos. Tal observação vem reforçar a ideia de Yildirim *et al.*, (2007) referida anteriormente.

Tendo em conta o Gráfico 6 que representa a frequência de bovinos com e sem *Fasciola* spp. em relação ao número total de machos e fêmeas abatidos, verificamos que as proposições anteriores se mantêm, à exceção do grupo de machos com idade superior ou igual a 72 meses. Contudo, nessa classe apenas foram abatidos catorze machos e apenas um estava parasitado.

Não tendo em conta a idade dos animais e considerando apenas o número total de fêmeas e machos abatidos e os que estavam parasitados, verifica-se que a frequência de *Fasciola* spp. em fêmeas é de 1,93% (49/2539) e em machos é de 1,09% (8/736), continuando assim a infeção a ser superior em fêmeas, como é referido pelos autores citados.

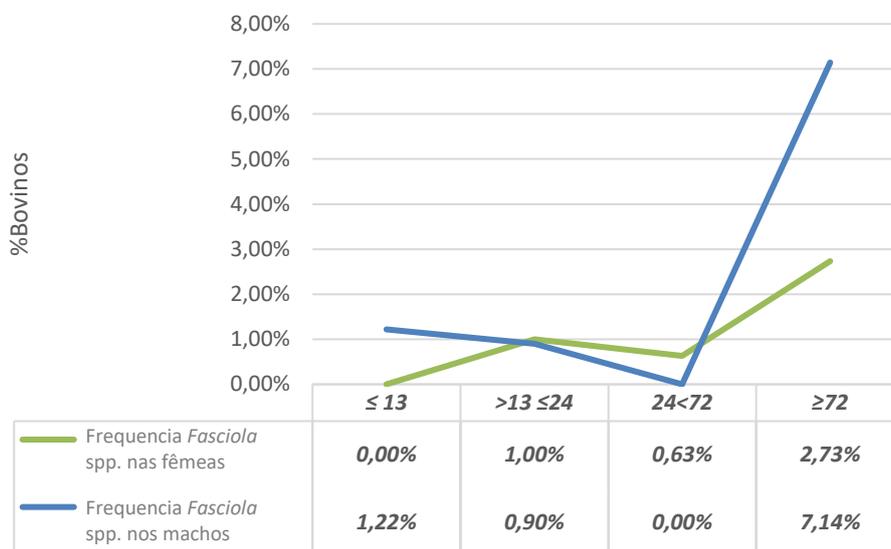


Gráfico 6 - Frequência de bovinos com e sem *Fasciola* sp. em relação ao número total de machos e fêmeas abatidos (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).

4.2.4. Relação do número de exemplares de *Fasciola* spp. com a idade e o peso

No Gráfico 7 estão representados o número de exemplares de *Fasciola* spp. que constituíam as infra-populações de cada bovino, por ordem crescente de idades (Anexo 2).

Apesar do reduzido número de amostras de bovinos com idade inferior a 13 meses, estes e os animais com idade superior a 65 meses apresentaram maior número de parasitas que os bovinos com idades compreendidas entre os 13 e os 65 meses de idade.

De acordo com Day & Schultz (2011), na maioria das espécies, a imunidade não está totalmente desenvolvida até aos doze meses de idade. Segundo os autores, há um declínio da função imunológica com o aumento da idade, alteração fisiológica considerada normal em animais mais velhos (imunossenescência). Deste modo, a possibilidade de animais mais novos e mais velhos apresentarem debilidades no sistema imunitário, pode justificar infeções mais intensas (maior número de exemplares de *Fasciola* spp.) nessas classes etárias.

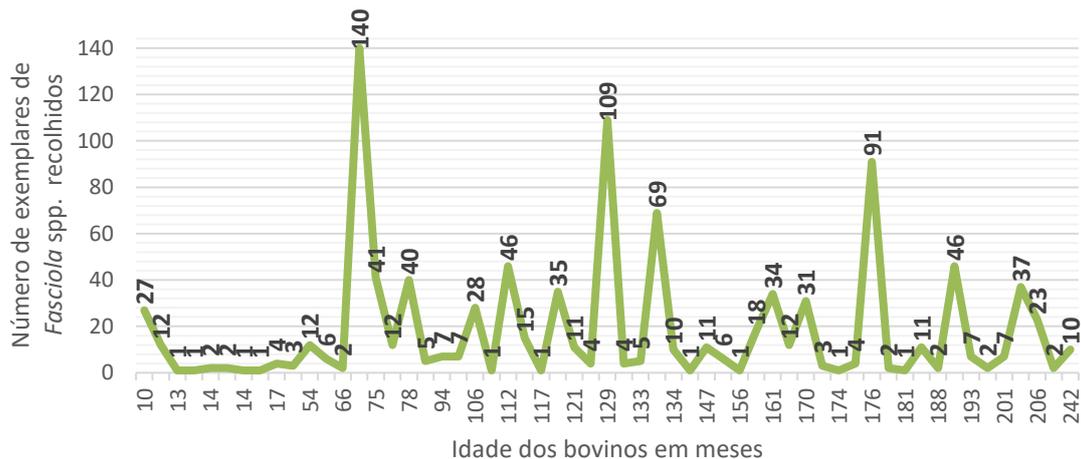


Gráfico 7 - Número de exemplares colhidos em cada bovino em função da idade. (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja)

No Gráfico 8 está representada a relação entre a idade, o peso da carcaça e o número de exemplares de *Fasciola* spp. colhidos em cada bovino (Anexo 2). A análise destes valores não demonstrou haver uma relação direta entre o peso da carcaça e a intensidade da infeção (número de parasitas colhidos). Contudo, nos animais nos quais foi colhido um maior número de exemplares, identifica-se uma ligeira redução no peso da carcaça (que também ocorre noutros animais representados), não se podendo, deste modo, atribuir como causa direta o nível de infeção por *Fasciola* spp..

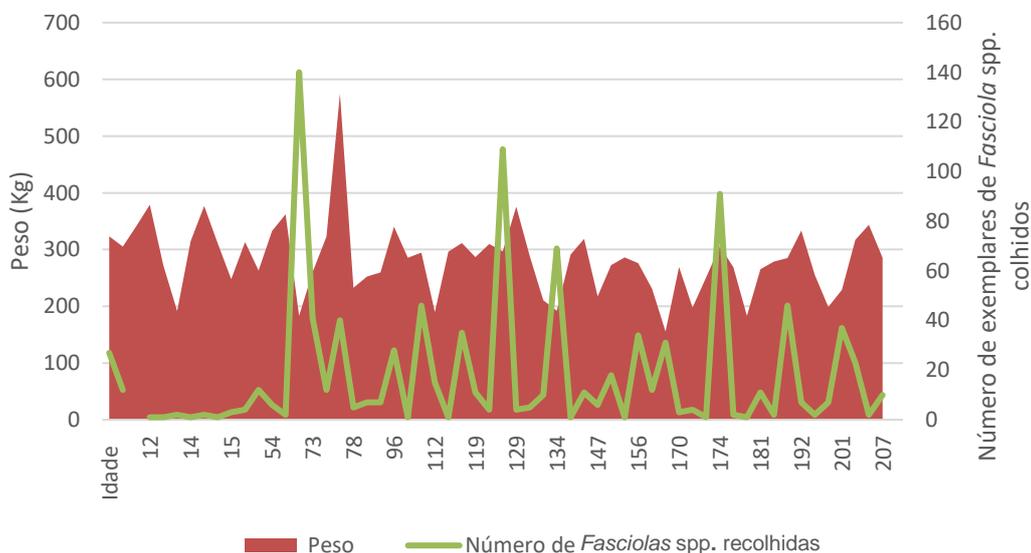


Gráfico 8 – Relação entre a idade (em meses) dos bovinos infetados com *Fasciola* spp. com o peso da carcaça (em Kg) e o número de exemplares de *Fasciola* sp colhidos de cada bovino. (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja)

4.2.5. Influência da infecção por *Fasciola* spp. na classificação das carcaças

As carcaças são classificadas segundo o disposto no *Artigo 10º, Secção 1, Parte II, Regulamento (UE) N. o 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de Dezembro de 2013*. Em função da idade do animal são classificadas em:

- Z → Carcaças de animais de idade igual ou superior a oito meses, mas inferior a doze meses;
- A → Carcaças de animais machos não castrados de idade igual ou superior a 12 meses, mas inferior a 24 meses;
- B → Carcaças de animais machos não castrados de idade igual ou superior a 24 meses;
- C → Carcaças de animais machos castrados de idade igual ou superior a 12 meses;
- D → Carcaças de fêmeas que tenham parido;
- E → Carcaças de outras fêmeas de idade igual ou superior a 12 meses.

São depois classificadas de acordo com a sua conformação, sendo avaliado o desenvolvimento dos perfis da carcaça, especialmente da coxa, dorso e pá. As classes dividem-se em S, E, U, R, O e P que corresponde respetivamente a superior, excelente, muito boa, boa, média e fraca. Relativamente ao desenvolvimento da camada de gordura, a classificação é baseada na quantidade de gordura no exterior e no interior da carcaça e são utilizados números inteiros entre um e cinco, em que o um corresponde a uma camada de gordura fraca e o cinco a uma camada de gordura muito forte.

No Gráfico 9 apenas foram colocadas as classificações de carcaças que foram mais utilizadas. Da análise do mesmo verifica-se que não existe oscilação na classificação dos animais infetados com *Fasciola* spp. e dos animais não infetados.

Destacam-se apenas duas categorias, DO 2 (fêmeas paridas, com conformação média e com uma camada adiposa leve) e DR 3 (fêmeas paridas, com conformação boa e com uma camada adiposa média) em que 45,62% dos animais com *Fasciola* spp. foram classificados contrastando com 23,70% nos animais sem o parasita.

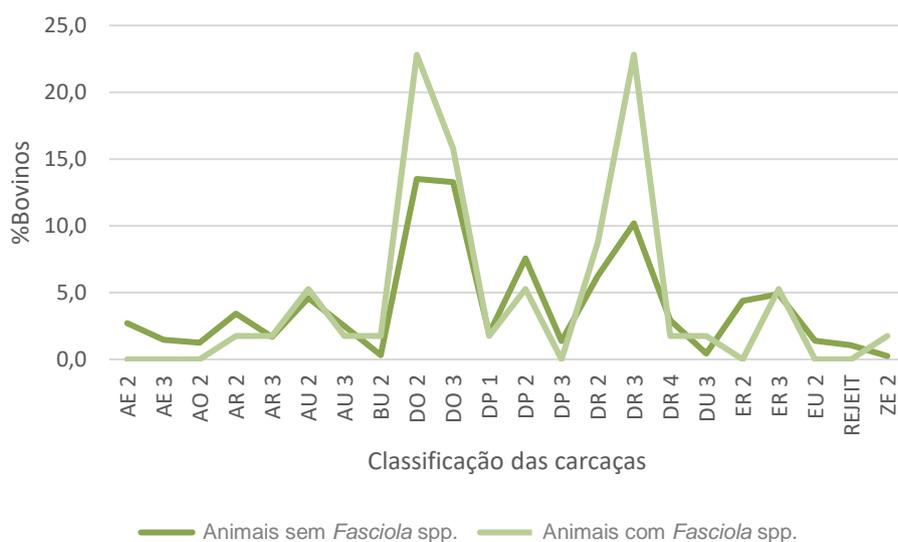


Gráfico 9 - Comparação entre a classificação das carcaças dos bovinos infetados com *Fasciola* spp. e dos bovinos sem a presença do parasita. (Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja)

Tabela 10 – Classificação das carcaças dos animais parasitados e não parasitados(Original, dados da Inspeção Sanitária do matadouro de Beja).

