



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

**Prevalência e fatores de risco associados à infecção por
Fasciola hepatica em ovinos das raças Merina Branca e
Merina Preta**

Catarina Filipa da Silva Oliveira

Orientador(es) | Elsa Leclerc Duarte
Helga Marlene Cardoso Waap
Ludovina Neto Padre

Évora 2022





Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

**Prevalência e fatores de risco associados à infecção por
Fasciola hepatica em ovinos das raças Merina Branca e
Merina Preta**

Catarina Filipa da Silva Oliveira

Orientador(es) | Elsa Leclerc Duarte
Helga Marlene Cardoso Waap
Ludovina Neto Padre

Évora 2022



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

Presidente | Rita Payan-Carreira (Universidade de Évora)

Vogais | Elsa Leclerc Duarte (Universidade de Évora) (Orientador)
Sérgio Eduardo Ramalho Sousa (Escola Universitária Vasco da Gama) (Arguente)

Agradecimentos

À Prof.^a Doutora Elsa Leclerc Duarte por ter aceitado orientar-me, pela ajuda incansável na procura de um local para a realização do meu estágio curricular e, principalmente, pela disponibilidade e acompanhamento prestados.

À Prof.^a Doutora Ludovina Neto Padre, por ter aceitado ser minha coorientadora, pela amabilidade, e pelo entusiasmo e dedicação com que transmite a sua sabedoria sobre parasitologia, que tanto a caracterizam.

À minha orientadora externa, Doutora Helga Waap, por me ter guiado nas diversas tarefas laboratoriais e na realização desta dissertação. Obrigada por todos os conhecimentos transmitidos, pela enorme simpatia e por me ter feito apaixonar pelo mundo da investigação e da parasitologia.

A todo o pessoal do departamento de Parasitologia do INIAV, particularmente à Doutora Ana Júlia Afonso, pela boa disposição e pelo apoio e auxílio diário no processamento e análise das amostras.

À ANCORME, pela recolha e envio das amostras de sangue e fezes, e ao Laboratório de Análises Clínicas Prof. Dr. Braço Forte Júnior da FMV-UL, pela realização dos hemogramas e bioquímicas.

Ao Professor Telmo Pina Nunes, pela ajuda e disposição facultadas no tratamento estatístico dos dados.

À minha família, em especial à minha mãe, pelos sábios conselhos e pela motivação ao longo da minha vida académica.

Aos meus amigos de Guimarães e da Universidade de Évora. Sem a vossa amizade, suporte e encorajamento constante, este trajeto teria sido certamente mais difícil.

Por fim, a todos que, apesar de não terem sido mencionados, contribuíram de alguma forma para o sucesso do meu percurso universitário.

Resumo

A fasciolose, causada por *Fasciola hepatica*, um trematode zoonótico globalmente distribuído, é uma parasitose hepática responsável por importantes perdas económicos na produção ovina.

O estudo teve por objetivo determinar a prevalência e possíveis fatores de risco associados à infecção por *F. hepatica* em ovinos das raças Merina Branca e Merina Preta da região do Alentejo.

Para tal, foram analisadas amostras de fezes e sangue colhidas de 423 ovinos da raça Merina Branca e 252 ovinos da raça Merina Preta provenientes de 28 explorações.

O exame coprológico, pelo método de sedimentação natural modificada, revelou uma prevalência de 2,1%. A análise serológica, utilizando kits comerciais ELISA (IDEXX[®] *Fasciolosis Verification Test*), mostrou uma seroprevalência de 4,4% (IC_{95%}=3,1%-6,3%). Apenas a variável “Pastoreio em regadio” foi identificada como fator de risco.

Com base nos resultados, os ovinos das raças Merina Branca e Merina Preta da região estudada apresentaram uma baixa prevalência de *F. hepatica*.

Palavras-chave: *Fasciola hepatica*, prevalência, ovinos Merino, serologia, fatores de risco.

Prevalence and risk factors associated with *Fasciola hepatica* infection in White Merino and Black Merino sheep

Abstract

Fasciolosis, caused by *Fasciola hepatica*, a globally distributed zoonotic trematode, is a hepatic parasitosis responsible for important economic losses in sheep production.

The aim of the present study was to determine the prevalence and possible risk factors associated with *F. hepatica* infection in White Merino and Black Merino sheep from the Alentejo region.

For this purpose, faecal and blood samples collected from 423 White Merino sheep and 252 Black Merino sheep from 28 farms were analysed.

The coprological exam, using a modified natural sedimentation method, obtained a prevalence of 2.1%. Serological analysis, using commercial ELISA kits (IDEXX© *Fasciolosis Verification Test*), revealed a seroprevalence of 4.4% (IC_{95%}=3.1%-6.3%). The only variable identified as a risk factor was "Grazing in irrigated pasture".

Based on the results, White Merino and Black Merino sheep from the studied region showed a low prevalence of *F. hepatica*.

Keywords: *Fasciola hepatica*, prevalence, Merino sheep, serology, risk factors.

Índice geral

1.	Introdução.....	1
2.	Objetivos.....	2
2.1	Objetivos gerais.....	2
2.2	Objetivos complementares.....	2
3.	Revisão bibliográfica	3
3.1	Taxonomia.....	3
3.2	Morfologia geral.....	4
3.2.1	Tegumento	5
3.2.2	Sistema digestivo	5
3.2.3	Sistema excretor.....	6
3.2.4	Sistema nervoso.....	6
3.2.5	Sistema reprodutor	7
3.3	Ciclo biológico	7
3.3.1	Ovo	8
3.3.2	Miracídio	9
3.3.3	Esporocisto.....	10
3.3.4	Rédia	10
3.3.5	Cercária	11
3.3.6	Metacercária.....	11
3.3.7	Da metacercária à forma adulta	12
3.4	Hospedeiro definitivo.....	13
3.5	Hospedeiros intermediários.....	14
3.5.1	Ecologia.....	15
3.6	Distribuição geográfica.....	16
3.7	Epidemiologia	18
3.7.1	Alterações climáticas.....	19
3.8	Fasciiose em Portugal.....	20
3.9	Patogenia e sinais clínicos	21
3.9.1	Forma aguda	21

3.9.2	Forma subaguda	22
3.9.3	Forma crónica.....	23
3.10	Diagnóstico laboratorial	25
3.10.1	Hemograma e análises bioquímicas	26
3.10.2	Coprologia	28
3.10.3	Imunodiagnóstico	29
3.10.4	Diagnóstico molecular	30
3.11	Terapêutica.....	31
3.12	Controlo e profilaxia.....	33
3.13	Resistência aos anti-helmínticos	34
4.	Materiais e métodos	35
4.1	Caracterização geográfica e climática da área de estudo	35
4.2	Caracterização da amostra	37
4.3	Colheita de amostras e recolha de dados	37
4.4	Processamento das amostras de sangue	38
4.5	Processamento das amostras de fezes	38
4.6	Serologia	39
4.7	Análise estatística.....	40
5.	Resultados.....	42
5.1	Caracterização da amostra: raça, sexo, idade.....	42
5.2	Resultados coprológicos	43
5.3	Resultados serológicos	44
5.4	Análise dos fatores de risco associados à infeção por <i>F. hepatica</i>	46
5.5	Resultados sanguíneos	47
5.5.1	Relação entre a seroprevalência e os parâmetros do hemograma e os parâmetros bioquímicos	47
5.6	Total de animais positivos: Sedimentação natural modificada e ELISA	52
5.6.1	Concordância das técnicas laboratoriais.....	52
5.7	Análise geográfica	53
5.7.1	Caracterização das explorações	53
5.7.1	Distribuição por distrito	53

5.7.3	Explorações positivas.....	54
6	Discussão.....	56
7	Conclusão.....	63
8	Bibliografia.....	65
9	Anexos.....	I
9.1	Anexo 1.....	II
9.2	Anexo 2.....	III
9.3	Anexo 3.....	V
9.4	Anexo 4.....	VIII

Índice de gráficos

Gráfico 1: Distribuição (%) dos ovinos estudados em função da raça.	42
Gráfico 2: Distribuição (%) dos ovinos estudados em função do sexo.	42
Gráfico 3: Distribuição (%) dos ovinos estudados em função da idade.....	43
Gráfico 4: <i>Boxplot</i> - Distribuição dos valores do HCT nos animais seronegativos e seropositivos.	48
Gráfico 5: <i>Boxplot</i> - Distribuição dos valores de proteína sérica total nos animais seronegativos e seropositivos.....	49
Gráfico 6: <i>Boxplot</i> - Distribuição dos valores de albumina sérica nos animais seronegativos e seropositivos.....	50
Gráfico 7: <i>Boxplot</i> - Distribuição dos valores de FA nos animais seronegativos e seropositivos.	50
Gráfico 8: <i>Boxplot</i> - Distribuição dos valores de AST nos animais seronegativos e seropositivos.	51
Gráfico 9: <i>Boxplot</i> - Distribuição dos valores de ALT nos animais seronegativos e seropositivos.	52
Gráfico 10: Distribuição (%) dos ovinos testados em função dos distritos	53

Índice de tabelas

Tabela 1: Espécies de hospedeiros intermediários de <i>F. hepatica</i> pertencentes à família Lymnaeidae e respetiva distribuição no mundo (Adaptado de Bargues & Mas-Coma, 1997; Bargues <i>et al.</i> , 1997; Bargues <i>et al.</i> , 2001; Bargues, 2005)	15
Tabela 2: Parâmetros hematológicos e bioquímicos em ovelhas saudáveis e infetadas com <i>F. hepatica</i> (Adaptado de Taylor <i>et al.</i> , 2016)	28
Tabela 3: Fármacos fasciolícidias para ovinos autorizados em Portugal (DGAV, 2021).	33
Tabela 4: Interpretação dos valores de kappa segundo Landis & Koch (1977).	41
Tabela 5: Número de animais das raças Merina Branca e Merina Preta analisados pela técnica de sedimentação natural modificada e respetivas percentagens (%) de infeção com <i>F. hepatica</i>	43
Tabela 6: Seroprevalência de <i>F. hepatica</i> em função das variáveis em estudo.	45
Tabela 7: Resultados do modelo linear generalizado misto para os fatores de risco associados à seropositividade de <i>F. hepatica</i> (as variáveis significativas encontram-se a negrito).	46
Tabela 8: Seroprevalência de <i>F. hepatica</i> associada às diferentes variáveis e categorias em estudo.	48
Tabela 9: Total de animais positivos para <i>F. hepatica</i> pelas técnicas laboratoriais realizadas e respetivo valor de kappa	53
Tabela 10: Distritos e número de animais testados, número de animais positivos e respetivas prevalências	54
Tabela 11: Freguesias e concelhos positivos, número de animais testados, número de animais positivos e respetivas prevalências	56

Índice de figuras

Figura 1: Classificação taxonómica de <i>Fasciola hepatica</i> segundo Taylor <i>et al.</i> , (2016).	3
Figura 2: <i>Fasciola hepatica</i> (A) (Laboratório de Parasitologia do INIAV), diagrama do parasita adulto com as estruturas principais (B) e (C) (Adaptado de Andrews, 1999).	4
Figura 3: Ciclo de vida <i>Fasciola hepatica</i>	8
Figura 4: Ovo de <i>Fasciola hepatica</i> . Opérculo indicado pela seta preta (Adaptado de Bowman, 2014)	9
Figura 5: Miracídio (A), cercária (B) e metacercária (C) (Adaptado de Taylor <i>et al.</i> , 2016).	12
Figura 6: Exemplar de <i>Galba truncatula</i> (Mrkvicha, 2009).....	16
Figura 7: Distribuição de <i>Fasciola hepatica</i> no mundo (Adaptado de Santos, 2012)	17
Figura 8: Parênquima hepático danificado com presença de tratos tortuosos causados por <i>Fasciola hepatica</i> (A) (Ruiz-Campillo <i>et al.</i> , 2017), superfície de corte do fígado irregular com áreas claras que alternam com áreas hemorrágicas escuras (B) (Fiss <i>et al.</i> , 2013), edema submandibular associado a fasciolose crónica (C) (Boray & Love, 2017).	25
Figura 9: Espectro de eficácia dos vários anti-helmínticos (Adaptado de Torgerson & Claxton, 1999)	32
Figura 10: Mapa dos distritos e regiões de Portugal Continental. Área de estudo delimitada a vermelho. (Adaptado de: https://xrei.com/pt/regioes-de-portugal/)	36
Figura 11: Aspeto dos ovos de <i>Fasciola hepatica</i> após adição do corante de contraste (ampliação 40x).....	39
Figura 12: Diagrama do teste ELISA fabricado pelos laboratórios IDEXX®.....	40
Figura 13: Placa ELISA no final do ensaio serológico.	40
Figura 14: Distribuição geográficas das explorações amostradas e prevalência intraexploração nas explorações positivas	55

Lista de abreviaturas, siglas ou símbolos

Ag-: Antígeno controlo

Ag+: Antígeno f2

ALT: Alanina aminotransferase

ANCORME: Associação Nacional de Criadores de Ovinos da Raça Merina

AST: Aspartato aminotransferase

cELISA: ELISA de coproantígeno

C. novyi tipo B: *Clostridium novyi* tipo B

DNA: Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

EDTA: Ácido etilendiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)

ELISA: Ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

ES: Excreção/secreção

FA: Fosfatase alcalina

FMV-UL: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

GDH: Glutamato desidrogenase

GGT: Gama glutamil transpeptidase

H₀: Hipótese nula

HCT: Hematócrito

IgG: Imunoglobulina G

INIAV: Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

IPMA: Instituto Português do Mar e da Atmosfera

K3EDTA: Ácido tripotássico etilendiamino tetra-acético (*Tripotassium ethylenediamine tetraacetic acid*)

LAMP: Amplificação isotérmica mediada por ciclos (*Loop mediated isothermal amplification*)

Min: Minutos

ml: Mililitro

mm: Milímetros

OPG: Ovos por grama de fezes

OR: *Odds ratio*

PCR: Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)

RPA: Amplificação de polimerase recombinase (*Recombinase polymerase amplification*)

RPM: Rotações por minuto

SC: Subcutânea

SDH: Sorbitol desidrogenase

TMB: Tetrametilbenzideno

µl: Microlitro

1. Introdução

A presente dissertação foi elaborada na sequência do trabalho desenvolvido durante o estágio curricular realizado entre setembro 2020 a fevereiro 2021, no laboratório de parasitologia do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), sob a orientação da Doutora Helga Marlene Cardoso Waap.

Os trabalhos laboratoriais executados encontravam-se inseridos no âmbito do Projeto MERINOParasite (PTDC/CVT-CVT/28798/2017), financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia numa parceria entre o INIAV, a Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL) e a Associação Nacional de Criadores de Ovinos da Raça Merina (ANCORME).

A fasciolose é uma doença provocada por dois parasitas, *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica*. No entanto, na Europa, *F. hepatica* é a única espécie registada e com relevância na transmissão e desenvolvimento da doença.

F. hepatica é um trematode com distribuição cosmopolita (Constable *et al.*, 2017), que parasita uma ampla gama de hospedeiros, especialmente ruminantes (Beesley *et al.*, 2018). É responsável por consideráveis perdas económicas, estimadas a nível global em mais de 3,2 mil milhões de dólares americanos por ano (Mehmood *et al.*, 2017). Estes prejuízos decorrem da morte de animais infetados, rejeição de fígados parasitados, perda de condição corporal, diminuição das taxas de fertilidade, da produção de leite e lã e dos custos ligados ao seu tratamento (Mitchell, 2007; Mehlhorn, 2016a; Howell & Williams, 2020). Apesar de ser um parasita bem conhecido e estudado, continua a constituir um desafio à saúde, bem-estar, produtividade e reprodução na pecuária em todo o mundo (Charlier *et al.*, 2014; Rinaldi *et al.*, 2015).

A fasciolose em ruminantes é endémica em muitas partes da Europa, e uma das principais infeções helmínticas (Mehmood *et al.*, 2017). Na última década, tem-se verificado um aumento do número de surtos de fasciolose em ovinos, principalmente no Reino Unido e Irlanda, mas também noutros países do Norte e do Sul da Europa. Uma das razões apontadas para a maior prevalência são as alterações climáticas causadas pelo aquecimento global, sugerindo que os padrões epidemiológicos da doença estão em mudança (Taylor, 2009; Rinaldi *et al.*, 2015).

Para além de ser um problema que afeta gravemente a saúde animal, é também uma zoonose parasitária de origem alimentar reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como uma doença tropical negligenciada reemergente, que afeta cerca de 2,4 milhões de pessoas em mais de 70 países (Nyindo & Lukumbagire, 2015; Mas-Coma *et al.*, 2019; Organização Mundial de Saúde, 2021).

As raças autóctones, como é o caso das raças Merina Branca e Merina Preta em estudo, são um recurso genético muito valioso devido à biodiversidade que apresentam, distinguindo-se pela sua rusticidade, longevidade e resistência a infeções parasitárias. Importa também fazer referência à sua importância socioeconómica, graças à produção de produtos de qualidade e à fixação da população no meio rural (Torgerson & Claxton, 1999; ANCORME, 2008; McManus *et al.*, 2014).

No nosso país são escassos os estudos relativos à prevalência da fasciolose, e a grande maioria dizem respeito a dados de matadouro em bovinos, sendo insuficiente a informação disponível no que toca à seroprevalência desta doença, sobretudo na espécie ovina.

Assim, surge a necessidade da realização deste estudo epidemiológico, a fim de poder contribuir para o panorama atual sobre o parasitismo por *F. hepatica* na região do Alentejo e particularmente nas raças Merina Branca e Merina Preta. Consequentemente, poderão ser retiradas informações úteis para avaliação do risco da doença nesta região e implementação de planos de controlo e terapêutica mais ajustadas à realidade.

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

O estudo epidemiológico realizado na presente dissertação teve como principais objetivos:

- I. Estimar a prevalência e distribuição geográfica da infeção por *F. hepatica* em ovinos da Raça Merina Branca e Merina Preta na região do Alentejo, com recurso a duas técnicas: sedimentação natural para deteção de ovos nas fezes e serologia (Ensaio imunoenzimático (ELISA));
- II. Identificar potenciais fatores de risco para a infeção por *F. hepatica* relacionados com as características individuais dos animais e com as características das explorações, através da realização de inquéritos junto das explorações.

2.2 Objetivos complementares

- I. Relacionar a seroprevalência com as características individuais dos ovinos (raça, idade, sexo) e das explorações amostradas;

- II. Analisar os valores de hemograma e dos perfis bioquímicos e a sua relação com a seroprevalência;
- III. Determinar a concordância entre os dois métodos de diagnóstico utilizados.

3. Revisão bibliográfica

3.1 Taxonomia

Taxonomicamente e de acordo com Taylor *et al.*, (2016), o parasita *F. hepatica* é classificado segundo o diagrama da Figura 1.

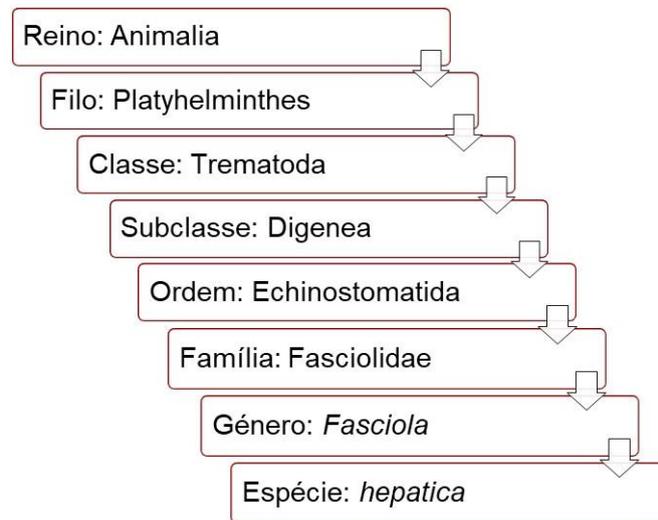


Figura 1: Classificação taxonômica de *Fasciola hepatica* segundo Taylor *et al.*, (2016).

Os parasitas do filo Platyhelminthes caracterizam-se por serem acelomados, achatados dorsoventralmente, apresentarem simetria bilateral e serem desprovidos de esqueleto, sistema circulatório e sistema respiratório (Roberts & Janovi, 2009; Bowman, 2014; Goater *et al.*, 2014). Os membros da classe Trematoda não são segmentados e apresentam uma forma foliácea, cônica ou cilíndrica (Leitão, 1983). A subclasse Digenea inclui as espécies com especial relevância veterinária (Bowman, 2014), cujo ciclo de vida é indireto, com um ou dois hospedeiros intermediários, o primeiro dos quais é sempre um gastrópode onde ocorre a reprodução assexuada (Gunn & Pitt, 2012). O hospedeiro definitivo é obrigatoriamente um vertebrado, no qual se dá a reprodução sexuada (Taylor *et al.*, 2016). A família Fasciolidae engloba os trematodes de grandes dimensões, hermafroditas, revestidos por uma cutícula espinhosa e que parasitam os canais biliares e o intestino dos mamíferos.

3.2 Morfologia geral

As formas adultas de *F. hepatica* (Figura 2) possuem um corpo largo e achatado dorsoventralmente, em forma de folha e com simetria bilateral (Hendrix & Robinson, 2012). As suas dimensões variam entre os 18 e 51 milímetros (mm) de comprimento e os 4 e 13 mm de largura (Vázquez & Pérez, 2001).

A extremidade anterior, mais larga que a posterior, possui forma cônica com ombros que se distinguem do resto do corpo e se projetam lateralmente (Hendrix & Robinson, 2012; Taylor *et al.*, 2016). É no cone cefálico que podemos encontrar os órgãos de fixação, constituídos por duas ventosas: a ventosa oral, de maiores dimensões, e a ventosa ventral ou *acetabulum* (Urquhart *et al.*, 1996; Goater *et al.*, 2014).

Todo o corpo é revestido por um tegumento constituído por espinhos projetados posteriormente. Imediatamente abaixo do tegumento, localizam-se os músculos. Não existe uma cavidade geral, estando todos os órgãos compactados num parênquima (Taylor *et al.*, 2016).

Devido à ramificação e sobreposição dos vários órgãos a anatomia interna de *F. hepatica* não se distingue com facilidade. O parasita apresenta uma cor castanha avermelhada quando fresco e adquire uma aparência acinzentada quando conservado (Hendrix & Robinson, 2012).

As formas imaturas são lanceoladas e medem entre um a dois milímetros de comprimento (Taylor *et al.*, 2016).

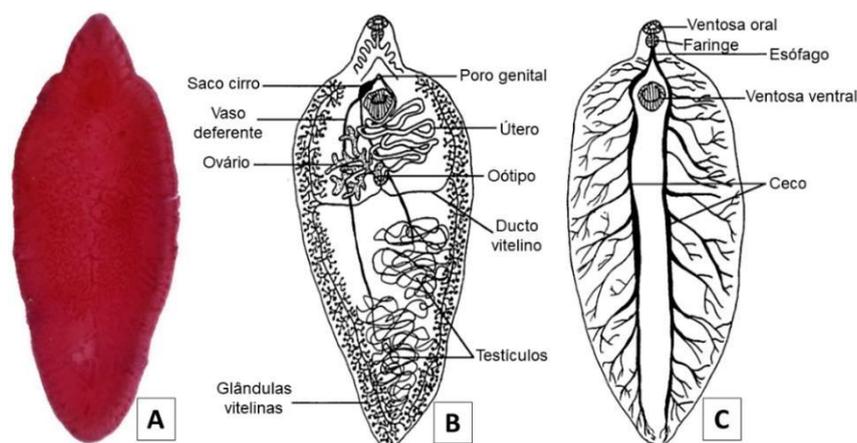


Figura 2: *Faciola hepatica* (A) (Laboratório de Parasitologia do INIAV), diagrama do parasita adulto com as estruturas principais (B) e (C) (Adaptado de Andrews, 1999).

3.2.1 Tegumento

O tegumento é das estruturas mais importantes na biologia do parasita, visto que é através desta superfície que se dá o contacto e se realizam trocas com o hospedeiro (Toet *et al.*, 2014).

Este consiste numa camada acelular basófila, mais ou menos homogénea, cuja espessura varia entre 7 e 16 μm (González, 2001). Trata-se de uma membrana de organização sincicial, unida por filamentos citoplasmáticos a corpos celulares nucleados localizados no parênquima corporal. Exteriormente, o tegumento encontra-se revestido por uma membrana plasmática que contém um espesso glicocálice (Fairweather, 2011; Toet *et al.*, 2014). Toda a área corporal é coberta por espinhos, firmemente ligados à membrana plasmática basal, que auxiliam a fixação do parasita nos ductos biliares e ajudam no processo de alimentação ao perfurarem o epitélio e os vasos sanguíneos (Fairweather *et al.*, 1999).

Esta camada é um tecido vivo complexo e metabolicamente ativo, onde ocorrem importantes interações bioquímicas, fisiológicas e imunes, onde se destacam as seguintes funções: síntese e excreção de várias substâncias; absorção de nutrientes; osmorregulação; proteção contra o sistema imune do hospedeiro e enzimas digestivas; capacidade sensorial (Fairweather *et al.*, 1999; Goater *et al.*, 2014). Sendo uma das estruturas com maior capacidade de absorção e mais exposta à ação de anti-helmínticos é considerada um tecido alvo para a atuação destes fármacos. Para além disso, como o tegumento se encontra continuamente exposto ao sistema imune do hospedeiro é também apontado como um potencial alvo para a ação de vacinas. Assim, a integridade da membrana plasmática e do tegumento sincicial são fundamentais para a sobrevivência deste trematode (McKinstry *et al.*, 2003; Ravidà *et al.*, 2016).

3.2.2 Sistema digestivo

F. hepatica apresenta um sistema digestivo simples incompleto (González, 2001; Goater *et al.*, 2014).

Na zona anterior encontramos a boca, rodeada por uma ventosa oral muscular, que se liga a uma faringe muscular que comunica com o esófago. O esófago, no seu extremo posterior, bifurca-se em dois ramos intestinais cegos (cecos) (Hendrix & Robinson, 2012). Os cecos intestinais, que se estendem até ao limite posterior do corpo, são muito ramificados lateralmente formando os chamados divertículos (ramificações de aspeto arboriforme) (González, 2001; Mehlhorn, 2016b).

Estes trematodes alimentam-se de sangue e detritos tecidulares provenientes da descamação do epitélio superficial dos ductos biliares hipertrofiados. Depois de ingeridos, os alimentos são digeridos e absorvidos no ceco (Urquhart *et al.*, 1996).

As formas de *F. hepatica* não possuem ânus, sendo a excreção dos alimentos digeridos feita por regurgitação dos conteúdos cecais (Hendrix & Robinson, 2012).

3.2.3 Sistema excretor

O sistema excretor é do tipo protonefrídio, constituído por células de flama ciliadas que transferem os resíduos metabólicos ao longo de um sistema de tubos coletores que se juntam e desembocam numa bexiga excretora que comunica com o exterior através de um poro localizado no extremo posterior do corpo (González, 2001; Goater *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2016).

Para além deste sistema, a remoção de desperdícios metabólicos para o exterior também ocorre por difusão, através da superfície externa, via lúmen intestinal. O principal produto de excreção, os metabólitos azotados, são libertados sob a forma de amoníaco (Goater *et al.*, 2014).

O processo de excreção inclui a remoção dos produtos do metabolismo, a regulação da pressão osmótica e iónica interna e a remoção de substâncias desnecessárias ou prejudiciais. Assim, o sistema excretor desempenha também funções de osmorregulação (Roberts & Janovi, 2009).

3.2.4 Sistema nervoso

Este trematode apresenta um sistema nervoso simples (Taylor *et al.*, 2016), formado por um cérebro primitivo anterior, a partir do qual se prolonga pelo menos um par de nervos longitudinais, ligados em intervalos por comissuras laterais. O sistema nervoso periférico, altamente organizado, encontra-se ligado ao tegumento, às camadas musculares, intestino e sistema reprodutor. Os neurotransmissores são aqueles que comumente estão associados aos animais vertebrados, como por exemplo a acetilcolina, noradrenalina, dopamina e serotonina (Goater *et al.*, 2014). Mousley *et al.*, 2005 (citado por Goater *et al.*, 2014) descreve a variedade de neuropéptidos existentes nos Platyhelminthes e o seu papel como alvos para atuação dos antiparasitários.

Apesar da dificuldade em compreender o funcionamento da fisiologia sensorial deste organismo, devido às suas pequenas dimensões, acredita-se que as funções dos órgãos sensoriais externos incluem a mecanorreção, quimiorreção e osmorreção (Goater *et al.*, 2014).

