

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Resistência a antiparasitários em helmintes
gastrointestinais de pequenos ruminantes na região
Norte de Portugal**

– Versão Final –

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

BEATRIZ COSTA RODRIGUES

Orientadora: Professora Doutora Ana Patrícia Antunes Lopes

Coorientadora: Doutora Filipa Cristina Teixeira de Sousa Rodrigues



Vila Real, 2021

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Resistência a antiparasitários em helmintes
gastrointestinais de pequenos ruminantes na região
Norte de Portugal**

– Versão Final –

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

BEATRIZ COSTA RODRIGUES

Orientadora: Professora Doutora Ana Patrícia Antunes Lopes

Coorientadora: Doutora Filipa Cristina Teixeira de Sousa Rodrigues

Composição do Júri:

Professora Doutora Maria João Miranda Pires

Professor Doutor Luís Miguel Martins Lucas Cardoso

Professor Doutor Hélder Miranda Pires Quintas

Professora Doutora Ana Patrícia Antunes Lopes

Vila Real, 2021

DECLARAÇÃO

NOME: Beatriz Costa Rodrigues

CC.: 15332828

TELÉMOVEL: (+351) 936874602

CORREIO ELETRÓNICO: beatriz_costa_rodrigues@hotmail.com

DESIGNAÇÃO DO MESTRADO: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA:

Resistência a antiparasitários em helmintes gastrointestinais de pequenos ruminantes na região Norte de Portugal

ORIENTADORES:

Professora Doutora Ana Patrícia Antunes Lopes

Doutora Filipa Cristina Teixeira de Sousa Rodrigues

ANO DE CONCLUSÃO: 2021

Afirmo que esta dissertação de mestrado é resultado da minha pesquisa e trabalho pessoal e das orientações das minhas orientadoras. O seu conteúdo é original e todas as fontes consultadas estão devidamente mencionadas no texto e na bibliografia final. Declaro ainda que este trabalho não foi apresentado em nenhuma outra instituição para obtenção de qualquer grau académico.

Vila Real, junho de 2021
Beatriz Costa Rodrigues

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), na pessoa do Magnífico Reitor, pela possibilidade que me deu de ingressar neste curso com que sempre sonhei desde criança.

A todos os docentes que permitiram o meu sucesso académico, o meu muito obrigada.

Obrigada a todos os profissionais de Medicina Veterinária com que me cruzei ao longo de todos estes anos curriculares que me fizeram crescer e aprender a ser melhor profissional.

À minha orientadora, a Professora Doutora Ana Patrícia Lopes, por todo incentivo, disponibilidade e prontidão em ajudar-me na realização desta dissertação.

À minha coorientadora, a Doutora Filipa Teixeira Rodrigues, por toda a ajuda na organização e realização deste trabalho.

Agradeço ao Professor Doutor Luís Cardoso pelo apoio prestado na análise estatística.

Agradeço ao Dr. Miguel Lopes da VALPATAS - Clínica Veterinária de Valpaços pelos conhecimentos que me transmitiu e pela possibilidade de poder praticar um pouco a profissão, assim como pelo carinho e amizade da Enfermeira Sónia Barroso, por toda a ajuda e paciência que me deu.

Aos meus pais, José e Clarinda, por todo apoio, motivação e esforço para que este sonho se pudesse concretizar, e à minha irmã, Caroline, que esteve sempre ao meu lado a apoiar-me e a motivar-me para ser melhor profissional e melhor mulher.

A toda a minha família que, direta ou indiretamente, foi parte integrante neste percurso e contribuiu para o meu sucesso.

À minha amiga Isabel, que esteve ao meu lado quando queria desistir, por todo apoio, motivação, cumplicidade e pela amizade. Obrigada por acreditares em mim.

Às minhas amigas, Daniella, Célia e Vanessa, pela sua verdadeira amizade, apoio, companheirismo, motivação e por estarem sempre aqui para tudo. Obrigada por serem assim.

E a todos os meus amigos, que me acompanharam neste percurso académico, nunca duvidaram de mim e sempre acreditaram que eu era capaz, o meu muito obrigada.

RESUMO

Os nematodes gastrointestinais de pequenos ruminantes sujeitos a sistemas de produção extensivos ou intensivos, são de elevada importância, dado que podem vão afetar a saúde, bem-estar, produtividade e reprodução destes animais em todo mundo. Os programas de desparasitação devem ser corretamente elaborados de forma a interromper os ciclos de vida dos parasitas. Porém, o tratamento e a profilaxia da infeção por vermes gastrointestinais têm-se praticamente baseado no uso de anti-helmínticos, muitas vezes sem qualquer indicação prévia da existência do parasita. Por esse motivo, e devido à diversidade genética, os parasitas têm evoluído para lá das medidas de controlo, observando-se um aumento da resistência aos anti-helmínticos utilizados.

O presente estudo teve como principal objetivo a recolha e análise de amostras fecais de pequenos ruminantes e identificação dos principais nematodes gastrointestinais, no Laboratório de Parasitologia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), de forma a verificar a existência de resistência a anti-helmínticos em pequenos ruminantes no Norte de Portugal.

De setembro de 2020 a fevereiro de 2021 foram recolhidas um total de 87 amostras fecais provenientes de pequenos ruminantes de três diferentes explorações de montanha na serra do Marão (exploração A) e na serra da Aboboreira (explorações B e C). Foi observada uma prevalência de infeção por ovos do tipo tricostrongilídeo de 90,8%, por ovos de *Nematodirus* de 41,5% e por ovos de *Strongyloides* de 15,4%. Após a comparação das proporções de positividade verificou-se que a espécie estava correlacionada ($p = 0,020$) com a presença de ovos de *Nematodirus*, verificando-se uma prevalência mais elevada nos caprinos do que nos ovinos. Observou-se também uma prevalência significativamente ($p = 0,004$) mais elevada de ovos de *Nematodirus* na raça Bravia quando comparada com a raça cruzada e uma prevalência significativamente mais elevada ($p = 0,006$) de ovos de *Strongyloides* na raça cruzada. Nas restantes variáveis sexo, idade, condição corporal e positividade geral não se verificaram diferenças estatisticamente significativas.

Relativamente à análise de sensibilidade do anti-helmíntico, observou-se a presença da falta de eficácia do fenbendazol, na exploração B. A percentagem dos géneros *Trichostrongylus* e *Teladorsagia* era elevada mesmo após a aplicação do anti-helmíntico (66,7% e 23,8%, respetivamente).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram a importância do controle parasitário integrado que deve incluir programas de gestão parasitária com medidas específicas, de maneira a introduzir práticas mais corretas nas explorações de pequenos ruminantes, de forma a reduzir o uso indiscriminado de anti-helmínticos, e assim a pressão de adaptação dos parasitas, que leva ao aumento de resistências.

Palavras-chave: parasitas gastrointestinais, pequenos ruminantes, anti-helmínticos, resistências.

ABSTRACT

Gastrointestinal nematodes of small ruminants from extensive or intensive production systems, are of high importance as they will affect the health, well-being, productivity, and reproduction of these animals worldwide. Deworming programs must be correctly designed to interrupt the parasites' life cycles. However, the treatment and prophylaxis of infection by gastrointestinal worms has been based almost exclusively on the use of anthelmintics, often without any previous indication of the existence of the parasite. For this reason, and due to genetic diversity, parasites have evolved beyond control measures, with an increase in resistance to the anthelmintics used.

The main objective of the present study was the collection and analysis of faecal samples from small ruminants and identification of the main gastrointestinal nematodes, in the Parasitology Laboratory of the University of Trás-os-Montes and Alto Douro (UTAD), to verify the existence of resistance to anthelmintics in small ruminants in Northern Portugal.

From September 2020 to February 2021, a total of 87 faecal samples were collected from small ruminants from three different mountain farms Serra do Marão (farm A) and Serra da Aboboreira (farms B and C). The prevalence of infection was 90.8%, by trichostrongylide-like eggs, 41.5% by *Nematodirus* eggs and 15.4% by *Strongyloides* eggs. After comparison of the positivity proportions, it was found that the animal species was correlated ($p = 0.020$) with the presence of *Nematodirus* eggs, with a higher prevalence in goats than in sheep. There was also a significantly ($p = 0.004$) higher prevalence of *Nematodirus* eggs in the Bravia breed compared to the cross breed and a significantly higher prevalence ($p = 0.006$) of *Strongyloides* eggs in the cross breed. In the remaining variables sex, age, body condition and general positivity there were no statistically significant differences.

Regarding the analysis of anthelmintic sensitivity, the presence of lack of efficacy of fenbendazol was observed on farm B. The percentage of the genera *Trichostrongylus* and *Teladorsagia* was high even after the application of the anthelmintic (66,3% and 23,8%, respectively).

The results obtained in this study demonstrate the importance of integrated parasite control, which should include parasite management programs with specific measures, in order to introduce more correct practices in small ruminants' farms, reducing the indiscriminate use

of anthelmintics, and thus the adaptation pressure of parasites, which lead to increased resistance.

Keywords: gastrointestinal parasites, small ruminants, anthelmintics, resistance.