Classificação	Animais sem <i>Fasciola</i> spp.	Animais com <i>Fasciola</i> spp.
AE 2	87	0
AE 3	47	0
AO 2	40	0
AR 2	110	1
AR 3	54	1
AU 2	148	3
AU 3	80	1
BU 2	10	1
DO 2	435	13
DO 3	427	9
DP 1	62	1
DP 2	243	3
DP 3	44	0
DR 2	202	5
DR 3	328	13
DR 4	94	1
DU 3	14	1
ER 2	141	0
ER 3	157	3
EU 2	45	0
REJEIT	34	0
ZE 2	8	1
Total	2810/3219	57/57

4.2.6. Custos diretos da reprovação dos fígados

Os fígados dos animais com *Fasciola* spp. são reprovados, havendo assim um prejuízo económico inerente. Para calcular o prejuízo direto da reprovação dos fígados considerou-se o preço de venda dos fígados em dois talhos diferentes e o referido por Gavião (2013) foi que o valor médio obtido foi de 5,62€ por Kg. Para o cálculo do prejuízo total referente à reprovação dos fígados utilizou-se o peso médio de 5,3 Kg referido por Gavião (2013).

Tendo em conta que durante o período de estudo foram rejeitados 57 fígados devido a *Fasciola* spp. e considerando o peso por fígado de 5,3 Kg faz-se a seguinte estimativa:

$$57 \times 5,3 \times 5,62 = 1697,80\text{€}$$

O prejuízo estimado pela reprovação de 57 fígados é de 1697,80€.

4.3. Morfometria

Na apresentação dos resultados morfométricos, será feito um estudo comparativo, onde serão usados valores de diferentes populações de *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* e de híbridos. São usadas como referência estas populações, tendo em conta as características morfométricas dos exemplares colhidos. Excluiu-se a hipótese de ser *Fasciola magna*, uma vez que a forma e estrutura não eram compatíveis com esta espécie. Os parasitas adultos, tanto de *Fasciola hepatica* como de *Fasciola gigantica*, são planos e têm o corpo em forma de folha, ao contrário da *Fasciola magna* cujo corpo é oval, espesso e de tamanho superior às anteriores.

4.3.1. Fundamentação para o estudo morfométrico

As espécies *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica* foram tradicionalmente classificadas com base nas suas características morfológicas, sendo a forma e o tamanho do corpo dos adultos as principais diferenças.

A espécie *Fasciola hepatica* é mais curta, mais larga, tem um cone cefálico relativamente curto e distinto, que lhe confere uma aparência de ombros largos e definidos. A espécie *Fasciola gigantica* é comprida, mais estreita e tem um cone cefálico menos proeminente que lhe confere uma aparência de ombros menos definidos (Hendrix & Robinson, 2012; Shaldoum *et al.*, 2015). A extremidade posterior de *Fasciola gigantica* fica mais estreita no seu limite, enquanto que a *Fasciola hepatica* apresenta uma forma semelhante a um V (Periago *et al.*, 2006).

Têm sido utilizados estudos morfométricos, utilizando um sistema de análise de imagem de computador (CIAS), para distinguir fenotipicamente espécimes adultos de *Fasciola* spp., tendo por base medidas padronizadas úteis para a diferenciação das espécies, o crescimento alométrico, a influência das espécies de hospedeiros definitivos e a distribuição geográfica (Valero, Panova & Mas-Coma, 2005; Ashrafi *et al.*, 2006; Periago *et al.*, 2006, 2008; Ahasan *et al.*, 2016).

São considerados como valores de referência, por Ahasan *et al.* (2016) e por outros autores, os resultados do estudo morfométrico de Periago *et al.* (2006), obtidos com as populações de *Fasciola hepatica* de Espanha e da Córsega e da população de *Fasciola gigantica* do Burkina Faso. As populações de *Fasciola* spp. provenientes das referidas localizações geográficas foram consideradas pelos autores como «puras», tendo em conta que nessas áreas não coexistiam ambas as espécies.

São várias as medidas padronizadas utilizadas nos estudos morfométricos com recurso à análise de computador (CIAS). Foi verificado por Periago *et al.* (2006), que as medidas de alguns parâmetros, quando comparadas entre as populações consideradas «puras», não se sobrepunham, sendo por isso consideradas úteis na distinção entre indivíduos de ambas as espécies, como é o caso da distância entre a ventosa ventral e a parte posterior do corpo. No entanto, é de referir que esta medida, em determinadas situações, nomeadamente em

espécimes adultos de *Fasciola gigantica*, cujo útero tenha poucos ovos, pode sobrepor-se aos valores mais elevados atribuídos a exemplares adultos, mais velhos e gravídicos de *Fasciola hepatica* (Periago *et al.*, 2006).

Seguindo o mesmo princípio da não sobreposição de valores, os intervalos de valores para a medida do comprimento do corpo também foram considerados úteis para a diferenciação entre as espécies de *Fasciola gigantica*, com medidas de 31,73mm a 52,29mm, e *Fasciola hepática*, com 12,22mm a 29,00mm (Periago *et al.*, 2006). Também a razão entre a largura máxima dos ombros e o comprimento do corpo foi considerado um parâmetro útil na distinção entre ambas as espécies por Periago *et al.* (2008).

Os exemplares de *Fasciola* sp. do Bangladesh foram caracterizados por Ahasan *et al.* (2016) e, de acordo com as características biométricas determinadas, provaram que estas se encontram entre as populações padrão de *Fasciola hepatica* e de *Fasciola gigantica*, apontando para a presença de fenótipos de formas intermediárias.

As diferenças morfométricas em exemplares de *Fasciola* spp. de diferentes hospedeiros do Egito foram estudadas por Shaldoum *et al.* (2015), que utilizaram doze parâmetros diferentes considerados adequados para a diferenciação entre espécies. Analisando as características morfométricas encontradas, com o teste de análise de variância ANOVA, Shaldoum *et al.* (2015) demonstraram que as diferenças nos parâmetros: comprimento e largura do corpo, comprimento e largura do cone, distância entre a ventosa ventral e a extremidade posterior do corpo, diâmetro máximo da ventosa oral, diâmetro mínimo da ventosa ventral e a razão entre o comprimento do corpo e a largura do corpo, tanto de *Fasciola gigantica* como de *Fasciola hepatica* dos diferentes hospedeiros foram estatisticamente significativos ($P < 0,05$). Deste modo demonstrou que estes parâmetros podem ser usados para o diagnóstico diferencial das duas espécies.

Contudo no que se refere à caracterização morfométrica através de medidas microscópicas tradicionais simples, Valero *et al.* (2001) consideram que tais parâmetros podem ser insuficientes para a identificação à espécie de *Fasciola* spp., dada a grande variabilidade nas características morfológicas, influenciada por exemplo, pela origem geográfica ou pela existência de formas híbridas. Assim, as técnicas de Biologia Molecular com base na análise do ácido desoxirribonucleico (ADN), através da sua amplificação e sequenciação, têm vindo, cada vez mais, a constituir uma ferramenta na caracterização genética, permitindo a identificação de exemplares ao nível da espécie (Itagaki, 2005).

4.3.2. Estudo comparativo

No estudo comparativo foram apenas utilizados dados resultantes da análise de *Fasciola* spp. colhidas em bovinos, tendo em conta que a espécie do hospedeiro definitivo influencia o fenótipo das formas adultas e dos ovos, principalmente pelos diferentes tamanhos dos ductos hepáticos (Valero *et al.*, 2001; Ahasan *et al.*, 2016).

Como referido anteriormente, os valores de referência usados no estudo comparativo têm origem na análise de trabalhos de referência na área, assim:

→ Caracterização morfométrica realizada por Periago *et al.* (2006), de populações adultas de *Fasciola hepatica* com origem em Espanha e na Córsega e a população adulta de *Fasciola gigantica* natural do Burkina Faso. Os exemplares foram colhidos de fígados naturalmente infetados de animais abatidos em matadouros das referidas regiões.

A distinção entre ambas as espécies foi feita com base na origem geográfica de cada uma delas, uma vez que são zonas em que *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica* não coexistem.

Para o estudo comparativo são utilizados os intervalos de valores das seguintes populações: *Fasciola hepatica* de Espanha (Anexo 3 – I), *Fasciola hepatica* da Córsega (Anexo 3 – J) e *Fasciola gigantica* da Burkina Faso (Anexo 3 – O).

→ Caracterização morfométrica de populações de *Fasciola* sp. do Egito e do Irão realizada por Periago *et al.* (2008). Os exemplares foram colhidos de fígados naturalmente infetados de animais abatidos em matadouros das referidas regiões. Após a mensuração de um conjunto de parâmetros morfométricos, tanto os espécimes do Egito como os do Irão foram agrupados em *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* ou *Fasciola* sp., tendo em conta os seguintes critérios: esfericidade do corpo, razão entre o comprimento e a largura do corpo e a distância entre a ventosa ventral e a extremidade posterior do corpo.

Para o estudo comparativo são utilizados os intervalos de valores das seguintes populações: *Fasciola hepatica* do Irão (Anexo 3 – K), *Fasciola hepatica* do Egito (Anexo 3 – L), *Fasciola* sp. do Irão (Anexo 3 – M), *Fasciola* sp. do Egito (Anexo 3 – N), *Fasciola gigantica* do Irão (Anexo 3 – Q) e *Fasciola gigantica* do Egito (Anexo 3 – R).

→ Estudo morfométrico comparativo realizado por Ashrafi *et al.* (2006), entre as espécies de *Fasciola* sp. presentes no Irão e populações de *Fasciola hepatica* e de *Fasciola gigantica* de regiões geográficas onde ambas as espécies não coexistiam. Foi utilizada uma população de *Fasciola hepatica* da Bolívia e uma população de *Fasciola gigantica* da Burkina Faso. Todos os exemplares do estudo foram colhidos de fígados naturalmente infetados de animais abatidos em matadouros das referidas regiões. Contrariamente aos outros estudos, neste foram usados exemplares em todas as fases de desenvolvimento, contudo no Anexo 3 verificamos que os valores não diferem muito das outras populações de *Fasciola gigantica*.

Os critérios utilizados pelos autores para distinção entre *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica* do Irão foram a aparência geral do corpo e o comprimento do corpo.

Tendo em consideração os intervalos de valores referido por Ashrafi *et al.* (2006), para o presente estudo comparativo são usados como referência os dados das seguintes populações: *Fasciola hepatica*, Bolívia (Anexo 3 – H) e *Fasciola gigantica*, Burkina Faso (Anexo 3 – P).

Tendo em conta o Anexo 3, ou seja, os intervalos de referência dos parâmetros selecionados nas referidas populações, é realizada a análise comparativa (Anexo 4 a Anexo) das medidas obtidas nos exemplares de *Fasciola* spp. recolhidos no matadouro de Beja (Anexo 3 – G). Da análise dos Anexo 4 a Anexo , os valores determinados na população em estudo, distribuem-se uniformemente pelos intervalos de valores das populações de referência, na distância entre a ventosa ventral e a união das glândulas vitelinas e na largura máxima do corpo.

Contudo, a população em estudo distribui-se de forma irregular pelos valores de referência nos seguintes parâmetros: comprimento do corpo, distância entre a união das glândulas vitelinas e a extremidade posterior do corpo, distância entre a ventosa ventral e a extremidade posterior do corpo e razão entre a largura máxima do corpo e o seu comprimento. Tendo em conta o desvio padrão da população em estudo para os parâmetros referidos (Tabelas: Tabela 11, Tabela 12, Tabela 13, Tabela 14) e os das populações de referência (Anexo 3), podemos inferir que a população em estudo não é tão uniforme quanto as populações de referência.

Nos seus estudos, Ashrafi *et al.* (2006) e Periago *et al.* (2008) fizeram a distinção entre exemplares de diferentes espécies apenas com base na morfometria. Com base nos resultados dos referidos autores, foram criados dois grupos de acordo com os intervalos de valores de referência para a *Fasciola hepatica* ou para a *Fasciola gigantica*. Assim, com os exemplares do presente estudo foram formados dois grupos, A e B. Do grupo A fazem parte 51 exemplares, cujos parâmetros considerados se situam maioritariamente nos intervalos de referência para *Fasciola hepatica* (Anexo 4 a Anexo 5). O grupo B, com 28 exemplares, integra os exemplares cujos parâmetros maioritariamente se situam nos intervalos de referência para a *Fasciola gigantica* (Anexo 4 a Anexo 5). Quando a distribuição dos parâmetros não mostrou tendência para nenhuma das referidas espécies, não foram agrupadas. Dada a distribuição irregular da população em estudo, além do grupo A e B foi considerada a população total.