3.2.5 Sistema reprodutor

F. hepatica, sendo um parasita hermafrodita, possui tanto órgãos reprodutores masculinos como femininos (Hendrix & Robinson, 2012). A reprodução dá-se por fertilização cruzada, no entanto também pode ocorrer autofecundação (Bowman, 2014).

No sistema reprodutor masculino estão presentes dois testículos ramificados que ocupam a parte média do corpo. Os espermatozoides produzidos abandonam os testículos pelos vasos deferentes, que se fundem para formar a vesícula seminal localizada no interior da bolsa do cirro (Goater *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2016). Da vesícula seminal, os espermatozoides passam para o ducto ejaculatório que se encontra rodeado por células da glândula prostática e que comunica com o cirro (órgão copulador). Este último, abre-se para o exterior através do poro genital comum, anterior à ventosa ventral (Fairweather *et al.*, 1999). Durante a cópula, o cirro entra no gonoporo e o esperma é libertado para o trato reprodutor feminino ficando armazenado no recetáculo seminal (Goater *et al.*, 2014).

No sistema reprodutivo feminino existe apenas um ovário, muito ramificado, localizado anteriormente aos testículos e que ocupa o lado direito do corpo (Roberts & Janovi, 2009). Os óvulos, produzidos pelo ovário, seguem pelo oviduto e são fertilizados aquando da sua passagem pelo recetáculo seminal. O zigoto diploide então formado é transportado para o oótipo. Aqui desemboca também o ducto vitelino que recebe os produtos formados pelas glândulas vitelogéneas, dispersas ao longo das margens laterais do corpo, que produzem o vitelum e elementos que participam na formação da casca de ovo (González, 2001; Taylor *et al.*, 2016). O oótipo está rodeado pelas glândulas de Mehli's que libertam enzimas que endurecem a casca do ovo à medida que este passa do oótipo para o útero (Goater *et al.*, 2014). Os ovos armazenados no útero são eliminados através do poro genital comum para o meio ambiente juntamente com as fezes do hospedeiro (Hendrix & Robinson, 2012).

3.3 Ciclo biológico

F. hepatica apresenta um ciclo de vida heteroxeno (Figura 3), que envolve dois hospedeiros, um hospedeiro definitivo mamífero e um gastrópode aquático da família Lymnaeidae como hospedeiro intermediário (Andrews, 1999; Loker & Hofkin, 2015).

As formas adultas parasitam os canais biliares dos animais infetados e expulsam os ovos não embrionados juntamente com as fezes. Uma vez no ambiente, e em contacto com a água, os ovos embrionam e liberta-se o miracídio ciliado móvel que procura um hospedeiro intermediário disponível para invadir. Este processo, à temperatura ótima de 22-26 °C, demora aproximadamente nove dias, podendo acelerar ou abrandar dependendo da temperatura ser

mais elevada ou mais baixa. No interior da cavidade corporal do caracol, ocorre a reprodução assexuada do parasita que passa pelas várias fases de desenvolvimento larvar, num processo de poliembrionia: esporocisto, rédias e cercárias. As cercárias abandonam o caracol e movimentam-se de forma livre na água até enquistarem na vegetação aquática sob a forma de metacercária (forma infetante). A evolução desde do miracídio até à metacercária dura cerca de seis a sete semanas (Urquhart *et al.*, 1996; Mitchell, 2007; Taylor *et al.*, 2016; Constable *et al.*, 2017).

O hospedeiro definitivo infeta-se ao alimentar-se do pasto contaminado com metacercárias. Estas, depois de ingeridas, desenquistam no duodeno, penetram a parede intestinal e migram pela cavidade peritoneal até atingir o fígado e os canais biliares onde alcançam a maturidade sexual (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012; Beesley *et al.*, 2018).

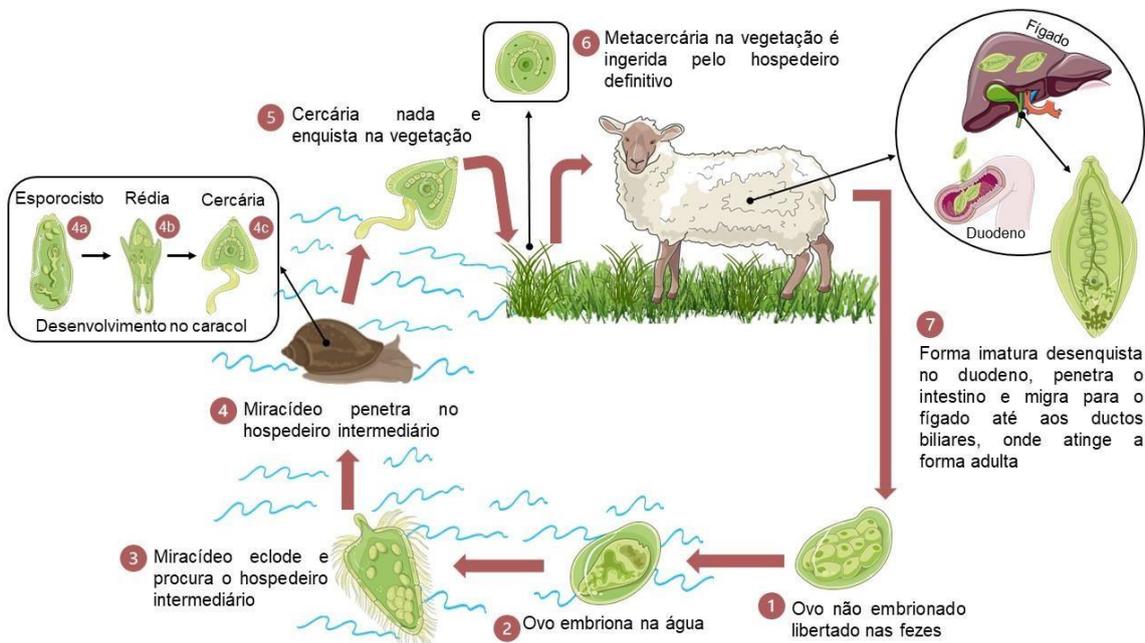


Figura 3: Ciclo de vida *Fasciola hepatica*.

3.3.1 Ovo

Os ovos de *F. hepatica* têm forma oval (Figura 4), apresentam um opérculo num dos polos e medem entre 130 a 150 µm de comprimento e 60 a 90 µm de largura (Hendrix & Robinson, 2012). A casca é grossa e lisa e, graças à bilis, apresenta uma pigmentação amarelo-acastanhada característica (González, 2001; Hendrix & Robinson, 2012).

Segundo Vázquez & Pérez, (2001) o parasita adulto elimina entre dois e cinco mil ovos por dia, no entanto Loker & Hofkin, (2015) referem que a produção de ovos pode superar os 20 mil ovos diários. Este número está dependente de fatores relacionados com o hospedeiro (espécie do

hospedeiro, a duração da infecção, situações de reinfeções, intensidade parasitária e variabilidade individual) e com o próprio trematode. A expulsão dos ovos para o meio ambiente não é um processo constante, e apesar de ocorrer durante todo o ano, observa-se alguma sazonalidade com um aumento durante a primavera e o outono (Vázquez & Pérez, 2001).

No momento da postura, os ovos não embrionados contêm no seu interior um óvulo fecundado e um conjunto de células vitelinas envoltas por uma cápsula operculada (Bowman, 2014; Mas-Coma *et al.*, 2019). O processo de desenvolvimento embrionário depende da existência de fatores termo-higrométricos adequados (Vázquez & Pérez, 2001). Os limites térmicos para o desenvolvimento do ovo situam-se entre os 10 °C e os 30 °C, sendo que à temperatura de 10°C este processo dura cerca de 23 semanas, e à temperatura de 30 °C fica completo em 8 dias. Acima de 30 °C o desenvolvimento abranda, parando por completo aos 37 °C (Roberts & Janovi, 2009). A tolerância a baixas temperaturas é reduzida, ocorrendo a morte dos ovos a temperaturas de -5 °C e -15 °C em 17 dias e 24 horas, respetivamente. O valor de pH ideal é de 7, contudo tolera variações entre 4,2 a 9,0. A existência de água e de um ambiente aeróbico é essencial, para tal é necessário o ovo separar-se da massa fecal e ficar coberto por uma película de água (Andrews, 1999; Vázquez & Pérez, 2001).

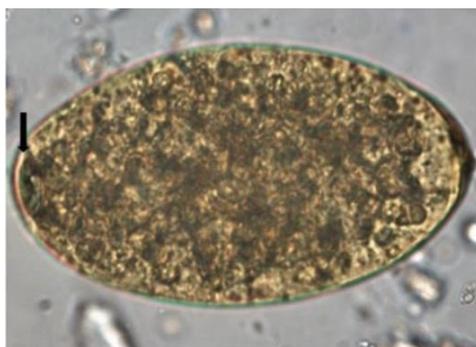


Figura 4: Ovo de *Fasciola hepatica*. Opérculo indicado pela seta preta (Adaptado de Bowman, 2014).

3.3.2 Miracídio

A eclosão do miracídio (Figura 5A) é estimulada pela ação da luz azul-violeta (450-550 nm). Quando exposto a este estímulo luminoso, o miracídio liberta enzimas proteolíticas que atuam sobre a união do opérculo com a casca do ovo, convertendo ao mesmo tempo o gel que se encontra dentro do ovo numa solução coloidal, aumentando assim o volume no seu interior. Este aumento da pressão provoca a quebra do opérculo já fragilizado pela ação das enzimas, permitindo a saída do miracídio para o exterior (Goater *et al.*, 2014). Após a eclosão, o miracídio tem aproximadamente 20 a 30 horas para encontrar um gastrópode aquático antes que as reservas de glicogénio se esgotem (Mehlhorn, 2016b). Neste processo de busca, estão

implicados estímulos quimiotáticos que envolvem a temperatura, o pH, concentração de oxigénio, composição iónica, salinidade e turbidez da água (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

O miracídio tem aspeto piriforme (Roberts & Janovi, 2009), atinge o comprimento de 130 µm e é constituído por um sistema nervoso, um sistema excretor rudimentar e um conjunto de células germinativas (Mehlhorn, 2016b). O seu corpo encontra-se revestido por cílios, que lhe conferem mobilidade no meio aquático (Hendrix & Robinson, 2012).

No extremo anterior possui uma papila cónica que utiliza para aderir por sucção ao caracol e penetrar nos seus tecidos, auxiliado pela ação de enzimas citolíticas (Taylor *et al.*, 2016). No processo de penetração, que dura cerca de 30 minutos, o miracídio perde os seus cílios e migra para a gónada ou glândula digestiva onde se transforma em esporocisto (Urquhart *et al.*, 1996; Bowman, 2014).

3.3.3 Esporocisto

O esporocisto, localizado no hepatopâncreas do gastrópode (Mitchell, 2007), constitui o primeiro estágio larvar de *F. hepatica* no interior do hospedeiro intermediário. Consiste numa bolsa, com cerca de 0,5 mm, que contém células germinativas indiferenciadas que darão origem a rédias (Mehlhorn, 2016b; Taylor *et al.*, 2016). Não possui boca nem sistema digestivo, alimentando-se através da absorção de nutrientes dos tecidos do molusco, com o qual está em íntimo contacto (Roberts & Janovi, 2009).

3.3.4 Rédia

As rédias de primeira geração desenvolvem-se em 15 dias após a formação do esporocisto (Vázquez & Pérez, 2001) e crescem até romperem a parede do esporocisto sendo libertadas para os tecidos do caracol (Bowman, 2014).

Apresentam uma forma cilíndrica (Andrews, 1999), com dimensões que variam entre 1,5 e 2 mm, e possuem uma ventosa oral, uma faringe e um intestino não ramificado (Mehlhorn, 2016b). Alimentam-se dos tecidos da glândula digestiva do molusco (Vázquez & Pérez, 2001). O seu corpo contém um elevado número de células germinativas que darão origem ao último estágio larvar, as denominadas cercárias. Na presença de condições ambientais desfavoráveis para o caracol, são frequentemente geradas rédias de segunda, terceira e até quarta geração (Rondelaud *et al.*, 2009).

As migrações larvares podem provocar lesões graves no hospedeiro intermediário e até a morte em situações de infeções muito intensas (Andrews, 1999).

3.3.5 Cercária

A cercária (Figura 5B), formada por um corpo discoide e uma cauda longa, assemelha-se a um girino. O seu corpo mede 250 a 350 μm de comprimento e a cauda aproximadamente o dobro (Andrews, 1999). Esta forma evolutiva corresponde a uma forma juvenil de *F. hepatica*, que apresenta alguns órgãos característicos do parasita adulto, nomeadamente a ventosa oral e ventral, boca, faringe, intestino bifurcado, canais excretores com células de flama e órgãos reprodutores primitivos (Roberts & Janovi, 2009; Bowman, 2014).

As cercárias maduras abandonam as rédias pelo poro de nascimento e deslocam-se para os tecidos do hospedeiro intermediário de onde emergem para a água circundante (Bowman, 2014). No meio aquático, nadam durante um curto período de tempo (aproximadamente uma hora), até encontrarem vegetação próxima do nível da água para se fixarem. Uma vez fixadas, perdem a cauda e começam a segregar mucoproteínas que irão formar um invólucro protetor em seu redor, enquistando-se e adotando uma forma resistente e infetante designada por metacercária (Urquhart *et al.*, 1996; Hendrix & Robinson, 2012; Mehlhorn, 2016a). As cercárias podem enquistar livremente na água se não encontrarem plantas, ou outros substratos (rochas, paus) aos quais se fixar (Roberts & Janovi, 2009).

O número de cercárias libertadas por cada gastrópode é muito variável e não depende do número de miracídios que o infetou, podendo cada caracol libertar entre 10 e 4000 cercárias (Vázquez & Pérez, 2001), graças a um processo designado por poliembrionia (Loker & Hofkin, 2015).

3.3.6 Metacercária

A metacercária (Figura 5C) torna-se infetante 24 horas após a sua formação (Mas-Coma *et al.*, 2019). Tem um diâmetro compreendido entre os 200 e os 300 μm , e permanece enquistada no ambiente até à sua ingestão pelo hospedeiro definitivo (Bowman, 2014; Mehlhorn, 2016b).

As metacercárias possuem uma estrutura complexa, apresentando quatro membranas (duas internas e duas externas), que as protegem de influências ambientais desfavoráveis como o frio, calor, seca, bactérias e fungos, possibilitando a sua sobrevivência no exterior por longos períodos de tempo (até 12 meses) (Andrews, 1999; Vázquez & Pérez, 2001; Goater *et al.*, 2014). As metacercárias são pouco resistentes à dessecação e a temperaturas superiores a 25 °C, suportando melhor temperaturas baixas, o que lhes permite resistirem ao inverno (Andrews, 1999; Vázquez & Pérez, 2001).

Este estágio larvar é um elemento importante no ciclo de vida dos trematodes, já que constitui um mecanismo de dispersão adicional do parasita e permite a sua sobrevivência durante períodos em que os hospedeiros do ciclo de vida estão ausentes (Goater *et al.*, 2014).

São necessárias seis a sete semanas para que o desenvolvimento de miracídio a metacercária se complete, prolongando-se este tempo por vários meses na inexistência de condições favoráveis (Urquhart *et al.*, 1996).



Figura 5: Miracídio (A), cercária (B) e metacercária (C) (Adaptado de Taylor *et al.*, 2016).

3.3.7 Da metacercária à forma adulta

O desenquistamento das metacercárias, após a sua ingestão pelo hospedeiro definitivo, acontece em duas fases: uma fase de ativação seguida por uma fase de emergência (González, 2001). A primeira, tem início no rúmen, induzida pelas elevadas concentrações de dióxido de carbono, ambiente redutor e temperaturas de aproximadamente 39 °C (Dixon, 1966; Andrews, 1999;). As proteases presentes no rúmen digerem a parede quística externa (Cwiklinski *et al.*, 2018). A segunda, ocorre no intestino delgado, logo abaixo do canal colédoco e é iniciada por uma substância química presente na bÍlis, o ácido glicocólico, que induz fortes espasmos no parasita, possibilitando a sua libertação da parede interna do quisto (Dixon, 1966; Sukhdeo & Mettrick, 1986; Forbes, 2017). A existência de um ambiente intestinal com baixo potencial de oxidação redução, temperaturas de 39 °C, tensão de dióxido de carbono e pH neutro são também fatores importantes para o desenquistamento da *F. hepatica* juvenil (Roberts & Janovi, 2009; Cwiklinski *et al.*, 2018).

Os movimentos musculares da forma jovem desencadeados pela estimulação da bÍlis, juntamente com a secreção de enzimas lÍticas, permitem que a larva penetre a parede intestinal e entre assim na cavidade peritoneal. Com a ajuda da ventosa oral e ventral, adere ao endotélio e movimenta-se ao longo deste até atingir o fÍgado (Loker & Hofkin, 2015; González-Miguel *et al.*, 2021). Em hospedeiros definitivos menos específicos e como consequência de uma elevada carga parasitÁria, podem ocorrer migrações erráticas, em que a forma parasitÁria jovem atravessa o peritoneu visceral e é transportada pela corrente sanguínea até aos pulmões, útero, gânglios linfáticos e pele (Vázquez & Pérez, 2001).

São necessárias cerca de duas horas desde a ingestão da metacercária até à entrada da forma imatura na cavidade peritoneal, e cerca de seis dias para que esta chegue ao fÍgado, onde inicia o seu processo de histofagia e liberta enzimas proteolÍticas que degradam a matriz extracelular

do fígado (Mas-Coma *et al.*, 2019; Lalor *et al.*, 2021). Após seis a sete semanas de permanência no parênquima hepático, o trematode jovem entra nos dutos biliares menores, onde amadurece durante quatro semanas, migrando posteriormente para o dutos biliares maiores e ocasionalmente para a vesícula biliar (Mitchell, 2007). O período pré patente é de 10 a 12 semanas e o tempo mínimo para que o ciclo de vida se complete é de 17 a 19 semanas (Taylor *et al.*, 2016). Nos ovinos não tratados, o parasita apresenta uma larga longevidade, podendo atingir os 11 anos (Roberts & Janovi, 2009; Mas-Coma *et al.*, 2019).

Apesar de ser um processo de suma importância na fisiopatologia da fasciolose, os mecanismos que regem a migração de *F. hepatica* não são ainda totalmente conhecidos (Moazeni & Ahmadi, 2016; González-Miguel *et al.*, 2021).

3.4 Hospedeiro definitivo

A espécie *F. hepatica* parasita uma larga variedade de hospedeiros definitivos incluindo o homem (Beesley *et al.*, 2018).

Os ruminantes domésticos (ovinos, caprinos e bovinos) constituem os hospedeiros preferenciais (Mas-Coma *et al.*, 2005) contudo, os suínos, equinos e camelídeos são também espécies alvo deste parasita (Forbes, 2017). Para além dos animais domésticos, *F. hepatica* tem também a capacidade de infetar animais silváticos como a lebre, o coelho, os cervídeos ou o javali (Vázquez & Pérez, 2001), tendo até já sido reportados casos em roedores (Ménard *et al.*, 2000) e em aves (Vaughan *et al.*, 1997). Os animais silváticos, em muitos casos, atuam como reservatórios da doença (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012; Caminade *et al.*, 2015).

A receptividade dos hospedeiros definitivos à infeção por *F. hepatica* é variável, podendo estes ser agrupados em três grupos em função da sua suscetibilidade: os de alto, médio e baixo nível de resistência. O primeiro grupo engloba os animais que combatem rapidamente a infeção, eliminando as formas jovens durante a migração hepática e as formas adultas que se estabelecem acabam por encapsular, como é o caso do cão, do gato, do porco e do javali. O segundo grupo, inclui os bovinos, equídeos e o homem, que reagem tardiamente à infeção, quando o parasita já está instalado no fígado. Estes animais desenvolvem alguma resistência à reinfeção graças a uma extensa fibrose hepática que dificulta a alimentação do parasita. No terceiro grupo, temos as espécies mais recetivas, observando-se elevada produtividade parasitária e patogenicidade, como é o caso dos ovinos, caprinos e lagomorfos. Estes, por sua vez, não desenvolvem resistência à reinfeção já que, apesar de haver uma reação tecidual, não existe produção de tecido fibroso, nem reação celular suficiente para imobilizar ou destruir o parasita (Gomes, 2012).

Apesar dos anticorpos circulantes anti-*F. hepatica* serem facilmente detetáveis em ovinos (Taylor *et al.*, 2016), não existe evidência de imunidade adquirida contra *F. hepatica*, podendo ocorrer situações em que uma fasciolose aguda se sobrepõe a uma infecção crónica pré-existente (Forbes, 2017).

De acordo com Vázquez & Pérez (2001), a prevalência da infecção na espécie ovina é superior a qualquer outra espécie de hospedeiro definitivo, justificada pelos seus hábitos alimentares, uma vez que se alimentam de porções mais baixas da vegetação onde existe maior concentração de metacercárias.

3.5 Hospedeiros intermediários

Os hospedeiros intermediários envolvidos na transmissão de *F. hepatica* são gastrópodes de água doce da família Lymnaeidae, com especial relevância para as espécies pertencentes ao género *Galba/Fossaria* (Mas-Coma *et al.*, 2019).

A distribuição geográfica dos trematodes varia em função da distribuição geográfica dos seus hospedeiros intermediários. Assim, também no caso de *F. hepatica* a gama de possíveis hospedeiros intermediários varia dependendo das espécies de gastrópodes prevalentes nas diferentes regiões do mundo (Tabela 1) (Graczyk & Fried, 1999).

Galba truncatula (anteriormente conhecida como *Lymnaea truncatula*) é o principal vetor na Europa, encontrando-se também presente em África, Ásia e América do Sul (Mas-Coma *et al.*, 2019).

Em Portugal, ainda que nas áreas de fasciolose várias espécies de *Lymnaea* (*Lymnaea peregra*, *Lymnaea palustris*, *Lymnaea stagnalis*, *Lymnaea auricularia*) possam coexistir, além de *G. truncatula* e *Physa acuta*, há estudos que demonstraram que apenas *G. truncatula* é suscetível e é a única que se encontra parasitada na natureza (Conceição, 2001 referido por Gomes, 2012).

A nomenclatura dos géneros na sistemática da família Lymnaeidae é controversa e sofreu diversas alterações ao longo dos tempos, não existindo ainda consenso científico na definição dos seus critérios de classificação (Bargues *et al.*, 2003; Vinarski *et al.*, 2019). A maioria dos nomes não são fixos e são baseados mais em semelhanças fenotípicas do que em características evolutivas e filogenéticas. A uniformidade morfológica e anatómica interespecífica das espécies pertencentes a esta família torna difícil e muitas vezes impossível a sua classificação. A correta identificação das espécies é uma ferramenta importante na caracterização das áreas de risco epidemiológico e na compreensão das interações entre o parasita e os gastrópodes assim como da sua evolução (Correa *et al.*, 2010).

Tabela 1: Espécies de hospedeiros intermediários de *F. hepatica* pertencentes à família Lymnaeidae e respetiva distribuição no mundo (Adaptado de Bargues & Mas-Coma, 1997; Bargues *et al.*, 1997; Bargues *et al.*, 2001; Bargues, 2005).

Hospedeiros Intermediários principais ou obrigatórios	
Espécie	Distribuição no globo
<i>Galba truncatula</i>	Europa
<i>Galba truncatula</i> , <i>Pseudosuccinea columella</i>	África
<i>Galba truncatula</i> , <i>Austropeplea ollula</i>	Ásia
<i>Fossaria humilis</i> , <i>Fossaria bulimoides</i> , <i>Fossaria cubensis</i>	América do Norte
<i>Galba truncatula</i> , <i>Fossaria viatrix</i> , <i>Lymnaea diaphana</i> , <i>Fossaria cubensis</i>	América do Sul
<i>Fossaria cubensis</i> , <i>Pseudosuccinea columella</i>	América Central
<i>Lymnaea tomentosa</i>	Austrália
<i>Lymnaea tomentosa</i> , <i>Pseudosuccinea columella</i> , <i>Galba truncatula</i>	Nova Zelândia
<i>Austropeplea ollula</i>	Havai, Papua Nova Guiné, Filipinas, Japão
Hospedeiros intermediários alternativos ou facultativos	
Espécie	Distribuição no globo
<i>Omphiscola glabra</i> , <i>Lymnaea (Stagnicola) palustris</i> , <i>Catascopia oculata</i> ,	Europa
<i>Pseudosuccinea columella</i>	América do Norte e América do Sul
<i>Pseudosuccinea columella</i> , <i>Austropeplea ollula</i>	Austrália
<i>Radix gedrosiana</i>	Irão

3.5.1 Ecologia

G. truncatula (Figura 6) é a espécie mais difundida globalmente e com maior relevância na transmissão de *F. hepatica*. Trata-se de um caracol de pequena dimensão, cuja forma adulta mede aproximadamente 1,0 cm largura. A sua concha, dextrogira, assemelha-se a uma torre enrolada numa série de espirais e apresenta geralmente uma cor castanha escura (Taylor *et al.*, 2016).

Este molusco anfíbio vive em habitats semiaquáticos, com águas paradas ou com pouco movimento, lamas húmidas e solos ligeiramente ácidos. Possui a capacidade de resistir à seca e a baixas temperaturas, enterrando-se na lama por longos períodos de tempo, por mecanismos de estivação e hibernação, respetivamente. A temperatura ótima de crescimento situa-se entre

os 15 °C e os 22 °C, cessando a temperaturas abaixo dos 5 °C. (Taylor *et al.*, 2016; Beesley *et al.*, 2017; Howell & Williams, 2020).

Do ponto de vista ecológico, os seus habitats podem dividir-se em dois grupos: focos primários e áreas de extensão (Carrada-Bravo, 2003). Os focos primários correspondem a áreas constantemente húmidas, como é o caso das margens de rios ou lagoas e dos cursos de água de baixo caudal, onde os moluscos se reproduzem continuamente. Nestes locais a população de caracóis mantém-se constante e em quantidade relativamente reduzida (Carrada-Bravo, 2003; Taylor *et al.*, 2016). As inundações ou chuvas intensas, originam áreas de extensão a partir dos focos primários, que provocam grandes concentrações de moluscos, que são transportados pelas enchentes ou reativados após períodos de estivação devido à seca (Carrada-Bravo, 2003).

Para além destas situações, existem também os habitats temporários, formados por qualquer tipo de depressão (sulco, marca de casco ou roda) com capacidade de reter água em quantidades adequadas para o estabelecimento do ciclo durante os períodos de chuvas e que originam focos de infeção. Assim, os habitats temporários ou de extensão possuem especial relevância nas áreas de pastagem por constituírem zonas enzoóticas onde ocorrem surtos graves de fasciolose (Carrada-Bravo, 2003; Bowman, 2014).

As características do solo podem variar drasticamente mesmo a curtas distâncias, favorecendo a concentração de moluscos e metacercárias em determinadas áreas, enquanto o resto da pastagem continua segura (Bowman, 2014).



Figura 6: Exemplar de *Galba truncatula* (Mrkvicha, 2009).

3.6 Distribuição geográfica

A espécie *F. hepatica* tem uma ampla distribuição geográfica, estando presente em áreas focais em mais de 70 países, em todos os continentes, exceto na Antártica (CDC, 2019). Apesar de amplamente difundida no continente Europeu e em muitas outras partes do mundo, a sua

distribuição espacial é desigual e apresenta grandes variações regionais em termos de prevalência (Beesley *et al.*, 2018).

Este trematode, originário do continente europeu e possuidor de uma enorme capacidade de adaptação, colonizou novas áreas geográficas e climas, apresentando atualmente uma distribuição global, com especial predominância nos climas temperados e subtropicais, nomeadamente na Europa, América do Norte, Central e do Sul, Ásia Central e do Norte, Oceânia, Norte, Leste e Sul de África, e também grandes ilhas, incluindo Nova Zelândia, Tasmânia, Reino Unido, Islândia, Chipre, Córsega, Sardenha, Sicília, Japão, Papua Nova Guiné, Filipinas e várias ilhas das Caraíbas (Figura 7) (Andrews, 1999; Mas-Coma *et al.*, 2009a; Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

O sucesso da sua expansão para outras partes do globo está relacionado com a disseminação geográfica do hospedeiro intermediário europeu *G. truncatula*, a propagação da espécie secundária americana *Pseudosuccinea columella*, e a adaptação do parasita a outras espécies de Lymnaeidae autóctones das áreas recém-colonizadas. Para além destes fatores, a exportação e movimentação de gado e outros animais para os cinco continentes e a capacidade do parasita de se adaptar a novas espécies passando a infetar uma maior variedade de hospedeiros, foram também fatores importantes na sua disseminação (Mas-Coma *et al.*, 2005; Mas-Coma *et al.*, 2009a)

A vasta distribuição de *F. hepatica*, que vai desde zonas localizadas abaixo do nível do mar, como na área do Mar Cáspio, até regiões de altitudes muito elevadas, como por exemplo o Paso del Condor na Venezuela com 4200 metros de altitude, espelham a sua capacidade de adaptação a ambientes, habitats e climas muito diversos e extremos. Atualmente, a fasciolose é a doença transmitida por vetores com maior distribuição latitudinal, longitudinal e altitudinal de que há conhecimento (Mas-Coma *et al.*, 2019).