ÍNDICE GERAL

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS OU ACRÓNIMOS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE GRÁFICOS.....	xv
LISTA DE TABELAS	xvii
I. INTRODUÇÃO GERAL	1
II. REVISÃO DA LITERATURA CIENTÍFICA.....	3
1. Importância geral do estudo das parasitoses nos pequenos ruminantes	3
2. Principais nematodes gastrointestinais dos ovinos e caprinos	4
2.1. Superfamília Trichostrongyloidea	6
2.1.1. Hemoncose	6
2.1.1.1. Distribuição e prevalência	6
2.1.1.2. Ciclo de vida.....	7
2.1.1.3. Sinais clínicos e lesões	8
2.1.1.4. Importância económica	9
2.1.2. Ostertagiose.....	9
2.1.2.1. Ciclo de vida.....	9
2.1.2.2. Sinais clínicos e lesões	10
2.1.3. Tricostrongilose	11
2.1.3.1. Ciclo de vida.....	11
2.1.3.2. Sinais clínicos e lesões	12
2.1.4. Cooperiose.....	12
2.1.4.1. Sinais clínicos e lesões	12
2.1.5. Nematodirose	12
2.1.5.1. Ciclo de vida.....	13
2.1.5.2. Sinais clínicos e lesões	13

2.2. Superfamília Strongyloidea	14
2.2.1. Cabertiose	14
2.2.1.1. Ciclo de vida.....	14
2.2.1.2. Sinais clínicos e lesões	14
2.2.2. Esofagostomose	15
2.2.2.1. Ciclo de vida.....	15
2.2.2.2. Sinais clínicos e lesões	16
2.2.3. Bunostomose	16
2.2.3.1. Ciclo de vida.....	16
2.2.3.2. Sinais clínicos e lesões	17
3. Métodos de diagnóstico coprológico	18
3.1. Princípios básicos para a recolha de amostras fecais.....	18
3.2. Observação macroscópica.....	19
3.3. Esfregaço fecal.....	19
3.4. Técnica de flutuação.....	19
3.5. Sedimentação natural.....	20
3.6. Contagem de ovos fecais (COF).....	21
3.6.1. Método de McMaster.....	21
3.6.2. FECPAK ^{G2}	23
3.6.3. FLOTAC e mini-FLOTAC.....	24
3.7. Identificação morfológica das larvas de estágio 3 (L3).....	26
3.7.1. Características diferenciadoras entre L3 de nematodes gastrointestinais	28
4. Tratamento	31
5. Resistência a anti-helmínticos.....	32
5.1. Diagnóstico de resistência	37
5.1.1. Testes <i>in vivo</i>	37

5.1.1.1. Teste de redução da contagem de ovos fecais (TRCOF)	37
5.1.2. Testes <i>in vitro</i>	40
5.1.2.1. Teste de eclosão dos ovos (TEO)	40
5.1.2.2. Teste de desenvolvimento larvar (TDL)	41
5.1.3. Testes moleculares	42
6. Controlo integrado e sustentável das parasitoses gastrointestinais nos pequenos ruminantes.....	43
6.1. Tratamento seletivo direcionado (TSD) e tratamento direcionado (TD).....	45
III. COMPONENTE PRÁTICA.....	49
1. Introdução	49
2. Objetivos.....	50
3. Materiais e métodos.....	50
3.1. Caracterização das explorações em estudo	50
3.2. Recolha e conservação de amostras	53
3.3. Análise coprológica	54
3.3.1. Método de Willis - Mollay	54
3.3.2. Método de McMaster.....	58
3.3.3. Coprocultura.....	61
3.4. Análise de dados	63
4. Resultados.....	64
4.1. Caracterização da população em estudo	64
4.2. Identificação dos ovos de helmintes gastrointestinais	68
4.3. Prevalência de helmintes gastrointestinais	71
4.4. Avaliação da eficácia dos anti-helmínticos	73
4.5. Coprocultura (exploração B)	75
5. Discussão.....	80

IV. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	87
V. BIBLIOGRAFIA	89

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS OU ACRÓNIMOS

©	<i>Copyright</i>
°C	Grau Celsius
µm	Micrómetro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
COF	Contagem de ovos fecais
L1	Larva de primeiro estágio
L2	Larva de segundo estágio
L3	Larva de terceiro estágio
L4	Larva de quarto estágio
ml	Mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
opg	Ovos por grama de fezes
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês “Polimerase chain reaction”)
SCOPS	Controlo sustentável das parasitoses dos ovinos (do inglês “Sustainable control of parasites in sheep”)
TD	Tratamento direcionado
TDL	Teste de desenvolvimento larvar
TEO	Teste de eclosão dos ovos
TRCOF	Teste de redução da contagem de ovos fecais
TSD	Tratamento seletivo direcionado
UTAD	Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
ZnSO ₄	Sulfato de zinco
WAAVP	Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária (do inglês “World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology”)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida geral dos nematodes gastrointestinais	5
Figura 2 - Classificação taxonómica dos principais nematodes gastrointestinais nos pequenos ruminantes.....	5
Figura 3 - Ciclo de vida de <i>Haemonchus contortus</i>	7
Figura 4 - Ciclo de vida de <i>Teladorsagia circumcincta</i>	10
Figura 5 - Ciclo de vida do género <i>Oesophagostomum</i>	15
Figura 6 - Esboço da câmara de McMaster	22
Figura 7 - Teste comercial FECPAK ^{G2}	23
Figura 8 - Observação do sistema FLOTAC ao microscópio	24
Figura 9 - Observação do aparelho do mini-FLOTAC ao microscópio	25
Figura 10 - Fill-FLOTAC e os principais componentes.....	25
Figura 11 - Diagrama de uma larva de estágio 3 (L3) infetante	26
Figura 12 - L3 mais comuns dos pequenos ruminantes, medidas em micrómetros (µm)	27
Figura 13 - Diferenças entre as extremidades anteriores dos géneros <i>Trichostrongylus</i> (à esquerda) e <i>Teladorsagia</i> (à direita).....	29
Figura 14 - Diferenças entre as extremidades anteriores das L3 de <i>Cooperia</i> spp. e <i>Haemonchus contortus</i>	29
Figura 15 - Diferenças entre as células intestinais das L3 de <i>Chabertia ovina</i> e <i>Oesophagostomum</i> spp	30
Figura 16 - Esquema ilustrador das mudanças globais que influenciam a contaminação das pastagens com helmintes gastrointestinais	34
Figura 17 - População de vermes gastrointestinais expostos e <i>in refugia</i>	36
Figura 18 - Sistema FAMACHA [®]	47
Figura 19 - Caprinos da raça Bravia da exploração A.....	51
Figura 20 - Caprinos, ovinos e bovinos na exploração B	51
Figura 21 - Recolha de fezes frescas a partir da ampola retal de um caprino, da exploração A	53
Figura 22 - Material utilizado no método de Willis - Mollay	55
Figura 23 - Lâminas em câmara húmida prontas a serem visualizadas ao microscópio	56

Figura 24 - Ovos do tipo tricostrongilídeo.....	56
Figura 25 - Ovos do tipo tricostrongilídeo (setas).....	57
Figura 26 - Ovos do tipo tricostrongilídeo (setas).....	57
Figura 27 - Material utilizado no método de McMaster.....	58
Figura 28 - Câmara de McMaster, em câmara húmida, pronta para observação.....	59
Figura 29 - Esquema representativo dos ovos nos retículos da câmara de McMaster	60
Figura 30 - Ovos do tipo tricostrongilídeo (setas a amarelo) na câmara de McMaster.....	60
Figura 31 - Coprocultura: amostras fecais prontas a seguir para a estufa	63
Figura 32 - Observação de L3 (setas) ao microscópio	63
Figura 33 - Ovos do tipo tricostrongilídeo (setas).....	68
Figura 34 – I. A) Ovos do tipo tricostrongilídeo. B) Ovo de <i>Strongyloides</i> sp. II. C) Ovo de <i>Moniezia</i>	69
Figura 35 - A) Ovos de <i>Nematodirus</i> spp. B) Ovos do tipo tricostrongilídeo	69
Figura 36 - A) Ovo do tipo tricostrongilídeo. B) Oocisto de <i>Eimeira</i> spp. C) Ovo de <i>Moniezia benedeni</i>	70
Figura 37 - A) Ovos do tipo tricostrongilídeo. B) Ovo do género <i>Nematodirus</i> . C) Oocistos de <i>Eimeira</i> spp	70
Figura 38 - Pseudoparasitas: bolhas de ar (setas a vermelho) e estrutura vegetal (círculo a preto). Ovos de tricostrongilídeos (setas a verde)	70
Figura 39 - Larva L3 do género <i>Teladorsagia</i> , com o pormenor da extremidade cranial.....	77
Figura 40 - Larva L3 do género <i>Trichostrongylus</i>	77
Figura 41 - Larva L3 de <i>Haemonchus contortus</i>	78
Figura 42 - Larva L3 do género <i>Cooperia</i> . Presença de dois corpos refráteis (círculo a preto)	78
Figura 43 - Larva L3 do género <i>Chabertia</i> ou <i>Oesophagostomum</i>	78