Agruparam-se os diferentes parâmetros de todas as populações de referência por espécie, apesar das diferenças entre populações da mesma espécie serem evidentes no Anexo 3 e nos desvios padrão nas tabelas Tabela 11, Tabela 12, Tabela 13 e Tabela 14.

Como referido anteriormente, os exemplares híbridos de *Fasciola* spp. foram classificados como *Fasciola* sp. Na apresentação e discussão dos resultados serão denominados também por híbridos.

Comprimento do corpo

No Gráfico 10 verificamos que o comprimento do corpo da maioria dos exemplares de *Fasciola* spp. colhidos no matadouro de Beja se situa no intervalo de valores das populações de híbridos (*Fasciola* sp.) e muito próximo da sua medida central. Cerca de metade da amostra em estudo tem valores correspondentes às populações de *Fasciola hepatica*, valores esses que se situam todos na metade superior da representação. Apenas os valores acima do terceiro percentil e o valor “outlier” correspondem aos valores do primeiro e segundo percentil do comprimento do corpo das populações de *Fasciola gigantica*.

O grupo A situa-se no intervalo de valores mais altos do comprimento do corpo das populações de *Fasciola hepatica* e nos menores das populações de híbridos. Já o grupo B distribui-se pelos valores mais elevados das populações híbridas e pelos menores das populações de *Fasciola gigantica*.

Tabela 11 – Valores referentes ao comprimento do corpo (mm) dos exemplares de *Fasciola* spp. colhidos no matadouro de Beja, do Grupo A, do Grupo B e das populações de *Fasciola hepatica*, *Fasciola* sp., e *Fasciola gigantica*.

	Exemplares de <i>Fasciola</i> spp. colhidos no matadouro de Beja			Populações de <i>Fasciola hepatica</i>	Populações de formas intermédias de <i>Fasciola</i> sp.	Populações de <i>Fasciola gigantica</i>
	Total	Grupo A	Grupo B			
Máximo	37	29	37	30,02	45,4	62,39
Mínimo	20,5	20,5	30	11,47	21,46	28,82
M _d	28,5	26,5	32	20,45	31,36	39,62
\bar{x}	28,61	26,21	32	20,32	31,58	41,97
σ	3,27	2,03	1	6,61	8,12	9,94

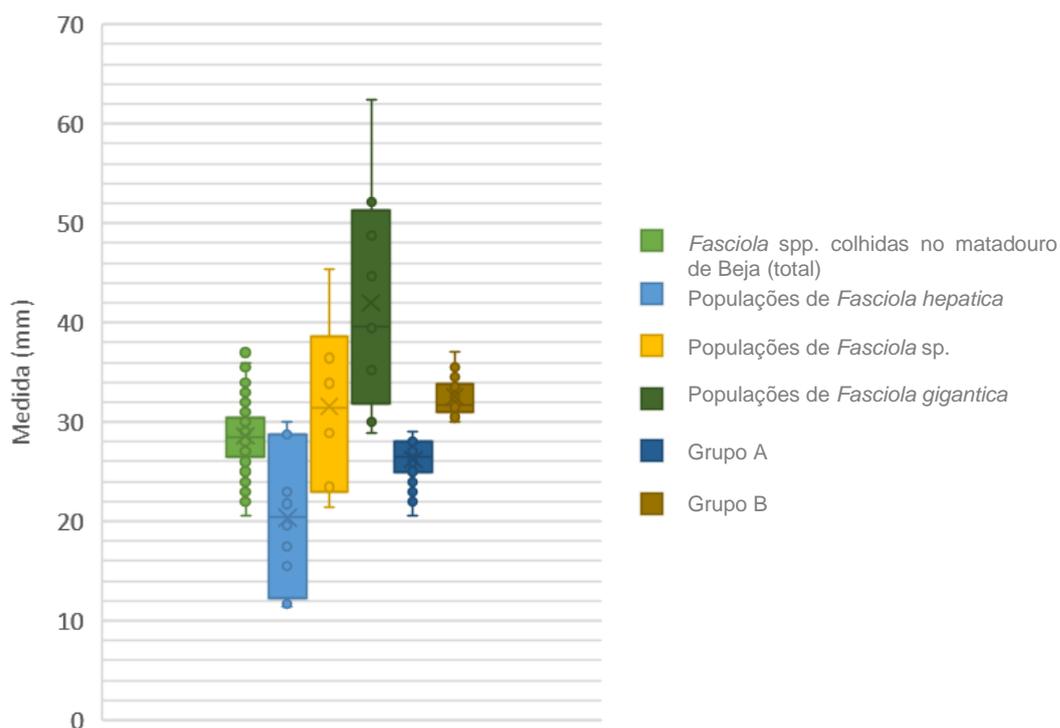


Gráfico 10 – Representação em diagrama de caixas do comprimento do corpo dos exemplares de *Fasciola* spp. colhidos no matadouro de Beja, do Grupo A, do Grupo B e das populações de *Fasciola hepatica*, *Fasciola* sp., e *Fasciola gigantica*.

Distância entre a união das glândulas vitelinas e a extremidade posterior do corpo

No Gráfico 11 verificamos que a distância entre a união das glândulas vitelinas e a extremidade posterior do corpo da maioria dos exemplares em estudo também se situa no intervalo de valores das populações de híbridos e com valores de mediana muito próximos. Apenas a primeira metade da amostra em estudo tem valores correspondentes às populações de *Fasciola hepatica*, com uma maioria a situar-se na metade superior da representação. Os valores acima do terceiro percentil e o valor “outlier” correspondem aos valores inferiores à mediana nas populações de *Fasciola gigantica*.

Como esperado, o grupo A situa-se próximo dos valores inferiores da representação da totalidade da amostra em estudo (valores máximos nas populações de *Fasciola hepatica* e inferiores nas populações de híbridos) e o grupo B junto dos valores superiores (valores superiores nas populações de híbridos e valores inferiores nas populações de *Fasciola gigantica*).

Tabela 12 - Valores referentes à distância entre a união das glândulas vitelinas e a extremidade posterior do corpo (mm) dos exemplares de *Fasciola* spp. colhidos no matadouro de Beja, do Grupo A, do Grupo B e das populações de *Fasciola hepatica*, *Fasciola* sp., e *Fasciola gigantica*.

	Exemplares de <i>Fasciola</i> spp. colhidos no matadouro de Beja			Populações de <i>Fasciola hepatica</i>	Populações de formas intermédias de <i>Fasciola</i> sp.	Populações de <i>Fasciola gigantica</i>
	Total	Grupo A	Grupo B			
Máximo	13,5	11	13,5	12,02	15,01	25,46
Mínimo	4,5	4,5	7	2,45	5,26	8,18
M _d	8,5	7	10,25	5,64	9,29	13,88
\bar{x}	8,36	7,15	10,25	5,98	9,46	14,85
σ	1,81	1,43	0,75	2,94	3,52	5,35

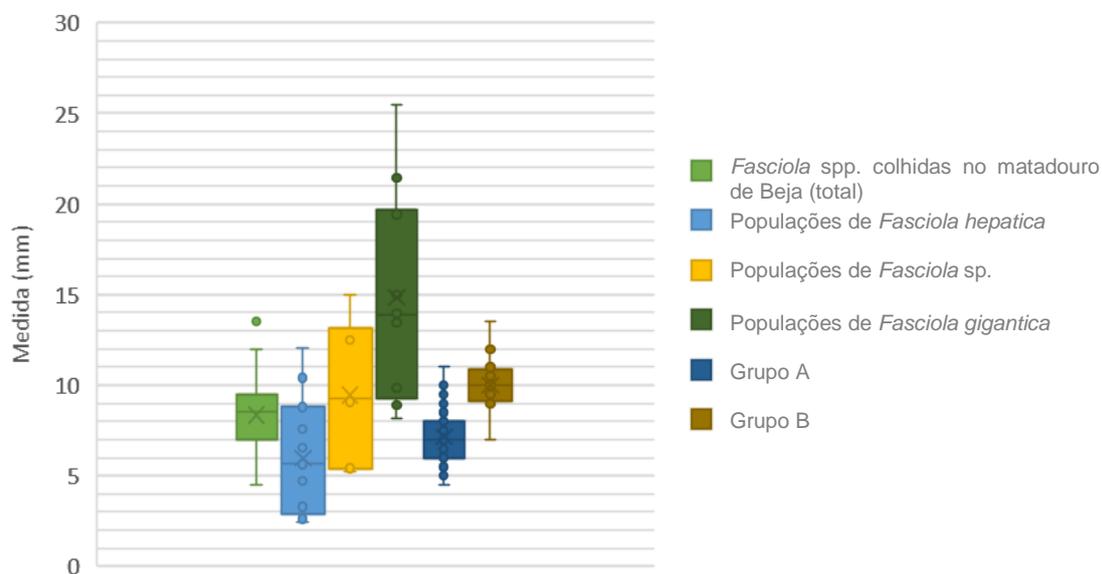


Gráfico 11 - Representação em diagrama de caixas da distância entre a união das glândulas vitelinas e a extremidade posterior do corpo dos exemplares de *Fasciola* spp. colhidos no matadouro de Beja, do Grupo A, do Grupo B e das populações de *Fasciola hepatica*, *Fasciola* sp., e *Fasciola gigantica*.

Distância entre a ventosa ventral e a extremidade posterior do corpo

No Gráfico 12 verificamos que a distância entre a ventosa ventral e a extremidade posterior do corpo na maioria dos exemplares em estudo, situa-se entre o segundo percentil e a mediana nas populações de híbridos. Apenas a primeira metade da amostra em estudo tem valores correspondentes às populações de *Fasciola hepatica*, sendo que os valores acima do segundo percentil e abaixo da mediana estão todos concentrados abaixo, e muito próximos do terceiro percentil. Os valores acima do terceiro percentil correspondem aos valores inferiores à mediana nas populações de *Fasciola gigantica*.

O grupo A tem distribuição acima da mediana das populações de *Fasciola hepatica* e abaixo da mediana das populações de híbridos enquanto a distância entre a ventosa ventral e a extremidade posterior do corpo do grupo B tem distribuição junto à mediana das populações híbridas e em redor dos valores do primeiro percentil das populações de *Fasciola gigantica*.

Tabela 13 - Valores referentes à distância entre a ventosa ventral e a extremidade posterior do corpo (mm) dos exemplares de *Fasciola* spp. colhidos no matadouro de Beja, do Grupo A, do Grupo B e nas populações de *Fasciola hepatica*, *Fasciola* sp., e *Fasciola gigantica*.