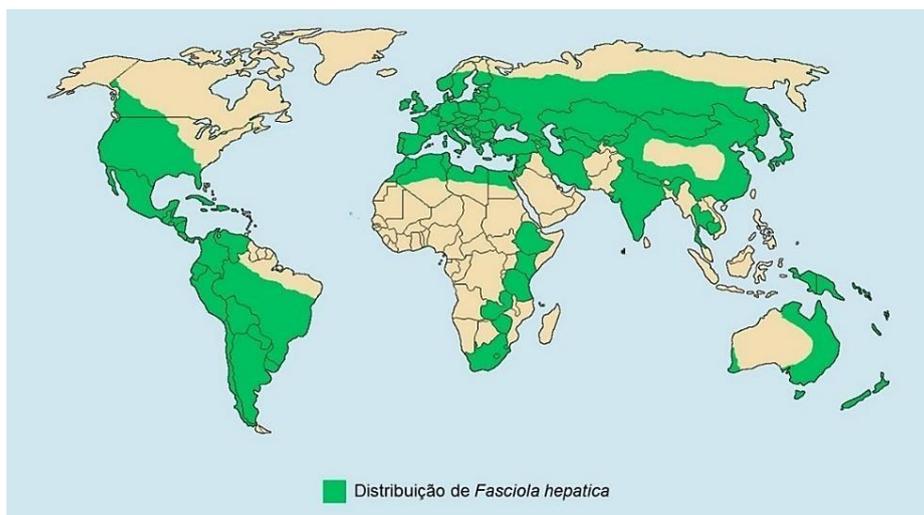


Figura 7: Distribuição de *Fasciola hepatica* no mundo (Adaptado de Santos, 2012).

3.7 Epidemiologia

O desenvolvimento de *F. hepatica*, assim como dos ovos, das formas larvares e do seu hospedeiro intermediário dependem em grande medida das condições geoclimáticas, ecológicas como a altitude, precipitação, temperatura, evapotranspiração, humidade, vegetação e tipo de solo (Beesley *et al.*, 2018) e antropogénicas, sobretudo o grau de conhecimento por parte dos agricultores sobre o controlo da doença e os fatores relacionadas com a gestão das explorações e o modo de exploração pecuário, nomeadamente as práticas de gestão das pastagens e de manejo dos rebanhos (Bennema *et al.*, 2011; Mehmood *et al.*, 2017).

As condições de humidade ideais são alcançadas quando a chuva excede a evapotranspiração e a saturação do meio ambiente é atingida. Estas condições favorecem a reprodução do hospedeiro intermediário, a incubação dos ovos, a procura de caracóis por parte dos miracídios e a dispersão das cercárias após a sua eliminação (Urquhart *et al.*, 1996; Mitchell, 2007). A incidência do parasita está intrinsecamente ligada à elevada pluviosidade e é particularmente prevalente nos anos em que as chuvas nos meses de verão são mais abundantes (Taylor, 2012).

Por outro lado, em algumas zonas quentes e secas, observam-se valores de prevalência relativamente elevados da doença provocados pela aglomeração de animais ao longo das margens de riachos, lagoas e pontos de abeberamento. Nestes locais, onde ocorrem condições favoráveis ao desenvolvimento do hospedeiro intermediário, o intenso pastoreio por animais infetados aumenta a probabilidade dos caracóis se infetarem. A vegetação nestas zonas é suscetível de estar fortemente contaminada por metacercárias, surgindo assim um importante foco de infeção (Urquhart *et al.*, 1996; Torgerson & Claxton, 1999; Carrada- Bravo, 2003).

A reprodução dos moluscos e o desenvolvimento de *F. hepatica* no seu interior requer uma temperatura média diurna/noturna de 10 °C ou superior, cessando toda a atividade a 5 °C. Este intervalo de temperaturas é também favorável ao desenvolvimento e eclosão dos ovos de *F. hepatica*. No entanto, quando as temperaturas sobem para 15 °C ocorre uma multiplicação considerável do hospedeiro intermediário e das formas larvares do trematode (Taylor *et al.*, 2016).

Tanto os ovos de *F. hepatica* como as metacercárias resistem durante o inverno, contudo, estas últimas, apresentam baixa resistência à seca e a temperaturas elevadas, podendo, no entanto, sobreviver vários meses no feno. A ingestão de feno cultivado em prados infestados, pode originar casos de fasciolose longe do local de origem de um surto (Urquhart *et al.*, 1996; Carrada- Bravo, 2003).

Nos países da Europa Ocidental, as condições climáticas ótimas ao desenvolvimento do parasita vão de maio a outubro. Em Portugal, estas condições acontecem praticamente durante todo o

ano, excetuando os meses mais quentes e secos do verão (Caminade *et al.*, 2015). Nas regiões secas, as altas temperaturas sentidas no verão garantem um baixo risco de infecção. O início das chuvas outonais, acompanhadas de temperaturas amenas, oferece as condições ideais para o aumento do risco de transmissão (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

Nas zonas temperadas do hemisfério norte, a concentração máxima de metacercárias na pastagem acontece no final do verão e outono (agosto a outubro), devido à infecção dos caracóis no verão, e as manifestações clínicas aparecem, normalmente, no fim do outono e durante o inverno. Assim, o outono corresponde ao período de máximo risco de infecção para os hospedeiros definitivos para além de que também coincide com o momento de esgotamento dos pastos e o aproveitamento das zonas de regadio, onde há maior densidade de metacercárias (Vázquez & Pérez, 2001). As infecções dos gastrópodes no verão surgem de miracídeos que eclodiram de ovos eliminados na primavera e início do verão, ou de ovos que sobreviveram ao inverno (Urquhart *et al.*, 1996).

A infecção dos caracóis também pode ocorrer durante o inverno, no entanto apresenta menor relevância que a infecção de verão. Neste caso, as metacercárias aparecem na pastagem na primavera (maio a junho) e os animais são infetados mais cedo. Estas resultam de caracóis que foram infetados no outono anterior e cujo desenvolvimento larval foi interrompido durante o período de hibernação de inverno do hospedeiro (Urquhart *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2016). Em invernos amenos, a resistência das metacercárias a condições ambientais desfavoráveis contribui para a contaminação do pasto na primavera (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

Importa lembrar outros fatores que contribuem para a dinâmica epidemiológica de *F. hepatica*, como a ocorrência de animais cronicamente infetados que levam à contaminação contínua dos pastos, situações de infecções massivas em ovelhas cuja eliminação de ovos por dia pode ascender aos dois a cinco milhões de ovos, o elevado potencial biótico dos caracóis capazes de, a partir de um único indivíduo, produzir 25 000 novos exemplares e a ocorrência do fenómeno de poliembrionia e ainda a ampla gama de hospedeiros suscetíveis e a existência de hospedeiros reservatórios (Vázquez & Pérez, 2001).

3.7.1 Alterações climáticas

A natureza do ciclo de vida de *F. hepatica*, fortemente dependente das condições ambientais e dos fatores climáticos, torna este parasita muito vulnerável às alterações do clima, que têm um particular impacto nos estádios de vida livre e nos hospedeiros intermediários (Kenyon *et al.*, 2009; Mas-Coma *et al.*, 2009).

Os climas temperados, como o Europeu, têm registado um aumento das temperaturas, com invernos mais quentes, curtos e húmidos, conducentes a alterações nos padrões

epidemiológicos da doença e aumento da prevalência, como é o caso do Reino Unido (Fox *et al.*, 2011; Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

Alguns estudos sugerem que, até ao final do século, poderá haver um aumento adicional de 4°C, tendo-se já observado um aumento de 1 °C entre 1961 e 2004. O aumento da temperatura tem por consequência um prolongamento da época de crescimento das pastagens e uma redução do número de dias de geada. A existência de invernos mais amenos permite a presença de metacercárias durante todo o inverno e a sobrevivência dos gastrópodes responsáveis pela libertação e contaminação dos pastos com cercárias na primavera. Deste modo, os animais encontram-se expostos à infeção por períodos de tempo mais longos (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

O modelo de simulação climática criada por Caminade *et al.*, (2015) para o espaço temporal entre 2020 e 2080, revelou um aumento significativo da propagação da fasciolose para o centro e noroeste da Europa, com uma distribuição a norte em expansão. O mesmo estudo mostra ainda que as mudanças climáticas terão um forte impacto na sazonalidade da doença, prevendo-se que o risco diminua durante os meses mais quentes do verão, devido à seca, e aumente durante os meses amenos do início da primavera e do outono.

3.8 Fasciolose em Portugal

Em Portugal, o parasita pode ser encontrado em praticamente todo o território nacional, graças ao clima temperado que favorece o seu crescimento e propagação, assim como do seu hospedeiro intermediário. *F. hepatica* mostra particular preferência pelas zonas inundáveis e circundantes dos grandes rios, como o Tejo, Minho, Douro, Vouga, entre outros. Também está presente em determinados microclimas no Alentejo, Beira Alta e Beira Baixa e Algarve (Grácio, 1985; Rombert *et al.*, 1991).

Até ao momento, ainda não foi efetuado nenhum estudo que abrangesse todo o país, tendo sido alvo de pesquisa apenas algumas regiões. Os vários estudos, maioritariamente fundamentados em dados de matadouro, confirmaram a presença de fasciolose na zona norte (Leitão, 1965, referido por Levy *et al.*, 2013; Arias *et al.*, 2011), centro e sul de Portugal (Grácio *et al.*, 2011). Para além do continente, também nas ilhas, nomeadamente na região Autónoma da Madeira e na Ilha de São Miguel nos Açores, há registo da existência de fasciolose animal (Fernandes & Torres, 1988; Barbosa *et al.*, 2019).

A presença de *F. hepatica* foi também detetada em exames coprológicos e necrópsias efetuadas a animais silváticos (javali e gamo) da Tapada Nacional de Mafra (Sousa, 2001; Santos, 2013).

Especificamente em ovinos, um estudo coprológico na raça autóctone Churra Galega Mirandesa realizado por Ruano *et al.*, (2019) revelou uma percentagem de animais infetados de 1,8% (num total de 512 animais) na zona noroeste de Portugal (distrito de Bragança).

3.9 Patogenia e sinais clínicos

A patogenia da infeção por *F. hepatica* envolve essencialmente duas fases, a primeira decorre no fígado durante as migrações pelo parênquima hepático, resultando em danos no fígado e hemorragias. Nesta fase, as migrações podem veicular outros agentes infecciosos, provocar obstrução do fluxo biliar e facilitar a multiplicação de agentes infecciosos, como é o caso da bactéria *Clostridium novyi* tipo B. A segunda, ocorre quando o parasita já se estabeleceu nos ductos biliares, estando associada à sua atividade hematófaga e às lesões provocadas pelo tegumento espinhoso na mucosa biliar (Vázquez & Pérez, 2001; Mehlhorn, 2016b; Taylor *et al.*, 2016).

A migração das formas juvenis, do intestino para a cavidade peritoneal, podem ocasionar peritonites e produzir úlceras nas localizações ectópicas (Roberts & Janovi, 2009).

As manifestações clínicas e patológicas da fasciolose estão relacionadas com a espécie de hospedeiro, o número de metacercárias ingeridas e a sua capacidade infetante, a fase de desenvolvimento parasitário, a duração da infeção, o estado nutricional e as necessidades metabólicas do animal (Vázquez & Pérez, 2001; Rojo-Vázquez *et al.*, 2012; Bowman, 2014).

Os danos causados resultam dos efeitos químicos e mecânicos gerados pelo parasita e das respostas inflamatórias e imunológicas induzidas no hospedeiro definitivo. Os efeitos mecânicos advêm das migrações das formas juvenis no fígado, juntamente com a ação irritante das espículas do tegumento. Os efeitos químicos são originados pela atividade das enzimas proteolíticas secretadas, como é o caso das catepsinas (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

A fasciolose é geralmente classificada como aguda, subaguda e crónica (Mitchell, 2007). Esta classificação baseia-se essencialmente nos achados de necrópsia, no número de parasitas encontrados no fígado e no seu estágio de desenvolvimento (Vázquez & Pérez, 2001).

3.9.1 Forma aguda

A fasciolose aguda é menos comum que a fasciolose crónica e é quase sempre observada em ovinos (Mehlhorn, 2016a). Esta forma ocorre cinco a seis semanas após a infeção e manifesta-se pela morte súbita de animais, com boa condição corporal e frequentemente sem sinais clínicos prévios (Constable *et al.*, 2017). Surge por ingestão de um elevado número de metacercárias,

geralmente superior a 4000 (Boray, 1967). Outros autores, no entanto, referem um valor inferior, de 2000 ou mais metacercárias (Urquhart *et al.*, 1996).

Ocorre maioritariamente durante o outono e início do inverno, no entanto pode acontecer a qualquer altura do ano quando os animais se alimentam de pastagens altamente contaminadas (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012; Bowman, 2014). A doença aguda apenas pode ser confirmada pelo exame *post mortem*, uma vez que nesta fase as formas parasitárias são ainda imaturas não sendo por isso capazes de produzir e eliminar ovos (Mitchell, 2007; Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

3.9.1.1 Fisiopatologia e sinais clínicos

A fasciolose aguda resulta essencialmente numa hepatite traumática, frequentemente acompanhada de hemorragias devido à rotura dos vasos sanguíneos, provocadas pela passagem dos estádios imaturos de *F. hepatica* pelo parênquima hepático (Mehlhorn, 2016b; Forbes, 2017). No decorrer das migrações hepáticas, os esporos de *C. novyi* tipo B, quando presentes, podem ser ativados pelo ambiente anaeróbio, causando hepatite necrótica infecciosa (*black disease*) e complicar assim o quadro clínico da fasciolose aguda (Constable *et al.*, 2017).

Os sinais clínicos, quando observáveis, incluem: fraqueza, anorexia, mucosas pálidas ou ictéricas, dor abdominal à palpação, hepatomegalia, ascite e dispneia (Mitchell, 2007; Kahl *et al.*, 2021).

3.9.1.2 Lesões *post mortem*

No exame *post mortem*, verifica-se a presença de um exsudado sanguinolento na cavidade abdominal e aderências generalizadas entre o fígado, parede abdominal, diafragma e intestino delgado (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012; Bowman, 2014).

O fígado encontra-se aumentado de tamanho, hemorrágico e com o parênquima severamente danificado devido às migrações larvares (Figura 8A) (Mitchell, 2007). Possui um aspeto friável, com depósitos de fibrina e exsudado fibrinoso cobrindo a superfície. Esta é irregular, particularmente no lobo ventral (Urquhart *et al.*, 1996; Fiss *et al.*, 2013; Constable *et al.*, 2017).

3.9.2 Forma subaguda

A doença subaguda deve-se à ingestão de um grande número de metacercárias, durante um período de tempo suficientemente longo, acabando por impossibilitar o surgimento de um processo agudo (Vázquez & Pérez, 2001). Aparece geralmente no final do outono e no inverno,

seis a dez semanas após a ingestão de 500 a 1500 metacercárias (Urquhart *et al.*, 1996; Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

A morte dos animais ocorre geralmente uma ou duas semanas após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos (Mitchell, 2007).

3.9.2.1 Fisiopatologia e sinais clínicos

Na fasciolose subaguda, observam-se simultaneamente formas parasitárias nos ductos biliares, onde causam colangite, e formas parasitárias migrantes no parênquima hepático, responsáveis por lesões semelhantes à fasciolose aguda, mas com menor severidade (Taylor *et al.*, 2016).

Nos animais afetados, os sinais clínicos mais evidentes são a perda de peso e a palidez das mucosas (Constable *et al.*, 2017). Frequentemente mostram-se letárgicos, com dificuldades em acompanhar o resto do rebanho e evidenciam dor à palpação da zona anterior do abdômen. Apenas alguns apresentam hepatomegalia palpável (Vázquez & Pérez, 2001). O edema submandibular e ascite também podem estar presentes em alguns casos (Mitchell, 2007; Fiss *et al.*, 2013). Esta forma da doença tem ainda um impacto importante no desempenho reprodutivo das ovelhas, levando a baixas taxas de fertilidade, redução do número de gestações gemelares e partos prolongados (Sargison, 2008).

3.9.2.2 Lesões *post mortem*

Nos casos subagudos, o fígado encontra-se hipertrofiado, apresentando focos necróticos e hemorragias subcapsulares (Taylor *et al.*, 2016). As lesões fibrinosas estendem-se desde a cápsula até ao parênquima, com ductos biliares proeminentes. A superfície de corte do fígado é irregular, evidenciando zonas claras que alternam com zonas hemorrágicas escuras (Figura 8B) (Scott *et al.*, 2005; Rojo-Vázquez *et al.*, 2012; Fiss *et al.*, 2013).

3.9.3 Forma crónica

A fasciolose crónica é a forma mais frequente na espécie ovina (Vázquez & Pérez, 2001) e ocorre quando o parasita adulto atinge os ductos biliares (Molina-Hernández *et al.*, 2015).

É observada no final do inverno e início da primavera, quatro a cinco meses após a ingestão de quantidades baixas a moderadas de metacercárias ao longo de todo o ano, especialmente durante o outono e inverno (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). Em ensaios experimentais, Boray (1967)

demonstrou serem necessárias entre 400 a 500 metacercárias para produzir a forma crónica, contudo Urquhart *et al.*, (1996) refere um intervalo entre 200 a 500.

3.9.3.1 Fisiopatologia e sinais clínicos

A doença crónica progride de forma lenta. A presença e atividade de *F. hepatica* nos ductos biliares provoca colangite, colangiectasia e fibrose (Fouda *et al.*, 2013; Constable *et al.*, 2017).

A apresentação clínica caracteriza-se pelos sinais clínicos clássicos de uma infeção parasitária no fígado (Bowman, 2014). Os animais apresentam perda de apetite, diminuição do ganho de peso e perda progressiva da condição corporal devido à redução na eficiência da conversão de alimentos. As mucosas tornam-se pálidas como consequência da anemia instalada, e a hipoproteinémia conduz a ascite e a edema submandibular (Figura 8C) e subcutâneo. Ao nível do sistema digestivo, os distúrbios são inespecíficos, podendo ocorrer episódios de diarreia aquosa abundante nos casos mais graves. Verifica-se também fraqueza, letargia e relutância ao movimento. A icterícia raramente é observada (Fouda *et al.*, 2013; Bowman, 2014; Mehlhorn, 2016b; Kahl *et al.*, 2021).

A redução da produção e qualidade da lã, que fica áspera, seca e quebradiça, observa-se frequentemente em ovelhas sem sinais aparentes de fasciolose (Mehlhorn, 2016b; Kahl *et al.*, 2021). Podem ocorrer também quebras na produção de leite (Mitchell, 2007).

A fasciolose crónica dificulta a conceção e implantação do feto e parece predispor as ovelhas a algumas doenças metabólicas na época do parto, incluindo hipocalcémia e toxémia (George, 2002; Mehlhorn, 2016b).

A infeção concomitante com o nematode do abomaso *Teladorsagia (Ostertagia) circumcincta* pode agravar o desenrolar da doença (Mitchell, 2007).

3.9.3.2 Lesões *post mortem*

No exame *post mortem*, o fígado dos animais com fasciolose crónica apresenta-se pálido e firme, de contorno irregular, com o lobo ventral mais afetado e reduzido de tamanho (Urquhart *et al.*, 1996). A patologia hepática caracteriza-se pela ocorrência de fibrose e colangite hiperplásica. Estão presentes vários tipos de fibrose, sendo que a primeira a ocorrer é a cicatriz pós-necrótica, encontrada principalmente no lobo ventral e associada à cicatrização das migrações. A segunda, denominada fibrose isquémica, é uma sequela dos danos e trombose dos grandes vasos. A fibrose peribiliar surge por último, desenvolvendo-se quando os parasitas atingem os pequenos ductos biliares (Taylor *et al.*, 2016).

A colangite hiperplásica nos ductos biliares maiores decorre da erosão severa e necrose da mucosa resultante da atividade alimentar dos trematodes (Urquhart *et al.*, 1996).

Os ductos biliares encontram-se distendidos, espessados e podem conter no seu interior numerosos parasitas adultos (Bowman, 2014). A presença de um elevado número de formas parasitárias, a descamação das células epiteliais e a proliferação excessiva de tecido fibroso, podem conduzir à obstrução dos ductos biliares (Taylor *et al.*, 2016; Constable *et al.*, 2017).



Figura 8: Parênquima hepático danificado com presença de tratos tortuosos causados por *Fasciola hepatica* (A) (Ruiz-Campillo *et al.*, 2017), superfície de corte do fígado irregular com áreas claras que alternam com áreas hemorrágicas escuras (B) (Fiss *et al.*, 2013), edema submandibular associado a fasciolose crónica (C) (Boray & Love, 2017).

3.10 Diagnóstico laboratorial

De um modo geral, o diagnóstico da fasciolose reveste-se de alguma dificuldade. Os animais doentes muitas vezes não apresentam sinais clínicos específicos e, noutros casos, podem exibir sinais clínicos compatíveis com a doença, mas estar afetados com outra doença parasitária ou infecciosa (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

A fasciolose crónica pode ter manifestações clínicas semelhantes às causadas por outros parasitas gastrointestinais (*Haemonchus* spp., *Teladorsagia (Ostertagia) circumcincta*, *Cooperia* spp. e *Trichostrongylus* spp.), deficiências nutricionais em cobre ou cobalto, nutrição inadequada, paratuberculose (*Johne's disease*), tremor epizoótico (*scrapie*) e outras condições crónicas debilitantes. Já a fasciolose aguda tem como diagnósticos diferenciais as seguintes doenças: hepatite necrótica infecciosa (*black disease*), enterotoxémia, hemoncose, carbúnculo hemático, pasteurelose e outras doenças septicémicas, envenenamento e acidose ruminal (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012; Alvarez Rojas *et al.*, 2014; Constable *et al.*, 2017).

O correto diagnóstico clínico é alcançado mediante a observação dos sinais clínicos, utilização de meios de diagnóstico específicos (biopatológicos, parasitológicos e imunológicos) e exame

post mortem do fígado (Vázquez & Pérez, 2001). A ocorrência sazonal da doença, o tipo de clima prevalente, a história prévia de fasciolose na exploração e a identificação de habitats de gastrópodes são também importantes fatores a ter em conta no processo de diagnóstico (Taylor *et al.*, 2016).

O diagnóstico correto é fundamental para estimar a distribuição e prevalência de *F. hepatica* e avaliar as suas alterações após a aplicação de um tratamento anti-helmíntico, determinar a existência de resistências aos antiparasitários e encontrar tratamentos e programas de controlo eficazes no combate à fasciolose (Alvarez Rojas *et al.*, 2014).

Embora existam atualmente vários métodos de diagnóstico disponíveis, não há ainda diretrizes recomendadas ou protocolos padronizados em vigor para o diagnóstico de *F. hepatica* (Fairweather *et al.*, 2020).

3.10.1 Hemograma e análises bioquímicas

O hemograma dos animais acometidos por esta doença revela a presença de eosinofilia, anemia e redução do hematócrito (HCT) (Taylor *et al.*, 2016).

Estão descritos diferentes tipos de anemia tendo em conta as diferentes fases de progressão da fasciolose. Inicialmente, durante a fase migratória, a anemia é normocítica e normocrômica desencadeada pelas hemorragias provenientes da destruição dos vasos hepáticos. Quando o parasita se estabelece nos ductos biliares e se atinge a cronicidade da doença, a anemia evolui para macrocítica e hipocrômica. Nesta fase, a anemia pode ser atribuída à atividade hematófaga do trematode que resulta na ingestão diária de 0,2-0,5 ml de sangue (relatado por Behm & Sangster, 1999), ingestão de vitamina B12 e redução contínua das reservas de ferro. A severidade da anemia observada depende da capacidade eritropoética do animal, sendo influenciada pelo seu estado nutricional, especialmente os níveis de proteína e ferro da dieta (Valero *et al.* 2008; Fouda *et al.* 2013; Mehlhorn 2016a; Constable *et al.* 2017).

A etiologia da anemia é controversa, não havendo consenso se a hematofagia e as hemorragias associadas à destruição dos vasos hepáticos durante a fase migratória, são suficientes para produzir os sinais de anemia observados na fasciolose (Mehlhorn, 2016a). Alguns autores defendem que a anemia pode ter origem numa substância química tóxica libertada pelo parasita, a prolina (Spengler & Isseroff, 1981; Roberts & Janovi, 2009).

Ocorrem alterações nas proteínas séricas, com diminuição da albumina em comparação com as outras globulinas. A hipoalbuminémia, durante o período de migração no fígado, é progressiva, mas geralmente leve, motivada por uma síntese reduzida de albumina, devido ao comprometimento da função hepática, e pela expansão do volume plasmático. Com a presença das formas parasitárias adultas nos canais biliares, a gravidade da hipoalbuminémia está

relacionada com a perda de albumina para o intestino por extravasamento pela mucosa biliar hiperplásica e com as taxas de síntese e de catabolismo da albumina. Estas, por sua vez, estão relacionadas com os níveis de nutrição, anorexia e carga parasitária. Os baixos níveis de produtividade observados nos animais infetados com *F. hepatica* podem ser explicados pelo aumento da síntese de albumina que desvia aminoácidos disponíveis do metabolismo de outras proteínas (músculo, leite, lã) (Behm & Sangster, 1999; Mehlhorn, 2016a; Taylor *et al.*, 2016).

Desenvolve-se também hiperglobulinemia, decorrente do aumento da síntese de imunoglobulinas em resposta aos antígenos parasitários (Mehlhorn, 2016a).

Devido à ação que o parasita exerce sobre o fígado e os canalículos biliares, são de esperar alterações ao nível das enzimas hepáticas e a sua determinação plasmática pode ser uma ferramenta útil no diagnóstico da infeção (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). As enzimas hepáticas mais sensíveis na avaliação de lesões ao nível do fígado são a glutamato desidrogenase (GDH) e gama glutamil transpeptidase (GGT) (Kozat & Denizhan, 2010). A primeira é libertada devido à destruição das células parenquimatosas durante as migrações larvares, e o seu aumento surge duas a três semanas após a infeção, diminuindo assim que o parasita atinge os ductos biliares. A segunda é libertada quando há dano das células epiteliais que revestem os ductos biliares e mantém valores plasmáticos elevados por um período de tempo mais prolongado (Urquhart *et al.*, 1996; Vázquez & Pérez, 2001; Mitchell, 2007).

Na ausência de qualquer outro parâmetro, o aumento da GDH e GGT, é sugestivo de fasciolose aguda e subaguda/crónica, respetivamente (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

A atividade plasmática da aspartato aminotransferase (AST) e da sorbitol desidrogenase (SDH) também aumenta durante a passagem das formas jovens pelo parênquima hepático, contudo estas enzimas são menos sensíveis que as anteriores (Vázquez & Pérez, 2001).

A Tabela 2 resume os parâmetros hematológicos e bioquímicos relevantes no diagnóstico da fasciolose. É essencial que a interpretação dos valores laboratoriais seja feita de forma cuidadosa e em conjunto com outros dados clínicos (Taylor *et al.*, 2016).

Tabela 2: Parâmetros hematológicos e bioquímicos em ovelhas saudáveis e infetadas com *F. hepatica* (Adaptado de Taylor *et al.*, 2016).

Parâmetro	Normal	Fasciiose
HCT (%)	35 (27-45)	≥ 6
Eosinófilos		
(%)	0-10	> 10
(×10 ³ /μL)	0-1	
Proteínas (g/L)	60-79	< 55
Albumina (g/L)	28-34	10-20
Globulinas (g/L)	32-43	65-80
Glutamato desidrogenase	2-10	30x valor normal (150-300)
(GDH) (IU/L)		Aumenta ≥ 4 semanas após a infecção
Gama glutamil transpeptidase	0-32	25x valor normal em infecções crônicas
(GGT) (IU/L)		

3.10.2 Coprologia

Tradicionalmente, o exame das fezes é o teste de diagnóstico mais utilizado para confirmar o parasitismo por *F. hepatica* (Beesley *et al.*, 2018). Contudo, a detecção de ovos nas fezes não é possível durante a fase pré patente da Infecção, como tal, a observação microscópica e contagem de ovos só é útil cerca de 10 semanas após o início da infecção (Paz-Silva *et al.*, 2010). Por conseguinte, a coprologia é um método de diagnóstico valioso na detecção da fasciiose crônica (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

Estão descritas várias técnicas coprológicas, desde métodos simples (análise fecal direta) até testes quantitativos, que concentram os ovos de uma amostra fecal através da sedimentação ou flutuação (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). Além dos métodos supracitados, frequentemente empregues nos laboratórios de diagnóstico, estão disponíveis testes comerciais como o FLUKEFINDER® (Alvarez Rojas *et al.*, 2014).