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição geral dos animais incluídos no estudo de acordo com a espécie.....	64
Gráfico 2 - Distribuição dos animais incluídos no estudo de acordo com a raça.	65
Gráfico 3 - Distribuição geral dos animais incluídos no estudo de acordo com o sexo.....	65
Gráfico 4 - Distribuição dos caprinos e ovinos incluídos no estudo de acordo com o sexo. ...	66
Gráfico 5 - Distribuição dos ovinos e caprinos incluídos no estudo de acordo com a idade. ..	66
Gráfico 6 - Distribuição dos animais incluídos no estudo de acordo com a condição corporal.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comprimento da extremidade caudal das L3 (extensão da bainha da cauda), em μm	28
Tabela 2 - Possíveis razões para a subdosagem de anti-helmínticos gastrointestinais. Adaptado de Bartley (2008).	34
Tabela 3 - Caracterização geral das explorações em estudo.	52
Tabela 4 - Grau de infecção de acordo com as diferentes espécies de nematodes	61
Tabela 5 - Prevalência de infecção por ovos de nematodes gastrointestinais em pequenos ruminantes das explorações de montanha de acordo com a espécie, raça, sexo, idade e condição corporal.	72
Tabela 6 - Avaliação da eficácia do anti-helmíntico das explorações B e C.	75
Tabela 7 - Resultados da coprocultura das amostras fecais da exploração B pré e pós-tratamento com fenbendazol.	76

I. INTRODUÇÃO GERAL

Os pequenos ruminantes albergam vermes gastrointestinais, embora a quantidade possa variar de acordo com o animal, o tipo de produção (intensiva/extensiva), o local de pastoreio, o manejo da exploração, condições climáticas, entre outras. Na produção de pequenos ruminantes, as doenças parasitárias têm elevada importância, pois causam elevadas perdas económicas e baixos níveis de produção, custos elevados de tratamentos antiparasitários e controlo.

Durante vários anos, o controlo das parasitoses gastrointestinais tem-se baseado exclusivamente no uso de anti-helmínticos, em vez de se recorrer a outras medidas complementares mais sustentáveis. Com esse facto, e também devido à diversidade genética, os parasitas têm adquirido genes de resistência aos anti-helmínticos de uso frequente. Desta forma, o uso destes fármacos torna-se ineficaz e com isso vai aumentar a população com genes de resistência.

Assim, torna-se crucial adotar programas de uso sustentável de antiparasitários nas explorações bem como de medidas profiláticas eficientes para o controlo da população parasitária.

O presente estudo teve como principais objetivos identificar os principais nematodes gastrointestinais nos pequenos ruminantes nas regiões de montanha, nomeadamente nas serras do Marão e Aboboreira no Norte de Portugal, bem como obter informação sobre possíveis falhas de eficácia, devido a resistências aos anti-helmínticos. Para isso, durante cinco meses, procedeu-se à recolha de amostras fecais em três diferentes explorações. Posteriormente, todas as amostras foram analisadas no Laboratório de Parasitologia da UTAD, recorrendo à análise coprológica utilizando o método de Willis-Mollay, o método de McMaster e, para a identificação morfológica das larvas de terceiro estágio (L3), fez-se coprocultura. Dos métodos mencionados, apenas o método de McMaster permite quantificar a infeção parasitária, possibilitando comparações e avaliações da eficácia do anti-helmíntico através do Teste de redução da contagem de ovos fecais (TRCOF).

Adicionalmente, assisti e participei na prática clínica de pequenos animais na VALPATAS – Clínica Veterinária de Valpaços, em Valpaços.

Este trabalho inicia-se por uma breve revisão bibliográfica onde são abordadas as principais parasitoses gastrointestinais dos pequenos ruminantes, incluindo os seus ciclos de

vida, sinais clínicos e lesões. Também são descritos os métodos de diagnóstico e tratamentos amplamente utilizados. Por fim, é tratado o tema do aumento da resistência a anti-helmínticos nas explorações de pequenos ruminantes, assim como métodos de a detetar e compreender.

II. REVISÃO DA LITERATURA CIENTÍFICA

1. Importância geral do estudo das parasitoses nos pequenos ruminantes

Os pequenos ruminantes, seja em sistemas de produção extensivos ou intensivos, são altamente suscetíveis a um largo espectro de parasitas gastrointestinais. Assim, o controlo de doenças parasitárias nestes animais tem elevada importância, dado que as mesmas afetam a saúde, bem-estar, produtividade e reprodução destes animais em todo mundo (Rinaldi et al., 2015a). É de sublinhar que as parasitoses têm efeitos na produção, tanto nas perdas de produtividade dos animais e diminuição da produção de leite, carne ou mesmo abortos, como nos custos com o tratamento e profilaxia das mesmas (Charlier et al., 2018).

Os sistemas de produção são muito variáveis entre países e de acordo com o tamanho do efetivo de animais, mas, normalmente, os rebanhos encontram-se confinados em áreas pequenas. Esta sobrepopulação tende a aumentar a concentração de formas parasitárias, incluindo ovos e larvas, na pastagem, tornando-se fontes potenciais de infeção e reservatório para uma infeção futura (Kumar et al., 2013).

Muitas doenças parasitárias dos pequenos ruminantes apresentam potencial zoonótico, o que poderá constituir um grave problema para a saúde pública, principalmente ao afetar pessoas pertencentes a grupos de risco, como crianças, idosos, indivíduos com doenças imunossupressoras e grávidas (Shalaby, 2013).

Assim, os programas de desparasitação devem ser corretamente elaborados tal forma que permitam interromper os ciclos de vida dos parasitas, de modo a proceder ao controlo e prevenção da perpetuação dos mesmos. Contudo, ao longo dos anos, o tratamento e a profilaxia da infeção por vermes gastrointestinais tem-se baseado no uso de anti-helmínticos, muitas vezes sem qualquer indicação prévia da existência do parasita. Por esse motivo, e devido à diversidade genética, os parasitas têm evoluído para lá das medidas de controlo, observando-se um aumento da resistência aos anti-helmínticos utilizados (Vercruysse et al., 2018). De maneira a contrariar este facto, deve-se estudar a prevalência de determinados parasitas em relação à sua área geográfica, assim como os efeitos dos mesmos e o método mais adequado para os erradicar.

2. Principais nematodes gastrointestinais dos ovinos e caprinos

Os helmintes gastrointestinais são um grupo diverso de vermes que engloba os nematodes, os cestodes e os trematodes (Shalaby, 2013).

Embora os ovinos e os caprinos sejam fisiologicamente diferentes, muitos dos parasitas gastrointestinais são compartilhados (Craig, 2009).

Os nematodes gastrointestinais que provocam mais lesões são *Haemonchus* spp., *Teladorsagia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Cooperia* spp. e *Nematodirus* spp. (Morgan & van Dijk, 2012). A distribuição destes parasitas pode variar de acordo com a localização geográfica (Fleming et al., 2006) e também com o método de produção animal utilizado (Taylor, 2012). Com exceção de *Teladorsagia*, *Trichostrongylus* e *Haemonchus*, o ciclo de vida destes nematodes gastrointestinais é semelhante (Abbott et al., 2012). Sendo um ciclo de vida direto (Figura 1), sem intervenção de hospedeiro intermediário. Depois de acasalar dentro do hospedeiro, as fêmeas adultas põem ovos que são excretados nas fezes. Posteriormente, de cada ovo eclode uma larva de primeiro estágio (L1). A L1 vai desenvolver-se e ocorre uma muda para uma larva de segundo estágio (L2). Na segunda muda para larva de terceiro estágio (L3), estágio infetante, há migração para a pastagem, onde vão ser ingeridas pelos pequenos ruminantes. Quando chegam ao estômago ou ao intestino, desenvolvem-se em larvas de quarto estágio (L4) antes de se tornarem vermes adultos, cerca de 14 dias depois. O período pré-patente, entre a ingestão de L3 e o aparecimento dos ovos nas fezes é, geralmente, de 16 a 21 dias, mas depende da temperatura e humidade (Craig, 2009; Abbott et al., 2012).

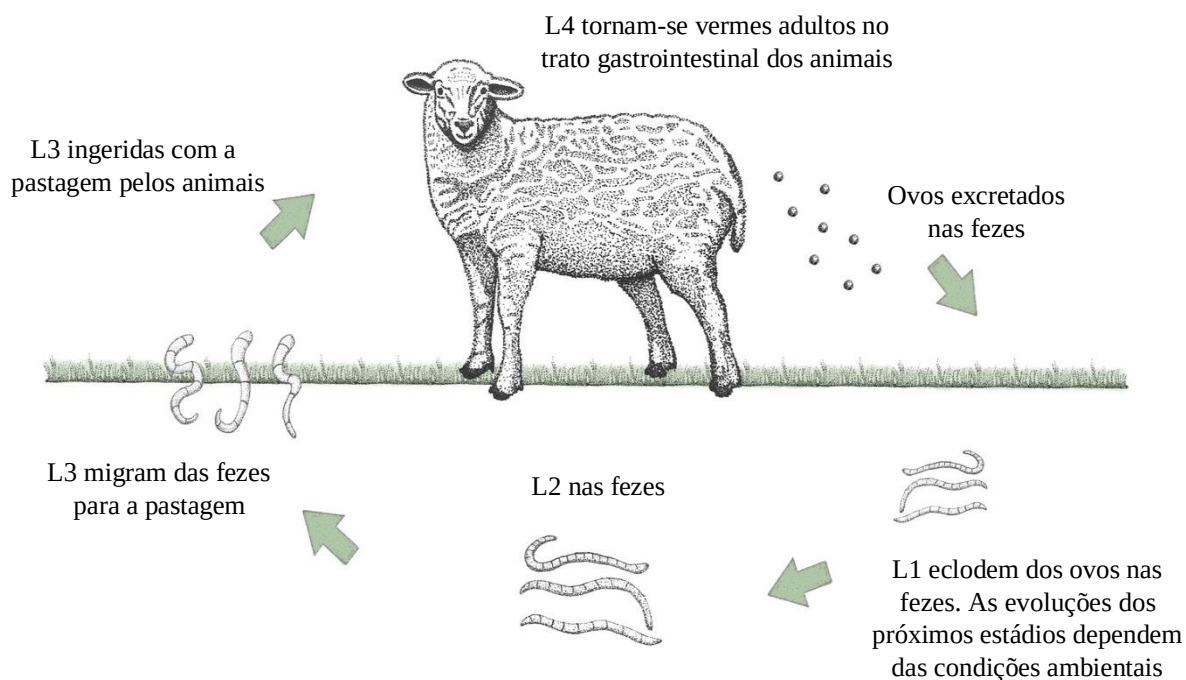


Figura 1 - Ciclo de vida geral dos nematodes gastrointestinais. Adaptado de <https://www.farmhealthfirst.com/disease-solution/gastrointestinal-worms-in-sheep>.