	Exemplares de <i>Fasciola</i> spp. colhidos no matadouro de Beja			Populações de <i>Fasciola hepatica</i>	Populações de formas intermédias de <i>Fasciola</i> sp.	Populações de <i>Fasciola gigantica</i>
	Total	Grupo A	Grupo B			
Máximo	32	25,5	32	25,08	41,11	54,49
Mínimo	17	17	26	8,54	18,81	26,28
M _d	24,5	22,5	28,5	17,32	27,23	35,99
\bar{x}	24,88	22,56	28,5	17,50	27,71	37,93
σ	3,12	1,95	1	5,93	7,59	9,35

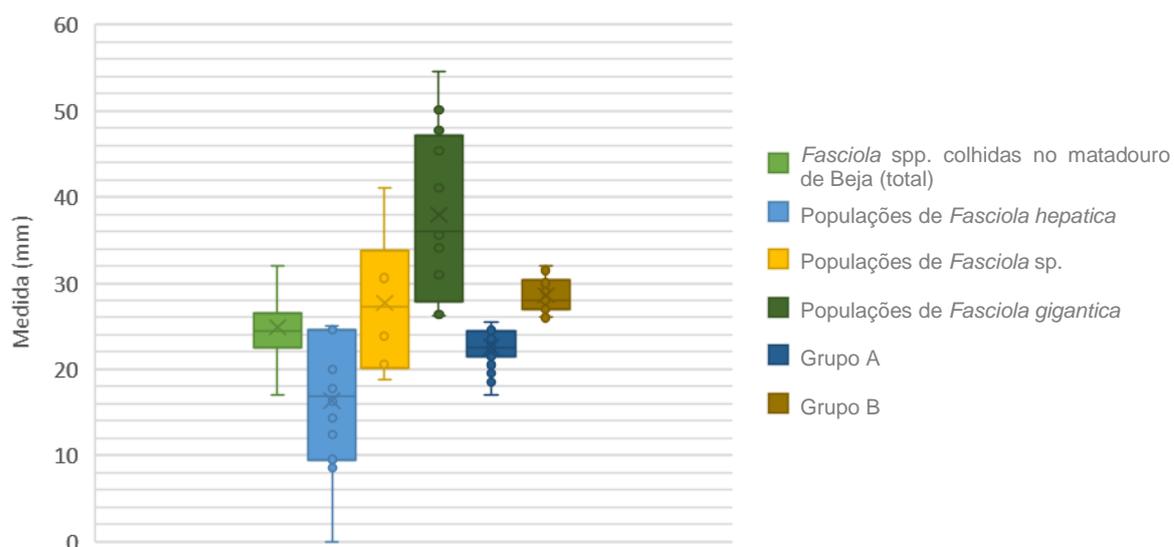


Gráfico 12 - Representação em diagrama de caixas da distância entre a ventosa ventral e a extremidade posterior do corpo dos exemplares de *Fasciola* spp. colhidos no matadouro de Beja, do Grupo A, do Grupo B e das populações de *Fasciola hepatica*, *Fasciola* sp., e *Fasciola gigantica*.

Razão entre a largura máxima do corpo e o seu comprimento

No Gráfico 13 verificamos que a razão entre a largura máxima do corpo e o seu comprimento na maioria dos exemplares em estudo se situa acima da mediana nas populações de *Fasciola hepatica*, tendo o terceiro percentil em ambas as populações valores muito próximos. Os valores da população em estudo também correspondem ao intervalo de valores das populações de

híbridos, mas situam-se essencialmente abaixo da mediana. Apenas os valores “outliers” correspondem a valores acima do segundo percentil nas populações de *Fasciola gigantica*.

Tanto as medições do grupo A como do grupo B se situam no intervalo de valores de referência para as populações de *Fasciola hepatica* e para as populações de híbridos.

Tabela 14 - Valores referentes à razão entre a largura máxima do corpo e o seu comprimento dos exemplares de *Fasciola* spp. colhidos no matadouro de Beja, do Grupo A, do Grupo B e nas populações de *Fasciola hepatica*, *Fasciola* sp., e *Fasciola gigantica*.

	Exemplares de <i>Fasciola</i> spp. colhidos no matadouro de Beja			Populações de <i>Fasciola hepatica</i>	Populações de formas intermédias de <i>Fasciola</i> sp.	Populações de <i>Fasciola gigantica</i>
	Total	Grupo A	Grupo B			
Máximo	3,74	3,29	3,74	3,08	6,33	8,41
Mínimo	1,95	1,95	2,07	1,29	1,86	3,20
M _d	2,43	2,38	2,62	2,24	2,99	4,59
\bar{x}	2,53	2,45	2,62	2,14	3,45	4,97
σ	0,35	0,30	0,14	0,58	1,44	1,49

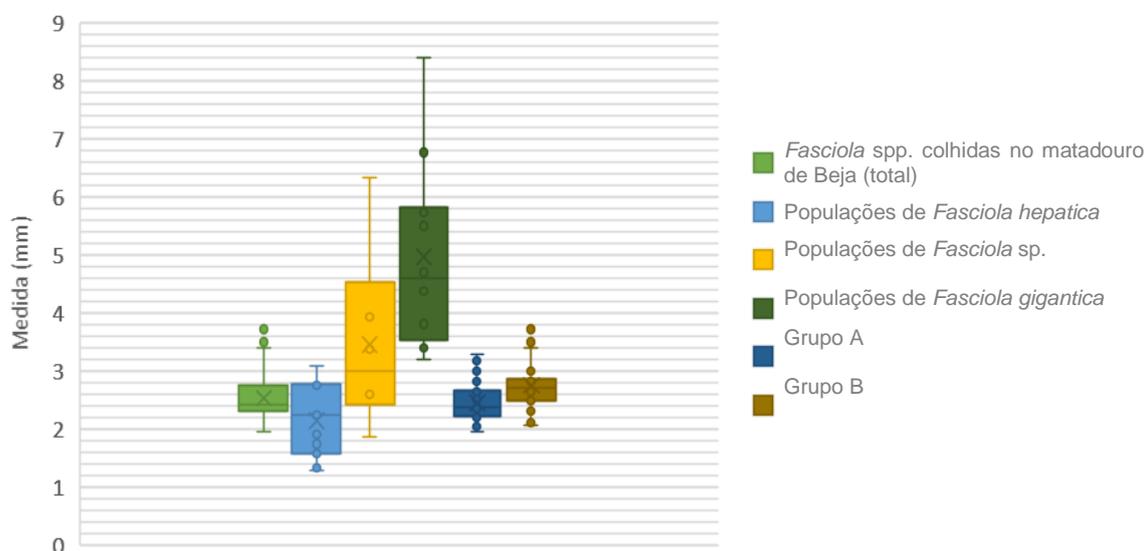


Gráfico 13 - Representação em diagrama de caixas da razão entre a largura máxima do corpo e o seu comprimento dos exemplares de *Fasciola* spp. colhidos no matadouro de Beja, do Grupo A, do Grupo B e das populações de *Fasciola hepatica*, *Fasciola* sp., e *Fasciola gigantica*.

4.3.3. Discussão dos resultados e sua associação aos critérios de seleção dos exemplares

Da análise dos Anexo 4 a Anexo e dos gráficos de caixas apresentados, verificamos que todos os exemplares em estudo se enquadram no intervalo de valores das populações híbridas (*Fasciola* sp.) e metade (51 exemplares) tem medidas correspondentes aos valores de referência das populações de *Fasciola hepatica*. Apenas 28 exemplares têm valores que correspondam ao intervalo de valores das populações de *Fasciola gigantica*, sendo que, para a razão entre a largura máxima do corpo e o seu comprimento, apenas os valores “outliers” se situam nesse intervalo.

Dado que a distribuição geográfica das espécies de trematodas é determinada pela distribuição geográfica das espécies de hospedeiro intermediário adequadas, e que nas zonas de clima temperado (como Portugal) ocorre a presença de *Galba truncatula* e *Lymnaea rubiginosa*, é expectável encontrar-se o seu parasita associado, a *Fasciola hepatica* (Nyindo & Lukumbagire, 2015). Até ao momento não se encontram registos da presença de *Fasciola gigantica* ou de formas intermédias a oeste e no centro da Europa (Mas-Coma, Valero & Bargues, 2009).

De acordo com os resultados obtidos, poderemos estar perante uma população de *Fasciola hepatica* com valores acima dos exibidos nos estudos apresentados, podendo isso dever-se, por exemplo a uma influência geográfica, ou termos presente *Fasciola gigantica* e formas híbridas ou apenas a ocorrência de formas híbridas.

É revelada assim a necessidade de um estudo genético para tentar clarificar esta situação.

É referido por Shaldoum *et al.* (2015) que a fixação e montagem dos parasitas pode afetar alguns parâmetros. Apesar dos procedimentos terem seguido a metodologia dos artigos de referência, não descuroamos a possibilidade de poderem ter ocorrido algumas alterações decorrentes da manipulação durante as medições e do armazenamento em álcool a 70°. No entanto, a ocorrer algum viés dos citados, ocorreu de igual forma em todos os exemplares, o que não comprometerá os resultados apresentados.

Na Tabela 15 é possível interpretar os critérios de seleção dos exemplares em estudo (a azul) de acordo com o seu agrupamento ou não no grupo A ou no grupo B, estando assinalados na coluna “Categorização dos exemplares estudados”. Assinalados com H estão os exemplares cujas medidas se enquadram no intervalo de valores para *Fasciola hepatica* (grupo A) e com G os que se enquadram no intervalo de valores para *Fasciola gigantica* (grupo B).

A observação da Tabela 15 permite verificar que os exemplares de *Fasciola* spp. cujas medidas se enquadram no intervalo de valores das populações de *Fasciola gigantica* têm origem em alguns distritos contíguos sendo eles Viseu e Coimbra e Santarém, Portalegre e Évora (Figura 13).

Verifica-se que no mesmo animal foram colhidos exemplares que se enquadram nas medidas de referência para a *Fasciola hepatica* e outros que se enquadram nos valores das populações de *Fasciola gigantica*.

Não se regista uma redução no tamanho dos exemplares quando a carga parasitária é elevada, como se pode observar nos animais número 8, 22 e 23. Em animais mais novos (nº 5, 11 e 21) foram colhidos exemplares de *Fasciola* spp. com características morfométricas diversas.

Todos os distritos em que foram identificados exemplares com morfometria compatível com as populações de *Fasciola gigantica*, tiveram origem em diferentes produtores e localidades do mesmo distrito, à exceção do distrito de Viseu, onde foram registados exemplares compatíveis com as populações de *Fasciola gigantica* apenas numa localidade do distrito.

Tabela 15 – Relação entre os critérios de seleção dos exemplares em estudo (a azul) e a sua categorização em H - exemplares cujas medidas se enquadram no intervalo de valores para *Fasciola hepatica*; G - exemplares cujas medidas se enquadram no intervalo de valores para *Fasciola gigantica*.

Número de codificação do animal	Categorização dos exemplares estudados			Idade (meses)	Sexo	Distrito	Proprietário	Nº exemplares de <i>Fasciola</i> spp. colhidos por animal	% Animais Parasitados Animais abatidos		
3	--	H	H	H	134	Fêmea	Viseu (Castro d'Aire)	A	69	3/85	Mesmo distrito 2 localidades diferentes
22	G	G	--	G	73	Fêmea	Viseu	A	140		
2	H	H	H	H	170	Fêmea	Viseu	C	31		
1	G	H	G	H	192	Fêmea	Coimbra (Soure)	D	46	2/74	
12	--	H	H	--	113	Fêmea	Santarém (Chamusca)	F	15	2/9	Mesmo distrito 2 localidades diferentes
4	G	H	H	H	193	Fêmea	Santarém (Cartaxo)	G	7	1/6	
5	H	H	H	H	54	Fêmea	Portalegre	K	12	4/188	
6	G	--	H	H	134	Fêmea		K	10		
19	G	--	G	G	76	Fêmea		K	12		
9	H	H	H	H	167	Fêmea	Portalegre (Avis)	L	12	5/6	2 produtores diferentes na mesma localidade
10	G	--	--	G	242	Fêmea		L	10		
7	G	H	G	G	78	Macho	Portalegre (Avis)	M	40	2/5	
8	G	--	H	--	176	Fêmea		M	91		
14	--	--	--	--	206	Fêmea	Portalegre (Avis)	N	37	5/20 (com origem em 2 explorações com localizações diferentes)	
15	H	H	H	H	147	Fêmea		N	11		
16	G	--	G	G	206	Fêmea	Portalegre (Arronches)	N	23		
17	G	G	G	G	112	Fêmea		N	46		
18	H	H	G	G	156	Fêmea		N	18		
23	G	G	H	H	129	Fêmea	Évora (Arraiolos)	P	109	8/40	Mesmo distrito 2 localidades diferentes
24	--	--	--	G	75	Fêmea		P	41		
25	--	H	--	H	133	Fêmea		P	5		
11	H	--	H	H	12	Macho	Évora	R	12	4/33	
21	H	H	H	G	10	Macho		R	27		
13	H	H	H	H	201	Fêmea	Setúbal (Alcácer do Sal)	S	7	3/7	
20	H	H	H	H	96	Fêmea	Beja (Serpa)	X	7	6/6	



Figura 13 – Assinalado com ● os distritos de origem dos exemplares de *Fasciola* spp. cujas medidas se enquadram no intervalo de valores das populações de *Fasciola gigantica*

4.4. Análise genética

O transiluminador (Chemidoc, Bio-Rad) permitiu visualizar a corrida das amostras no gel de eletroforese confirmando o sucesso da reação de amplificação por “Polymerase Chain Reaction” (PCR). Uma vez confirmado o tamanho do produto de amplificação e a formação de uma única banda, recorreu-se a um kit comercial para a purificação das amostras (QIAquick PCR Purification, Qiagen) e após quantificação estas foram enviadas diretamente para sequenciação (NZYTech).