Os métodos de flutuação baseiam-se no uso de soluções de alta densidade, como o sulfato de zinco ou o iodomercurato de potássio, que permitem que os ovos flutuem. Contudo, apresentam o inconveniente de deformarem e colapsarem os ovos por fenómenos osmóticos, para além de serem ineficazes nos casos em que a eliminação de ovos é menor que 10 ovos por grama de fezes (OPG) (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

A técnica recomendada é a sedimentação, baseada na maior densidade dos ovos em comparação com os detritos fecais, permitindo concentrá-los no sedimento após sucessivas lavagens. A observação dos ovos ao microscópio é facilitada pela adição de um corante (azul de metileno) ao concentrado, o que permite destacar a coloração amarelada dos ovos de *F. hepatica*. Na espécie ovina, a contagem de 300 a 600 OPG indica a existência de uma infecção ativa e grave, que requer tratamento através da administração de anti-helmínticos (Vázquez & Pérez, 2001; Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

A eliminação intermitente dos ovos pelos hospedeiros e a escassa eliminação em infecções de baixa intensidade podem conduzir a resultados falsos negativos. Para além disto, a similaridade dos ovos de *F. hepatica* com os ovos de *Paramphistomum* spp. dificulta o diagnóstico diferencial entre ambas as infecções (Paz-Silva *et al.*, 2010). Da mesma forma, outros fatores, incluindo a idade do hospedeiro, o teor de água nas fezes e o volume da amostra, contribuem para a variabilidade na deteção de ovos. O aumento do número de amostras testadas conduz a uma maior sensibilidade da técnica coprológica (Alvarez Rojas *et al.*, 2014; Charlier *et al.*, 2014).

3.10.3 Imunodiagnóstico

O desenvolvimento da resposta imunitária nos animais vivos tem sido amplamente utilizado para inferir sobre a existência de infecção atual ou exposição prévia ao parasita (Alvarez Rojas *et al.*, 2014).

Estão descritos vários ensaios imunológicos como a precipitação, aglutinação, imunofluorescência, ELISAs, testes de fixação do complemento, imunoeletroforese, imunodifusão dupla e o *immunoblotting*, que detetam a presença de anticorpos específicos contra antígenos do parasita no soro dos animais infetados. Estes testes utilizam uma ampla gama de antígenos, incluindo antígenos de excreção/secreção (ES), componentes do tegumento, extratos do parasita adulto e mais recentemente, proteínas recombinantes. O teste ELISA, nos seus variados modelos, é a técnica comumente empregue no diagnóstico de fasciolose (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012; Alvarez Rojas *et al.*, 2014).

Existem no mercado provas ELISA comerciais para deteção de anticorpos em amostras de soro e leite e provas ELISA para deteção de coproantígenos (cELISA) e antígenos no soro (Beesley *et al.*, 2018; Verocai *et al.*, 2020).

As provas de imunodiagnóstico são uma mais-valia no diagnóstico de fasciolose no período pré patente da infecção, na avaliação dos tratamentos anti-helmínticos e na realização de estudos epidemiológicos de grande escala e ao nível do rebanho (Vázquez & Pérez, 2001; Paz-Silva *et al.*, 2010; Verocai *et al.*, 2020). Para além disto, comparativamente aos exames coprológicos, apresentam maior sensibilidade, reprodutibilidade e, frequentemente, maior custo-benefício (Beesley *et al.*, 2018).

3.10.3.1 Serologia: detecção de anticorpos contra *F. hepatica*

Como *F. hepatica* induz uma resposta imune humoral no hospedeiro, a maioria dos métodos serológicos para o diagnóstico da infecção destina-se à detecção de anticorpos no soro usando antígenos derivados do parasita (Alvarez Rojas *et al.*, 2014).

Os testes ELISA indiretos de detecção de anticorpos são os mais usados atualmente. Baseiam-se maioritariamente no uso do antígeno somático f2 e no uso de antígenos de ES (excreção/secreção) em bruto, sob a forma de frações purificadas ou recombinantes (Dorchies, 2006).

Os anticorpos anti-*F. hepatica* (Imunoglobulina G (IgG)) podem ser detetados no soro duas a quatro semanas após a infecção (Taylor *et al.*, 2016), atingem o pico dos níveis séricos entre as oito e as dez semanas após a infecção e diminuem lentamente após a cura (Paz-Silva *et al.*, 2010; Beesley *et al.*, 2018).

Uma desvantagem da serologia é a incapacidade de diferenciar uma infecção ativa de uma infecção ou exposição anterior, devido à persistência de anticorpos IgG circulantes durante períodos prolongados (até 20 semanas após a infecção), o que dificulta a interpretação dos resultados. Outro problema é a possibilidade de ocorrência de reações serológicas cruzadas com antígenos de outros trematodes (Paz-Silva *et al.*, 2010; Alvarez Rojas *et al.*, 2014). No entanto, os testes serológicos são acessíveis, fáceis de executar e apresentam grande fiabilidade (Dorchies, 2006; Paz-Silva *et al.*, 2010).

O kit *IDEXX Fasciolosis Verification test*, fabricado e comercializado pelos laboratórios IDEXX®, é um teste ELISA para pesquisa de anticorpos. As placas ELISA do kit estão revestidas com antígeno f2 purificado, altamente imunogénico e específico para *F. hepatica*. O teste permite detetar a infecção em amostras de leite e soro (Kuerpick *et al.*, 2013). Num estudo conduzido por Reichel (2002), o kit apresentou uma elevada sensibilidade (99%) e especificidade (100%), permitindo detetar a presença de anticorpos contra o parasita em animais experimentalmente infetados sete a oito semanas mais cedo que outras técnicas parasitológicas.

3.10.4 Diagnóstico molecular

A aplicação de métodos de diagnóstico molecular na medicina veterinária tem aumentando recentemente, com o propósito de aumentar a sensibilidade e a especificidade em relação aos testes de diagnóstico convencionais (Paz-Silva *et al.*, 2010; Beesley *et al.*, 2017).

Ensaio em animais experimentalmente infetados demonstraram que o uso de ferramentas de biologia molecular foram úteis no diagnóstico precoce da fasciolose (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

A detecção específica de ácido desoxirribonucleico (DNA) de *F. hepatica* nas fezes utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), a amplificação isotérmica mediada por ciclos (LAMP) e a amplificação de polimerase recombinase (RPA) demonstraram serem capazes de diagnosticar infecções em ovelhas naturalmente infetadas com uma sensibilidade igual ou superior, comparativamente ao exame das fezes tradicional e cELISA (Alvarez Rojas *et al.*, 2014; Arifin *et al.*, 2016; Fairweather *et al.*, 2020).

Uma das desvantagens da PCR é a necessidade de equipamentos especializados, para além da dificuldade na reprodutibilidade dos métodos e procedimentos publicados nos diferentes laboratórios. Deste modo, a LAMP parece ser uma alternativa interessante à PCR visto que é um procedimento de amplificação de genes muito específico, eficiente, rápido, isotérmico e não necessita de equipamento específico. Também a RPA tem vantagens sobre a PCR em termos de sensibilidade e velocidade, não necessitando de equipamentos dispendiosos e pessoal altamente treinado (Beesley *et al.*, 2017; Fairweather *et al.*, 2020).

3.11 Terapêutica

O tratamento do hospedeiro com anti-helmínticos é a principal estratégia adotada para controlar a fasciolose (Torgerson & Claxton, 1999). Este deve ser dirigido tanto contra as formas adultas, como contra as formas larvares migrantes (Vázquez & Pérez, 2001).

Os fasciolicidas utilizados na terapêutica antiparasitária pertencem a cinco grupos químicos principais: benzimidazóis (albendazol e triclabendazol), fenóis halogenados (niclofolan e nitroxinil), salicilanilidas (closantel, rafoxanida, oxiclozanida e bitionol), sulfonamidas (clorsulon) e fenoxialcanos (dianfenetida), no entanto nem todas as moléculas são igualmente efetivas contra todos os estádios larvares de *F. hepatica* (Flores-Ramos *et al.*, 2014; Ceballos *et al.*, 2017).

De entre os fármacos disponíveis, o triclabendazol é considerado o princípio ativo de eleição, devido à sua alta eficácia contra as formas imaturas e adultas do parasita, para além da ampla margem de segurança e boa tolerância por parte dos animais (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). Os restantes fármacos têm boa eficácia adulticida (parasitas com oito ou mais semanas de idade), enquanto o nitroxinil, closantel, rafoxanida e dianfenetida apresentam também ação larvicida. Ressalva-se que, o nitroxinil e o closantel só são efetivos contra formas imaturas com mais de seis semanas de idade (Lanusse *et al.*, 2017) (Figura 9).

Droga	Idade do parasita (semanas)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Albendazol														
Niclofolan														
Oxiclozanida											50-70%			
Bitionol													80-99%	
Clorsulon														
Nitroxinil, Closantel														
Rafoxanida														
Triclabendazol														
Dianfenetida														

Figura 9: Espectro de eficácia dos vários anti-helmínticos (Adaptado de Torgerson & Claxton, 1999).

Para o tratamento da fasciolose aguda é fundamental escolher um produto altamente eficaz contra os parasitas juvenis, principalmente nos ovinos, uma vez que a doença aguda é particularmente grave nesta espécie (Skuce & Zadoks, 2014; Constable *et al.*, 2017). O fármaco de eleição é o triclabendazol, efetivo contra todos os estádios de desenvolvimento com mais de dois dias de idade (Vázquez & Pérez, 2001; Forbes, 2017). Outros medicamentos, como o closantel e nitroxinil, são também opções válidas. Em simultâneo com o tratamento, os animais devem ser movidos para uma nova pastagem, de preferência bem drenada e recentemente cultivada. No caso de o tratamento ser realizado com closantel ou nitroxinil poderá ser necessária uma segunda dose, quatro a seis semanas após a mudança para o novo pasto. Na impossibilidade de mover os ovinos para uma pastagem limpa, o tratamento deve ser repetido em intervalos de três semanas até seis semanas após as mortes pela doença cessarem (Taylor *et al.*, 2016).

Nos casos de doença subaguda, o tratamento recomendado é semelhante ao da fasciolose aguda (Vázquez & Pérez, 2001). É aconselhável mudar os animais para uma nova pastagem e, caso isto não seja possível, o tratamento deve ser repetido às quatro e às oito semanas para eliminar as formas adultas (Taylor *et al.*, 2016).

O tratamento das infeções crónicas é relativamente simples, na medida em que todos os fasciolocidas licenciados possuem eficácia contra os trematodes adultos, sendo suficiente o tratamento com uma dose única (Taylor *et al.*, 2016; Forbes, 2017). No momento da escolha do fármaco, a segurança do produto é um aspeto a ter em consideração, devido ao comprometimento da função hepática (Constable *et al.*, 2017).

A Tabela 3 mostra os fármacos fasciolocidas disponíveis para ovinos em Portugal, assim como informação referente à dose, via de administração e intervalo de segurança. Existem alguns princípios ativos que não se encontram licenciados no nosso país, como é exemplo a rafoxanida, niclofolan, bitionol e dianfenetida. O clorsulon apenas apresenta formulação autorizada para uso em bovinos.

Alguns produtos combinam fármacos fasciolocidas e nematocidas, no entanto estes só devem ser usados quando houver risco simultâneo destes dois helmintes já que o seu uso indevido pode levar à seleção de resistências *off-target* (Abbott *et al.*, 2012; Constable *et al.*, 2017).

Tabela 3: Fármacos fasciolocidas para ovinos autorizados em Portugal (DGAV, 2021).

Princípio ativo	Apresentação	Dose	Via ad.	Intervalo segurança (dias)	
				Carne	Leite
Albendazol	Albendavet®	7,5 mg/kg	Oral	10	4
	Sinvermin®	4,75-7,5 mg/kg	Oral	10	4
	Valben®	7,5 mg/kg	Oral	10	4
	Alphalben®	7,5 mg/kg	Oral	14	X
Triclabendazol	Cydectin TriclaMox®*	10 mg/kg	Oral	31	X
Nitroxinil	Dovenix®	10 mg/kg	SC	60	X
Oxiclozanida	Oxyfluke®	15 mg/kg	Oral	14	7
	Distocur®	15 mg/kg	Oral	14	7
Closantel	Oxydrench®**	10 mg/kg	Oral	42	X
	Seponver Plus®***	10 mg/kg	Oral	28	X
	Flukiver®	10 mg/kg	Oral	28	X
	ClosamectinFF®****	5 mg/kg	SC	28	X

SC: subcutânea; X: Não administrar a produtoras de leite; *Associado a moxidectina; **Associado a oxfendazol; *** Associado a mebendazol; **** Associado a ivermectina.

3.12 Controlo e profilaxia

A prevenção e o controlo da infeção por *F. hepatica* deve combinar a aplicação correta e integrada de várias medidas, das quais fazem parte a redução da população de hospedeiros intermediários, o tratamento dos animais infetados, com o objetivo de diminuir a contaminação das pastagens, e a gestão das áreas agrícolas de forma a reduzir a exposição à infeção (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). Além disto, o uso de raças resistentes e/ou adaptados a esta parasitose poderá ajudar na redução do impacto da infeção, especialmente quando os custos associados ao tratamento são elevados (Torgerson & Claxton, 1999).

Para aplicar corretamente estas medidas, é necessário haver um conhecimento prévio das variações sazonais de *F. hepatica*, das suas formas de dispersão bem como da dinâmica

populacional do hospedeiro intermediário. Neste sentido, os sistemas de previsão de risco, baseados na correlação entre a temperatura e precipitação e a ocorrência de surtos de fasciolose são instrumentos valiosos para prever o momento ideal para a administração de anti-helmínticos e/ou adoção de medidas de manejo (Mitchell, 2007; Beesley *et al.*, 2017).

Em áreas endêmicas, as medidas preventivas são importantes e necessárias já que a ocorrência de casos de fasciolose pode provocar consideráveis perdas econômicas para as explorações (Constable *et al.*, 2017). Recomenda-se geralmente a aplicação de dois tratamentos anuais, um antes da entrada dos animais nas pastagens, a fim de evitar a sua contaminação, e outro no final do outono, se não forem registados casos agudos da doença (Vázquez & Pérez, 2001).

O controlo das populações do hospedeiro intermediário pode ser feito mediante a drenagem das áreas alagadas e aplicação de moluscidas (Carmona & Tort, 2017). Apesar da drenagem ser um método eficaz a longo prazo, é bastante dispendioso, e o uso de moluscidas potencialmente perigoso para humanos, animais e ambiente, para além da sua questionável utilidade prática devido ao elevado potencial biótico dos moluscos (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2016; Constable *et al.*, 2017). Assim, os métodos de controlo de gastrópodes são quase sempre impraticáveis por serem insuficientes e apresentarem custos proibitivos (Torgerson & Claxton, 1999).

Manter o rebanho afastado de áreas onde as metacercárias e os moluscos estão presentes, impedir que estes pastem em zonas húmidas e durante os períodos de alto risco de infeção e aplicar a rotação sazonal de pastagens ou de espécies em pastoreio são práticas que devem ser adotadas para reduzir as possibilidades de infeção. Porém, nem todas as explorações conseguem implementar, tendo de recorrer ao uso de anti-helmínticos de forma profilática (Vázquez & Pérez, 2001; Fairweather, 2011; Howell & Williams, 2020).

Recomenda-se também a quarentena de novos animais introduzidos no rebanho, e o seu tratamento com um fasciolicida eficaz contra formas parasitárias imaturas. Posteriormente devem ser mantidos em pastagens limpas durante quatro semanas (Mitchell, 2007).

De momento, não se encontra disponível nenhuma vacina comercial (Wesołowska *et al.*, 2018), por isso o uso de fasciolicidas é a única e a principal opção na profilaxia da doença (Fairweather, 2011).

3.13 Resistência aos anti-helmínticos

O desenvolvimento de resistências é influenciado por fatores relacionados com o hospedeiro, o parasita, o modo de utilização dos anti-helmínticos e o meio ambiente. Assim que as situações de resistência aparecem, a sua prevalência cresce exponencialmente, e a eficácia dos anti-

helmínticos torna-se muito baixa. A reversão da suscetibilidade é um processo difícil e pouco provável (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

O uso regular e prolongado em ovinos de compostos de salicilanilida, nomeadamente rafoxanida e closantel, conduziu a resistências no sudeste da Austrália, oeste de Inglaterra e País de Gales, tendo sido também registada a resistência cruzada ao nitroxinil (Fairweather & Boray, 1999). No grupo dos benzimidazóis, anti-helmínticos de amplo espetro, estão reportadas resistências ao albendazol em países como Espanha, Suécia, Argentina, Uruguai e Bolívia. No que toca ao clorsulon, até ao momento, só estão identificadas resistências em Espanha (Alvarez *et al.*, 2020; Fairweather *et al.*, 2020).

O desenvolvimento de resistência ao triclabendazol, o fasciolicida mais utilizado no tratamento da fasciolose, particularmente nos casos agudos da doença em ovinos, é presentemente um motivo de grande preocupação. A dependência excessiva deste fármaco, devido à sua elevada eficácia (> 98%) contra as formas imaturas, resultou inevitavelmente no surgimento de resistências (Kelley *et al.*, 2016; Beesley *et al.*, 2018).

Alguns autores defendem que o triclabendazol deveria ser utilizado exclusivamente em ovinos com fasciolose aguda, na tentativa de preservar sua eficácia, já que as formas imaturas de *F. hepatica* raramente provocam doença em bovinos (Skuce & Zadoks, 2014; Forbes, 2017).

Os casos de resistência e/ou falha no tratamento das infeções por *F. hepatica* em ruminantes são cada vez mais frequentes, existindo resistências reportadas na Europa (Irlanda, Escócia, País de Gales, Espanha, Suécia e Holanda), Austrália, Nova Zelândia e América do Sul (Brasil, Bolívia e Peru) (Cwiklinski *et al.*, 2016; Fairweather *et al.*, 2020).

A ampla incidência da resistência ao triclabendazol na pecuária é uma grande ameaça à produção animal, sendo por isso importante adotar medidas estratégicas que preservem a eficácia dos anti-helmínticos existentes. Estas medidas passam pela escolha certa do medicamento, a sua utilização na altura, frequência e dose correta, a alternância de fármacos e a combinação de moléculas sinérgicas (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012; Fairweather *et al.*, 2020).

4. Materiais e métodos

4.1 Caracterização geográfica e climática da área de estudo

A região do Alentejo, localizada no Sul de Portugal (latitude: 40°N e 37°N, longitude: 9°E e 7°E), possui uma área equivalente a 31,500 km², cerca de um terço de todo o território nacional, sendo por isso a maior região portuguesa. Faz fronteira com o Centro, Algarve e com as regiões espanholas da Estremadura e da Andaluzia. Encontra-se dividida em 5 sub-regiões

respetivamente, Alentejo Litoral, Alto Alentejo, Alentejo Central, Baixo Alentejo e Lezíria do Tejo (European Commission, s.d.). As explorações incluídas neste estudo pertenciam às seguintes sub-regiões alentejanas: Alto Alentejo (Portalegre), Centro Alentejo (Évora) e Baixo Alentejo (Beja) (Figura 10).

O clima é Temperado Mediterrâneo, caracterizando-se por verões quentes e secos e invernos chuvosos e suaves, com temperaturas médias anuais de 15,1 °C (a norte) e 18 °C (a sul). A precipitação encontra-se concentrada nas épocas de outono e inverno, com valores anuais acumulados que variam entre 800 mm e menos de 600 mm (interior do baixo Alentejo) (IPMA, 2020). Ao nível do relevo, esta região define-se pela grande uniformidade das suas formas e pelas vastas planícies, de onde emergem algumas formações montanhosas de reduzida altitude, destacando-se a serra de São Mamede como o ponto mais alto (1027 m) (Lourenço, 1995).

É no Alentejo que está concentrada a maior parte da produção de ovinos do país, com cerca de 1 415 875 ovinos registados em 2020, totalizando assim 53% de toda a produção nacional (INE, 2020; IFAP, 2021). As raças Merina Preta e Merina Branca são exploradas em todo o sul do país, no entanto é no Alentejo onde os efetivos são mais expressivos. Estas raças autóctones são criadas em regime de sequeiro extensivo, com recurso a pastagens naturais ou semeadas, muitas vezes associadas ao ecossistema de montado onde predominam as explorações de grandes dimensões (> 50 hectares) com efetivos numerosos (300 a 500 ovelhas) (ANCORME, 2008). Há data de abril de 2021, o efetivo nacional contava com 13 692 ovinos da raça Merina Branca (13 071 fêmeas e 621 machos; 38 criadores em 42 explorações) e 15 688 ovinos da raça Merina Preta (14 995 fêmeas e 693 machos; 62 criadores em 68 explorações).



Figura 10: Mapa dos distritos e regiões de Portugal Continental. Área de estudo delimitada a vermelho. (Adaptado de: <https://xrei.com/pt/regioes-de-portugal/>).

4.2 Caracterização da amostra

O presente estudo epidemiológico teve como base amostras de soro e fezes recolhidas a 675 ovinos da raça Merina Preta e Branca da região do Alentejo, obtidas durante o período compreendido entre agosto de 2019 e janeiro de 2021, cujo processamento e tratamento de dados ocorreu durante o estágio curricular no INIAV. No total foram obtidas 675 amostras de fezes e 661 amostras de sangue.

Os ovinos incluídos neste estudo foram selecionados segundo os seguintes critérios: 1) Registo no livro genealógico das raças Merina Preta e Merina Branca; 2) idade igual ou inferior a 12 meses; 3) última desparasitação efetuada no mínimo há dois meses.

4.3 Colheita de amostras e recolha de dados

A colheita das amostras foi realizada no momento da visita dos colaboradores da ANCORME às explorações ovinas da sua área de atuação, no seguimento dos trabalhos de identificação e registo dos animais no livro genealógico da raça Merina.

A cada ovino foram colhidas duas amostras de sangue por punção venosa jugular, obtidas em tubos de vácuo com ácido tripotássico etilenodiamino tetra-acético (K3EDTA), e em tubos de vácuo secos. Foram também colhidas fezes diretamente da ampola retal para sacos individuais de plástico. Todas as amostras foram devidamente identificadas com o número de registo no livro genealógico da raça. Após a colheita, as amostras de sangue e fezes foram refrigeradas à temperatura de 4 °C e enviadas por correio, num prazo máximo de 24 horas, para os respetivos locais de processamento. As amostras de sangue foram enviadas para o laboratório da FMV-UL para a realização de hemograma e bioquímicas e as amostras fecais para o INIAV.

Paralelamente à recolha das amostras foi também realizado um inquérito epidemiológico (ver Anexo 1) junto dos produtores com o objetivo de obter informações relativas às condições de manejo e dados de produtividade da exploração. Estas incluíram o tipo de sistema de produção, a área e tipo de pastoreio (sequeiro/regadio), duração do pastoreio, presença de zonas alagadas, frequência de desparasitação, anti-helmínticos utilizados, data da última desparasitação e taxas de reposição interna e externa. Outros dados da exploração e dados individuais dos animais amostrados foram obtidos a partir da base de dados da ANCORME, entre eles, o tamanho do efetivo, a raça, o sexo, a data de nascimento e o ganho médio diário dos animais.

O questionário foi implementado através de uma aplicação *online* para dispositivos móveis especialmente desenvolvida para o efeito através do programa *Survey 123 for ArcGIS®*. Este *software* faz parte da *Esri Geospatial Cloud*, e é uma solução simples e intuitiva para a recolha de dados que permite criar, partilhar e analisar inquéritos. Os dados podem ser obtidos no campo

em qualquer dispositivo móvel, mesmo quando desligado, e são automaticamente sincronizados com a plataforma do sistema de informação geográfica *ArcGIS* de forma segura. O levantamento dos dados foi realizado pelos colaboradores da ANCORME no dia da recolha de amostras, sendo toda a informação do questionário epidemiológico juntamente com a localização geográfica da exploração, automaticamente transferida para uma base de dados de *Backoffice*.

4.4 Processamento das amostras de sangue

As amostras de sangue enviadas para a FMV-UL foram processadas no Laboratório de Análises Clínicas Prof. Dr. Braço Forte Júnior para a realização do hemograma e determinação de diferentes parâmetros bioquímicos. Os parâmetros hematológicos avaliados foram: concentração de hemoglobina, HCT, contagem total de eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos; e os parâmetros bioquímicos avaliados foram: proteína sérica total, albumina sérica, fosfatase alcalina (FA), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

Uma vez concluídas estas análises, os tubos de sangue foram transportados para o INIAV. Aqui, as amostras de sangue em ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) foram congeladas para posterior processamento e os tubos secos novamente centrifugados a 1500 rotações por minuto (RPM) durante 10 minutos para obtenção de soro. Os soros foram transferidos em volumes de 1000 µl para tubos tipo Micronic (1,2 ml), previamente identificados, e conservados a 4 °C ou congelados a -20 °C, dependendo se fossem utilizados para diagnóstico serológico de *F. hepatica* no espaço de dois a três dias ou analisados mais tarde.

4.5 Processamento das amostras de fezes

As amostras fecais foram processadas no laboratório de parasitologia do INIAV para a pesquisa e contagem de ovos de *F. hepatica* através de uma técnica de sedimentação natural modificada. O princípio desta técnica baseia-se no facto dos ovos de trematodes apresentarem uma maior densidade que a maioria dos detritos presentes nas fezes, sedimentando mais rápido do que estes, o que permite concentrá-los no sedimento após repetidas lavagens em água. A adição de um corante de contraste (azul de metileno) ao sedimento permite destacar a cor amarela dourada dos ovos de *F. hepatica* (Figura 11) (Vázquez & Pérez, 2001). Uma vez que as amostras de fezes eram utilizadas também para diagnóstico de parasitas gastrointestinais, estas foram submetidas primeiro a um processo de flutuação, sendo a porção sedimentada utilizada para pesquisa de ovos de *F. hepatica*. O material necessário à realização desta técnica e o respetivo protocolo encontram-se descritos no Anexo 2.



Figura 11: Aspeto dos ovos de *Fasciola hepatica* após adição do corante de contraste (ampliação 40x).

4.6 Serologia

As amostras de soro individuais foram testadas para a presença de anticorpos contra *F. hepatica* pela técnica de ELISA utilizando o kit *IDEXX Fasciolosis Verification test*, fabricado pelos laboratórios IDEXX®. Trata-se de um ensaio imunoenzimático que pode ser utilizado em soros individuais de ovinos e bovinos, em pools de 5 ou 10 soros, e também em amostras de leite de tanque de bovinos.

As microplacas deste teste encontram-se alternadamente impregnadas com antígeno controle (Ag-) e antígeno f2 (Ag+). As amostras a serem testadas são diluídas e incubadas nos poços da placa impregnada. Após a incubação, qualquer anticorpo específico contra f2 liga-se ao antígeno nos poços revestidos com Ag+ formando um imunocomplexo antígeno/anticorpo na superfície do poço da placa. Ocorrem ligações inespecíficas na mesma extensão nos poços revestidos com Ag- e Ag+. Depois da remoção por lavagem de todo o material não ligado, um conjugado enzimático anti-ruminante é adicionado e liga-se a qualquer complexo imune antígeno/anticorpo formado. O conjugado não ligado é removido por lavagem e é adicionado um substrato da enzima (Tetrametilbenzideno (TMB)). Na presença da enzima, o substrato é oxidado e forma-se um composto azul que se transforma em amarelo após a interrupção da reação com a solução *stop*. O desenvolvimento de cor está diretamente relacionado com a quantidade de anticorpos contra o antígeno f2 presente na amostra. A leitura ótica do Ag- é subtraída da leitura ótica do Ag+. A Figura 12 descreve o funcionamento do teste.