Na Figura 2 encontra-se esquematizada a classificação taxonómica, segundo Taylor et al. (2016).

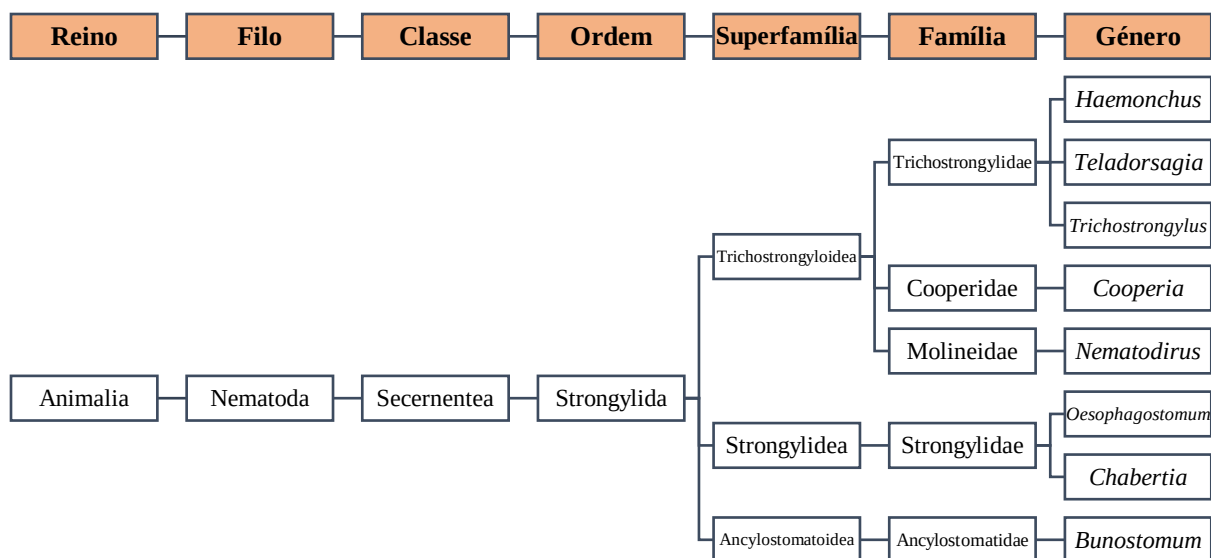


Figura 2 - Classificação taxonómica dos principais nematodes gastrointestinais nos pequenos ruminantes. Adaptado de Taylor et al. (2016).

2.1. Superfamília Trichostrongyloidea

2.1.1. Hemoncose

Muito comum em pequenos ruminantes, a hemoncose é provocada por nematodes hematófagos que se localizam no abomaso. A principal espécie é *Haemonchus contortus* (Zajac, 2006).

2.1.1.1. Distribuição e prevalência

A hemoncose é uma parasitose comum em todo mundo, mais especificamente em áreas com clima quente, como áreas tropicais e subtropicais (Taylor et al., 2016). Embora, seja um parasita típico destas regiões, a adaptabilidade ecológica de *Haemonchus contortus* proporcionada pelo seu elevado nível de polimorfismo genético e elevado potencial biótico, permite que se adapte a um amplo conjunto de zonas climáticas, o que confere uma vantagem seletiva a mudanças climáticas (Besier et al., 2016b).

O projeto GLOWORM assenta-se em “estratégias inovadoras e sustentáveis para mitigar o impacto das alterações globais das parasitoses por helmintes gastrointestinais em ruminantes”, que tem por base um consórcio de pesquisa em que participam instituições acadêmicas e empresas, para abranger uma infinidade de áreas como a parasitologia, a epidemiologia, a biologia molecular, os sistemas agrícolas e os sistemas de informação geográfica, de vários países europeus do projeto (Rinaldi et al., 2015a). Assim, com base nos resultados obtidos no projeto GLOWORM, a prevalência geral de infecção por *Haemonchus contortus* em explorações de ovinos na Europa foi de cerca de 56%. No entanto, os resultados diferiram entre os países incluídos no estudo, observando-se elevadas prevalência na Suíça (77%) e em Itália (73%) e valores de prevalência inferiores na Irlanda (4%) (Rinaldi et al., 2015b).

2.1.1.2. Ciclo de vida

O ciclo de vida encontra-se esquematizado na Figura 3. As fêmeas podem atingir até três centímetros de comprimento e são bastante prolíficas em ovos. Num período de cinco dias, ocorre a eclosão da L1 na pastagem e desenvolvimento até L3, sendo que a sua evolução pode ser influenciada pelas condições ambientais, atrasando este período em semanas ou meses. Após a ingestão pelos pequenos ruminantes da pastagem contaminada e desembainhamento no rúmen, a L3 muda duas vezes, próxima das glândulas gástricas. Antes da muda final, o parasita desenvolve uma lanceta perfurante que permite obter sangue a partir dos vasos da mucosa gástrica. Quando adultos, estes nematodes conseguem mover-se livremente na superfície da mucosa (Zajac, 2006; Taylor et al., 2016). O período pré-patente em ovinos é de duas a três semanas (Zajac, 2006) e em caprinos é de três a quatro semanas (Aimulajiang et al., 2020).

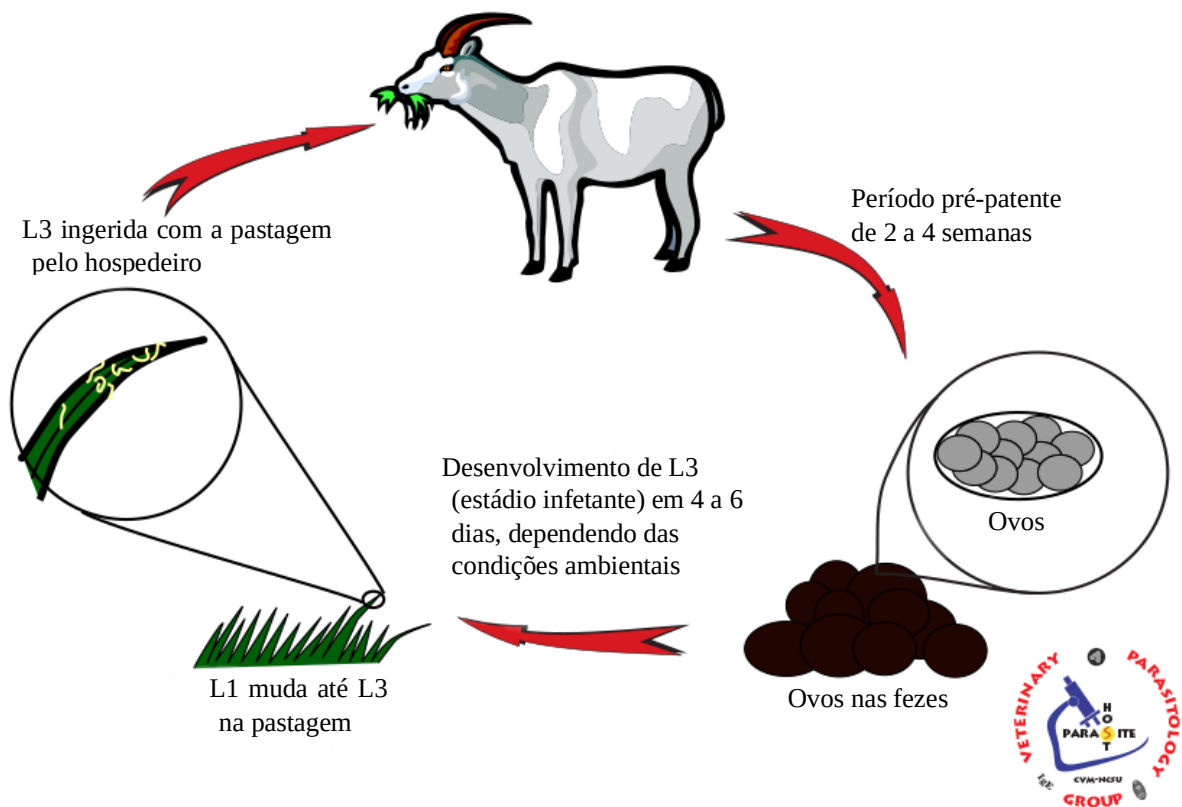


Figura 3 - Ciclo de vida de *Haemonchus contortus*. Adaptado de https://parasitology.cvm.ncsu.edu/life_cycles/nematodes/haemonchus.html. Acedido a 19/09/2020

2.1.1.3. Sinais clínicos e lesões

Esta parasitose é uma causa frequente de mortalidade em ovinos e caprinos, seja devido à capacidade hematófaga do parasita, que provoca anemia nos animais afetados, ou mesmo pela elevada prolificidade do parasita (Besier et al., 2016a).