Com os resultados, foi feito um alinhamento exploratório para analisar uma região específica de apenas 550 pares de bases do gene 28S, para as poder comparar em conjunto com sequências parciais desta mesma região disponíveis nas bases de dados (NCBI: *Fasciola hepatica* AJ439738 (Valência, Espanha), AJ440788 (Bolívia); *Fasciola gigantica* AJ440786 (Egipto), AJ439739 (Cabo Verde)). Nesta região do gene nuclear 28S, estes exemplares diferem em quatro nucleótidos entre espécies, mantendo-se iguais dentro da espécie. Porém, três dos quatro exemplares enviados para sequenciação possuem três destes nucleótidos em comum com as sequências de *Fasciola hepatica*, mas possuem um nucleótido em comum com as sequências de *Fasciola gigantica* com as quais comparámos. As sequências terão de ser confirmadas e mais exemplares terão de ser processados e analisados antes de uma discussão

preliminar destes resultados, o que não foi possível fazer até ao prazo de entrega desta dissertação.

5. Conclusão

A frequência de *Fasciola* spp. em bovinos abatidos no matadouro de Beja no período do estudo foi de 1,74%.

Em ordem decrescente de quantidade de animais abatidos no matadouro, os distritos de Beja, Évora, Portalegre, Viseu, Setúbal e Santarém apresentaram frequências da infeção pelo parasita respetivamente de 0,80%, 1,79%, 3,51%, 2,72%, 1,67% e 2,37%, representando no seu conjunto 89% dos animais abatidos no matadouro e 93% dos animais com *Fasciola* spp.

A frequência de *Fasciola hepatica* foi superior em animais com mais de dois anos de idade, o que segundo Yildirim *et al.* (2007) ocorre porque os bovinos mais velhos pastoreiam mais frequentemente pastagens, aumentando assim a possibilidade de ingestão de metacercárias.

Os animais com a presença do parasita eram maioritariamente fêmeas, o que o mesmo autor justifica com o facto da maioria das fêmeas serem selecionadas para reprodução e produção de leite, sendo os machos abatidos mais precocemente, o que se constatou na nossa amostra.

Apesar do reduzido número de amostras de bovinos com idade inferior a 13 meses, estes e os animais com idade superior a 65 meses apresentaram maior número de parasitas que os bovinos com idades compreendidas entre os 13 e os 65 meses de idade. A possibilidade de animais mais novos e mais velhos apresentar debilidades no sistema imunitário, pode justificar infeções mais intensas (maior número de exemplares de *Fasciola* spp.) nessas classes etárias.

Não se encontrou uma relação direta entre o peso da carcaça e a intensidade da infeção (número de parasitas colhidos). Contudo, nos animais dos quais foram colhidos um grande número de exemplares, verificou-se uma ligeira diminuição do peso da carcaça.

Não se observou uma oscilação significativa na classificação das carcaças dos animais infetados com *Fasciola* spp. e dos animais não infetados, contudo destacam-se duas categorias, DO 2 (fêmeas paridas, com conformação média e com uma camada adiposa leve) e DR 3 (fêmeas paridas, com conformação boa e com uma camada adiposa média), em que 45,62% dos animais classificados nestas categorias se revelaram infetados com *Fasciola* spp., contrastando com 23,70% dos animais sem o parasita.

Houve produtores que enviaram poucos animais para abate, apresentando a maioria bovinos com *Fasciola* spp., o que leva a inferir que podem ser animais provenientes de zonas endémicas, animais não desparasitados ou em que houve uma falha generalizada na

desparasitação, como por exemplo, dose inadequada ou uso de um produto sem eficácia (por exemplo, por falha no armazenamento).

Quando verificamos que há produtores que enviaram um elevado número de bovinos para abate e apresentaram um número reduzido de animais com *Fasciola* spp. podemos suspeitar de uma falha pontual na desparasitação, contudo também é admissível ponderar a existência de possíveis casos de resistência ao anti-helmíntico utilizado.

A caracterização morfométrica, feita pela primeira vez a esta escala, revela diferenças entre os exemplares que recomendam a continuação de estudos para caracterização e classificação taxonómica das populações de *Fasciola* spp. presentes em Portugal.

Segundo Valero *et al.* (2001), a caracterização morfométrica pode ser insuficiente para a identificação da espécie de fasciola, uma vez que há grande variabilidade nas características morfológicas, nomeadamente pela influência geográfica e existência de formas híbridas. No caso da população em estudo, a caracterização morfométrica não se mostrou suficiente para identificação à espécie. Posto isto ou estamos perante uma população de *Fasciola hepatica* com valores acima dos exibidos nos estudos apresentados ou estamos perante a presença de *Fasciola gigantica* e a ocorrência de formas híbridas ou apenas a ocorrência de formas híbridas.

Três dos quatro exemplares enviados para sequenciação possuem três nucleótidos em comum com as sequências de *Fasciola hepática* e possuem um nucleótido em comum com as sequências de *Fasciola gigantica* com as quais comparámos. As sequências terão de ser confirmadas e mais exemplares terão de ser processados e analisados antes de uma discussão preliminar destes resultados, o que não foi possível fazer até ao prazo de entrega desta dissertação. É manifesta assim a necessidade em continuar com o estudo genético de modo a clarificar esta situação.

6. Perspetivas futuras

É objetivo continuar o estudo genético iniciado, investigando o possível até esclarecer os resultados apresentados no que concerne à identificação à espécie dos exemplares recolhidos. Dada a importância que tem vindo a adquirir a resistência de *Fasciola* spp. aos anti-helmínticos, torna-se necessário estudar essa possibilidade em Portugal, como contributo para a elaboração de planos de controlo. Nesse sentido, foram recolhidos ovos de *Fasciola* spp. adultas e conservaram-se no escuro a 4 °C, de modo a retardar o seu desenvolvimento. Com estes ovos pretende avaliar-se “in vitro” a eficácia da dose dos anti-helmínticos mais utilizados no controlo e tratamento em bovinos.

BIBLIOGRAFIA

Ahasan, Syed Ali, M. Adela Valero, Emdadul Haque Chowdhury, Mohammad Taohidul Islam, Mohammad Rafiqul Islam, Mohammad Motahar Hussain Mondal, Raquel V. Peixoto, Lavinia Berinde, Miroslava Panova, e Santiago Mas-Coma (2016) «CIAS detection of *Fasciola hepatica*/F. *gigantica* intermediate forms in bovines from Bangladesh». *Acta Parasitologica* 61 (2): 267–77. doi:10.1515/ap-2016-0037.

Alvarez-Sánchez, M a, R C Mainar-Jaime, J Pérez-García, e F a Rojo-Vázquez (2006) «Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain.» *The Veterinary record* 159 (13): 424–25. doi:10.1136/vr.159.13.424.

Arias, M., C. Lomba, V. Dacal, L. Vazquez, J. Pedreira, I. Francisco, P. Pineiro (2011) «Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and north-west Spain». *Veterinary Record* 168 (15): 408–408. doi:10.1136/vr.d85.

Regulamento (UE) N. o 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de Dezembro de 2013; Artigo 10o, Secção 1, Parte II, 2013. *Jornal Oficial da União Europeia*.

Ashrafi, K., M. A. Valero, M. Panova, M. V. Periago, J. Massoud, e S. Mas-Coma (2006) «Phenotypic analysis of adults of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* and intermediate forms from the endemic region of Gilan, Iran». *Parasitology International* 55 (4): 249–60. doi:10.1016/j.parint.2006.06.003.

Aspöck, H. (2016) *Encyclopedia of Parasitology*, 4a ed. Springer; Berlim, Alemanha, ISBN 978-3-5404-8994-8, pp. 524-1069

Bowman, Dwight D (2014) *Georgis' Parasitology For Veterinarians*. 10aed; Elsevier, St. Louis, Missouri, ISBN: 978-1-4557-4006-2pp. 122-130

Calretas, Susana, e Armando Carvalho (2003) «Seis casos de fasciolíase hepática». *Medicina* 10 (4): 185–92.

Caminade, Cyril, Jan van Dijk, Matthew Baylis, e Diana Williams (2015) «Modelling recent and future climatic suitability for fasciolosis in Europe». *Geospatial Health* 9 (2): 301–8. doi:10.4081/gh.2015.352.

Campillo, M. Cordero del, e F.A. Rojo Vázquez (2001) *Parasitología Veterinaria*, McGraw-Hill, Madrid, Espanha, ISBN: 84-486-0236-6, pp. 260-282

Carrada-bravo, Prof Teodoro (2003) «Fascioliasis. Diagnóstico, epidemiología y tratamientos». *Revista de gastroenterología de México* 68: 135–42.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2013. «Fascioliasis». Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/parasites/fasciola/epi.html>.

Dalton, J.P. (1999) «Fasciolosis» 1aed, CABI Publishing, Nova Iorque, USA, ISBN: 0-85199-260-9, pp.1-509

Dar, Y., P. Vignoles, G. Dreyfuss, e D. Rondelaud (2003) «*Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: Comparative morphometric studies on the redial stage of both species». *Parasitology Research* 91 (5): 369–73. doi:10.1007/s00436-003-0966-7.

Day, Michael J, e Ronald D Schultz (2011) «*Immunology Principles and Practice*» 1aed, Manson Publishing, Londres, Reino Unido, ISBN: 978-1-84076-143-6, pp. 181-189

Gavião, A (2013) «Impacto da Fasciolyse em Inspeção Higio-sanitária de Bovinos». Tese de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade de Trás os Montes e Alto Douro.

Goater, Timothy M.; Cameron P.; Goater, e W. Esch Gerald. (2014) «*Parasitism The Diversity and Ecology of Animal Parasites*» 2aed. University Press, Nova Iorque, EUA, ISBN 978-0-521-12205-4, pp. 124-133

Grácio, Maria Amélia, Isabel Mousinho, Ana Maria, Isabel Clemente, Pedro Ferreira, e Cátia Ferreira (2011) «Preliminary Survey of Animal Fascioliasis in Portuguese Abattoirs .» *Acta Parasitológica Portuguesa* 18 (July 2017): 25–28.

Hendrix, Charles M., e Ed Robinson (2012) «*Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians*» 4aed. Elsevier, St. Louis, EUA, ISBN: 978-0-323-07761-3, pp. 123-134

Kelley, Jane M., Timothy P. Elliott, Travis Beddoe, Glenn Anderson, Philip Skuce, e Terry W. Spithill (2016) «Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*», *Trends in Parasitology* 32 (6). Elsevier Ltd: 458–69. doi:10.1016/j.pt.2016.03.002.

Lamann, Gregory V. (2010) «*Veterinary Parasitology*» Vol. 2, Nova Science Publishers, Inc, Nova Iorque, USA, ISBN: 978-1-61122-550-1, capítulo XIII.