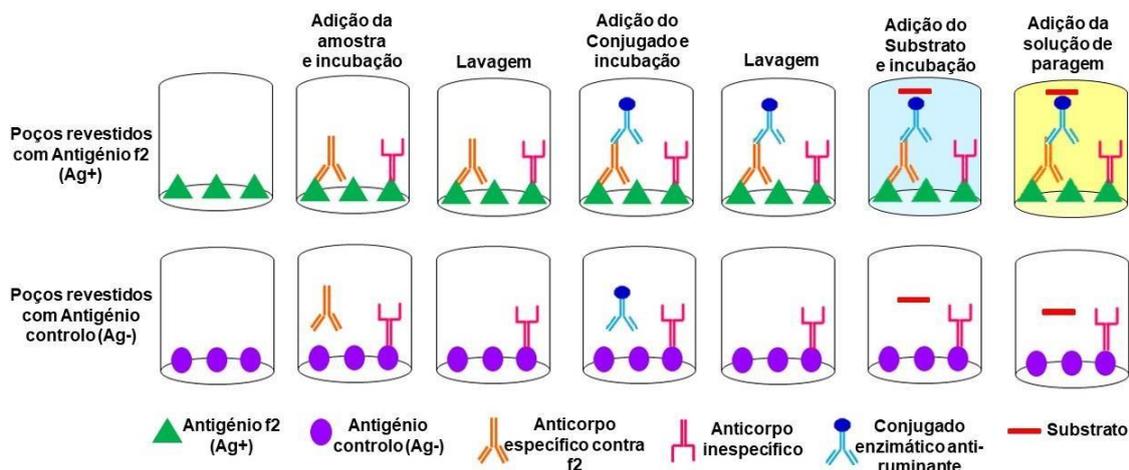


Figura 12: Diagrama do teste ELISA fabricado pelos laboratórios IDEXX®.

Os testes serológicos foram realizados de acordo com o protocolo laboratorial fornecido pelo fabricante, que se encontra detalhado no Anexo 3. Na Figura 13 é possível observar o aspeto de uma placa ELISA no final do ensaio serológico, após a adição da solução de paragem da reação.

Para efeitos da análise e tratamento dos resultados, as amostras com os resultados “Forte positivo”, “Moderado positivo” e “Positivo” foram consideradas como “Positivas”.

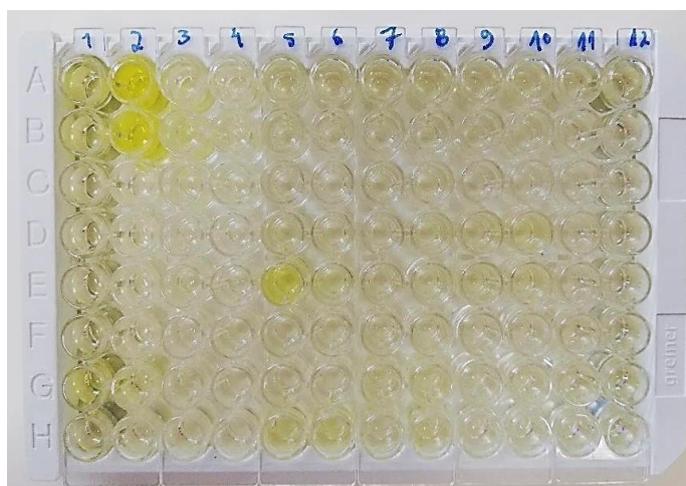


Figura 13: Placa ELISA no final do ensaio serológico.

4.7 Análise estatística

Os dados recolhidos através da aplicação para dispositivos móveis (*Survey 123 for ArcGIS®*), bem como os dados laboratoriais introduzidos na aplicação de *BackOffice* foram descarregados, e tratados com o *Software Microsoft Office Excel®*. A análise dos dados estatísticos foi feita com o auxílio do *Software R 3.5.3 para Windows* desenvolvido pela *R Foundation for Statistical*

Computing, utilizando a extensão *R Commander*, disponível *online* (R Core team, 2014). Os resultados dos testes estatísticos foram considerados significativos quando o valor de p (significância) foi menor que 0,05, com um intervalo de confiança de 95%.

Os cálculos da prevalência do parasita em estudo foram efetuados através da plataforma *online Epitools*, com intervalos de confiança de 95% e tendo em consideração os valores de sensibilidade e especificidade do método de diagnóstico utilizado. O cálculo da prevalência aparente foi feito segundo os limites de Wilson e o cálculo da verdadeira prevalência foi feito segundo os limites de Blaker (Rogan & Gladen, 1978).

A seroprevalência foi analisada em função de cada variável individual referente às características dos ovinos e às características das explorações. Apenas foram selecionadas as características com interesse para o estudo em questão.

De forma a avaliar a associação estatística existente entre as variáveis qualitativas e os possíveis fatores de risco para a infecção por *F. hepatica*, foi aplicado o modelo estatístico linear generalizado misto, que inclui o efeito aleatório da exploração, para ter em conta a falta de independência das observações. Para além disto, este modelo estatístico também permite obter o valor de p e o risco relativo de um acontecimento em relação a outro, o *odds ratio* (OR).

De forma a avaliar o tipo de distribuição das amostras de sangue (hemograma e bioquímicas), foi utilizado o teste da normalidade de Shapiro-Wilk, com nível de significância de 5%. O valor de p inferior a 0,05 conduziu à rejeição da hipótese nula (H_0) e à conclusão de que os dados não se encontravam normalmente distribuídos. Posteriormente foi aplicado o teste não paramétrico Wilcoxon para comparação das medianas.

A análise da concordância entre o método coprológico e o método serológico foi investigado através do coeficiente de concordância de Kappa de Cohen. A interpretação dos valores obtidos foi feita segundo as diretrizes propostas por Landis & Koch (1977), presentes na Tabela 4.

Tabela 4: Interpretação dos valores de kappa segundo Landis & Koch (1977).

Valores	Interpretação
< 0	Sem concordância
0 – 0,19	Concordância pobre
0,20 – 0,39	Concordância razoável
0,40 – 0,59	Concordância moderada
0,60 – 0,79	Concordância substancial
0,80 – 1,00	Concordância quase perfeita

5. Resultados

5.1 Caracterização da amostra: raça, sexo, idade

Dos 675 ovinos incluídos no estudo, 423 (62,7%) eram da raça Merina Branca e 252 (37,3%) da raça Merina Preta (Gráfico 1).

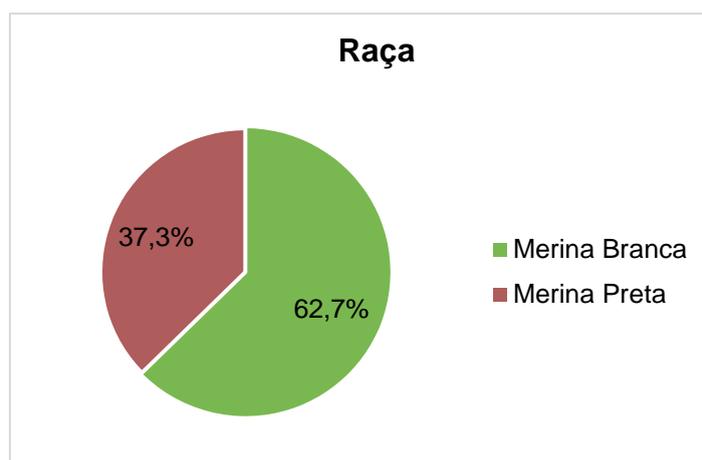


Gráfico 1: Distribuição (%) dos ovinos estudados em função da raça.

No que respeita ao sexo, 601 (89%) animais eram do sexo feminino e apenas 74 (11%) do sexo masculino (Gráfico 2).

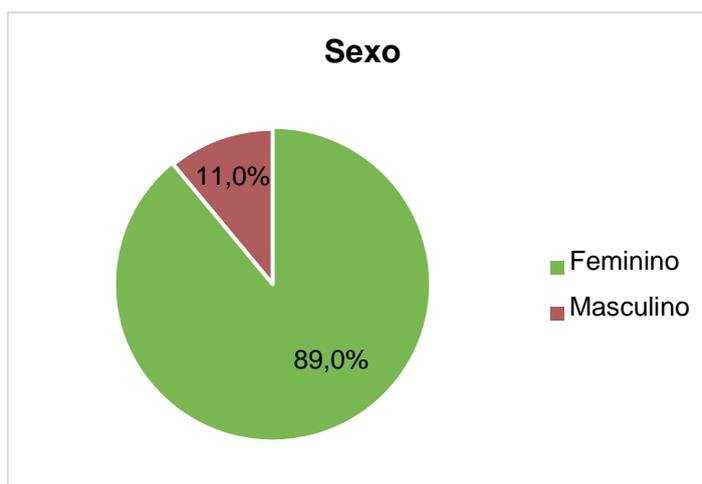


Gráfico 2: Distribuição (%) dos ovinos estudados em função do sexo.

Relativamente à idade, esta variou entre os 2 e os 12 meses, com uma média de 7,6 meses (desvio padrão de 1,6 meses) e uma mediana de 8 meses (intervalo interquartil - //Q: 1-8 meses). De forma a facilitar a análise estatística, os animais foram divididos em dois grupos: “< 6 meses” e “6-12 meses”. Assim, 88 (13,3%) ovinos tinham idade inferior a 6 meses e 573 (86,7%) tinham idade compreendida entre os 6 e os 12 meses (Gráfico 3).

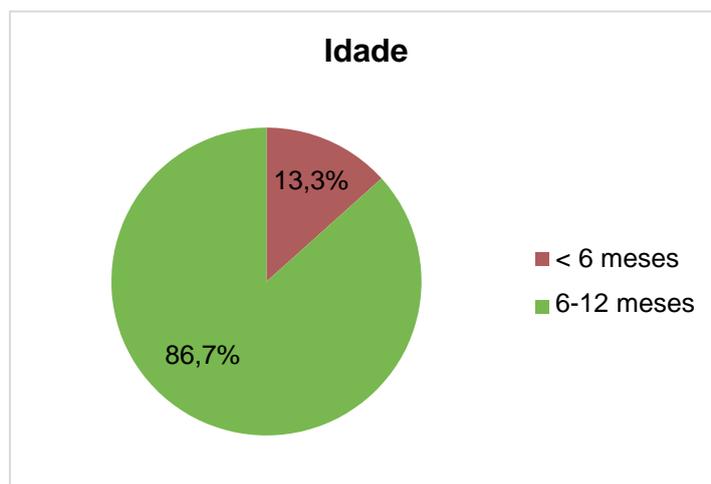


Gráfico 3: Distribuição (%) dos ovinos estudados em função da idade.

5.2 Resultados coprológicos

O exame das fezes, pela técnica de sedimentação natural modificada, realizado às 675 amostras fecais, permitiu identificar ovos de *F. hepatica* em 14 (2,1%) dos animais (Tabela 5). Não foram detetados ovos de *F. hepatica* nos ovinos da raça Merina Preta. A percentagem de animais da raça Merina Branca infetados com *F. hepatica* foi de 3,3% (IC_{95%}= 1,24-3,45%).

Tabela 5: Número de animais das raças Merina Branca e Merina Preta analisados pela técnica de sedimentação natural modificada e respetivas percentagens (%) de infeção com *F. hepatica*.

Raça	nº animais	nº animais positivos	% animais positivos
Merina Branca	423	14	3,3%
Merina Preta	252	0	0%
Total	675	14	2,1%

5.3 Resultados serológicos

Os testes serológicos, realizados às 661 amostras de soro individuais, permitiram detetar a presença de anticorpos específicos contra *F. hepatica* em 29 animais. Tendo em conta os valores de sensibilidade (99%) e especificidade (100%) do teste ELISA utilizado, estes resultados permitiram obter uma verdadeira prevalência de animais infetados de 4,4% (IC_{95%}= 3,1 – 6,29%).

A Tabela 6 apresenta o número de animais testados, número de animais positivos e respetivas seroprevalências associadas às diferentes variáveis e categorias em estudo.

Dos 29 soros que testaram positivo, 27 correspondiam a ovinos da raça Merina Branca e 2 a ovinos da raça Merina Preta, traduzindo-se numa seroprevalência de 6,7% e 0,8% respetivamente.

Relativamente ao sexo, 28 dos animais que testaram positivo eram do sexo feminino e apenas 1 do sexo masculino, refletindo-se numa seroprevalência de 4,8% nas fêmeas e de 1,4% nos machos.

Todos os animais serologicamente positivos tinham entre 6 e 12 meses de idade, o que resultou numa seroprevalência de 5,1% neste grupo etário.

De forma a avaliar a relação entre a seroprevalência e o tamanho do efetivo, as explorações foram divididas em duas categorias: efetivos com menos de 500 animais (“< 500”) e efetivos com 500 ou mais animais (“≥ 500”). Na categoria “< 500”, 27 ovinos testaram positivo e na categoria “≥ 500”, 2 ovinos testaram positivo. A percentagem de animais infetados com *F. hepatica* nos efetivos com menos de 500 animais foi de 8,1% e nos efetivos com mais de 500 animais foi de 0,6%.

As explorações com zonas alagadas apresentaram um maior número de casos positivos, com 27 animais positivos, comparativamente às explorações sem zonas alagadas, onde apenas foram detetados 2 animais positivos, refletindo-se numa percentagem de animais infetados de 10,6% e 0,5% respetivamente.

Todos os 29 ovinos seropositivos pertenciam ao grupo de animais que partilhavam o pasto com outras espécies, o que se traduziu numa seroprevalência de 11,4% nesta categoria. Na categoria de animais que não pastavam juntamente com outras espécies não se encontraram casos positivos.

A maioria dos animais seropositivos pertenciam a explorações que praticavam alguns meses de pastoreio em regadio, com respetivamente 26 animais positivos e uma seroprevalência de 38,1%. Nas explorações onde não se praticava pastoreio em regadio foram apenas detetados 3 animais positivos, o que resultou numa seroprevalência de 0,5%.

Para o grupo de borregos que, em algum período do ano, eram colocados em estabulação permanente obtivemos 4 casos positivos e uma seroprevalência de 1,1%. Nos borregos que não eram colocados em estabulação permanente, o número de casos positivos foi superior, com 25 animais infetados e uma seroprevalência de 8,5%.

No conjunto de animais cuja desparasitação era realizada 1 vez por ano, 26 ovinos testaram positivo e no conjunto de animais desparasitados 2 vezes por ano, 3 ovinos testaram positivo. Obteve-se assim uma seroprevalência de 18,4% e 0,6% nos animais desparasitados 1 e 2 vezes ao ano, respetivamente.

Analisando os dados relativos à estação do ano em que se procedeu à recolha das amostras, o outono foi a estação com a seroprevalência mais elevada, com 6,4%, logo seguido do inverno, com 1,4%. Não foram recolhidas amostras durante o verão e não se registaram animais positivos, nas amostras recolhidas durante a primavera.

Tabela 6: Seroprevalência de *F. hepatica* em função das variáveis em estudo.

Variável	Categoria	nº animais	nº e % animais positivos	Seroprevalência (%)
Raça	Merina Branca	416	27 (6,5%)	6,7%
	Merina Preta	245	2 (0,8%)	0,8%
Sexo	Feminino	590	28 (4,7%)	4,8%
	Masculino	71	1 (1,4%)	1,4%
Idade (meses)	< 6 meses	88	0 (0%)	0%
	6-12 meses	573	29 (5,1%)	5,1%
Tamanho do efetivo	< 500	338	27 (8%)	8,1%
	≥ 500	323	2 (0,6%)	0,6%
Presença de zonas alagadas	Sim	257	27 (10,5%)	10,6%
	Não	404	2 (0,5%)	0,5%
Pastoreio com outras espécies	Sim	257	29 (11,3%)	11,4%
	Não	411	0 (0%)	0%
Pastoreio em regadio	Sim	69	26 (37,7%)	38,1%
	Não	592	3 (0,5%)	0,5%
Estabulação permanente dos borregos	Sim	365	4 (1,1%)	1,1%
	Não	296	25 (8,4%)	8,5%
Frequência de desparasitação	1 vez ano	143	26 (18,2%)	18,4%
	2 vez ano	518	3 (0,6%)	0,6%
Estação do ano	Primavera	83	0 (0%)	0%

	Outono	428	27 (6,3%)	6,4%
	Inverno	150	2 (1,3%)	1,4%
Total		661	29 (4,4%)	4,4%

5.4 Análise dos fatores de risco associados à infecção por *F. hepatica*

Os resultados do modelo linear generalizado misto estão descritos na Tabela 7. De acordo com estes dados, observou-se que a variável “Pastoreio em regadio” foi a única variável que apresentou uma relação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com a serologia positiva a *F. hepatica*. Assim, os ovinos pertencentes a explorações que praticavam pastoreio em regadio, apresentavam um risco 431,20 vezes superior de contrair infecção por *F. hepatica* ($OR > 1$).

Tabela 7: Resultados do modelo linear generalizado misto para os fatores de risco associados à seropositividade de *F. hepatica* (as variáveis significativas encontram-se a negrito).

Variável	Fatores	Odds ratio	IC _{95%}	p
Raça	Merina Branca	Parâmetro de referência	-----	0,7960
	Merina Preta	0,46	0,00 – 162,83	
Sexo	Feminino	Parâmetro de referência	-----	0,8890
	Masculino	1,32	0,03 – 62,58	
Idade (meses)	6-12meses	Parâmetro de referência	-----	1
	< 6 meses	$4,37 \times 10^{-108}$	0 – Inf	
Tamanho do efetivo	< 500	Parâmetro de referência	-----	0,6495
	≥ 500	0,27	0,00 – 79,75	
Presença de zonas alagadas	Não	Parâmetro de referência	-----	0,7057
	Sim	0,37	0,00 – 0,37	
Pastoreio com outras espécies	Não	Parâmetro de referência	-----	1
	Sim	$8,35 \times 10^{12}$	0,00 – Inf	
Pastoreio em regadio	Não	Parâmetro de referência	-----	0.0308
	Sim	431,20	1,75 – 105982,97	
Estabulação permanente dos borregos	Não	Parâmetro de referência	-----	0,7160
	Sim	2,69	0,01 – 554,74	

Frequência de desparasitação	2 vez ano 1 vez ano	Parâmetro de referência 9,23	----- 0,04 – 2093,36	0,4221
Estação do ano	Inverno Outono Primavera	Parâmetro de referência 1,12 0	----- 8,71×10 ⁻⁷ – 1448499,15 0,00 – Inf	0,9870 1

5.5 Resultados sanguíneos

5.5.1 Relação entre a seroprevalência e os parâmetros do hemograma e os parâmetros bioquímicos

Na Tabela 8 estão expressos os dados relativos ao número de animais que apresentavam os valores de hemograma e bioquímicos alterados em relação aos valores de referência, e a respetiva seroprevalência. Foram apenas tidos em consideração os parâmetros causados por ação do parasita em estudo, nomeadamente: anemia (HCT < 27%), hipoproteinémia (< 6 g/dL), hipoalbuminémia (< 2,4 g/dL), FA aumentada (> 390 UI/L), AST aumentada (> 280 UI/L), ALT aumentada (> 38 UI/L) (Jackson & Cockcroft, 2002).

Relativamente à variável “anemia”, das 661 amostras de sangue recolhidas, não foi possível obter informação relativa aos valores de hemograma de 48 animais, devido a hemólise do sangue. Dos ovinos seropositivos, nenhum apresentou valores de hematócrito correspondentes a anemia.

Nas análises bioquímicas, não foi possível obter os valores da proteína sérica total de 26 animais, os valores de albumina sérica e de FA de 22 animais e os valores de AST e ALT de 25 animais. Nenhum dos animais seropositivos apresentou alterações ao nível do HCT, compatíveis com anemia e dos valores das enzimas hepáticas, mas 3,5% e 7,8% apresentavam hipoproteinémia e hipoalbuminémia, respetivamente.

Tabela 8: Seroprevalência de *F. hepatica* associada às diferentes variáveis e categorias em estudo.

Variável	Categoria	nº animais	nº e % animais positivos	Seroprevalência (%)
Anemia	Sim	63	0 (0%)	0%
	Não	550	26 (4,7%)	4,8%
Hipoproteinemia	Sim	174	6 (3,4%)	3,5%
	Não	461	22 (4,8%)	4,8%
Hipoalbuminemia	Sim	13	1 (7,7%)	7,8%
	Não	626	28 (4,5%)	4,5%
FA aumentada	Sim	46	0 (0%)	0%
	Não	593	29 (4,9%)	4,9%
AST aumentada	Sim	7	0 (0%)	0%
	Não	629	29 (4,6%)	4,7%
ALT aumentada	Sim	8	0 (0%)	0%
	Não	628	29 (4,6%)	4,7%

A realização do teste de normalidade Shapiro-wilk, para os valores do HCT, revelou um valor de p inferior a 0,05 ($p < 0,001$), o que conduziu à rejeição da H_0 e à conclusão de que os dados não se encontravam normalmente distribuídos. Observou-se que, a mediana do HCT nos animais seropositivos foi de 29,9%, enquanto a mediana do HCT dos animais seronegativos foi de 30%. As diferenças observadas não foram estatisticamente significativas pelo Teste Wilcoxon ($p=0,208$) (Gráfico 4).

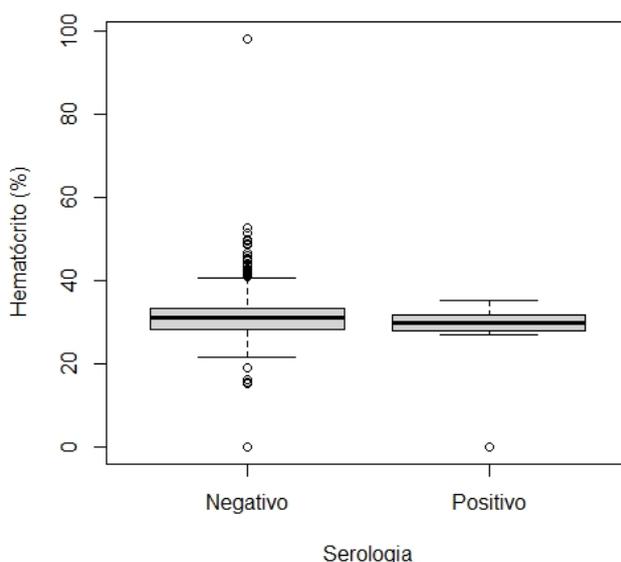


Gráfico 4: *Boxplot*- Distribuição dos valores do HCT nos animais seronegativos e seropositivos.

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk para o parâmetro de proteína sérica total revelou um valor de p inferior a 0,05 ($p < 0,001$), indicando que a distribuição dos valores não se encontrava normalmente distribuída. A mediana dos valores de proteína sérica total observada nos ovinos seronegativos foi de 6,28 g/dL, e nos ovinos seropositivos foi de 6,32 g/dL, com um valor de $p=0,7703$ (Teste Wilcoxon) (Gráfico 5). Não se observaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) relativamente aos valores medianos para a proteína sérica total.

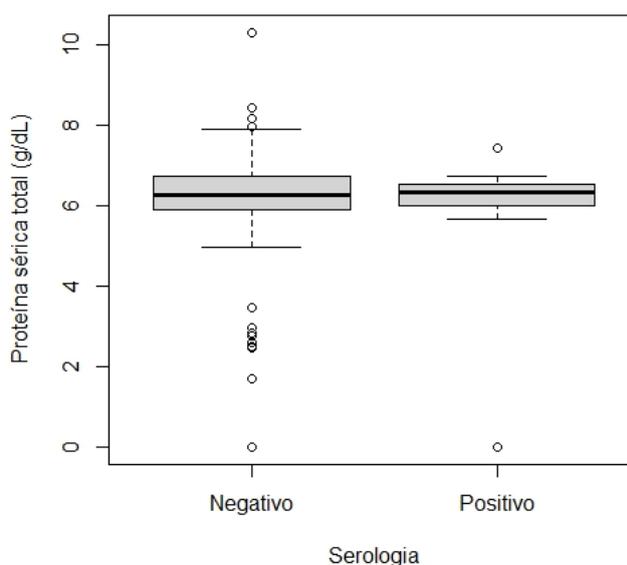


Gráfico 5: *Boxplot*- Distribuição dos valores de proteína sérica total nos animais seronegativos e seropositivos.

Para o parâmetro da albumina sérica, o valor de p obtido pelo teste da normalidade de Shapiro-Wilk foi inferior a 0,05 ($p < 0,001$), pelo que se concluiu que os valores de albumina sérica não seguiam uma distribuição normal. A mediana do valor de albumina sérica nos ovinos seronegativos foi de 2,785 g/dL, ao passo que nos ovinos seropositivos foi de 2,850 g/dL, com um valor de $p=0,694$ (Teste Wilcoxon) (Gráfico 6). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) nos valores de mediana para a albumina sérica.

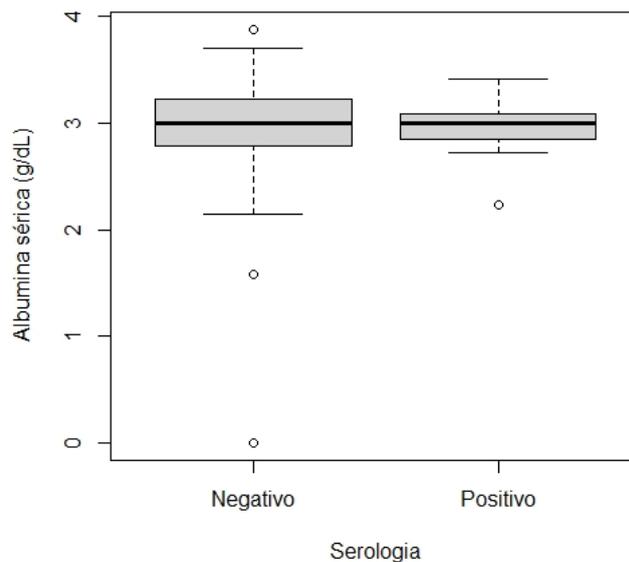


Gráfico 6: *Boxplot*- Distribuição dos valores de albumina sérica nos animais seronegativos e seropositivos.

O resultado do teste da normalidade de Shapiro-Wilk para os valores de FA evidenciou um valor de p inferior a 0,05 ($p < 0,001$), o que conduziu à conclusão de que os dados não se encontravam normalmente distribuídos. A mediana dos valores de FA nos animais seronegativos foi de 193 UI/L e nos animais seropositivos foi de 143 UI/L, com um valor de $p=0,006$ (Teste Wilcoxon) (Gráfico 7). Verificou-se a existência de uma relação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para as diferenças na mediana dos valores de FA.

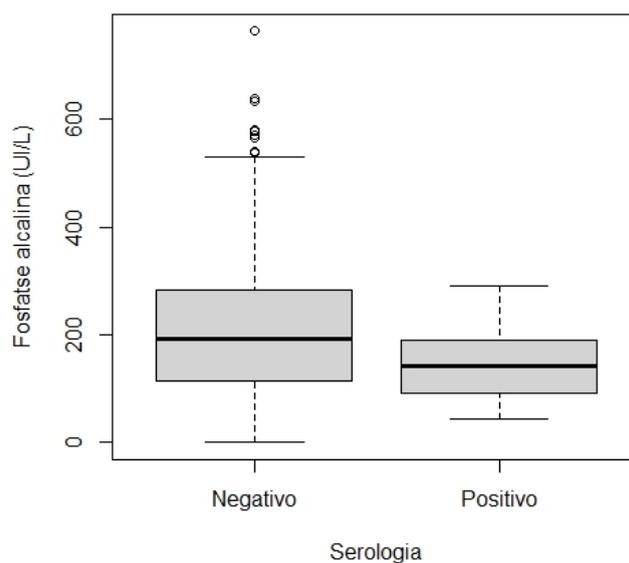


Gráfico 7: *Boxplot*- Distribuição dos valores de FA nos animais seronegativos e seropositivos.

O Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para os valores do AST, revelou um valor de p inferior a 0,05 ($p < 0,001$), pelo que os valores de AST não seguem uma distribuição normal. A mediana do valor de AST nos animais seronegativos foi de 119 UI/L, enquanto nos animais seropositivos foi de 131 UI/L, com um valor de $p=0,1755$ (Teste Wilcoxon) (Gráfico 8). As diferenças entre as medianas dos valores de AST não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

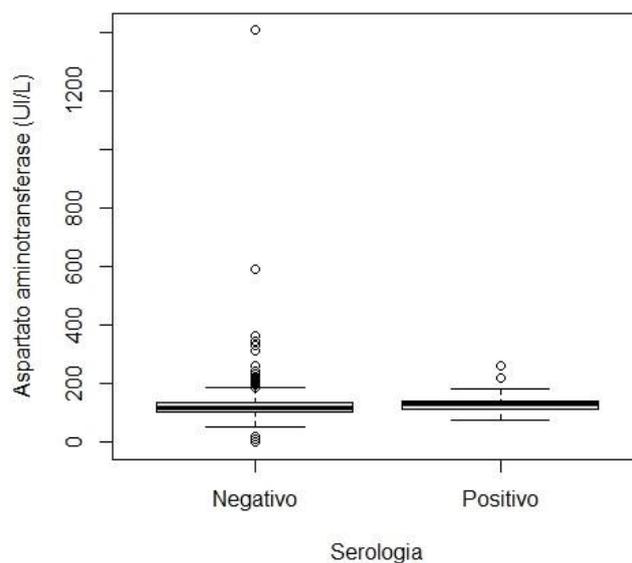


Gráfico 8: *Boxplot*- Distribuição dos valores de AST nos animais seronegativos e seropositivos.