A gravidade da hemoncose está intimamente relacionada com a intensidade da infeção e da resposta do hospedeiro, dado que há uma forte correlação entre a perda de sangue e o número de vermes adultos (Besier et al., 2016a). Esta doença pode ser categorizada em três formas distintas: hiperaguda, aguda e crónica (Abbott et al., 2012).

Na forma hiperaguda, que é relativamente rara, a gastrite hemorrágica conduz a perda maciça de sangue e anemia. Nesta forma, as mortes ocorrem repentinamente, sem sinais premonitórios de doença, mas com sinais de anemia grave em muitos dos animais sobreviventes. O diagnóstico é realizado na necropsia, devido ao elevado número de vermes em diferentes estádios de desenvolvimento e de várias hemorragias na superfície da mucosa (Besier et al., 2016a; Taylor et al., 2016).

Na forma aguda também ocorre anemia, que se desenvolve durante um período relativamente mais longo, podendo também ocorrer mortes, dentro de 4 a 6 semanas após a infeção, dependendo da quantidade de larvas ingeridas. O animal pode também exibir letargia, fezes firmes, escassas e de cor escura, devido à presença de melena (Besier et al., 2016a) e perda de lã (Craig, 2009; Taylor et al., 2016). Normalmente, não é comum a presença de diarreia. À necropsia, a carcaça apresenta-se pálida com ascite acentuada (Besier et al., 2016a) e níveis variáveis de edema, incluindo edema submandibular, reflexo da hipoproteïnemia devido à hematofagia por *Haemonchus contortus* (Taylor et al., 2016). O sangue do animal apresenta-se fluído e não coagula, sendo que a mucosa abomasal costuma apresentar-se edemaciada, com muco sanguinolento e sinais da presença do parasita (Besier et al., 2016a). As alterações histopatológicas associadas à forma aguda incluem lesões traumáticas na superfície da mucosa e presença de resposta celular inflamatória (Besier et al., 2016a).

Na forma crónica ocorrem infeções com cargas parasitárias menores, mas mais persistentes, que podem passar despercebidas ou óbvias apenas quando a ingestão de larvas aumenta ou quando as más condições nutricionais reduzem a capacidade de resposta do hospedeiro. Esta forma é mais comum em ambientes menos favoráveis, devido às condições ambientais das zonas endémicas, com a infeção por outros parasitas (Besier et al., 2016b). A hemoncose crónica está associada a perda de peso progressiva e fraqueza e os níveis de ferro,

cobalto e cobre apresentam-se reduzidos, o que conduz a anemia microcítica e hipocrômica (Abbott et al., 2012). As concentrações de proteínas séricas são baixas, pela perda das mesmas através do trato gastrointestinal (Craig, 2009). A redução na produção de leite, em ovinos e em caprinos, pode estar associada a cargas parasitárias pequenas, mas de forma crônica, que podem provocar também hipoagalaxia em ovinos, podendo influenciar o crescimento dos cordeiros (Besier et al., 2016a) ou provocar a morte dos mesmos (Taylor et al., 2016).

2.1.1.4. Importância económica

A hemoncose é reconhecida como uma das parasitoses com maior importância económica em zonas endémicas, devido à sua elevada prevalência e taxa de mortalidade em pequenos ruminantes, a qual varia muito entre regiões, anos e estações. As condições ambientais e a eficácia das medidas de controlo, bem como a presença de resistências aos anti-helmínticos, vão influenciar a prevalência da hemoncose.

O impacto económico imediato é maior em explorações intensivas em áreas endémicas. No entanto, as perdas económicas em sistemas de exploração tradicionais também são consideravelmente elevadas, devido a períodos de má nutrição ou de disponibilidade alimentar limitada, acesso limitado a anti-helmínticos devido à capacidade económica dos produtores ou à falta de eficácia dos mesmos (Besier et al., 2016b).

2.1.2. Ostertagiose

A espécie *Teladorsagia circumcincta*, também conhecida como *Ostertagia circumcincta*, é um nematode que se encontra presente no abomaso de ovinos e caprinos. A ostertagiose é uma parasitose comum em todo mundo, sendo que em climas frios e húmidos, a espécie *Teladorsagia circumcincta* é a principal causa de perdas económicas (Craig, 2009). Este género apresenta como principal vantagem de sobrevivência às condições do ambiente, uma maior resistência à dessecação e capacidade de se desenvolver em temperaturas mais baixas (O'Connor et al., 2006).

2.1.2.1. Ciclo de vida

O ciclo de vida de *Teladorsagia circumcincta* (Figura 4) é semelhante ao de outros nematodes gastrointestinais, com a particularidade de que as L3 são bastante resilientes e conseguem sobreviver na pastagem em condições adversas. No hospedeiro, as larvas formam

pequenos nódulos nas glândulas gástricas da parede do abomaso e permanecem inativas durante vários meses, sem se desenvolver. Quando há condições ambientais favoráveis, as larvas desenvolvem-se em vermes adultos, emergindo dos nódulos, recomeçando o ciclo (Abbott et al., 2012).

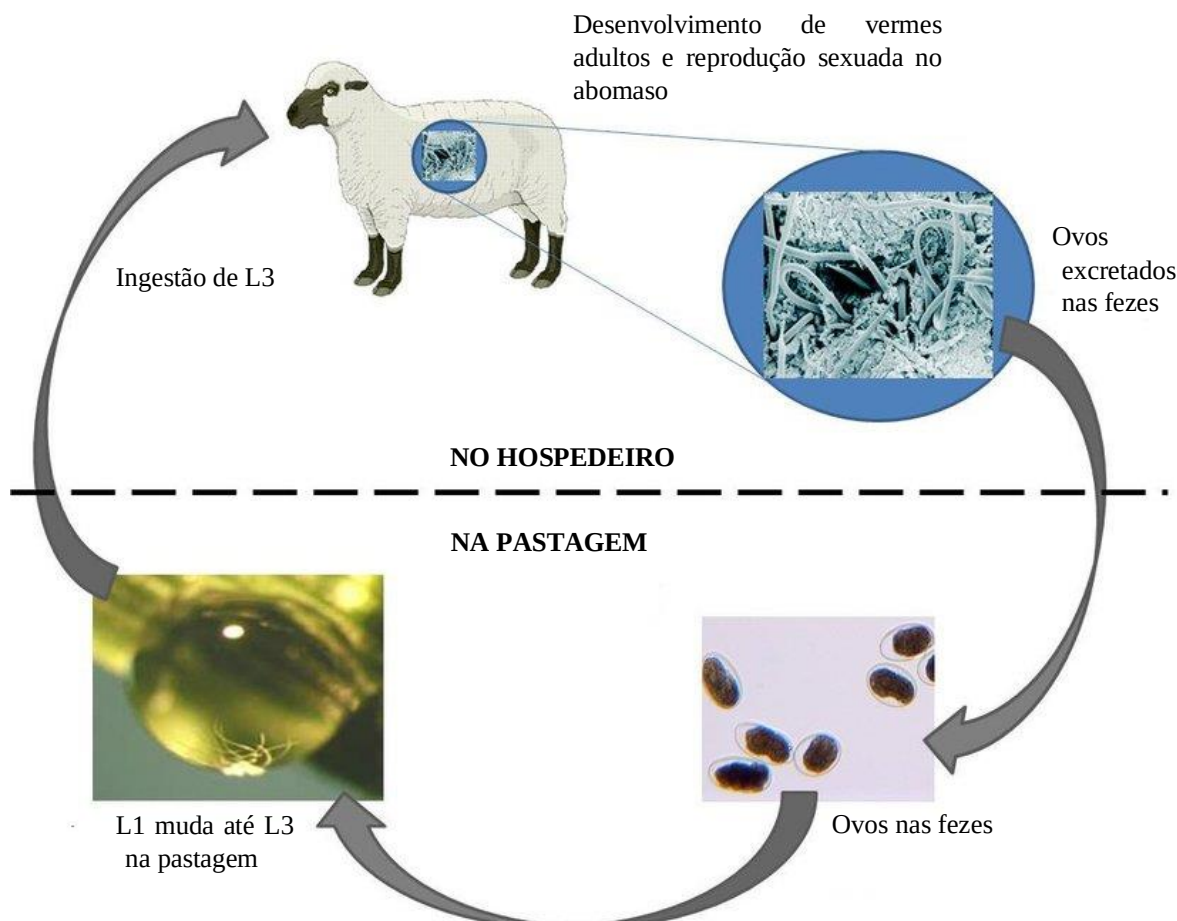


Figura 4 - Ciclo de vida de *Teladorsagia circumcincta*. Adaptado de https://www.researchgate.net/figure/Life-cycle-of-T-circumcincta_fig1_47705925. Acedido em 27/09/2020

2.1.2.2. Sinais clínicos e lesões

Existem duas formas de apresentação da ostertagiose: ostertagiose tipo I e ostertagiose tipo II. A ostertagiose tipo I afeta geralmente animais jovens em pastoreio no verão, que vão ingerir uma grande quantidade de larvas, num curto período de tempo (Abbott et al., 2012). É uma doença com elevada morbilidade, acima de 75%, mas em que a mortalidade é rara, desde que seja instituído precocemente um tratamento adequado (Bowman, 2014; Taylor et al., 2016). Em oposição, a ostertagiose tipo II afeta animais até um ano de idade, no final do inverno ou primavera, resultado da maturação das larvas ingeridas durante o outono anterior, que estiveram enquistadas nas glândulas gástricas, em latência (Abbott et al., 2012; Bowman, 2014). A prevalência desta doença é baixa comparativamente à anterior, em que apenas uma porção dos

animais é afetada, mas em que a mortalidade pode ser elevada, se não for instituído tratamento precoce com um antiparasitário eficaz (Taylor et al., 2016).