- Loker, Eric S., e Bruce V. Hofkin. (2015) «Parasitology: A conceptual approach» 1aed. Garlande Scienc, Nova Iorque, USA, ISBN 978-0-8153-4473-5, pp.9-342
- Mas-Coma, Santiago, María Adela Valero, e María Dolores Bargues (2009), Fasciola, Lymnaeids and Human Fascioliasis, with a Global Overview on Disease Transmission, Epidemiology, Evolutionary Genetics, Molecular Epidemiology and Control. in «Advances in Parasitology» volume 69, Rollinson, David; Iain Hay, Simon; Academic Press, Elsevier, Nova Iorque, USA, ISBN: 978-0-12-374795-2, pp.44.130
- Mas - Coma, M S, J G Esteban, e M D Bargues. (1999) «The traditional epidemiological picture of human fascioliasis has changed markedly in recent years, as outlined below.» Bulletin of the World Health Organization, 77 (4): 340–46.
- Medvet - Base de Dados de Medicamentos, Productos e Biocidas de uso Veterinário: <http://medvet.dgav.pt/> (Direção Geral de Alimentação e Veterinária)
- Mehlhorn, Heinz (2016) «Animal Parasites Diagnosis, Treatment, Prevention» 1aed., Springer, Cham, Suíça, ISBN: 78-3-319-46403-9, pp. 6, 265-269
- Nyindo, Mramba, e Abdul Hamid Lukumbagire (2015) «Fascioliasis: An Ongoing Zoonotic Trematode Infection». BioMed Research International 2015. doi:10.1155/2015/786195.
- Papich, Mark G; Riviere, Jim E.; (2009) «Veterinary pharmacology and therapeutics» 9aed. Wiley-Blackwell, Iowa, EUA, ISBN: 978-0-8138-2061-3, pp. 1101-1103
- Periago, M. V., M. A. Valero, M. Panova, e S. Mas-Coma (2006) «Phenotypic comparison of allopatric populations of Fasciola hepatica and Fasciola gigantica from European and African bovines using a computer image analysis system (CIAS)». Parasitology Research 99 (4): 368–78. doi:10.1007/s00436-006-0174-3.
- Periago, M. V., M. A. Valero, M. El Sayed, K. Ashrafi, A. El Wakeel, M. Y. Mohamed, M. Desquesnes, F. Curtale, e S. Mas-Coma (2008) «First phenotypic description of Fasciola hepatica/Fasciola gigantica intermediate forms from the human endemic area of the Nile Delta, Egypt». Infection, Genetics and Evolution 8 (1): 51–58. doi:10.1016/j.meegid.2007.10.001.
- Romero, Héctor Quiroz. (1990) «Parasitología» 1aed.; Editorial Limusa; Balderas, México; ISBN:968-18-1674-9; pp. 231-250

- Samuel, William M., Margo J. Pybus, e A. Alan Kocan (2001) «Parasitic Diseases of Wild Mammals» 2aed. State University Press, Iowa, USA, ISBN: 0-8138-2978-X, pp. 136-138
- Sánchez-Andrade, R., A. Paz-Silva, J. L. Suárez, R. Panadero, J. Pedreira, C. López, P. Díez-Baños, e P. Morrondo (2002) «Influence of age and breed on natural bovine fasciolosis in an endemic area (Galicia, NW Spain)». *Veterinary Research Communications* 26 (5): 361–70. doi:10.1023/A:1016290727793.
- Shaldoum, Fayez M, Alaa A Muhammad, Adham G Sadek, Mohamed K Yassin, Ali O Elmadawy, e M Gobaara (2015) «Advanced and classical diagnosis of *Fasciola* spp. in Egypt». *Journal of American Science* 11 (5): 111–20.
- Taylor, M.A., R.L. Coop, e R.L. Wall (2016) *Veterinary Parasitology*. Vol. 165, 4aed., Wiley-Blackwell, West Sussex, Reino Unido, ISBN 978-0-470-67162-7, pp. 75-79
- Tolan, Robert W (2011) «Fascioliasis Due to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* Infection: An Update on This 'Neglected' Neglected Tropical Disease». *LabMedicine* 42 (2): 107–16. doi:10.1309/LMLFBB8PW4SA0YJI.
- Urquhart, G M.; J Armour, J L Duncan, A M Dunn, e F W Jennings (1996) «*Veterinary Parasitology*» 2aed. Wiley-Blackwell., Oxford, Reino Unido, pp. 103-113
- Valero, M. Adela, N. Agustín Darce, Miroslava Panova, e Santiago Mas-Coma (2001) «Relationships between host species and morphometric patterns in *Fasciola hepatica* adults and eggs from the northern Bolivian Altiplano hyperendemic region». *Veterinary Parasitology* 102 (1–2): 85–100. doi:10.1016/S0304-4017(01)00499-X.
- Valero, M. Adela, Ignacio Perez-Crespo, M. Victoria Periago, Messaoud Khoubbane, e Santiago Mas-Coma (2009) «Fluke egg characteristics for the diagnosis of human and animal fascioliasis by *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*». *Acta Tropica* 111 (2): 150–59. doi:10.1016/j.actatropica.2009.04.005.
- Valero, María Adela, M Panova, e S. Mas-Coma (2005) «Phenotypic analysis of adults and eggs of *Fasciola hepatica* by computer image analysis system.» *Journal of helminthology* 79 (3): 217–25. doi:10.1079/JOH2005301.
- World Health Organization (2013) «Fascioliasis» in «A Statistical Update - Latest Data Available».

Yildirim, A, A Ica, O Duzlu, e A Inci (2007) «Prevalence and risk factors associated with *Fasciola hepatica* in cattle from Kayseri province , Turkey». *Revue de Médecine Vétérinaire* 158: 613–17

ANEXOS

Anexo 1 – Número de animais abatidos e número de exemplares de *Fasciola* spp. recolhidos por localidade e distrito.

Distrito	Localidade	Número total de animais abatidos	Número de animais com <i>Fasciola</i> spp.
Aveiro	Vouzela	1	
Beja	Ferreira do Alentejo	23	
Beja	Alvito	74	
Beja	Cuba	254	1
Beja	Moura	54	
Beja	Barrancos	58	
Beja	Aljustrel	18	
Beja	Beja	69	1
Beja	Serpa	56	5
Beja	Ourique	186	
Beja	Castro Verde	15	
Beja	Mértola	158	1
Beja	Almodôvar	11	
Beja	Odemira	24	
Bragança	Miranda do Douro	2	
Bragança	Mogadouro	7	
Castelo Branco	Penamacôr	14	
Castelo Branco	Idanha-a-Nova	18	
Castelo Branco	Castelo Branco	1	
Coimbra	Mira	4	
Coimbra	Cantanhede	8	
Coimbra	Figueira da Foz	37	
Coimbra	Montemor-o-Velho	1	
Coimbra	Soure	59	2
Évora	Mora	8	
Évora	Arraiolos	94	10
Évora	Estremoz	50	
Évora	Vila Viçosa	6	
Évora	Montemor-o-Novo	130	
Évora	Évora	140	4
Évora	Redondo	115	
Évora	Alentejo	9	
Évora	Viana do Alentejo	120	
Évora	Portel	128	1
Évora	Reguengos de Monsaraz	22	
Évora	Mourão	16	
Faro	Silves	10	1
Guarda	Figueira-de-Castelo-Rodrigo	6	
Guarda	Pinhel	2	

Guarda	Covilhã	6	
Guarda	Fundão	27	1
Leiria	Pombal	9	
Leiria	Leiria	12	
Leiria	Nazaré	2	
Leiria	Caldas da Rainha	26	
Lisboa	Torres Vedras	98	
Lisboa	Sobral de Monte Agraço	4	
Lisboa	Loures	7	
Portalegre	Castelo de Vide	26	
Portalegre	Crato	21	
Portalegre	Portalegre	195	5
Portalegre	Ponte de Sôr	31	
Portalegre	Alter do Chão	57	
Portalegre	Avis	26	9
Portalegre	Monforte	49	
Portalegre	Arronches	8	3
Portalegre	Elvas	72	
Santarém	Ferreira do Zezere	1	
Santarém	Chamusca	9	2
Santarém	Cartaxo	88	1
Santarém	Benavente	71	1
Setúbal	Montijo	6	
Setúbal	Moita	10	
Setúbal	Palmela	109	1
Setúbal	Alcácer do Sal	47	3
Setúbal	Grândola	32	
Setúbal	Santiago do Cacém	35	
Viseu	Cinfães	1	
Viseu	Tarouca	2	
Viseu	Moimenta da Beira	14	
Viseu	Castro d'Aire	87	3
Viseu	Vila Nova de Paiva	2	
Viseu	Oliveira de Frades	1	
Viseu	São Pedro do Sul	3	1
Viseu	Viseu	59	1
Viseu	Carregal do Sal	14	
Viseu	Santa Comba Dão	1	
Total		3276	57

Anexo 2 – Número total de animais parasitados e selecção das amostras para o estudo morfométrico.

Número de codificação do animal	Nr. Ordem	Idade (meses)	Sexo	Peso fr.	Classificação da carcaça	Local origem do animal	Distrito	Proprietário	Número de exemplares de <i>Fasciola</i> spp. colhidas por animal
24	xxx	75	Fêmea	260,48	DO 3	Arraiolos	Évora	P	41
	xxx	106	Fêmea	339,86	DR 3	Arraiolos	Évora	P	28
	xxx	117	Fêmea	296,35	DO 3	Arraiolos	Évora	P	1
	xxx	119	Fêmea	311,44	DR-3	Arraiolos	Évora	P	35
	xxx	122	Fêmea	309,48	DR 4	Arraiolos	Évora	P	4
23	xxx	129	Fêmea	296,74	DR-2	Arraiolos	Évora	P	109
	xxx	130	Fêmea	375,53	DR+3	Arraiolos	Évora	P	4
25	xxx	133	Fêmea	288,51	DR 3	Arraiolos	Évora	P	5
	xxx	66	Fêmea	362,2	DR 3	Avis	Portalegre	L	2
	xxx	148	Fêmea	217,56	DO+2	Avis	Portalegre	L	6
9	xxx	167	Fêmea	230,88	DO 2	Avis	Portalegre	L	12
	xxx	196	Fêmea	255,19	DR 2	Avis	Portalegre	L	2
10	xxx	242	Fêmea	285,37	DR 2	Avis	Portalegre	L	10
4	xxx	193	Fêmea	333,2	DO 3	Cartaxo	Santarém	G	7
	xxx	188	Fêmea	278,9	DR 3	Soure	Coimbra	D	2
1	xxx	192	Fêmea	284,98	DR-3	Soure	Coimbra	D	46
	xxx	14	Fêmea	272,04	ER+3	Palmela	Setúbal	I	1
	xxx	94	Fêmea	252,25	DO-2	São Pedro do Sul	Viseu	B	7
	xxx	207	Fêmea	343,58	DU 3	Silves	Faro	Z	2
	xxx	17	Fêmea	247,74	ER 3	Mértola	Beja	Y	3

2	xxx	170	Fêmea	155,42	DO-2	Viseu	Viseu	C	31
7	xxx	78	Macho	574,86	BU 2	Avis	Portalegre	M	40
8	xxx	176	Fêmea	305,95	DR 3	Avis	Portalegre	M	91
	xxx	14	Macho	191,49	AR 2	Beja	Beja	V	2
	xxx	60	Fêmea	333	DO+3	Serpa	Beja	X	6
	xxx	87	Fêmea	232,45	DO 2	Serpa	Beja	X	5
20	xxx	96	Fêmea	259,5	DO 3	Serpa	Beja	X	7
	xxx	121	Fêmea	286,55	DO 2	Serpa	Beja	X	11
12	xxx	113	Fêmea	189,92	DO 2	Chamusca	Santarém	F	15
	xxx	181	Fêmea	182,86	DO 2	Chamusca	Santarém	F	1
	xxx	174	Fêmea	197,56	DO 2	Cuba	Beja	U	4
	xxx	174	Fêmea	250,88	DR 3	Alcácer do Sal	Setúbal	S	1
	xxx	180	Fêmea	268,91	DO 2	Alcácer do Sal	Setúbal	S	2
13	xxx	201	Fêmea	198,94	DO-2	Alcácer do Sal	Setúbal	S	7
	xxx	145	Fêmea	291,25	DP 2	Fundão	Guarda	E	1
5	xxx	54	Fêmea	263,22	DO 2	Portalegre	Portalegre	K	12
19	xxx	76	Fêmea	322,81	DR 2	Portalegre	Portalegre	K	12
	xxx	112	Fêmea	285,37	DO 3	Portalegre	Portalegre	K	1
6	xxx	134	Fêmea	210,7	DP 2	Portalegre	Portalegre	K	10
	xxx	14	Macho	314,58	AR+3	Serpa	Beja	W	1
	xxx	15	Macho	310,66	AU 2	Benavente	Santarém	H	1
21	xxx	10	Macho	323,2	ZE 2	Évora	Évora	R	27
11	xxx	12	Macho	305,17	AU 2	Évora	Évora	R	12
	xxx	12	Macho	341,04	AU-2	Évora	Évora	R	
	xxx	13	Macho	378,86	AU 3	Évora	Évora	R	1

	xxx	14	Macho	376,71	AU+2	Évora	Évora	R	2
17	xxx	112	Fêmea	294,39	DR 3	Arronches	Portalegre	N	46
15	xxx	147	Fêmea	318,69	DR 3	Avis	Portalegre	N	11
18	xxx	156	Fêmea	272,44	DO 3	Arronches	Portalegre	N	18
14	xxx	206	Fêmea	228,73	DO 2	Avis	Portalegre	N	37
16	xxx	206	Fêmea	316,93	DR 3	Arronches	Portalegre	N	23
22	xxx	73	Fêmea	182,86	DP 2	Castro d'Aire	Viseu	A	140
3	xxx	134	Fêmea	191,88	DP 1	Castro d'Aire	Viseu	A	69
	xxx	161	Fêmea	275,77	DR 2	Castro d'Aire	Viseu	A	34
	xxx	156	Fêmea	286,16	DO 3	Portalegre	Portalegre	J	1
	xxx	182	Fêmea	265,18	DO 3	Arraiolos	Évora	O	11
	xxx	171	Fêmea	269,1	DR 3	Arraiolos	Évora	Q	3
	xxx	17	Fêmea	313,01	ER 3	Portel	Évora	T	4