A realização do teste de normalidade Shapiro-wilk para o parâmetro bioquímico ALT, revelou um valor de p inferior a 0,05 ($p < 0,001$), o que levou à conclusão de que distribuição dos dados não é normal. A mediana do valor de ALT nos ovinos seronegativos foi de 17 UI/L e nos ovinos seropositivos foi de 20 UI/L, com um valor de $p= 0,0027$ (Teste Wilcoxon) (Gráfico 9). As diferenças entre as medianas para os valores de ALT foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

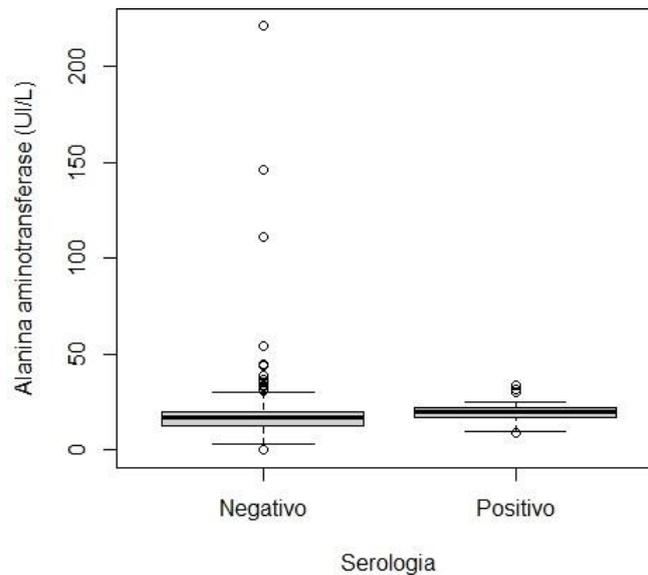


Gráfico 9: *Boxplot*- Distribuição dos valores de ALT nos animais seronegativos e seropositivos.

5.6 Total de animais positivos: Sedimentação natural modificada e ELISA

Dos 29 animais positivos pelo teste ELISA, 13 apresentaram ovos de *F. hepatica* na técnica de sedimentação natural modificada, enquanto dos 14 animais positivos pela técnica de sedimentação, 1 foi negativo para a presença de anticorpos anti-*F.hepatica*. Assim, as duas técnicas combinadas permitiram detetar um total de 30 ovinos positivos no universo dos 675 animais incluídos no estudo (Tabela 9).

5.6.1 Concordância das técnicas laboratoriais

Encontram-se expressos na Tabela 9 os dados da análise do grau de concordância entre os resultados obtidos pela coprologia, para pesquisa de ovos nas fezes e pela serologia, para pesquisa de anticorpos específicos contra *F. hepatica*. Analisando o valor de Kappa obtido (0,59), conclui-se que existe um grau de concordância moderada (Landis & Koch, 1977) entre as duas técnicas laboratoriais empregues.

Tabela 9: Total de animais positivos para *F. hepatica* pelas técnicas laboratoriais realizadas e respetivo valor de kappa.

Técnica laboratorial	nº animais	nº animais positivos	Kappa (IC _{95%})
Sedimentação natural modificada	675	14	0,59
ELISA	661	29	(0,52-0,66)
Total (Sedimentação natural modificada + ELISA)	675	30	

5.7 Análise geográfica

5.7.1 Caracterização das explorações

As amostras incluídas no estudo foram recolhidas num total de 28 explorações em 15 concelhos e 23 freguesias na região do Alentejo (Anexo 4). Das explorações visitadas, 15 localizavam-se no distrito de Évora, 8 no distrito de Portalegre e 6 no distrito de Beja. Por exploração foram testados em média 24,1 animais. O efetivo ovino total nestas explorações apresentava uma dimensão média de 738,2 animais, variando entre 69 e 2107 animais. As áreas de pastoreio disponíveis possuíam em média 477,5 ha, variando entre 32 ha e 1146 ha.

5.7.2 Distribuição por distrito

O distrito com o maior número de animais testados foi Évora (58%), seguido do distrito de Portalegre (28%) e do distrito de Beja (14%) (Gráfico 10).

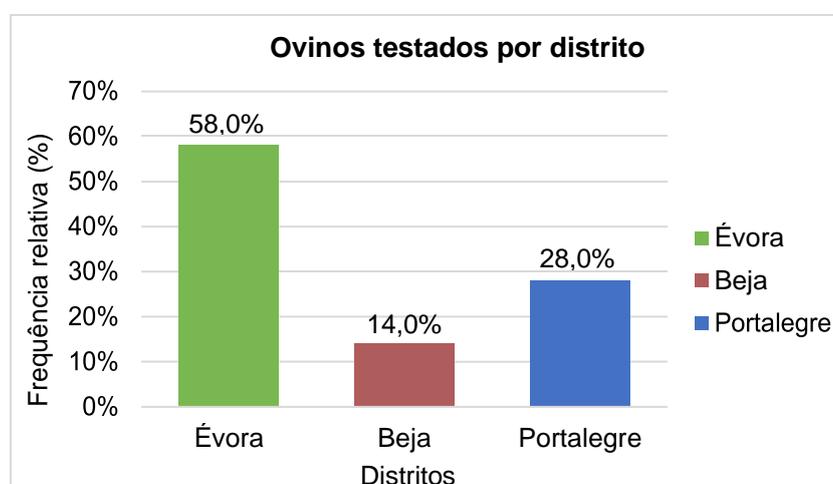


Gráfico 10: Distribuição (%) dos ovinos testados em função dos distritos.

Ao considerar o número de casos de infecção por *F. hepatica*, verificamos que grande parte dos casos positivos se concentrou no distrito de Évora, com uma prevalência de 7,4%, e Beja com 1,1%. Não foram detetados animais positivos em Portalegre (Tabela 10).

Tabela 10: Distritos e número de animais testados, número de animais positivos e respetivas prevalências.

Distrito	nº animais	nº animais Positivos	Prevalência distrito	IC _{95%}
Évora	391	29	7,4%	5,21-10,45%
Beja	95	1	1,1%	0,19-5,72%
Portalegre	189	0	0%	0-1,99%

5.7.3 Explorações positivas

As explorações foram consideradas infetadas, quando pelo menos um animal obteve um resultado positivo quer pela técnica de sedimentação natural modificada, quer pela técnica ELISA. Assim, das 28 explorações amostradas, 4 foram positivas para *F. hepatica*, o que se traduziu numa percentagem de explorações infetadas de 14,3%. Das 4 explorações positivas, todas apresentaram pelo menos um animal positivo pela técnica ELISA e 2 explorações apresentaram pelo menos um animal positivo para ambas as técnicas.

Na Figura 14 encontra-se representada a distribuição geográfica das 28 explorações visitadas e a respetiva prevalência intraexploração nas explorações consideradas positivas. A prevalência intraexploração variou entre 6,7% e 80,7%.

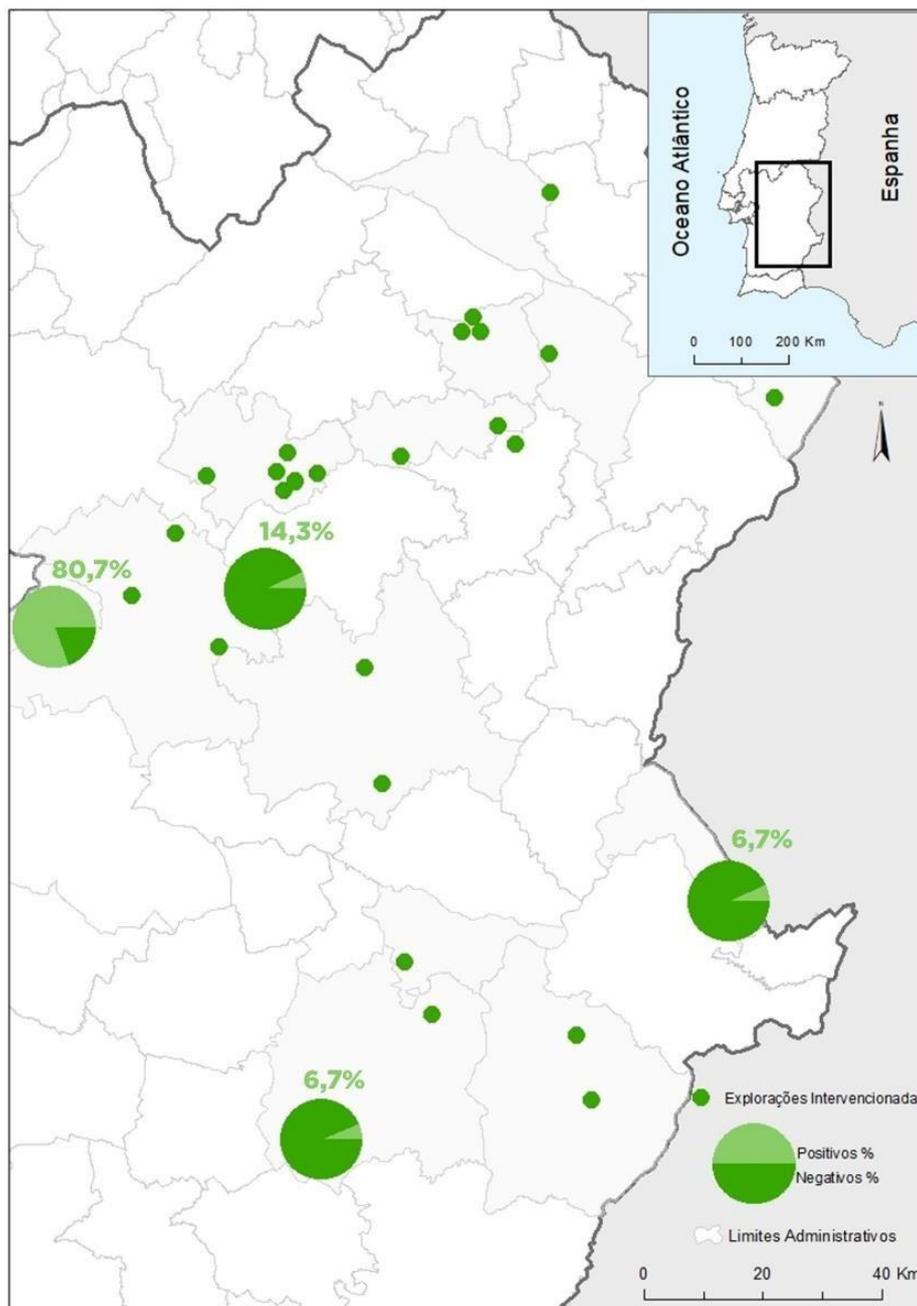


Figura 14: Distribuição geográfica das explorações amostradas e prevalência intraexploração nas explorações positivas.

5.7.3.1 Distribuição por concelho e freguesia

As 4 explorações positivas identificadas no trabalho localizavam-se em 4 freguesias pertencentes a 4 concelhos na região do Alentejo. Os valores de prevalência foram inferiores a 15% em todas as freguesias, à exceção de Vendas Novas que se destacou por apresentar uma prevalência de 80,7% (Tabela 11).

Tabela 11: Freguesias e concelhos positivos, número de animais testados, número de animais positivos e respetivas prevalências.

Distrito	Concelho	Freguesia	nº animais concelho	nº animais freguesia	Pos.	Prevalência concelho (IC _{95%})	Prevalência freguesia (IC _{95%})
Évora	Vendas	Vendas	31	31	25	80,7%	80,7%
	Novas	Novas				(63,7-90,8%)	(63,7-90,8%)
	Arraiolos	Arraiolos	14	14	2	14,3%	14,3%
						(4-39,4%)	(4-39,4%)
	Mourão	Granja	30	30	2	6,7%	6,7%
						(1,9-21,3%)	(1,9-21,3%)
Beja	Beja	Albernoa	22	15	1	4,6%	6,7%
						(0,8-21,8%)	(1,2-29,8%)

6. Discussão

Os resultados obtidos na presente dissertação de mestrado revelaram que, os ovinos das raças Merina Branca e Merina Preta apresentaram uma baixa prevalência de *F. hepatica* nas regiões do Alentejo em estudo. A investigação dos possíveis fatores de risco associados à serologia positiva a *F. hepatica*, apenas identificou a variável “Pastoreio em regadio” como estatisticamente significativa.

Neste estudo, as análises coprológicas realizadas apontam para uma percentagem de ovinos infetados de 2,1% (14/675). Estes dados vão ao encontro da prevalência de 1,8%, já discutida anteriormente, obtida por Ruano *et al.* (2019) num estudo que envolveu ovinos da raça Churra Galega Mirandesa do município de Miranda do Douro (distrito de Bragança). Num outro estudo, realizado na região do Baixo Alentejo não foram detetados animais positivos para *F. hepatica* pelo método de sedimentação (Banha, 2016). A nível europeu, os valores de prevalência obtidos por coprologia variam muito, tendo sido determinada uma prevalência geral de *F. hepatica* de aproximadamente 16% para a Europa. Os valores mais elevados foram reportados na Irlanda (cerca de 62%), e os mais baixos na Suíça (cerca de 4%) e Itália (cerca de 8%) (Rinaldi *et al.*, 2015).

A prevalência de *F. hepatica*, determinada no presente trabalho através da análise serológica de 661 soros com o kit comercial *IDEXX Fasciolosis Verification test* (ELISA) foi de 4,4% (29/661). Este valor não difere muito da seroprevalência de 1% obtida anteriormente por Banha (2016) em ovinos e caprinos do Baixo Alentejo utilizando um teste de ELISA indireto (*POURQUIER-ELISA Fasciola hepatica Serum and Milk Verification*). No que respeita a estudos realizados em

ovinos no continente europeu, na Turquia (região do mar negro), Acici *et al.* (2017) obtiveram uma seroprevalência de 31,4% utilizando um teste ELISA indireto e, em Espanha (Galiza), a prevalência determinada através de testes ELISA sanduiche e ELISA indireto foi de 39,1% e 56%, respetivamente (Paz-Silva *et al.*, 2003). No continente Asiático, nomeadamente na China (planalto Qinghai-Tibete), o resultado de seroprevalência determinado pelo mesmo Kit comercial ELISA empregue no presente ensaio foi de 37,1% (Gao *et al.*, 2020). No que respeita ao continente americano, Munguía-Xóchihua *et al.* (2007) recorrendo à técnica de ELISA indireto obteve uma prevalência de 30,6% numa área semidesértica na zona noroeste do México. Já no continente africano, na Tunísia (Oásis de Gafsa), a seroprevalência registada foi de 35% (Hammami *et al.*, 2007).

A discrepância entre os valores encontrados na região em estudo e os reportados a nível global podem ser explicados pela existência de condições ecológicas, geoclimáticas e de origem antrópica locais menos propícias ao desenvolvimento dos ovos e estádios larvares do parasita, bem como do seu hospedeiro intermediário (Beesley *et al.*, 2018). Como é sabido, as condições climáticas, principalmente de humidade e temperatura, influenciam fortemente o ciclo de vida de *F. hepatica* e o desenvolvimento de *G. truncatula*, o que se reflete na intensidade e impacto desta infeção parasitária. Assim, deve ser tido em conta o período temporal no qual o estudo decorreu, entre o final do verão de 2019 (agosto 2019) e o início do Inverno de 2021 (janeiro 2021). De acordo com o Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), o ano de 2019 classificou-se como quente e seco. O valor médio de temperatura média do ar foi de 15,58 °C (+0,32 °C em relação ao valor normal), e o valor médio da temperatura mínima do ar foi de 9,61 °C (-0,41 °C em relação ao valor normal). Em relação à precipitação total anual, o valor médio de 7556 mm correspondeu a cerca de 86% do valor normal, com valores de precipitação particularmente baixos no Alentejo (IPMA, 2019). O ano de 2020 foi o quarto ano mais quente dos últimos 90 anos em Portugal continental e foi qualificado como muito quente e seco. Registou-se um valor médio da temperatura média do ar de 16,22 °C (+0,96 °C em relação ao valor normal), e um valor médio da temperatura mínima do ar de 10,49 °C (+0,47 °C em relação ao valor normal). A precipitação total anual, 746,8 mm, correspondeu a cerca de 85% do valor normal, o que contribuiu para a situação de seca meteorológica, especialmente nas regiões a sul do Tejo e com maior incidência no Baixo Alentejo (IPMA, 2020). Janeiro de 2021, foi um mês muito frio e seco, o quarto mês mais frio dos últimos 20 anos. O valor médio de temperatura média foi de 8,02 °C (-0,79 °C em relação ao valor normal) e o valor médio de temperatura mínima de 3,73 °C (-0,81 °C em relação ao valor normal). A quantidade de precipitação em janeiro foi de 90,8 mm, correspondente a 77% do valor normal, o que favoreceu o aparecimento da classe de seca fraca nalguns locais do Baixo Alentejo (IPMA, 2021). No geral, durante o período em estudo, constaram-se temperaturas médias (acima de 15 °C) e mínimas (superiores a 5 °C) favoráveis ao desenvolvimento do parasita e do seu hospedeiro intermediário. Porém, os baixos valores de

precipitação verificados, e a conseqüente falta de humidade, terão constituído um importante fator limitante ao ciclo biológico de *F. hepatica*, resultando em interrupções deste.

Para além disto, importa ter em conta a idade dos animais avaliados. O facto de estes serem ainda jovens, com idade inferior a 12 meses, poderá ter contribuído para a baixa seroprevalência observada. A bibliografia existente aponta para prevalências superiores em animais mais velhos já que estes estão expostos a uma maior pressão de infeção pelas metacercárias, devido a permanências mais longas na pastagem. Desta forma, quanto mais velho for o animal, maior é a probabilidade deste, durante a sua vida, contactar com a forma infetante do parasita e, conseqüentemente, desenvolver infeção (Rinaldi *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2020). Ademais, a duração mínima para que o ciclo de vida do parasita se complete é de 17 a 19 semanas (Taylor *et al.*, 2016) pelo que é improvável encontrar valores de prevalência elevados em animais tão jovens (Pinilla *et al.*, 2020). Coloca-se também a hipótese de que, a baixa prevalência verificada seja resultado de uma resistência e resiliência à infeção parasitária por *F. hepatica* por parte da raça ovina Merina Preta e Merina Branca. Boyce *et al.*, (1987) e Bishop & Morris, (2007) referem nos seus estudos que as raças autóctones são mais resistentes ao parasitismo comparativamente às raças exóticas ou menos bem-adaptadas ao meio ambiente.

A grande maioria dos produtores visitados aplicava dois tratamentos anti-helmínticos anuais de forma profilática, o que reduz significativamente as possibilidades de infeção. Não obstante, importa realçar que o esquema de desparasitação com dois tratamentos fasciolocidas anuais apenas está recomendado em áreas onde a ocorrência de fasciolose é considerada endémica (Vázquez & Pérez, 2001).

Embora se tenha registado uma seroprevalência superior nos ovinos Merino Branco (6,7%), em relação aos ovinos Merino Preto (0,8%), a análise dos potenciais fatores de risco relacionados com a serologia positiva a *F. hepatica* não identificou a variável “Raça” como estatisticamente significativa.

Para a variável “Sexo”, verificou-se um seroprevalência superior no sexo feminino (4,8%), comparativamente ao sexo masculino (1,4%). O fator sexo não foi reconhecido como fator de risco, o que está de acordo com estudos anteriormente realizados (Valderrama Pomé, 2016; Pinilla *et al.*, 2020). Por outro lado, outros autores reconhecem o sexo como um fator de risco (Gao *et al.*, 2020). Importa dizer que as fêmeas poderão estar mais predispostas ao parasitismo, devido ao stress e depressão do sistema imunológico durante a gestação e no período peri-parto (Urquhart *et al.*, 1996).

Relativamente à variável “Idade”, apenas se registaram animais serologicamente positivos entre a faixa etária dos 6 aos 12 meses (5,1%). A maior incidência da infeção nos animais mais velhos pode ser explicada pelo facto de que, à medida que a idade avança, aumentam as possibilidades dos ovinos contactarem com a forma infetante do parasita e contraírem a infeção. Também esta

variável não foi considerada um fator de risco porém, a informação veiculada por outros estudos contrariam este resultado ao confirmarem a existência de um risco de infecção mais elevado associado a animais mais velhos (Rinaldi *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2020; Pinilla *et al.*, 2020).

A seroprevalência nos efetivos de menor dimensão (8,1%), “< 500 animais”, foi superior à seroprevalência dos efetivos de maior dimensão (0,6%), com “≥ 500 animais”. Contrariamente ao observado, Abdel-Hakeem & Omar, (2019) obtiveram prevalências superiores em rebanhos de maior tamanho o que, segundo estes, está relacionado com uma maior densidade de animais no rebanho, favorecendo um contacto mais frequente com a infecção entre as ovelhas saudáveis e as parasitadas por *F. hepatica*. A seroprevalência superior observada nos rebanhos de menor dimensão poderá estar associada a práticas de gestão do rebanho que não foram aferidas no inquérito aplicado aos agricultores. Embora na análise dos fatores de risco, o “Tamanho de efetivo” não tenha sido significativo, Takeuchi-Storm *et al.*, (2017) e Bennema *et al.*, (2011) reconheceram nos seus estudos a dimensão do efetivo como um fator de risco. Estes autores apontam igualmente a densidade do efetivo e causas não determinadas ligadas ao manejo da exploração como possíveis explicações para os seus achados.

As explorações com zonas alagadas apresentaram uma seroprevalência mais elevada (10,6%), comparativamente às explorações sem zonas alagadas (0,5%). No entanto, contrariamente ao que seria esperado, a variável “Presença de zonas alagadas”, não foi considerada estatisticamente significativa no modelo misto. A existência de zonas alagadas é um fator de risco sugerido na literatura e confirmado por vários estudos, já que estes tipos de áreas proporcionam o ambiente ideal para a sobrevivência e propagação do hospedeiro intermediário *G. truncatula* (Kantzoura *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2016; Takeuchi-Storm *et al.*, 2017).

No que respeita à variável “Pastoreio com outras espécies”, todos os animais seropositivos eram provenientes de explorações cujo pasto era partilhado com outros animais (11,4%). Estes dados são suportados por Pinilla *et al.*, (2020) que registou valores de prevalência mais elevados em ovinos que coabitavam com várias espécies. O “Pastoreio com outras espécies” perdeu significância na investigação dos fatores de risco, resultado que é apoiado por Munita *et al.*, (2019), que também não encontrou nenhuma relação entre a infecção por *F. hepatica* e o pastoreio de ovelhas em conjunto com outros animais. Apesar de ter sido recolhida informação relativa à espécie com a qual os ovinos partilhavam o pasto, esta não foi incluída no tratamento estatístico dos dados devido ao número insuficiente de respostas obtidas.

Por outro lado, verificou-se que a variável “Pastoreio em regadio” estava associada a um maior risco de infecção por *F. hepatica*. Estes dados são corroborados por Durr *et al.*, (2005), que também identificou o regadio como um fator de risco significativo para a presença de fasciolose, e por Vázquez & Pérez (2001) que identifica as áreas de regadio como locais onde prevalece uma maior concentração de metacercárias.

Para os borregos com estabulação permanente a seroprevalência foi inferior (1,1%) em relação ao que não eram colocados em estabulação permanente (8,5%). Os borregos não estabulados estarão mais suscetíveis à infecção, devido à possibilidade de pastarem em campos contaminados com metacercárias, o que pode explicar a desigualdade entre as seroprevalências observadas. No entanto, a variável “Estabulação permanente dos borregos” também não foi identificada como fator de risco.

Embora não tenha atingido significância estatística, os ovinos sujeitos a desparasitação uma vez por ano apresentaram uma seroprevalência superior (18,4%) relativamente aos ovinos desparasitados duas vezes ao ano (0,6%). Estes dados vão ao encontro dos resultados de Munita *et al.*, (2019), que verificaram que a maioria dos rebanhos negativos recebiam dois tratamentos anti-helmínticos por ano, tendo a frequência da desparasitação sido identificada como um fator de risco pelo autor. Infelizmente, não foi possível relacionar a serologia positiva a *F. hepatica* com o tipo de anti-helmíntico utilizado, bem como a altura da sua administração pelos produtores por falta de resposta nos inquéritos realizados.

Em relação à estação do ano em que as amostras foram recolhidas, o outono foi a estação com a seroprevalência mais elevada (6,4%), logo seguido do inverno (1,4%) e por fim o verão (0%). Estes resultados são consistentes com a informação transmitida pela literatura que refere o outono como o período de maior risco de infecção para os hospedeiros definitivos (Vázquez & Pérez, 2001). No verão, o risco de infecção é geralmente baixo, devido à altas temperaturas e à baixa pluviosidade característica dos meses mais quentes e secos (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012; Caminade *et al.*, 2015) o que ajuda a explicar a inexistências de casos positivos nesta estação.

Embora a redução do HCT e conseqüente anemia seja uma alteração do hemograma evidenciada pelos animais acometidos por fasciolose (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012; Mehlhorn, 2016a), nenhum dos 29 ovinos seropositivos apresentou valores de HCT correspondentes a anemia. Para além disto, a mediana do HCT dos animais seronegativos e seropositivos foi idêntica ($p=0,208$). Estes dados são contrariados por estudos anteriores, que verificaram a ocorrência de anemia em ovelhas infetadas por *F. hepatica* (Matanović *et al.*, 2007; Lotfollahzadeh *et al.*, 2008; Valero *et al.*, 2008; Fouda *et al.*, 2013) e a existência de valores médios do HCT inferiores, comparativamente a animais não infetados (Valero *et al.*, 2008). As cargas parasitárias que acometeram os animais avaliados poderão ter sido insuficientes para provocar reduções do HCT compatíveis com anemia, o que poderá justificar os dados obtidos.

No que concerne aos parâmetros bioquímicos avaliados, nomeadamente a proteína sérica total, albumina sérica, FA, AST e ALT, não se detetaram alterações relevantes nos animais positivos a *F. hepatica*. O teste não paramétrico de Wilcoxon aplicado à analítica bioquímica revelou a existência de uma diferença significativa entre as medianas do grupo de seropositivos e de seronegativos apenas em relação aos parâmetros FA ($p= 0,006$) e ALT ($p= 0,0027$). Embora vários estudos indiquem um aumento das enzimas hepáticas, designadamente da FA, AST e

ALT, e a diminuição sérica das proteínas totais e da albumina sérica em animais com fasciolose (Lotfollahzadeh *et al.*, 2008; Kozat & Denizhan, 2010; Fouda *et al.*, 2013; Nasreldin & Zaki, 2020). alguns autores não registaram aumentos nos valores de AST e ALT nos animais infetados (Bulgjin *et al.*, 1984; Matanović *et al.*, 2007; Hodžić *et al.*, 2013). A AST aumenta durante a passagem das formas imaturas pelo parênquima hepático, regressando aos valores normais cerca de 11 semanas após a infeção (Gonzalo-Orden *et al.*, 2003). Assim, o facto de não se ter observado aumento desta enzima em nenhum animal seropositivo pode ser justificado pela inexistência de formas parasitárias migrantes. Apesar da FA e das enzimas ALT e AST serem indicadoras de lesão hepatobiliar e hepatocelular, respetivamente (Boone *et al.*, 2005), outros autores demonstraram que a medição das enzimas GDH e GGT poderá ser mais sensível na avaliação de lesões ao nível do fígado e dos canais biliares em situações de fasciolose (Urquhart *et al.*, 1996; Kozat & Denizhan, 2010). Importa salvaguardar que, não é possível garantir que todos os animais testados se encontravam parasitados, visto que um resultado serológico positivo apenas indica que o animal teve contacto com o parasita, no passado ou presente, e como consequência desenvolveu uma resposta imunológica (Alvarez Rojas *et al.*, 2014). A ausência de parasitismo no momento da recolha das amostras pode ter sido o motivo pelo qual os parâmetros hematológicos e bioquímicos não apresentarem alterações.

A prevalência detetada pela abordagem serológica (4,4%) foi superior à detetada pela coprologia (2,1%). A diferença entre a coproprevalência e a seroprevalência foi relatada de forma semelhante em estudos anteriores que mostraram valores mais elevados de prevalência com base em análises serológicas em comparação com o método coprológico (Munguía-Xóchihua *et al.*, 2007; Paz-Silva *et al.*, 2010). A explicação para esta diferença é que os anticorpos anti-*F. hepatica*, que se desenvolvem duas a quatro semanas após o início da infeção, podem ser detetados muito antes da deteção de ovos nas fezes, que só estão presentes 10 semanas após a infeção (Taylor *et al.*, 2016). Além disso, os anticorpos permanecem em circulação até 20 semanas após a infeção. Portanto, animais recentemente expostos ao parasita, assim como os que recuperaram da infeção, irão testar positivo para a presença de anticorpos anti-*Fasciola* sem haver eliminação de ovos nas fezes (Alvarez Rojas *et al.*, 2014).