Em ambas as formas da doença, o sinal clínico mais considerável é a perda acentuada de peso, devido a hiporexia (Craig, 2009). Na ostertagiose tipo I há presença de diarreia aquosa abundante, de cor verde brilhante; na ostertagiose tipo II, a diarreia, se existir, é intermitente, em que os membros pélvicos vão apresentar-se manchados com as fezes (Abbott et al., 2012; Ruano et al., 2017). Na ostertagiose tipo I, à medida que as larvas emergem das glândulas gástricas, vão lesionar a mucosa do abomaso, provocando o espessamento da mucosa gástrica. Há também presença de edema das “dobras” abomasais e descamação da mucosa, o que provoca hipoalbuminemia e níveis elevados de pepsinogénio sérico (Craig, 2009).

2.1.3. Trichostrongilose

O género *Trichostrongylus* representa um importante grupo de parasitas dos pequenos ruminantes. Estes parasitas encontram-se no intestino delgado e exercem os seus efeitos patogénicos em animais jovens durante os meses de outono ou inverno, em climas frios e húmidos, com elevada resistência à dessecação (O'Connor et al., 2006), mas também afetam o crescimento da lã, em animais idosos (Roeber et al., 2013a). As espécies mais comuns são *Trichostrongylus axei*, que se encontra no abomaso de ovinos e caprinos, *Trichostrongylus colubriformis* e *Trichostrongylus vitrinus*, que se encontram no intestino delgado de ovinos e caprinos (Abbott et al., 2012; Taylor et al., 2016).

2.1.3.1. Ciclo de vida

Os ovos de *Trichostrongylus* spp. são eliminados nas fezes do hospedeiro, que sob condições ótimas de temperatura e humidade vão eclodir em L1. Estas larvas vão alimentar-se e dar origem a L2. Na segunda muda para L3, estas larvas são ingeridas pelos pequenos ruminantes com a pastagem. No entanto, durante o inverno, as L3 têm a capacidade de sobreviver na pastagem e quando chega a primavera, os animais infetam-se após a ingestão das mesmas. À medida que as temperaturas aumentam no verão, as L3 morrem. As pastagens ficam novamente contaminadas pelos ovos excretados pelos novos animais que são introduzidos no pasto (Taylor et al., 2016).

2.1.3.2. Sinais clínicos e lesões

Na tricostrongilose os principais sinais clínicos são inapetência, diarreia e rápida perda de peso (Abbott et al., 2012). As L3 de *Trichostrongylus vitrinus* escavam túneis subepiteliais entre as vilosidades intestinais. Os nematodes jovens que se desenvolvem nesses túneis emergem 10 a 12 dias após a infecção, o que está associado a extensas lesões na mucosa duodenal e a sinais clínicos de enterite generalizada, incluindo hemorragia, edema e perda de proteínas plasmáticas com subsequente hipoproteinemia e hipoalbuminemia (Roeber et al., 2013a).

As infecções crônicas por *Trichostrongylus colubriformis* são acompanhadas pela redução da eficiência de conversão alimentar; no caso de *Trichostrongylus axei*, os sinais clínicos principais são diarreia, perda de peso e também morte, se o animal apresentar uma elevada carga parasitária (Abbott et al., 2012).

2.1.4. Cooperiose

O género *Cooperia* encontra-se presente no intestino delgado de ovinos e caprinos. A espécie mais relevante nestes animais é *Cooperia curticei*. A cooperiose é mais frequente em zonas temperadas frias, principalmente no outono (Bowman, 2014).

2.1.4.1. Sinais clínicos e lesões

Esta doença provoca hiporexia, anorexia e diarreia, em infecções maciças, o que leva a animais caquéticos e debilitados (Craig, 2009; Taylor et al., 2016). Os parasitas vão enrolar-se entre as vilosidades intestinais, o que vai causar atrofia das vilosidades adjacentes, visível na necropsia. Em infecções graves há atrofia disseminada das vilosidades intestinais, levando a perda das enzimas da bordadura em escova e alterações digestivas (Taylor et al., 2016).

2.1.5. Nematodirose

O género *Nematodirus* encontra-se presente no intestino delgado de ovinos e caprinos (Roeber et al., 2013a). As espécies mais comuns são *Nematodirus spathiger*, que parasita ruminantes, *Nematodirus filicollis* que afeta pequenos ruminantes (Bowman, 2014; Taylor et al., 2016) e *Nematodirus battus* que é encontrada principalmente em ovinos, mas também pode afetar caprinos (Taylor, 2012).

A nematodirose têm distribuição cosmopolita, em que as larvas estão bem-adaptadas a condições climáticas extremas, com elevada resistência a temperaturas baixas e à dessecação.

Nematodirus battus é mais frequentes em regiões húmidas e temperadas do hemisfério norte (van Dijk & Morgan, 2008; Craig, 2009).

2.1.5.1. Ciclo de vida

No ciclo de vida do género *Nematodirus*, o desenvolvimento para L3 ocorre dentro do ovo antes da eclosão do mesmo. Em *Nematodirus battus*, a eclosão da L3 ocorre após um período longo de temperatura baixa seguido por temperatura amena (Zajac, 2006), acima dos 10°C. Desta forma, a maioria dos ovos excretados pelos hospedeiros durante o verão e o outono não eclodem até a primavera seguinte (Sargison et al., 2012). A infeção por *Nematodirus battus* é transmitida entre de ovinos juvenis de um ano para o ano seguinte. A longa sobrevivência de ovos de *Nematodirus* permite esse intervalo de geração relativamente longo. O período pré-patente é curto, podendo chegar aos 14 dias (Abbott et al., 2012).

Como resultado dos requisitos climáticos específicos para a eclosão dos ovos, um grande número de larvas infetantes pode aparecer na pastagem de forma quase síncrona, o que ocorre entre abril e junho de cada ano, mas pode ocorrer em outras épocas do ano. Quando a eclosão em massa coincide com a presença de cordeiros com 6 a 12 semanas de idade, podem ocorrer surtos graves de nematodirose (Abbott et al., 2012).

2.1.5.2. Sinais clínicos e lesões

Em infeções graves, o sinal clínico mais óbvio é a diarreia verde-amarelada, que pode ocorrer durante o período pré-patente e ser extremamente grave e debilitante. Os animais apresentam-se também desidratados, fracos e com perda de peso visível (Sargison et al., 2012; Bowman, 2014). À necropsia, a carcaça apresenta-se desidratada, com presença de enterite aguda. Os vermes retorcidos finos e entrelaçados que se encontram no intestino fazem com que tenha aparência semelhante a algodão (Bowman, 2014). A mortalidade é elevada em animais não tratados, podendo existir um agravamento da doença na presença de uma infeção mista com coccídeas (Taylor et al., 2016).

2.2. Superfamília Strongyloidea

2.2.1. Cabertiose

A cabertiose é uma doença provocada por parasitas do género *Chabertia*, que se localizam preferencialmente fixos à mucosa do intestino grosso, mais exatamente do cólon, pela cápsula bucal para se poderem alimentar (Roeber et al., 2013b). A espécie *Chabertia ovina* afeta pequenos ruminantes em todo o mundo, mas é mais frequente em climas temperados (Tariq, 2015).

2.2.1.1. Ciclo de vida

A L3 é ingerida pelo animal e quando chega ao intestino delgado penetra na mucosa. Após uma semana ocorre a muda e as L4 emergem da superfície da mucosa migram para o ceco onde se agrupam e completam o desenvolvimento tornando-se adultos, 25 dias após a infeção. Os adultos põem ovos, que seguem posteriormente para o cólon e vão sair nas fezes. O período pré-patente é cerca de 42 dias.

Em áreas temperadas, a L3 é capaz de sobreviver às condições extremas do inverno, assim como a L4 pode sobreviver em latência na parede no intestino do animal, emergindo no fim do inverno ou início da primavera.

2.2.1.2. Sinais clínicos e lesões

A cabertiose contribui para a síndrome de gastroenterite parasitária, no entanto a carga parasitária deste género não é em número suficiente para causar a doença clínica por si só, em que é necessário que existam outros fatores (Taylor et al., 2016).