Anexo 3 – Valores descritos nos diferentes estudos (G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R) para as medições padrão efetuadas (A, B, C, D, E, F). Informações necessárias à interpretação dos Anexos 4 a 8.
 Exemplificação da leitura: GA – medida do comprimento do corpo dos exemplares de *Fasciola* sp. recolhidos no matadouro de Beja; HA – Intervalo de valores do comprimento do corpo da população de *Fasciola hepatica* de bovinos da Bolívia.
 Comprimento mínimo: 11,74mm; comprimento máximo: 28,72mm; Valor médio do comprimento: 19,57mm e respectivo desvio padrão $\pm 0,34$ (Ashrafi *et al.* 2006)

	N	A - Comprimento do corpo (mm)	B - Distancia entre a ventosa ventral e a união das glândulas vitelinas (mm)	C - Distancia entre a união das glândulas vitelinas e a extremidade posterior do corpo (mm)	D - Distância entre a ventosa ventral e a extremidade posterior do corpo (mm)	E - Largura máxima do corpo (mm)	F - $\frac{\text{Comprimento do corpo}}{\text{Largura do corpo}}$ (mm)
G - Parasitas <i>Fasciola</i> sp, colhidos no matadouro de Beja, Portugal	100	GA	GB	GC	GD	GE	GF
H - População <i>F. hepatica</i> , Bovinos, Bolívia (Ashrafi <i>et al.</i> 2006)	99	HA 11,74 – 28,72 19,57 \pm 0,34	HB 4,98 – 17,03 10,55 \pm 0,22	HC 2,71 – 8,80 5,64 \pm 0,13	HD 8,88 – 24,92 16,24 \pm 0,32	HE 5,37 – 12,90 8,63 \pm 0,15	HF 1,58 – 3,08 2,28 \pm 0,03
I - População <i>F. hepatica</i> , Bovinos, Espanha (Periago <i>et al.</i> 2006)	84	IA 11,64 – 22,93 17,41 \pm 0,23	IB 6,57 – 14,31 9,60 \pm 0,17	IC 2,63 – 7,57 4,73 \pm 0,10	ID 9,51 – 19,94 14,40 \pm 0,22	IE 6,41 – 13,88 10,02 \pm 0,17	IF 1,29 – 2,77 1,74 \pm 0,03
J - População <i>F. hepatica</i> , Bovinos, Córsega (Periago <i>et al.</i> 2006)	86	JA 12,22 – 29,00 20,45 \pm 0,37	JB 5,97 – 18,22 11,64 \pm 0,26	JC 2,90 – 8,99 5,17 \pm 0,15	JD 8,86 – 25,08 16,90 \pm 0,36	JE 4,88 – 14,07 10,71 \pm 0,18	JF 1,33 – 2,80 1,91 \pm 0,03
K - População <i>F. hepatica</i> , Bovinos, Irão (Periago <i>et al.</i> 2008)	121	KA 11,47 – 30,02 21,76 \pm 0,40	KB 6,09 – 18,03 11,91 \pm 0,24	KC 2,45 – 12,02 5,81 \pm 0,15	KD 8,54 – 24,54 17,73 \pm 0,34	KE 6,41 – 13,91 9,75 \pm 0,17	KF 1,57 – 2,79 2,24 \pm 0,03
L - População <i>F. hepatica</i> , Bovinos, Egipto (Periago <i>et al.</i> 2008)	82	LA 15,48 – 28,71 23,73 \pm 0,33	LB 8,07 – 19,00 14,24 \pm 0,25	LC 3,30 – 10,40 6,55 \pm 0,16	LD 12,40 – 25,08 20,79 \pm 0,31	LE 8,21 – 14,27 10,54 \pm 0,15	LF 1,65 – 2,76 2,27 \pm 0,03
M - População <i>Fasciola</i> sp., Bovinos, Irão (Periago <i>et al.</i> 2008)	66	MA 21,46 – 36,41 28,84 \pm 0,38	MB 11,61 – 21,08 14,80 \pm 0,22	MC 5,42 – 12,51 9,08 \pm 0,26	MD 18,81 – 31,30 23,87 \pm 0,31	ME 5,34 – 12,43 7,65 \pm 0,20	MF 2,60 – 6,33 3,94 \pm 0,12
N - População <i>Fasciola</i> sp., Bovinos, Egipto (Periago <i>et al.</i> 2008)	126	NA 23,46 – 45,40 33,88 \pm 0,34	NB 14,39 – 28,11 21,10 \pm 0,23	NC 5,26 – 15,01 9,49 \pm 0,37	ND 20,60 – 41,11 30,59 \pm 0,33	NE 7,92 – 17,15 13,10 \pm 0,14	NF 1,86 – 3,37 2,61 \pm 0,03
O - População <i>F. gigantica</i> , Bovinos, Burkina Faso (Periago <i>et al.</i> 2006)	81	OA 28,82 – 52,30 39,72 \pm 0,58	OB 12,26 – 34,11 22,68 \pm 0,45	OC 8,97 – 21,43 13,45 \pm 0,32	OD 26,28 – 50,09 36,39 \pm 0,59	OE 6,03 – 11,84 8,45 \pm 0,14	OF 3,40 – 6,77 4,70 \pm 0,08
P - População <i>F. gigantica</i> , Bovinos, Burkina Faso (Ashrafi <i>et al.</i> 2006)	48	PA 30,70 – 52,12 39,51 \pm 0,84	PB 16,05 – 31,61 21,87 \pm 0,55	PC 9,03 – 19,43 13,79 \pm 0,38	PD 26,73 – 47,76 35,58 \pm 0,81	PE 6,45 – 11,38 8,87 \pm 0,16	PF 3,20 – 5,86 4,48 \pm 0,08
Q - População <i>F. gigantica</i> , Bovinos, Irão (Periago <i>et al.</i> 2008)	154	QA 29,97 – 62,39 39,45 \pm 0,57	QB 12,13 – 32,51 20,05 \pm 0,35	QC 8,18 – 25,46 13,96 \pm 0,25	QD 26,39 – 54,49 34,08 \pm 0,54	QE 5,15 – 9,80 6,92 \pm 0,08	QF 3,81 – 8,41 5,74 \pm 0,07
R - População <i>F. gigantica</i> , Bovinos, Egipto (Periago <i>et al.</i> 2008)	12	RA 35,25 – 48,71 44,65 \pm 1,15	RB 21,15 – 30,76 26,04 \pm 0,82	RC 9,86 – 19,72 14,98 \pm 0,81	RD 31,01 – 45,39 41,02 \pm 1,21	RE 8,23 – 13,60 10,36 \pm 0,46	RF 3,43 – 5,50 4,37 \pm 0,17

Anexo 4 - Medições efetuadas em quatro exemplares de *Fasciola* spp. de cada um dos animais indicados por um número de codificação (Z): GA, GB, GC. Foi assinalado com um X na tabela seguinte sempre que essas medições se encaixavam no intervalo de valores codificados por: HA, IA, JA, KA, LA, MA, NA, OA, PA, QA, RA, HB, IB, JB, KB, LB, MB, NB, OB, PB, QB, RB, HC, IC, JC, KC, LC, MC, NC, OC, PC, QC e RC (correspondência no Anexo 3). **===** - Exemplares selecionados para PCR.
V - Identificação do número da amostra dos exemplares enviados para PCR.

Z	1				2				3				4				5				6				7				8				9				10							
GA	33	28	33	27,5	25,5	28,5	26,5	26,5	29,5	25,5	26	28	31	26	25,5	27	20,5	26	26	23,5	31,5	30	26	28,5	30	28	30,5	31,5	34	28,5	27	29,5	23	27	27,5	27	31	29	29,5	33,5				
HA		X		X	X	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X			X	X		X				X	X		X	X	X	X					X			
IA																	X																											
JA		X		X	X	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X			X	X		X				X	X		X	X	X	X					X			
KA		X		X	X	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X		X	X	X		X				X	X	X	X	X	X	X					X	X		
LA		X		X	X	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X			X	X		X				X	X		X	X	X	X					X			
MA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
NA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OA	X		X						X				X								X	X			X	X	X	X			X						X	X	X	X				
PA	X		X										X								X						X	X									X			X				
QA	X		X										X								X	X			X	X	X	X									X			X				
RA																																												
GB	18,5	16	19	17,5	14,5	15	15,5	14	16	17,5	15,5	16,5	17,5	17	14	16	12	14	15	12,5	18	17	15,5	16	17	17	17	20,5	21	16,5	18	18	15	15	15	15	17,5	15,5	17	20				
HB		X			X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X			X			X	X	X	X					X	X		
IB							X							X			X	X		X																								
JB		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
KB		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
LB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
NB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PB	X	X	X	X					X	X		X	X	X		X					X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X					X			X	X	X		X
QB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
RB																																												
GC	11	8	10	7	8	9,5	7,5	8,5	9,5	4,5	7	8	9	5	8	7	5	8,5	7	8,5	10	9,5	7	8,5	9	7,5	9,5	7	9,5	9	6	8	5	8	9	8	9	8	9	9,5	8,5	10		
HC		X		X	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	
IC		X		X	X		X			X	X	X		X	X	X	X			X			X			X		X		X	X	X	X	X	X	X					X			
JC		X		X	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	
KC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
LC		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
NC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OC	X		X		X				X				X								X	X			X	X	X	X									X			X	X	X		X
PC	X		X		X				X				X								X	X			X	X	X	X									X			X	X	X		X
QC	X	X	X		X	X		X	X			X				X			X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
RC	X		X																		X																							X
V																									1																			

Anexo 5 – Continuação inferior do Anexo 4. Medições efetuadas em quatro exemplares de *Fasciola* spp. de cada um dos animais indicados por um número de codificação (Z): GD, GE, GF. Foi assinalado com um X na tabela seguinte sempre que essas medições se encaixavam no intervalo de valores codificados por: HD, ID, JD, KD, LD, MD, ND, OD, PD, QD, RD, HE, IE, JE, KE, LE, ME, NE, OE, PE, QE, RE, HF, IF, JF, KF, LF, MF, NF, OF, PF, QF e RF (correspondência no Anexo 3). --- - Fasciolas selecionadas para PCR. V – Identificação do número da amostra de *Fasciola* spp. enviada para PCR; H – exemplares do grupo A; G – exemplares do Grupo B; --- não agrupados.