Contrariamente ao que seria esperado, 1 dos 14 animais positivos pela técnica de sedimentação, testou negativo para a presença de anticorpos anti-*F. hepatica*. Como a seroconversão ocorre mais cedo do que a libertação de ovos para o exterior, o expectável seria que todos os animais que testassem positivo ao exame das fezes também testassem positivo no ensaio serológico. Uma possível explicação para o sucedido poderá estar relacionada com a idade dos animais que, por serem ainda jovens, apresentam um sistema imunitário ainda imaturo traduzindo-se numa resposta imunológica inapropriada ao estímulo antigénico do trematode (Paz-Silva *et al.*, 2003). Ainda que, o kit comercial *IDEXX Fasciolosis Verification test* apresente um valor de sensibilidade elevado, nomeadamente 99%, não podemos excluir a possibilidade de estarmos perante um resultado serológico falso negativo.

A comparação entre os resultados obtidos através da técnica de sedimentação natural modificada e os resultados obtidos através da técnica de ELISA, evidenciaram um grau de concordância moderado pelo teste de Kappa. Estes resultados vão ao encontro do que era previsto, já que a maioria das amostras analisadas por coprologia com resultado positivo, também testaram positivo à serologia.

Por fim, a análise da distribuição geográfica dos ovinos e explorações identificadas como positivas na região do Alentejo, evidenciou uma aparente aglomeração de casos positivos no distrito de Évora, mais concretamente no concelho e freguesia de Vendas Novas, com prevalências de 7,4% (29/391) e 80,7% (25/31), respetivamente. A percentagem de explorações infetadas foi de 14,3% (4/28) tendo as prevalências intraexploração variado entre 6,7% e 80,7%. Apesar de, na região do Alentejo, as condições edafoclimáticas condicionarem a existência de gastrópodes aquáticos, principalmente devido à reduzida pluviosidade e baixo predomínio de terrenos de regadio, poderão ocorrer, em algumas explorações, pequenas áreas próximas de ribeiros, barragens, ambientes inundáveis e húmidos, propícias à manutenção do ciclo de *F. hepatica*. Associado à presença de temperaturas ótimas, este parasita poderá encontrar aí as condições necessárias para se desenvolver (Banha, 2016). Assim, tal como descrito, a existência de microclimas favoráveis ao desenvolvimento do parasita, poderá estar na origem das distintas prevalências espaciais observadas. A disparidade entre os valores de prevalência intraexploração poderá ter sido influenciada pelas diferentes práticas de produção e gestão da exploração adotadas pelos produtores, principalmente no que diz respeito ao controlo e profilaxia da doença. Ressalva-se que, esta análise é apenas observacional, sendo necessários outros estudos, com instrumentos de análise espacial mais adequados, para se definir padrões e contruir mapas de risco para a ocorrência da fasciolose.

Existiram naturalmente algumas limitações neste estudo, nomeadamente a exclusão de amostras de sangue, o que impossibilitou a obtenção dos valores de hemograma e bioquímicos e a obtenção de soro para realização dos testes serológicos. A hemólise das amostras sanguíneas e falhas na recolha das mesmas estarão na origem da sua exclusão. Também a ocorrência de falhas na resposta a certas questões do questionário terá impossibilitado o tratamento e apreciação de alguns dados que se poderiam vir a relevar interessantes. A dimensão da amostra, apesar de significativa, poderia ter sido mais uniforme no que à raça, sexo e idade dos animais diz respeito. Além disto, a inclusão neste estudo de animais jovens, com idade inferior a 12 meses, constituiu certamente uma limitação ao mesmo. Paralelamente a isto, por se se tratar de um estudo experimental no âmbito de uma dissertação de mestrado, o período temporal limitado que lhe está associado terá sido um dos principais fatores limitadores.

7. Conclusão

O estudo elaborado na presente dissertação cumpriu o objetivo a que se propôs, ao fornecer novos dados epidemiológicos que permitiram clarificar e melhorar o conhecimento do panorama atual relativamente à prevalência de *F. hepatica* na região do Alentejo, com especial foco nas raças autóctones Merina Branca e Merina Preta. A escassez de informação sobre esta temática, principalmente no que respeita a dados de seroprevalência, não só ao nível da região em estudo como a nível nacional, vem reforçar a importância da realização deste trabalho.

Perante os resultados de prevalência apresentados, nomeadamente de 2,1% pela coprologia e 4,4% pela análise serológica, foi possível concluir que os ovinos das raças Merina Branca e Merina Preta apresentaram uma baixa prevalência de *F. hepatica* na região em estudo. Para este facto terão contribuído as características edafoclimáticas da região alentejana, marcadas principalmente pela reduzida pluviosidade e escassez de pastoreio em regadio, a idade jovem dos animais testados, e as práticas de manejo adotadas pelos produtores, sobretudo a frequência bianual de desparasitação. Por outro lado, levanta-se a possibilidade de resistência genética à infeção por *F. hepatica* destas raças autóctones, conhecidas pelas suas características de longevidade e resistência às doenças, que se apresenta como uma possibilidade a ser explorada. A seleção de ovelhas mais resistentes às parasitoses é uma das estratégias apontadas para diminuir o uso de anti-helmínticos, diminuir a contaminação das pastagens e reduzir as perdas económicas associadas à fasciolose (Torgerson & Claxton, 1999; Abbott *et al.*, 2012).

Este valor de prevalência não se revelou surpreendente, tendo em conta que Banha (2016) já tinha reportado prevalências igualmente baixas para a zona do baixo Alentejo. No entanto, este estudo de prevalência parece ser o primeiro a abranger uma área geográfica tão extensa, que abrangeu áreas do Alto Alentejo (Portalegre), do Centro Alentejo (Évora) e do Baixo Alentejo (Beja).

Relativamente aos fatores de risco, o “Pastoreio em regadio” foi o único fator que apresentou relevância estatística. Salienta-se a importância da investigação e identificação dos fatores de risco para o desenvolvimento de medidas de controlo adequadas, de forma a reduzir a incidência da doença, bem como na necessidade de tratamento, a fim de aumentar a eficiência produtiva dos animais (Kantzoura *et al.*, 2011).

A concentração observada de casos positivos no distrito de Évora, especialmente no concelho e freguesia de Vendas Novas, e a percentagem relativamente elevada de animais infetados nas explorações, que variou entre 6,7% e 80,7%, realça o papel que os microclimas e os tipos de produção e sistema de pastoreio podem exercer nas explorações agropecuárias, levando a diferenças consideráveis na distribuição geográfica dos valores de prevalência. Ainda que, o número total de animais positivos não tenha sido expressivo, os 14,3% de explorações positivas

permite-nos sugerir que a infeção parasitária por *F. hepatica*, embora não predomine na região, pode ter mais relevância do que a que lhe é conferida presentemente. A economia da região alentejana depende fortemente da criação e produção animal e, portanto, os agricultores não devem negligenciar a importância que a fasciolose apresenta para a espécie ovina.

Atendendo às alterações climáticas que se têm vindo a registar, particularmente desde a última década, é de suma importância continuar a avaliar e monitorizar o parasitismo por *F. hepatica* em Portugal, para melhor perceber a dinâmica epidemiológica deste parasita no nosso país, já que se perspetivam alterações na sua abundância, distribuição espacial e sazonalidade. Neste sentido, a vigilância constante, através do desenvolvimento e implementação de sistemas de previsão de risco, são uma ferramenta crucial para auxiliar os agricultores a prever o momento ideal para a administração dos fármacos antiparasitários e/ou implementação de medidas estratégicas de controlo.

Futuramente, seria relevante a realização de uma pesquisa a nível nacional, envolvendo outras raças ovinas exploradas em Portugal, em conjunto com amostras recolhidas de outros locais, por exemplo do norte do país, onde as condições climáticas e agro-ecológicas, são distintas do Alentejo e aplicando inquéritos aos produtores semelhantes ao deste trabalho para se determinar a existência de uma relação entre a prevalência deste parasita, a raça dos ovinos, a localização das explorações, e os fatores de risco associados à infeção por *F. hepatica*.

8. Bibliografia

- Abbott K, Taylor M, Baber P (2012) A Technical Manual for Veterinary Surgeons and Advisers: Sustainable worm control strategies for sheep 4th Edition.
- Abdel-Hakeem SS, Omar MAE (2019) Ovine fascioliasis: environmental epidemiology and meta-analysis of the prevalence, Agro-ecological and economic factors in five provinces of the Nile Delta region of Egypt.
- Acici M, Buyuktanir O, Bolukbas CS, Pekmezci GZ, Gurler AT, Umur S (2017) Serologic detection of antibodies against *Fasciola hepatica* in sheep in the middle Black Sea region of Turkey. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 50:377–381. Doi 10.1016/j.jmii.2015.06.005.
- Alvarez LI, Valladares MM, Canton C, Lanusse CE, Ceballos L (2020) Testing albendazole resistance in *Fasciola hepatica*. *Methods in Molecular Biology* 2137:213–220. Doi 10.1007/978-1-0716-0475-5_16.
- Alvarez Rojas CA, Jex AR, Gasser RB, Scheerlinck JPY (2014) Techniques for the Diagnosis of *Fasciola* Infections in Animals. Room for Improvement. In: Rollinson D, Stothard JR (eds) *Advances in Parasitology*, 1st edn. Academic Press, Oxford, Reino Unido, pp 65–107.
- ANCORME - Associação Nacional de Criadores de Ovinos da Raça Merina (2008) Publicações. In: Raça Merina. <https://www.merina.pt/conteudo.php?idm=20>. Accessed 20 Feb 2021.
- Andrews SJ (1999) The Life Cycle of *Fasciola hepatica*. In: Dalton JP (ed) *Fasciolosis*, 1st edn. CABI Publishing, Dublin, República da Irlanda, pp 1–20.
- Arias M, Lomba C, Dacal V, Vázquez L, Pedreira J, Francisco I, Piñeiro P, Cazapal-Monteiro C, Suárez JL, Díez-Baños P, Morrondo P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2011) Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and north-west Spain. *Veterinary Record* 168:408. Doi 10.1136/vr.d85.
- Arifin MI, Höglund J, Novobilský A (2016) Comparison of molecular and conventional methods for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in the field. *Veterinary Parasitology* 232:8–11. Doi 10.1016/j.vetpar.2016.11.003.
- Banha PMB (2016) Contribuição para Conhecimento do Parasitismo por *Fasciola hepatica* no Baixo Alentejo. Universidade de Évora, Portugal.
- Barbosa R, Pinto C, Garcia P, Rodrigues A (2019) Prevalence of fasciolosis in slaughtered dairy cattle from São Miguel Island, Azores, Portugal. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 17:100319. Doi 10.1016/j.vprsr.2019.100319.

- Bargues MD (2005) Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses. Article in *Journal of Helminthology* 79:257–267. Doi 10.1079/JOH2005297.
- Bargues MD, Horák P, Patzner RA, Pointier JP, Jackiewicz M, Meier-Brook C, Mas-Coma S (2003) Insights into the relationships of Palearctic and Nearctic lymnaeids (Mollusca: Gastropoda) by rDNA ITS-2 sequencing and phylogeny of stagnicoline intermediate host species of *Fasciola hepatica*. *Parasite* 10:243–255. Doi 10.1051/parasite/2003103243.
- Bargues MD, Mangold AJ, Muñoz-Antoli C, Pointier JP, Mas-Coma S (1997) SSu rDNA characterization of lymnaeid snails transmitting human fascioliasis in south and central America. *Journal of Parasitology* 83:1086–1092. Doi 10.2307/3284367.
- Bargues MD, Mas-Coma S (1997) Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* 14:569–577. Doi 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025794.
- Bargues MD, Vigo M, Horak P, Dvorak J, Patzner RA, Pointier JP, Jackiewicz M, Meier-Brook C, Mas-Coma S (2001) European lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infection, Genetics and Evolution* 1:85–107. Doi 10.1016/S1567-1348(01)00019-3.
- Beesley NJ, Caminade C, Charlier J, Flynn RJ, Hodgkinson JE, Martinez-Moreno A, Martinez-Valladares M, Perez J, Rinaldi L, Williams DJL (2018) *Fasciola* and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs. *Transboundary and Emerging Diseases* 65:199–216. Doi 10.1111/tbed.12682.
- Behm C., Sangster N. (1999) Pathology, Pathophysiology and Clinical Aspects. In: Dalton JP (ed) *In: Fasciolosis.*, 1st edn. Dublin, República da Irlanda, pp 185–224.
- Bennema SC, Ducheyne E, Vercruysse J, Claerebout E, Hendrickx G, Charlier J (2011) Relative importance of management, meteorological and environmental factors in the spatial distribution of *Fasciola hepatica* in dairy cattle in a temperate climate zone. *International Journal for Parasitology* 41:225–233. Doi 10.1016/j.ijpara.2010.09.003.
- Bishop SC, Morris CA (2007) Genetics of disease resistance in sheep and goats. *Small Ruminant Research* 70:48–59. Doi 10.1016/j.smallrumres.2007.01.006.
- Boone L, Meyer D, Cusick P, Ennulat D, Bolliger AP, Everds N, Meador V, Elliott G, Honor D, Bounous D, Jordan H (2005) Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in preclinical studies. *Veterinary Clinical Pathology* 34:182–188.
- Boray JC (1967) Studies on experimental infections with *fasciola hepatica*, with particular reference to acute fascioliasis in sheep. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 61:439–450. Doi 10.1080/00034983.1967.11686513.

- Boray JC, Love S (2017) Liver fluke disease in sheep and cattle. In: Department of Primary Industries. www.dpi.nsw.gov.au. Accessed 17 Sep 2021.
- Bowman DD (2014) *Parasitology for Veterinarians*, 10th edn. Elsevier, St. Louis, Missouri.
- Boyce WM, Courtney CH, Loggins PE (1987) Resistance to experimental infection with *Fasciola hepatica* in exotic and domestic breeds of sheep. *International Journal for Parasitology* 17:1233–1237. Doi 10.1016/0020-7519(87)90087-7.
- Bulgin MS, Anderson BC, Hall RF, Lang BZ (1984) Serum gamma glutamyl transpeptidase activity in cattle with induced fascioliasis. *Research in Veterinary Science* 37:167–171.
- Caminade C, Van Dijk J, Baylis M, Williams D (2015) Modelling recent and future climatic suitability for fasciolosis in Europe. *Geospatial Health* 9:301–308. Doi 10.4081/gh.2015.352.
- Carmona C, Tort JF (2017) Fasciolosis in South America: Epidemiology and control challenges. *Journal of Helminthology* 91:99–109.
- Carrada-Bravo T (2003) Fascioliasis. Diagnóstico, epidemiología y tratamiento. *Revista de gastroenterología de México* 68:135–142.
- CDC - Centers for Disease Control and (2019) Fascioliasis. <https://www.cdc.gov/dpdx/fascioliasis/>. Accessed 17 May 2021.
- Ceballos L, Canton C, Cadenazzi G, Larsen K, Virkel G, Moreno L, Fairweather I, Lanusse C, Alvarez L (2017) Understanding the main route of drug entry in adult *Fasciola hepatica*: Further insights into closantel pharmacological activity. *Experimental Parasitology* 181:23–29. Doi 10.1016/j.exppara.2017.07.003.
- Charlier J, Vercruyse J, Morgan E, Van Dijk J, Williams DJL (2014) Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of *Fasciola hepatica* in cattle. *Parasitology* 141:326–335.
- Conceição M (2001) Fasciolose Bovina: Aspectos de diagnóstico e modelos de avaliação de risco. Universidade Técnica de Lisboa.
- Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grunberg W (2017) Hepatic Diseases Associated With Trematodes. In: *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*, 11th edn. Elsevier, St. Louis, Missouri, pp 641–645.
- Correa AC, Escobar JS, Durand P, Renaud F, David P, Jarne P, Pointier JP, Hurtrez-Boussès S (2010) Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. *BMC Evolutionary Biology* 10:381. Doi 10.1186/1471-2148-10-381.

- Cwiklinski K, Jewhurst H, McVeigh P, Barbour T, Maule AG, Tort J, O'Neill SM, Robinson MW, Donnelly S, Dalton JP (2018) Infection by the helminth parasite *Fasciola hepatica* requires rapid regulation of metabolic, virulence, and invasive factors to adjust to its mammalian host. *Molecular and Cellular Proteomics* 17:792–809. Doi 10.1074/mcp.RA117.000445.
- Cwiklinski K, O'Neill SM, Donnelly S, Dalton JP (2016) A prospective view of animal and human Fasciolosis. *Parasite Immunology* 38:558–568. Doi 10.1111/pim.12343.
- DGAV-Direção Geral de Alimentação e Veterinária (2021) Base de Dados de Medicamentos Veterinários. <https://medvet.dgav.pt/>. Accessed 10 Jul 2021.
- Dixon KE (1966) The physiology of excystment of the metacercaria of *Fasciola hepatica* L. *Parasitology* 56:431–456. Doi 10.1017/S0031182000068931.
- Dorchies P (2006) Flukes: Old parasites but new emergence. In: XXIV World Buiatrics Congress. Nice, França.
- Durr PA, Tait N, Lawson AB (2005) Bayesian hierarchical modelling to enhance the epidemiological value of abattoir surveys for bovine fasciolosis. *Preventive Veterinary Medicine* 71:157–172. Doi 10.1016/j.prevetmed.2005.07.013.
- European Commission Alentejo Region of Portugal - Internal Market, Industry, Entrepreneurship And Smes. <https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/regional-innovation-monitor/base-profile/alentejo-region-portugal>. Accessed 10 Feb 2021.
- Fairweather I (2011a) Liver fluke isolates: A question of provenance. *Veterinary Parasitology* 176:1–8.
- Fairweather I (2011b) Reducing the future threat from (liver) fluke: Realistic prospect or quixotic fantasy? *Veterinary Parasitology* 180:133–143. Doi 10.1016/j.vetpar.2011.05.034.
- Fairweather I, Boray JC (1999) Mechanisms of fasciolicide action and drug resistance in *Fasciola hepatica*. In: Dalton JP (ed) *Fasciolosis*, 1st edn. CABI Publishing, Dublin, República da Irlanda, pp 225–276.
- Fairweather I, Brennan GP, Hanna REB, Robinson MW, Skuce PJ (2020) Drug resistance in liver flukes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 12:39–59.
- Fairweather I, Threadgold LT, Hanna REB (1999) Development of *Fasciola hepatica* in the Mammalian Host. In: Dalton JP (ed) *Fasciolosis*, 1st edn. CABI Publishing, Dublin, República da Irlanda, pp 47–103.
- Fernandes MC, Torres VC (1988) Contribuição para o Conhecimento do Risco Parasitário das Populações de Gamo (*Dama dama* L.) e Javali (*Sus scrofa* L.) da Tapada Nacional de Mafra.

- Fiss L, De Lourdes Adrien M, Marcolongo-Pereira C, Assis-Brasil ND, Sallis ESV, Riet-Correa F, Ruas JL, Schild AL (2013) Subacute and acute fasciolosis in sheep in southern Brazil. *Parasitology Research* 112:883–887. Doi 10.1007/s00436-012-3096-2.
- Flores-Ramos M, Ibarra-Velarde F, Hernández-Campos A, Vera-Montenegro Y, Jung-Cook H, Cantó-Alarcón GJ, Del Rivero LM, Castillo R (2014) A highly water soluble benzimidazole derivative useful for the treatment of fasciolosis. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 24:5814–5817. Doi 10.1016/j.bmcl.2014.10.017.
- Forbes A (2017) Liver fluke infections in cattle and sheep. *Livestock* 22:250–256. Doi 10.12968/live.2017.22.5.250.
- Fouda TA, Youssef MA, Al-Ashkar MR (2013) Chronic Fascioliasis as Cause of Unthriftiness in Sheep with Reference to its Impacts on Blood Constituents.
- Fox NJ, White PCL, McClean CJ, Marion G, Evans A, Hutchings MR (2011) Predicting impacts of climate change on fasciola hepatica risk. *PLoS ONE* 6:16126. Doi 10.1371/journal.pone.0016126.
- Gao X, Zhang L, Tong X, Zhang H, Mehmood K, Jiang X, Li J (2020) Epidemiological survey of fasciolosis in yaks and sheep living on the Qinghai-Tibet plateau, China. *Acta Tropica* 201:105212. Doi 10.1016/j.actatropica.2019.105212.
- George M (2002) Update on fasciolosis in cattle and sheep. *In Practice* 24:378–385. Doi 10.1136/inpract.24.7.378.
- Goater TM, Goater CP, Esch GW (2014) *Parasitism The Diversity and Ecology of Animal Parasites*, 2nd edn. Cambridge University Press, Nova Iorque, EUA.
- Gomes C (2012) *Fasciolose em bovinos de engorda*. Universidade Técnica de Lisboa, Portugal.
- González-Miguel J, Becerro-Recio D, Siles-Lucas M (2021) Insights into Fasciola hepatica Juveniles: Crossing the Fasciolosis Rubicon. *Trends in Parasitology* 37:35–47.
- González MMY (2001) Trematodos. In: Cordero del Campillo M, Rojo Vázquez FA (eds) *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill, Madrid, Espanha, pp 85–104.
- Gonzalo-Orden M, Millán L, Álvarez M, Sánchez-Campos S, Jiménez R, González-Gallego J, Tuñón MJ (2003) Diagnostic imaging in sheep hepatic fascioliasis: Ultrasound, computer tomography and magnetic resonance findings. *Parasitology Research* 90:359–364. Doi 10.1007/s00436-003-0866-x.
- Grácio M (1985) Contribucion al conocimiento de los moluscos gastropoda de las aguas dulces de Portugal distribucion y bioecologia de Lymnaea truncatula en algunos distritos. *Revista iberica de parasitología* 45:9–14.

- Grácio MA, Mousinho I, Maria A, Clemente I, Ferreira P, Ferreira C (2011) Preliminary Survey of Animal Fascioliasis in Portuguese Abattoirs. *Acta Parasitológica Portuguesa* 18:25–28.
- Graczyk TK, Fried B (1999) Development of *Fasciola hepatica* in the Intermediate Host Thaddeus. In: Dalton JP (ed) *Fasciolosis*, 1st edn. CABI Publishing, Dublin, República da Irlanda, pp 31–41.
- Gunn A, Pitt SJ (2012) *Parasitology An Integrated Approach*, 1st edn. Wiley Blackwell, Sussex, Reino Unido.
- Hammami H, Hamed N, Ayadi A (2007) Epidemiological studies on *Fasciola hepatica* in Gafsa oases (South West of Tunisia). *Parasite* 14:261–264. Doi 10.1051/parasite/2007143261.
- Hendrix CM, Robinson E (2012) *Diagnostic parasitology for Veterinary Technicians*, 4th edn. Elsevier, St. Louis, EUA.
- Hodžić A, Zuko A, Avdić R, Alić A, Omeragić J, Jažić A (2013) Influence of *Fasciola hepatica* on serum biochemical parameters and vascular and biliary system of sheep liver. *Iranian Journal of Parasitology* 8:92–98.
- Howell AK, Williams DJL (2020) The Epidemiology and Control of Liver Flukes in Cattle and Sheep. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 36:109–123.
- IFAP - Instituto de Financiamento da Agricultura e Pescas (2021) Estatísticas Animais. In: Declarações de Existências de Ovinos e Caprinos - Anos 2011 a 2020. <https://www.ifap.pt/estatisticas-animais>. Accessed 24 Apr 2021.
- INE - Instituto Nacional de Estatística (2020) Recenseamento agrícola 2019. Lisboa.
- IPMA-Instituto Português do Mar e da Atmosfera (2019) Boletim Climatológico Anual Portugal Continental 2019. <https://www.ipma.pt/pt/publicacoes/boletins.jsp?cmbDep=cli&cmbTema=pcl&cmbAno=2019&idDep=cli&idTema=pcl&curAno=2019>.
- IPMA-Instituto Português do Mar e da Atmosfera (2020) Boletim Climático Globo e Europa Portugal 2020. <https://www.ipma.pt/pt/publicacoes/boletins.jsp?cmbDep=cli&cmbTema=pcl&cmbAno=2020&idDep=cli&idTema=pcl&curAno=2020>. Accessed 29 Sep 2021.
- IPMA-Instituto Português do Mar e da Atmosfera (2021) Boletim Climático Portugal Continental-Janeiro 2021. <https://www.ipma.pt/pt/publicacoes/boletins.jsp?cmbDep=cli&cmbTema=pcl&idDep=cli&idTema=pcl&curAno=-1>.

- IPMA - Instituto Português do Mar e da Atmosfera (2020) Clima de Portugal Continental. <https://www.ipma.pt/pt/educativa/tempo.clima/index.jsp?page=clima.pt.xml&print=true>. Accessed 24 Apr 2021.
- Jackson PGG, Cockcroft PD (2002) *Clinical Examination of Farm Animals*. Blackwell Science Ltd., Oxford, Reino Unido.
- Kahl A, Samson-Himmelstjerna G von, Krücken J, Ganter M (2021) Chronic wasting due to liver and rumen flukes in sheep. *Animals* 11:1–20. Doi 10.3390/ani11020549.
- Kantzoura V, Kouam MK, Demiris N, Feidas H, Theodoropoulos G (2011) Risk factors and geospatial modelling for the presence of *Fasciola hepatica* infection in sheep and goat farms in the Greek temperate Mediterranean environment. *Parasitology* 138:926–938. Doi 10.1017/S0031182011000436.
- Kelley JM, Elliott TP, Beddoe T, Anderson G, Skuce P, Spithill TW (2016) Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends in Parasitology* 32:458–469.
- Kenyon F, Sargison ND, Skuce PJ, Jackson F (2009) Sheep helminth parasitic disease in south eastern Scotland arising as a possible consequence of climate change. *Veterinary Parasitology* 163:293–297. Doi 10.1016/j.vetpar.2009.03.027.
- Kozat S, Denizhan V (2010) Glucose, lipid, and lipoprotein levels in sheep naturally infected with *fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology* 96:657–659. Doi 10.1645/GE-2104.1.
- Kuerpick B, Schnieder T, Strube C (2013) Evaluation of a recombinant cathepsin L1 ELISA and comparison with the Pourquier and ES ELISA for the detection of antibodies against *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 193:206–213. Doi 10.1016/j.vetpar.2012.11.021.
- Lalor R, Cwiklinski K, Calvani NED, Dorey A, Hamon S, Corrales JL, Dalton JP, De Marco Verissimo C (2021) PATHOGENICITY AND VIRULENCE OF THE LIVER FLUKES *FASCIOLA HEPATICA* AND *FASCIOLA GIGANTICA* THAT CAUSE THE ZOONOSIS *FASCIOSIS*. *Virulence*. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1996520>.
- Landis JR, Koch GG (1977) The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics* 33:159. Doi 10.2307/2529310.
- Lanusse CE, Alvarez LI, Virkel GL (2017) Anticestodal and Antitrematodal Drugs. In: Riviere JE, Papich MG (eds) *Veterinary Pharmacology & Therapeutics*, 10th edn. Wiley-Blackwell, Hoboken, EUA, pp 1081–1101.
- Leitão JS (1983) *Parasitologia Veterinária*. Volume I, 3rd edn. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal.