Os adultos provocam lesões quando se alimentam da mucosa, o que conduz a hemorragia local e perda de proteínas. A parede do intestino torna-se edematosa, congestionada e espessada com pequenas hemorragias nos locais de fixação do verme (petéquias); sendo estas lesões visíveis à necropsia (Urban et al., 2014).

As infeções moderadas são, normalmente, assintomáticas; as infeções mais graves provocam diarreia, que pode conter sangue e muco e na qual podem encontrar-se vermes. Os animais apresentam anemia e hipoalbuminemia e podem sofrer uma pronunciada perda de peso (Urban et al., 2014; Taylor et al., 2016).

2.2.2. Esofagostomose

O género *Oesophagostomum* parasita pequenos ruminantes, podendo provocar a esofagostomose. Estes parasitas encontram-se no ceco e no cólon, sendo que as espécies mais importantes são *Oesophagostomum columbianum* e *Oesophagostomum venulosum* (Bowman, 2014). Estas espécies têm distribuição mundial, mas localizam-se essencialmente em áreas tropicais e subtropicais (Tariq, 2015).

2.2.2.1. Ciclo de vida

Os ovos deste género eclodem no solo, libertando a L1 que muda até L3, a forma infetante a qual é ingerida pelo animal, mas não realiza migrações no corpo do hospedeiro, ocorrendo muda para L4, após a qual as larvas fixam-se na parede do intestino, em nódulos. Quando emergem desses nódulos, migram para o cólon e desenvolvem-se em adultos. O período pré-patente varia entre 5 a 7 semanas. As larvas podem permanecer em hipobiose em nódulos na mucosa até um ano (Taylor et al., 2016). A Figura 5 ilustra o ciclo de vida do género *Oesophagostomum*.

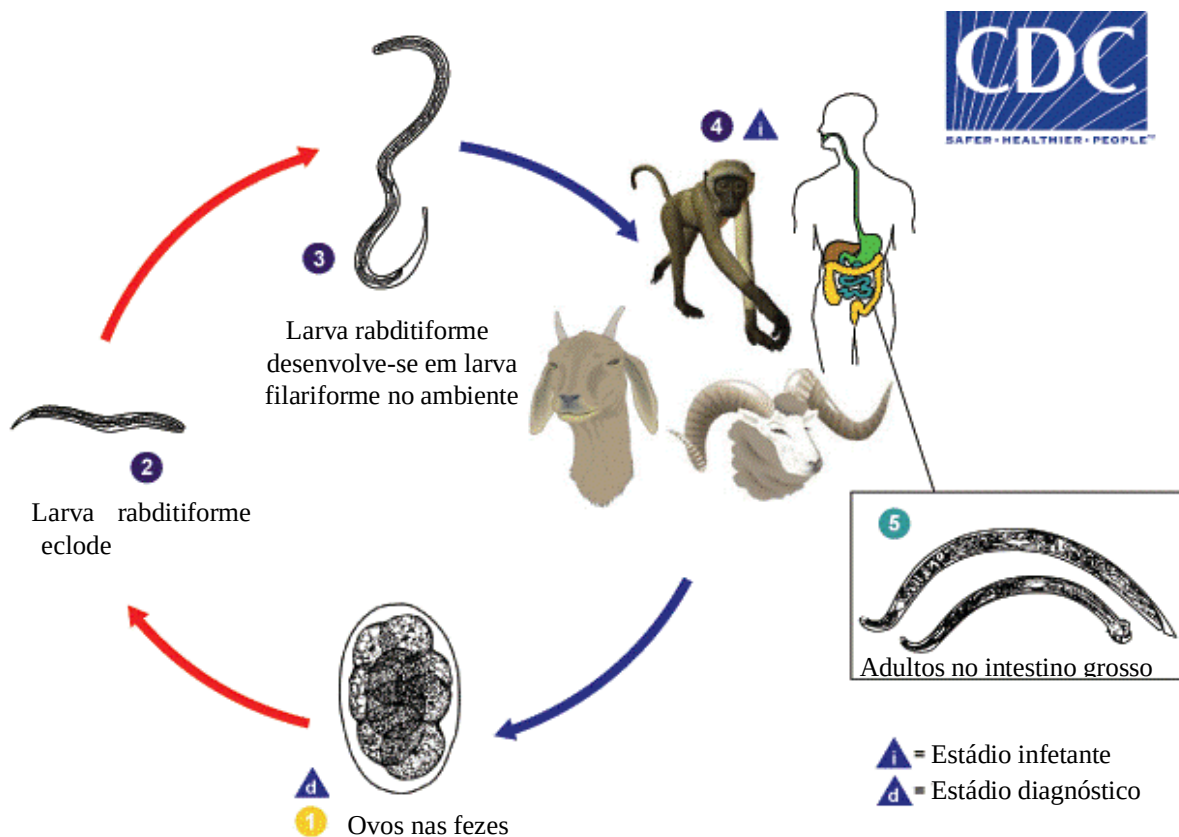


Figura 5 - Ciclo de vida do género *Oesophagostomum*. Adaptado de <https://www.cdc.gov/dpdx/oesophagostomiasis/index.html>. Acedido em 21/11/2020.

2.2.2.2. Sinais clínicos e lesões

Em infecções agudas, o principal sinal clínico é a diarreia grave de cor verde-escura, aquosa e fétida, com perda rápida de peso e, por vezes, com edema submandibular. Em infecções crônicas, os principais sinais clínicos são inapetência e emaciação com diarreia intermitente e também anemia. Dado que a doença aguda vai ocorrer no período pré-patente, os ovos de *Oesophagostomum* spp. não se encontram nas fezes. Em oposição, nas formas crônicas, os ovos encontram-se nas fezes e as L3 podem ser identificadas através de coprocultura (Taylor et al., 2016).

Ao exame *post mortem*, os animais apresentam mucosas pálidas e edematosas, linfoadenomegalia dos linfonodos mesentéricos e mucosa do cólon espessada, congestionada e coberta por muco onde se encontram os vermes. Há também hiperplasia das células caliciformes e a lâmina própria apresenta um infiltrado de células inflamatórias mistas, com eosinófilos, linfócitos e células plasmáticas (Bowman, 2014; Taylor et al., 2016).

2.2.3. Bunostomose

A espécie *Bunostomum trigonocephalum* é um dos maiores nematodes do intestino delgado de ovinos e caprinos, que provoca a bunostomose (Bowman, 2014).

A bunostomose apresenta distribuição mundial, sendo mais comum em países tropicais e temperados e, em algumas áreas, as maiores cargas parasitárias encontram-se no final da estação seca devido à maturação das larvas hipobióticas. Em países temperados é menos comum a observação de elevadas cargas parasitárias (Tariq, 2015). Normalmente, os animais jovens são os mais suscetíveis à bunostomose. O desenvolvimento de metodologias de profilaxia de nematodes gastrointestinais, contribuiu para a baixa prevalência deste parasita (Taylor et al., 2016).

2.2.3.1. Ciclo de vida

O género *Bunostomum* tem um ciclo de vida direto. No intestino do hospedeiro as fêmeas adultas põem ovos os quais são excretados com as fezes. Uma vez no ambiente, os ovos libertam as L1 que completam o desenvolvimento para L3 em cerca de 5 dias, em condições ambientais adequadas de temperatura e humidade. Essas larvas infetantes podem sobreviver por até 2 meses na pastagem (Taylor et al., 2016).

Os animais são infetados pela ingestão do parasita com a pastagem, solo ou água contaminada ou pela migração cutânea do mesmo através da traqueia. As larvas que penetram na pele chegam à corrente sanguínea e são transportadas para os pulmões, onde atravessam o tecido pulmonar, chegam à traqueia e à boca, alcançando o intestino delgado após serem deglutidas. Aí vão completar o desenvolvimento em vermes adultos e as fêmeas começam a ovopostura. O período pré-patente varia entre 4 a 8 semanas (Taylor et al., 2016).

2.2.3.2. Sinais clínicos e lesões

Os parasitas adultos de *Bunostomum* são hematófagos e, como tal, os principais sinais clínicos são anemia progressiva, com alterações associadas no hemograma, hipoalbuminemia e edema, principalmente edema submandibular. Os animais ficam fracos e emaciados, com hiporexia e, em alguns casos, pode ocorrer diarreia. Se a carga parasitária for muito elevada, os animais podem colapsar e morrer (Craig, 2009; Taylor et al., 2016).

3. Métodos de diagnóstico coprológico

As doenças causadas por helmintes gastrointestinais provocam diversos sinais clínicos, em que fatores, como a espécie, o número de vermes presentes, o estado nutricional ou imunitário do hospedeiro, vão ter influência na natureza e manifestação clínica da doença (Roeber et al., 2013b).

O diagnóstico preciso das infeções e o conhecimento dos parasitas presentes numa determinada área geográfica são de elevada importância, dado que permitem optar por estratégias de controlo mais indicadas e direcionadas (Roeber et al., 2013a).

O diagnóstico baseia-se na história clínica do animal, na presença de sinais clínicos, na ocorrência sazonal da doença e, se possível, deve ser realizada necropsia, permitindo a observação de lesões no exame *post mortem* (Roeber et al., 2013a). Contudo, para realizar a identificação direta de parasitas gastrointestinais, principalmente para identificação de ovos presentes nas fezes, devem ser também incluídos análises coprológicas como esfregaços fecais, testes de flutuação e sedimentação fecal (Mesquita et al., 2017).