Z	1				2				3				4				5				6				7				8				9				10						
GD	29,5	24	29	24,5	22,5	24,5	23	22,5	25,5	22	22,5	24,5	26,5	22	22	23	17	22,5	22	21	28	26,5	22,5	24,5	26	24,5	26,5	27,5	30,5	25,5	24,5	26	20	23	24	23	26,5	25	25,5	30			
HD		X		X	X	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X			X	X		X					X		X	X	X	X		X					
ID																	X																X										
JD		X		X	X	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X			X	X		X				X		X	X	X	X		X						
KD		X		X	X	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X			X	X		X				X		X	X	X	X		X						
LD		X		X	X	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X			X	X		X				X		X	X	X	X		X						
MD	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
ND	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
OD	X		X										X								X	X			X		X	X	X			X					X		X				
PD	X		X																		X							X	X										X				
QD	X		X										X								X	X			X		X	X	X			X					X		X				
RD																																											
GE	8,5	9	9	9,5	14,5	12	11	11	13	14	13	12	10,5	11	10	10,5	10	11	9,5	10,5	12,5	9,5	11,5	11	11	12	12	11	13	14,5	13	12,5	9	12,5	14,5	13	12	12	10,5	11,5			
HE	X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
IE	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
JE	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
KE	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
LE	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
ME	X	X	X	X		X	X	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X					X				X	X	X	X			
NE	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OE	X	X	X	X		X	X	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					X				X	X	X	X	X		
PE	X	X	X	X			X	X					X	X	X	X	X	X	X	X		X		X	X			X					X							X			
QE	X	X	X	X											X		X		X			X													X								
RE	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
GF	2,75	2,55	2,64	2,29	2,32	2,38	2,3	2,52	2,36	2,55	2,36	2,24	2,58	2,17	2,43	2,35	1,95	2,36	2,17	2,04	2,74	2,73	2,17	2,48	2,07	2,33	2,77	2,86	3,4	2,59	2,84	2,81	2,09	3	2,75	2,16	2,38	2,42	2,27	2,31			
HF	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
IF	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X			X			X	X	X	X	X	X	X	X
JF	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X			X			X	X	X	X	X	X	X	X
KF	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X			X			X	X	X	X	X	X	X	X
LF	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X			X			X	X	X	X	X	X	X	X
MF	X		X																			X	X				X	X	X		X	X		X	X								
NF	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OF																													X														
PF																													X														
QF																																											
RF																																											
V	G	H	G	H	H	H	H	H	---	H	H	H	G	H	H	H	H	H	H	H	G	---	H	H	G1	H	G	G	G	---	H	---	H	H	H	H	G	---	---	G			

Anexo 6 - Continuação lateral do Anexo 4. Medições efetuadas em quatro exemplares de *Fasciola* spp. de cada um dos animais indicados por um número de codificação (Z): GA, GB, GC. Foi assinalado com um X na tabela seguinte sempre que essas medições se encaixavam no intervalo de valores codificados por: HA, IA, JA, KA, LA, MA, NA, OA, PA, QA, RA, HB, IB, JB, KB, LB, MB, NB, OB, PB, QB, RB, HC, IC, JC, KC, LC, MC, NC, OC, PC, QC e RC (correspondência no Anexo 3). **====** - Exemplares selecionados para PCR. V – Identificação do número da amostra de *Fasciola* spp. enviada para PCR

Z	11				12				13				14				15				16				17				18				19				20							
GA	28,5	29,5	28	24,5	29,5	25	25,5	29	27,5	25	23,5	22	28	28	29,5	28,5	28	26,5	24	26,5	31	29,5	32	34,5	32,5	35,5	30,5	31,5	28	28,5	31,5	27,5	33,5	27	36	37	23	22,5	22	24				
HA	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X									X	X		X		X			X	X	X	X				
IA												X																									X	X	X					
JA	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X									X	X		X		X			X	X	X	X				
KA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X							X	X		X		X			X	X	X	X				
LA	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X									X	X		X		X			X	X	X	X				
MA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
NA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
OA		X			X			X						X							X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X		X								
PA																					X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X		X								
QA																					X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X		X								
RA																										X								X		X								
GB	18	17	16	13	19	16	17	17	17	13	13,5	13	16,5	15,5	16	17	19	14	15,5	16	17	16	19	19,5	18,5	18	17	18	17	14	17,5	13,5	18	14	20,5	21	14,5	13	12,5	14,5				
HB		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X					X		X	X		X		X			X	X	X	X				
IB				X						X	X	X						X												X		X		X				X		X				
JB	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X	X	X	X	X
KB	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X	X	X	X	X
LB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X	X	X	X	X
MB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
NB	X	X	X		X	X	X	X	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X
OB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PB	X	X	X		X	X	X	X	X				X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
QB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
RB																																							X					
GC	6,5	9	8	7,5	7	5,5	5,5	8	7	8	6,5	5,5	8	9	10	9	6	8,5	5,5	7	11	9,5	9	11	10,5	13,5	10	10	5	10	9,5	11	10,5	9	11	11	5	5,5	6	6				
HC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X									X					X				X			X	X	X	X
IC	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X		X	X									X												X	X	X	X
JC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X				X					X					X							X	X	X	X
KC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
LC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X						X	X		X		X			X	X		X	X	X	X	X
MC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
NC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OC		X												X	X	X					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
PC		X												X	X	X					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
QC		X	X					X		X			X	X	X	X		X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
RC														X							X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
V																									4	5					2		10	7	8	9			6					

Anexo 7 - Continuação inferior do Anexo 8. Medições efetuadas em quatro exemplares de *Fasciola* spp. de cada um dos animais indicados por um número de codificação (Z): GD, GE, GF. Foi assinalado com um X na tabela seguinte sempre que essas medições se encaixavam no intervalo de valores codificados por: HD, ID, JD, KD, LD, MD, ND, OD, PD, QD, RD, HE, IE, JE, KE, LE, ME, NE, OE, PE, QE, RE, HF, IF, JF, KF, LF, MF, NF, OF, PF, QF e RF (correspondência no Anexo 3). === - Exemplares selecionados para PCR. V – Identificação do número da amostra de *Fasciola* spp. enviada para PCR; H – exemplares do grupo A; G – exemplares do Grupo B; --- não agrupados.

Z	11				12				13				14				15				16				17				18				19				20					
GD	24,5	26	24	20,5	26	21,5	22,5	25	24	21	20	18,5	24,5	24,5	26	26	25	22,5	21	23	28	25,5	28	30,5	29	31,5	27	28	22	24	27	24,5	28,5	23	31,5	32	19,5	18,5	18,5	20,5		
HD	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X									X	X					X	X	X	X	X	X	X	X
ID											X	X																											X	X	X	
JD	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X									X	X					X		X		X	X	X	X
KD	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X									X	X					X		X		X	X	X	X
LD	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X									X	X					X		X		X	X	X	X
MD	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X
ND	X	X	X		X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
OD		X			X										X	X					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
PD																					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
QD		X			X										X	X					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
RD																										X																
GD	11,5	11	12	11,5	10,5	11	12	11,5	12,5	10	11	12,5	11	9	10	12,5	13	12	13	14,5	11	12	11,5	10,5	12	11	12,5	12	14	12,5	11,5	11,5	12,5	12	11,5	12,5	12	10,5	12	11,5		
HE	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
IE	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
JE	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
KE	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
LE	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
ME	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X		X				X	X	X	X	X	X			X	X					X	X	X	X	X	X	X	X
NE	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OE	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X		X				X	X	X	X	X	X			X	X					X	X	X	X	X	X	X	X
PE		X			X	X				X	X		X	X	X						X			X		X													X			
QE															X	X																										
RE	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
GF	2,85	2,81	2,67	2,33	2,36	2,08	2,22	2,32	2,39	2,38	2,76	2,2	2,15	2	2,27	2,38	2,67	2,41	2,4	2,52	2,58	2,81	2,67	3	2,6	3,74	2,65	2,86	3,29	3,17	3,5	2,89	3,72	2,16	2,48	2,85	2,88	2,5	2,75	2,82		
HF	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
IF			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
JF			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
KF			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
LF			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MF	X	X	X								X						X					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
NF	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OF																										X			X	X												
PF																										X		X	X	X												
QF																																										
RF																										X			X	X												
V	H	---	H	H	---	H	H	---	H	H	H	H	---	---	---	---	H	H	H	H	G	---	G	G	4G	5G	G	G	H	H	2G	H	10G	7---	8G	9G	H	H	6H	H		

Anexo 8 - Continuação lateral do Anexo 9. Medições efetuadas em quatro exemplares de *Fasciola* spp. de cada um dos animais indicados por um número de codificação (Z): GA, GB, GC, GD, GE, GF. Foi assinalado com um X na tabela seguinte sempre que essas medições se encaixavam no intervalo de valores codificados por: HA, IA, JA, KA, LA, MA, NA, OA, PA, QA, RA, HB, IB, JB, KB, LB, MB, NB, OB, PB, QB, RB, HC, IC, JC, KC, LC, MC, NC, OC, PC, QC, RC, HD, ID, JD, KD, LD, MD, ND, OD, PD, QD, RD, HE, IE, JE, KE, LE, ME, NE, OE, PE, QE, RE, HF, IF, JF, KF, LF, MF, NF, OF, PF, QF e RF (correspondência no Anexo 3). --- - Exemplos selecionados para PCR. V - Identificação do número da amostra de *Fasciola* spp. enviada para PCR; H - exemplares do grupo A; G - exemplares do Grupo B; --- não agrupados.

Z	21			22			23			24			25			X	21			22			23			24			25												
GA	29	28	28,5	31	33,5	34,5	30,5	36	31	30,5	27	27	29	29,5	29,5	31	30	28	29,5	28,5	GD	25	24,5	25,5	27,5	29,5	30,5	27	32	27	26	22,5	23,5	25,5	25,5	25,5	27,5	26,5	24	25,5	24,5
HA	X	X	X								X	X	X				X		X	HD	X	X									X	X						X		X	
IA																				ID																					
JA	X	X	X								X	X	X				X		X	JD	X	X									X	X						X		X	
KA	X	X	X								X	X	X	X	X		X	X	X	KD	X	X									X	X						X		X	
LA	X	X	X								X	X	X				X		X	LD	X	X									X	X						X		X	
MA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	MD	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
NA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	ND	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OA	X			X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X		X		OD				X	X	X	X	X	X	X	X					X	X				
PA				X	X	X		X	X	X					X					PD				X	X	X	X	X	X	X						X					
QA				X	X	X	X	X	X	X	X				X	X				QD				X	X	X	X	X	X	X	X					X	X				
RA								X												RD									X												
GB	17,5	16,5	18	18	20,5	20	20	20	18	16	16	16,5	15	15,5	14,5	18	16,5	14,5	16	17,5	GD	11,5	10,5	8,5	10	13	13	12,5	12,5	8	9	8	8,5	10	10,5	10,5	10,5	12	11,5	12,5	12,5
HB		X								X	X	X	X	X	X		X	X	X	HE	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
IB																				IE	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
JB	X	X	X	X					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	JE	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
KB	X	X	X	X					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	KE	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
LB	X	X	X	X					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	LE	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
MB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	ME	X	X	X	X						X	X	X	X	X	X	X	X	X				
NB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	NE	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
OB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	OE	X	X	X	X						X	X	X	X	X	X	X	X	X				
PB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X		X	X	PE		X	X	X						X	X	X	X	X	X	X	X				
QB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	QE			X	X						X	X	X	X	X								
RB																			RE	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
GC	7,5	8	7,5	9,5	9	10,5	7	12	9	10	6,5	7	10,5	10	11	9,5	10	9,5	9,5	7	GF	2,64	2,33	2,38	2,82	2,39	2,76	2,65	3,13	2,38	2,1	2,08	2,16	2,42	2,57	2,36	2,48	2,31	2,15	2,36	2,28
HC	X	X	X		X		X		X		X	X							X	HF	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
IC	X	X	X				X				X	X							X	IF	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
JC	X	X	X		X		X		X		X	X							X	JF	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
KC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	KF	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
LC	X	X	X	X	X		X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	LF	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
MC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	MF	X			X		X	X	X	X													
NC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	NF	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
OC				X	X	X		X	X	X			X	X	X	X	X	X	OF																						
PC				X	X	X		X	X	X			X	X	X	X	X	X	PF																						
QC		X		X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	QF																						
RC						X		X		X			X	X	X		X		RF																						
V								3											V	H	H	H	G	G	G	---	3G	G	G	H	H	---	---	---	G	---	H	---	H		