- Levy S, Mateus TL, Vieira Pinto M (2013) Fasciolose. *Agrotec* 8:12–15.
- Loker ES, Hofkin B V (2015) *Parasitology: A Conceptual Approach*, 1st edn. Garlande Scienc, Nova Iorque, EUA.
- Lotfollahzadeh S, Mohri M, Bahadori SR, Dezfouly MRM, Tajik P (2008) The relationship between normocytic, hypochromic anaemia and iron concentration together with hepatic enzyme activities in cattle infected with *Fasciola hepatica*. *Journal of Helminthology* 82:85–88. Doi 10.1017/S0022149X07874232.
- Lourenço L (1995) Alentejo I. *Guia Expresso de Portugal* 6–10.
- Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA (2005) Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology* 35:1255–1278.
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2019) Fascioliasis. In: Crusio WE, Dong H, Redeke HH, Rezaei N, Steinlein O, Xiao J (eds) *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1st edn. Adv Exp Med Biol, Nova Iorque, EUA, pp 71–103.
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2009a) Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Veterinary Parasitology* 163:264–280.
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2009b) *Fasciola*, Lymnaeids and Human Fascioliasis, with a Global Overview on Disease Transmission, Epidemiology, Evolutionary Genetics, Molecular Epidemiology and Control. In: *Advances in Parasitology*. Elsevier, Nova Iorque, EUA, pp 41–146.
- Matanović K, Severin K, Martinković F, Šimpraga M, Janicki Z, Barišić J (2007) Hematological and biochemical changes in organically farmed sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research* 101:1657–1661. Doi 10.1007/s00436-007-0709-2.
- McKinstry B, Fairweather I, Brennan GP, Forbes AB (2003) *Fasciola hepatica*: Tegumental surface alterations following treatment in vivo and in vitro with nitroxylnil (Trodax). *Parasitology Research* 91:251–263. Doi 10.1007/s00436-003-0930-6.
- McManus C, Paim T do P, De Melo CB, Brasil BSAF, Paiva SR (2014) Selection methods for resistance to and tolerance of helminths in livestock. *Parasite* 21.
- Mehlhorn H (2016a) *Encyclopedia of Parasitology*, 4th edn. Springer, Dusseldorf, Alemanha.
- Mehlhorn H (2016b) *Animal Parasites: Diagnosis, Treatment, Prevention*, 1st edn. Springer, Cham, Suíça.
- Mehmood K, Zhang H, Sabir AJ, Abbas RZ, Ijaz M, Durrani AZ, Saleem MH, Ur Rehman M, Iqbal MK, Wang Y, Ahmad HI, Abbas T, Hussain R, Ghori MT, Ali S, Khan AU, Li J (2017) A

- review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. *Microbial Pathogenesis* 109:253–262.
- Ménard A, L'Hostis M, Leray G, Marchandeu S, Pascal M, Roudot N, Michel V, Chauvin A (2000) Inventory of wild rodents and lagomorphs as natural hosts of *Fasciola hepatica* on a farm located in a humid area in Loire Atlantique (France). *Parasite* 7:77–82. Doi 10.1051/PARASITE/2000072077.
- Mitchell GBB (2007) Liver fluke. In: Aitken ID (ed) *Diseases of sheep*, 4th edn. Blackwell publishing, Edinburgh, Escócia, pp 195–203.
- Moazeni M, Ahmadi A (2016) Controversial aspects of the life cycle of *Fasciola hepatica*. *Experimental Parasitology* 169:81–89.
- Molina-Hernández V, Mulcahy G, Pérez J, Martínez-Moreno Á, Donnelly S, O'Neill SM, Dalton JP, Cwiklinski K (2015) *Fasciola hepatica* vaccine: We may not be there yet but we're on the right road. *Veterinary Parasitology* 208:101–111. Doi 10.1016/j.vetpar.2015.01.004.
- Mousley A, Maule AG, Halton DW, Marks NJ (2005) Inter-phyla studies on neuropeptides: The potential for broad-spectrum anthelmintic and/or endectocide discovery. *Parasitology* 131:S143–S167.
- Mrkvicha A (2009) Dwarf Pond Snail. In: *Lymnaeidae - pond snails*. <https://www.biolib.cz/en/image/id406909/>. Accessed 10 Jul 2021.
- Munguía-Xóchihua JA, Ibarra-Velarde F, Ducoing-Watty A, Montenegro-Cristino N, Quiroz-Romero H (2007) Prevalence of *Fasciola hepatica* (ELISA and fecal analysis) in ruminants from a semi-desert area in the northwest of Mexico. *Parasitology Research* 101:127–130. Doi 10.1007/s00436-006-0438-y.
- Munita MP, Rea R, Martínez-Ibeas AM, Byrne N, McGrath G, Munita-Corbalan LE, Sekiya M, Mulcahy G, Sayers RG (2019) Liver fluke in Irish sheep: Prevalence and associations with management practices and co-infection with rumen fluke. *Parasites and Vectors* 12. Doi 10.1186/s13071-019-3779-y.
- Nasreldin N, Zaki RS (2020) Biochemical and immunological investigation of fascioliasis in cattle in Egypt. *Veterinary World* 13:923–930. Doi 10.14202/vetworld.2020.923-930.
- Nyindo M, Lukambagire AH (2015) Fascioliasis: An Ongoing Zoonotic Trematode Infection. *BioMed Research International* 2015:8. Doi 10.1155/2015/786195.
- Organização Mundial de Saúde (2021) Foodborne parasitic infections: Fascioliasis (Liver fluke).
- Paz-Silva A, Arias M, Francisco I, Cortiñas FJ, Francisco R, Díaz P, Suárez JL, Díez-Baños P, Morrondo P, Sánchez-Andrade R (2010) Cross-immunity and interpretation of the

- diagnostics of parasitic trematodosis in ruminants by means of immunoenzymatic probes. In: LaMann G V (ed) *Veterinary Parasitology*, 1st edn. Nova Science Publishers, Nova Iorque, EUA, pp 271–288.
- Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Suárez JL, Pedreira J, Arias M, López C, Panadero R, Díaz P, Díez-Baños P, Morrondo P (2003) Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. *Parasitology Research* 91:328–331. Doi 10.1007/s00436-003-0961-z.
- Pinilla JC, Florez Muñoz AA, Uribe Delgado N (2020) Prevalence and risk factors associated with liver fluke *Fasciola hepatica* in cattle and sheep in three municipalities in the Colombian Northeastern Mountains. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 19:100364. Doi 10.1016/j.vprsr.2019.100364.
- R Core team (2014) The R Project for Statistical Computing. In: <http://www.R-project.org/>. <https://www.r-project.org/>. Accessed 2 Mar 2021.
- Ravidà A, Cwiklinski K, Aldridge AM, Clarke P, Thompson R, Gerlach JQ, Kilcoyne M, Hokke CH, Dalton JP, O'Neill SM (2016) *Fasciola hepatica* surface tegument: Glycoproteins at the interface of parasite and host. *Molecular and Cellular Proteomics* 15:3139–3153. Doi 10.1074/mcp.M116.059774.
- Reichel MP (2002) Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in sheep and cattle. *Veterinary Parasitology* 107:65–72. Doi 10.1016/S0304-4017(02)00095-X.
- Rinaldi L, Biggeri A, Musella V, de Waal T, Hertzberg H, Mavrot F, Torgerson PR, Selemetas N, Coll T, Bosco A, Grisotto L, Cringoli G, Catelan D (2015) Sheep and *Fasciola hepatica* in Europe: The GLOWORM experience. *Geospatial Health* 9:309–317. Doi 10.4081/gh.2015.353.
- Roberts LS, Janovi J (2009) Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' *Foundations of Parasitology*, 8th edn. McGraw-Hill, Nova Iorque, EUA.
- Rogan WJ, Gladen B (1978) Estimating prevalence from the results of a screening test. *American journal of epidemiology* 107:71–76. Doi 10.1093/OXFORDJOURNALS.AJE.A112510.
- Rojo-Vázquez FA, Meana A, Valcárcel F, Martínez-Valladares M (2012) Update on trematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology* 189:15–38. Doi 10.1016/j.vetpar.2012.03.029.
- Rombert PC, Grácio MAA, Trinca AT (1991) Importância crescente da fasciolíase hepática humana em Portugal. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas* 243–250.
- Rondelaud D, Belfaiza M, Vignoles P, Moncef M, Dreyfuss G (2009) Redial generations of *Fasciola hepatica*: A review. *Journal of Helminthology* 83:245–254.

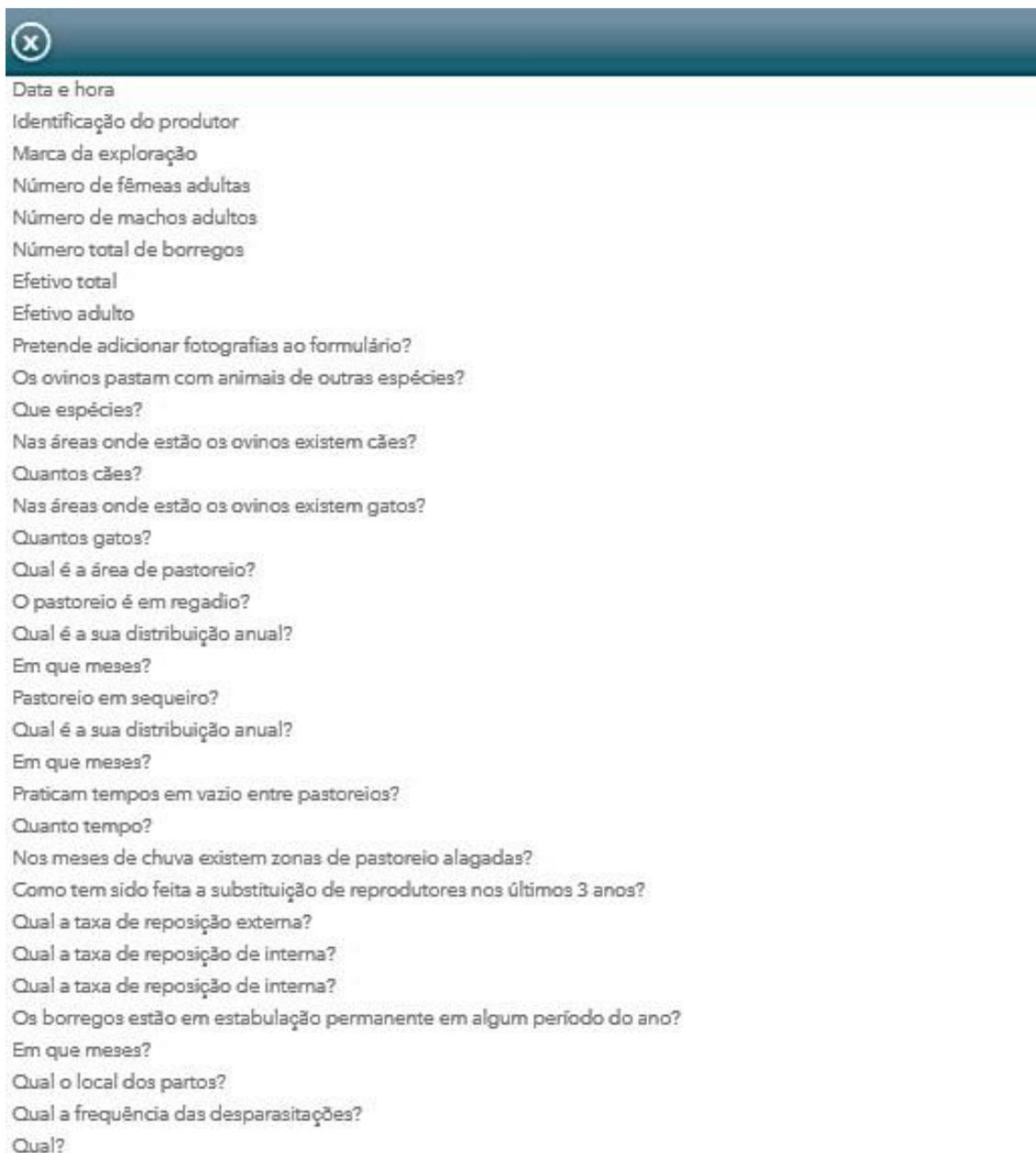
- Ruano ZM, Cortinhas A, Carolino N, Gomes J, Costa M, Mateus TL (2019) Gastrointestinal parasites as a possible threat to an endangered autochthonous Portuguese sheep breed. *Journal of helminthology* 94:1–7. Doi 10.1017/S0022149X19000968.
- Ruiz-Campillo MT, Molina-Hernandez V, Escamilla A, Stevenson M, Perez J, Martinez-Moreno A, Donnelly S, Dalton JP, Cwiklinski K (2017) Immune signatures of pathogenesis in the peritoneal compartment during early infection of sheep with *Fasciola hepatica*. *Scientific Reports* 7:1–14. Doi 10.1038/s41598-017-03094-0.
- Santos D (2013) Caracterização do Parasitismo de Ungulados Silvestres e aspectos da sua Epidemiologia na Tapada Nacional de Mafra, Concelho de Mafra, Portugal. Universidade de Lisboa.
- Santos TRM (2012) Genetic characterization of Portuguese *Fasciola hepatica* isolates. Universidade Nova de Lisboa.
- Sargison N (2008) Fluke diseases of UK ruminant livestock Part 1: Life cycles, economic consequences and diagnosis. *Livestock* 13:59–67. Doi 10.1111/j.2044-3870.2008.tb00185.x
- Scott PR, Sargison ND, Macrae A, Rhind SR (2005) An outbreak of subacute fasciolosis in Soay sheep: Ultrasonographic biochemical and histological studies. *Veterinary Journal* 170:325–331. Doi 10.1016/j.tvjl.2004.08.010.
- Skuce PJ, Zadoks RN (2014) Liver fluke - A growing threat to UK livestock production. *Cattle Practice* 21:138–149.
- Sousa CB (2001) Contribuição para o Conhecimento do Risco Parasitário das Populações de Gamo (*Dama dama* L.) e Javali (*Sus scrofa* L.) da Tapada Nacional de Mafra. Universidade Técnica de Lisboa.
- Spengler RN, Isseroff H (1981) Fascioliasis: Is the anemia caused by hematophagia? *Journal of Parasitology* 67:886–892. Doi 10.2307/3280715.
- Sukhdeo MVK, Mettrick DF (1986) The behavior of juvenile *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology* 72:492–497. Doi 10.2307/3281496
- Takeuchi-Storm N, Denwood M, Hansen TVA, Halasa T, Rattenborg E, Boes J, Enemark HL, Thamsborg SM (2017) Farm-level risk factors for *Fasciola hepatica* infection in Danish dairy cattle as evaluated by two diagnostic methods. *Parasites and Vectors* 10. Doi 10.1186/s13071-017-2504-y.
- Taylor M (2009) Changing patterns of parasitism in sheep. *In Practice* 31:474–483. Doi 10.1136/inpract.31.10.474.

- Taylor MA (2012) Emerging parasitic diseases of sheep. *Veterinary Parasitology* 189:2–7. Doi 10.1016/j.vetpar.2012.03.027.
- Taylor MA, Coop RL, Wall RL (2016) *Veterinary Parasitology*, 4th edn. Wiley Blackwell, West Sussex, Reino Unido.
- Toet H, Piedrafita DM, Spithill TW (2014) Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *International Journal for Parasitology* 44:915–927. Doi 10.1016/j.ijpara.2014.07.011.
- Torgerson P, Claxton J (1999) Epidemiology and Control. In: Dalton JP (ed) *Fasciolosis*, 1st edn. CABI Publishing, Dublin, República da Irlanda, pp 113–139.
- Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW (1996) *Veterinary Parasitology*, 2nd edn. Blackwell Science Ltd., Glasgow, Escócia.
- Valderrama Pomé AA (2016) Prevalencia de fascioliasis en animales poligástricos de Perú, 1985-2015. *Revista de Medicina Veterinaria* 121. Doi 10.19052/mv.3861.
- Valero MA, Gironès N, García-Bodelón MA, Periago M V., Chico-Calero I, Khoubbane M, Fresno M, Mas-Coma S (2008) Anaemia in advanced chronic fasciolosis. *Acta Tropica* 108:35–43. Doi 10.1016/j.actatropica.2008.08.007.
- Vaughan JL, Charles JA, Boray JC (1997) *Fasciola hepatica* infection in farmed emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Australian veterinary journal* 75:811–813. Doi 10.1111/j.1751-0813.1997.tb15659.x.
- Vázquez FAR, Pérez IF (2001) Parasitosis hepáticas. In: Cordero del Campillo M, Rojo Vázquez FA (eds) *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill, Madrid, Espanha, pp 260–272.
- Verocai GG, Chaudhry UN, Lejeune M (2020) Diagnostic Methods for Detecting Internal Parasites of Livestock. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 36:125–143.
- Vinarski VM, Clewing C, Albrecht C (2019) Lymnaeidae Rafinesque, 1815. In: Lydeard C, Cummings KS (eds) *Fresh Water Mollusks of the World: A Distribution Atlas*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, EUA, pp 158–162.
- Wesołowska A, Basałaj K, Norbury LJ, Sielicka A, Wędrychowicz H, Zawistowska-Deniziak A (2018) Vaccination against *Fasciola hepatica* using cathepsin L3 and B3 proteases delivered alone or in combination. *Veterinary Parasitology* 250:15–21. Doi 10.1016/j.vetpar.2017.12.007.

9. Anexos

9.1 Anexo 1

Inquérito epidemiológico aplicado às explorações intervencionadas através do programa *Survey 123 for ArcGIS®*.



ⓧ

Data e hora

Identificação do produtor

Marca da exploração

Número de fêmeas adultas

Número de machos adultos

Número total de borregos

Efetivo total

Efetivo adulto

Pretende adicionar fotografias ao formulário?

Os ovinos pastam com animais de outras espécies?

Que espécies?

Nas áreas onde estão os ovinos existem cães?

Quantos cães?

Nas áreas onde estão os ovinos existem gatos?

Quantos gatos?

Qual é a área de pastoreio?

O pastoreio é em regadio?

Qual é a sua distribuição anual?

Em que meses?

Pastoreio em sequeiro?

Qual é a sua distribuição anual?

Em que meses?

Praticam tempos em vazio entre pastoreios?

Quanto tempo?

Nos meses de chuva existem zonas de pastoreio alagadas?

Como tem sido feita a substituição de reprodutores nos últimos 3 anos?

Qual a taxa de reposição externa?

Qual a taxa de reposição de interna?

Qual a taxa de reposição de interna?

Os borregos estão em estabulação permanente em algum período do ano?

Em que meses?

Qual o local dos partos?

Qual a frequência das desparasitações?

Qual?

9.2 Anexo 2

Técnica combinada Mini-Flotac e sedimentação

Materiais e soluções:

- Balança de precisão;
- Copos de vidro;
- Centrífuga;
- Varetas de vidro;
- Funis de vidro;
- Crivos (“passador de chá”);
- Tubos cónicos tipo Falcon 50 ml;
- Tubo cónicos tipo Falcon 15 ml,
- Pipetas descartáveis;
- Solução saturada NaCl;
- Água;
- Solução de azul de metileno;
- Placa de Petri graduada;
- Estereoscópio binocular com luz subplatina.

Procedimento:

1. Para cada um dos animais, pesar 5 g de fezes em copos de vidro;
2. Proceder à homogeneização das fezes em 45 ml de solução saturada de NaCl, o correspondente a uma diluição de fezes de 1:10;
3. Passar a suspensão obtida por um crivo para um tubo tipo Falcon de 50 ml;
4. Encher as câmaras de Mini-Flotac com a suspensão filtrada, esperar 10 minutos, rodar o disco de Mini-Flotac e proceder ao diagnóstico e contagem de ovos de nemátodes gastrointestinais e coccídeos;
5. Centrifugar a suspensão a 2000 RPM durante 3 minutos;
6. Descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento com água até perfazer um volume de 50 ml;
7. Descartar 20 ml da suspensão, e voltar a encher o tubo com água até perfazer um volume de 45 ml. Obtém-se assim uma diluição de fezes de 1:15 (1g de fezes em 15 ml de água);
8. Transferir 15 ml da suspensão, com ajuda de um funil de vidro, para um tubo tipo Falcon de 15 ml através de um segundo crivo de malha mais apertada, para remoção de detritos. Cada tubo Falcon passa assim a ter o equivalente a 1g de fezes;

9. Esperar 10 minutos para a suspensão sedimentar e retirar o sobrenadante;
10. Repetir o último passo o número de vezes necessário até se obter um sobrenadante límpido (aproximadamente 3 vezes);
11. No final da lavagem, ressuspender o sedimento novamente num volume de 15 ml de água;
12. Transferir a suspensão, em todo ou em partes (dependendo do volume de sedimento), para uma placa de Petri com grelha de contagem e, se necessário, adicionar 5 ml de água para diluir a amostra e facilitar a visualização dos ovos;
13. Adicionar 2 gotas de azul de metileno, para melhorar o contraste entre os ovos e o sedimento;
14. Proceder à pesquisa e contagem dos ovos de *F. hepatica* ao estereoscópio binocular (20x-40x);
15. Calcular o número de ovos por grama de fezes (OPG) da seguinte forma: sabendo que cada tubo contém o equivalente a 1 g de fezes, o número de OPG é calculado tendo em conta o volume retirado para a placa de contagem.

9.3 Anexo 3

Protocolo laboratorial *IDEXX Fasciolosis Verification test*

Reagentes fornecidos no kit:

- Placas impregnadas com antígeno f2;
- Controlo positivo;
- Controlo negativo;
- Conjugado concentrado (100X);
- Tampão de diluição das amostras;
- Tampão de diluição do conjugado;
- Substrato TMB;
- Solução *stop*;
- Concentrado de lavagem (20X).

Materiais:

- Micropipetas monocal de 10, 100 e 1000 µl;
- Micropipeta multicanal de oito canais de 5-100 µl l;
- Pontas de pipeta descartáveis;
- Proveta graduada de 100 ml;
- Leitor de placas para 96 poços Dynex MRX equipado com filtro de 450 nm;
- Água destilada ou deionizada para preparação dos reagentes;
- Parafilm M®;
- Material absorvente (papel absorvente);
- Agitador de placas.
- Incubadora capaz de manter a temperatura de +37 °C (± 3 °C).

Procedimento:

1. Preparação dos reagentes:

- Todos os reagentes devem estar à temperatura de 18-26 °C antes do seu uso. Misturar gentilmente os reagentes através de inversão ou movimentos circulares leves;
- Solução de lavagem: Diluir o concentrado de lavagem (20X) na proporção de 1:20 com água destilada/deionizada antes do uso. Esta solução é estável até 3 dias se armazenada à temperatura de 2-8 °C;
- Conjugado: Diluir o conjugado concentrado na proporção de 1:100 no tampão de diluição N°1. A solução do conjugado (100X) diluída é estável até 8 horas a 18-26°C;

2. Preparação das amostras:

- Aguardar 10-15 minutos até que as amostras de soro refrigeradas fiquem à temperatura ambiente antes de serem utilizadas. As amostras que se encontravam congeladas eram colocadas no frigorífico no dia anterior à sua utilização para descongelarem;
3. Retirar as placas impregnadas do invólucro e identificar numericamente cada uma das tiras da placa. Registrar numa folha de trabalho a posição das amostras na placa;
4. Proceder à distribuição das amostras e controlos (Figura 1):
- Adicionar 190 µl de tampão de diluição N° 2 em cada poço;
 - Adicionar 10 µl de controlo negativo não diluído no poço Ag- apropriado (colunas ímpares) e no poço Ag+ apropriado (colunas pares);
 - Adicionar 10 µl de controlo positivo não diluído em dois poços Ag- apropriados (colunas numeração ímpares) e em dois poços Ag+ apropriados (colunas pares);
 - Adicionar 10 µl de cada amostra não diluída aos restantes poços: um poço Ag- (colunas ímpares) e um poço Ag+ (colunas pares).

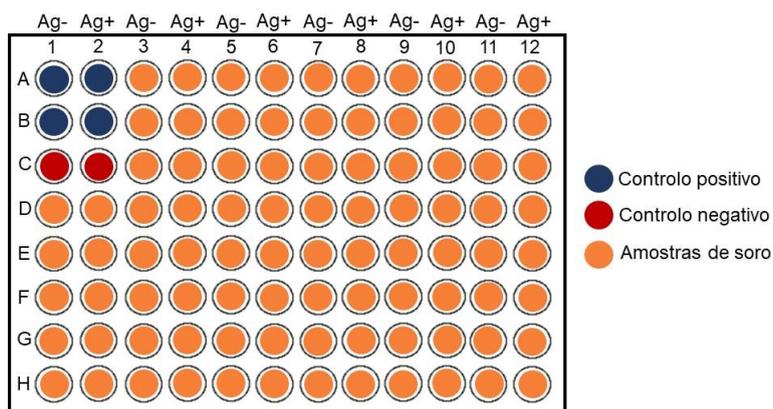


Figura 15: Distribuição das amostras e controlos na placa.

5. Homogeneizar o conteúdo dos poços com um agitador de placas;
1. Cobrir a placa e incubar por 1 hora (± 5 minutos) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$);
 2. Remover o conteúdo líquido dos poços da placa e lavar cada poço com aproximadamente 300 µl de solução de lavagem por 3-5 vezes. Evitar que a placa seque entre as lavagens antes da adição do próximo reagente. Após a lavagem final, remover o fluido residual de lavagem de cada placa batendo-a firmemente em material absorvente;
 3. Adicionar 100 µl do conjugado diluído em cada poço;
 4. Cobrir a placa e incubar por 30 minutos (± 3 minutos) $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$);
 5. Remover o conteúdo líquido dos poços da placa e lavar cada poço com aproximadamente 300 µl de solução de lavagem por 3 vezes. Evitar que a placa seque entre as lavagens antes

da adição do próximo reagente. Após a lavagem final, remover o fluido residual de lavagem de cada placa batendo-a firmemente em material absorvente;

6. Adicionar 100 µl do substrato TMB N°13 em casa poço;
7. Incubar durante 20 minutos (± 3 minutos) a 18-26 °C longe da luz direta;
8. Adicionar 100 µl de solução de interrupção N°3 em cada cavidade;
9. Medir e registar os valores de densidade ótica das amostras e controlos a 450 nm;
10. Cálculos:

10.1. Controlos: Determine a média do Controle Positivo ($CP\bar{X}$), a média da extinção líquida do controlo positivo ($NE\bar{X}_{CP}$) e a extinção líquida do controlo negativo (NE_{CN}):

- $CP\bar{X} = (CP1_{Ag+} A(450) + CP2_{Ag+} A(450)) / 2$
- $NE\bar{X}_{CP} = [(CP1_{Ag+} A(450)) + (CP2_{Ag+} A(450) - CP_{Ag-} A(450))] / 2$
- $NE_{CN} = CN_{Ag+} + A(450) - CN_{Ag-} A450$

10.2. Critérios de validade:

- $CP\bar{X} \geq 0,350$
- $NE\bar{X}_{CP} / NE_{CN} \geq 3,5$

Nota: O valor de NE_{CN} pode ser inferior a zero, e neste caso utilizar o valor absoluto para validação. No caso do valor de NE_{CN} ser igual a zero utilizar o valor 0,001 para cálculo da relação.

10.3. Amostras: calcula-se o valor líquido de extinção para cada amostra, subtraindo o valor correspondente da DO450 obtido na posição do controlo ($A_{Ag+} A(450)$) a partir do valor da DO450 obtida no poço revestido ($A_{Ag+} A(450)$):

- $NE = A_{Ag+} A(450) - A_{Ag-} A(450)$
- $A/P\% = 100 \times (NE / NE\bar{X}_{CP})$

11. Classificação dos resultados:

Tabela 12: Correlação entre o resultado do teste e o nível de infeção (soros individuais).

A/P% da amostra	Resultado	
$A/P\% > 150\%$	Forte Positivo para presença de <i>Fasciola hepatica</i>	+++
$80\% < A/P\% < 150\%$	Positivos para presença de <i>Fasciola hepatica</i>	++
$30\% < A/P\% \leq 80\%$	Moderado Positivo para presença de <i>Fasciola hepatica</i>	+
$A/P\% \leq 30\%$	Negativo para presença de <i>Fasciola hepatica</i>	0

9.4 Anexo 4

Distrito	Concelho	Freguesia	nº animais concelho	nº animais freguesia	Pos.	Prevalência concelho (IC _{95%})	Prevalência freguesia (IC _{95%})	
Évora	Estremoz	São Bento do Cortiço e Santo Estevão	30	30	0	---	---	
	Mora	Pavia	140	123	0	---	---	
		Brotas		17	0	---	---	
	Montemor-o-Novo	Ciborro	60	30	0	---	---	
		Foros de vale figueira		30	0	---	---	
	Vendas Novas	Vendas Novas	31	31	25	80,7% (63,7-90,8%)	80,7% (63,7-90,8%)	
	Arraiolos	Arraiolos	14	14	2	14,3% (4-39,4%)	14,3% (4-39,4%)	
	Évora		São Sebastião da Giesteira	86	26	0	---	---
			Évora		30	0	---	---
			Torre de Coelheiros		30	0	---	---

	Mourão	Granja	30	30	2	6,7%	6,7%
						(1,9-21,3%)	(1,9-21,3%)
Beja							
	Vidigueira	Selmes	13	13	0	---	---
	Beja	Baleizão	22	7	0	---	---
		Albernoa		15	1	4,6%	6,7%
						(0,8-21,8%)	(0,35%-30,1%)
	Serpa	Pias	60	30	0	---	---
		Vila Nova de São Bento		30	0	---	---
						---	---
Portalegre							
	Portalegre	Fortios	11	11	0	---	---
	Fronteira	Fronteira	80	80	0	---	---
	Monforte	Vaiamonte	30	30	0	---	---
	Sousel	Sousel	41	10	0	---	---
		Casa branca			31	0	---
	Campo maior	Campo maior	27	27	0	----	---