O exame coprológico é o método mais utilizado na prática clínica para o diagnóstico de parasitoses gastrointestinais, com a identificação de ovos nas fezes (Vercruysse et al., 2018).

Um dos métodos de diagnóstico coprológico mais utilizado para deteção de vermes gastrointestinais é a flutuação fecal, como é exemplo o método de Willis-Mollay ou o método de McMaster, amplamente utilizado para contagem de ovos fecais (COF) (Roeber et al., 2013a).

3.1. Princípios básicos para a recolha de amostras fecais

A recolha de amostras fecais de pequenos ruminantes deve ser realizada preferencialmente da ampola retal. Se tal for complicado, pode-se recolher a partir do pasto ou do chão, após defecação do animal, porém esta recolha poderá estar contaminada, dado que as amostras podem ser invadidas por nematodes de vida livre que podem dificultar a identificação dos parasitas do animal (Zajac, 2006; Vasconcelos-Nóbrega et al., 2017).

Idealmente, os exames das amostras fecais devem ser realizados em material fecal fresco. As amostras devem ser enviadas para o laboratório embaladas em papel alumínio ou filme plástico e colocadas em sacos *zip-lock* com o ar retirado do saco. Isto porque ao manter os níveis de oxigénio baixos, vai impedir a eclosão dos ovos (Zajac, 2006). Após colheita, as amostras devem ser preservadas refrigeradas, a uma temperatura de 4°C, e examinadas nas

próximas 24 horas. Deve-se tentar evitar congelar as amostras, pois a congelação provoca alteração das formas parasitárias (Taylor et al., 2016). A análise deverá ser rápida (em 24h), já que alguns parasitas são frágeis e podem morrer com o calor ou frio. Para além disso, os ovos podem eclodir em poucos dias e as larvas requerem pessoas experientes para as identificar (Mesquita et al., 2017).

Os ovos nas fezes não são constantes ao longo do tempo, mesmo com grandes volumes fecais, podendo ocorrer falsos negativos. Uma maneira de minimizar esta situação passa por recolher e processar não uma amostra, mas várias amostras em dias consecutivos para melhorar a sensibilidade (Mesquita et al., 2017).

3.2. Observação macroscópica

Após a recolha das amostras, deve-se proceder à observação macroscópica das mesmas de modo a verificar o aspeto, consistência e presença de alguma alteração incluindo sangue, muco, parasitas adultos ou seus fragmentos e partículas de alimentos (Taylor et al., 2016).

3.3. Esfregaço fecal

O esfregaço fecal consiste na recolha e observação microscópica de uma pequena amostra fecal, à qual foi adicionado uma pequena quantidade de água ou solução salina.

É um método simples e rápido, mas alguns parasitas podem ficar ocultos pelos detritos fecais, o que provoca um elevado número de falsos negativos. Na maioria dos animais, os resultados são inconclusivos, sendo apenas detetados em animais altamente parasitados (Taylor et al., 2016).

3.4. Técnica de flutuação

Os métodos baseados na flutuação são rápidos e baratos e podem ser facilmente implementados como medida de controlo da infeção parasitária. A técnica de flutuação mais utilizada no diagnóstico coprológico é o método de Willis - Mollay (Mesquita et al., 2017).

O método de Willis - Mollay tem como vantagem ser um método simples e rápido de executar. Também não há risco de contaminação cruzada, dado que cada amostra é tratada num recipiente diferente e uma pequena quantidade de amostra permite a aplicação deste método (Willis, 1921). No entanto, apesar das vantagens, estes métodos também apresentam limitações como a eliminação intermitente de ovos e oocistos, podendo dar resultados falsos negativos, e

a necessidade de experiência por parte da pessoa que realiza a análise de modo a identificar corretamente as formas parasitárias (Mesquita et al., 2017).

O método de Willis - Mollay é um método qualitativo. Este método baseia-se no princípio da densidade específica das diferentes formas parasitárias, isto é, a de que os ovos e oocistos dos parasitas na amostra fecal flutuam num líquido com gravidade superior. As soluções usadas de cloreto de sódio (NaCl) ou de açúcar são bastante utilizadas. A gravidade específica deve ser verificada regularmente, de modo a evitar distorção dos resultados (Mesquita et al., 2017).

Em 1921, H. Hastings Willis publicou pela primeira vez, no conceituado *Medical Journal of Australia*, um método para detetar ovos de helmintes de forma confiável, que fornecia uma percentagem de resultados positivos significativamente maior do que nos métodos de esfregaço e centrifugação usados anteriormente (Willis, 1921). Este método baseia-se em dois pressupostos: as formas parasitárias presentes nas fezes flutuam numa solução salina de gravidade específica de 1,130 e aderem a uma superfície de vidro com a qual entrem em contacto. Este último pressuposto foi descrito em 1908 por William Pepper, um professor assistente de patologia clínica da Universidade da Pensilvânia. Pepper propôs a colocação de uma gota de fezes sedimentadas e lavadas numa lâmina durante alguns minutos e, de seguida, imersa em água e examinada microscopicamente. Apenas os ovos iriam estar aderidos à lâmina e todos os materiais fecais teriam sido lavados. O investigador Willis, tendo em conta as descobertas de Pepper, utilizou um recipiente com 3,3 cm de diâmetro e 0,8 cm de altura, preenchido com uma sexta parte de fezes, misturadas com solução salina. A solução salina enchia o recipiente até à borda, no qual colocava-se uma lâmina de vidro em contacto com a superfície do líquido durante algum tempo. De seguida esta lâmina de vidro era retirada e visualizada ao microscópio. Desde a sua primeira descrição, este método sofreu algumas modificações ao longo do tempo (Mesquita et al., 2017).

3.5. Sedimentação natural

O método de sedimentação natural é utilizado para a detecção de ovos e oocistos mais densos que, normalmente, não vão aparecer na técnica de flutuação utilizada. Para além disso, pode ser utilizada para evitar a distorção de determinadas formas parasitárias, pela solução concentrada. A observação deve ser cuidada dado que muitas vezes há uma elevada quantidade de detritos, o que dificulta a detecção das formas parasitárias (Taylor et al., 2016).

3.6. Contagem de ovos fecais (COF)

Os métodos coprológicos clássicos permitem a detecção rápida das formas parasitárias. No entanto, esta detecção pode ser insuficiente e podem ser necessários mais dados para permitir o diagnóstico definitivo, como a quantificação das formas parasitárias. Por tal, a contagem de ovos fecais (COF) desempenha um papel crucial na monitorização das cargas parasitárias, determina a extensão da pastagem contaminada, sendo uma ferramenta essencial para identificar situações de resistência aos anti-helmínticos (Vasconcelos-Nóbrega et al., 2017). A técnica é fácil, de baixo custo e a aplicação deste método permite estimar a intensidade da infeção, o grau de contaminação ambiental, avaliar a eficácia dos anti-helmínticos, determinar o valor genético do animal de acordo com a seleção de vermes resistentes e orientar as decisões de tratamento ou controlo parasitário. Assim sendo, a COF é o método mais comum para o diagnóstico de parasitoses gastrointestinais (Roeber et al., 2013a; Vasconcelos-Nóbrega et al., 2017).

No entanto, existem algumas limitações importantes. A produção de ovos não está perfeitamente correlacionada com a carga real de vermes nos animais e as diferentes espécies de nematodes têm prolificidades diferentes, portanto, sem o conhecimento prévio da população de vermes nas explorações, a interpretação dos resultados poderá ser difícil. Outra limitação é que não há uma distribuição uniforme de ovos nas amostras fecais e a COF é apenas uma indicação do número de adultos que excretam ovos nas fezes, ou seja, não reflete exatamente o número de larvas infetantes ingeridas no período de pré-patente (Abbott et al., 2012).

De modo a obter a COF, podemos recorrer a diversos métodos, entre os quais o método de McMaster, o FECPAK^{G2}, o FLOTAC e o mini-FLOTAC (Bosco et al., 2014; Godber et al., 2015).

3.6.1. Método de McMaster

O método de McMaster é um método quantitativo, que permite obter a COF através do número de ovos por grama de fezes (opg) utilizando uma câmara de McMaster, que possui uma grelha ou retículo que facilita a contagem pelo operador (Taylor et al., 2016). A Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária (“World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology” - WAAVP) recomenda o uso do método de McMaster nos testes *in vivo* para a detecção de resistência aos anti-helmínticos (Coles et al., 1992, 2006).

Este método foi desenvolvido no Laboratório McMaster na Universidade de Sydney e publicado, pela primeira vez em 1939 no *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research* por H.M. Gordon e H.V. Whitlock (Gordon & Whitlock, 1939). Nesta publicação, a primeira técnica utilizava uma lâmina de vidro para a observação das formas parasitárias, contudo, os autores apontavam como principais desvantagens o tempo de preparação das amostras e a presença de detritos fecais que obscureciam as formas parasitárias, o que dificultava a observação microscópica. Desta forma, Gordon & Whitlock (1939) introduziram, para ultrapassar estas problemáticas, uma “lâmina especial”, que foi o primeiro esboço da câmara de McMaster (Figura 6).

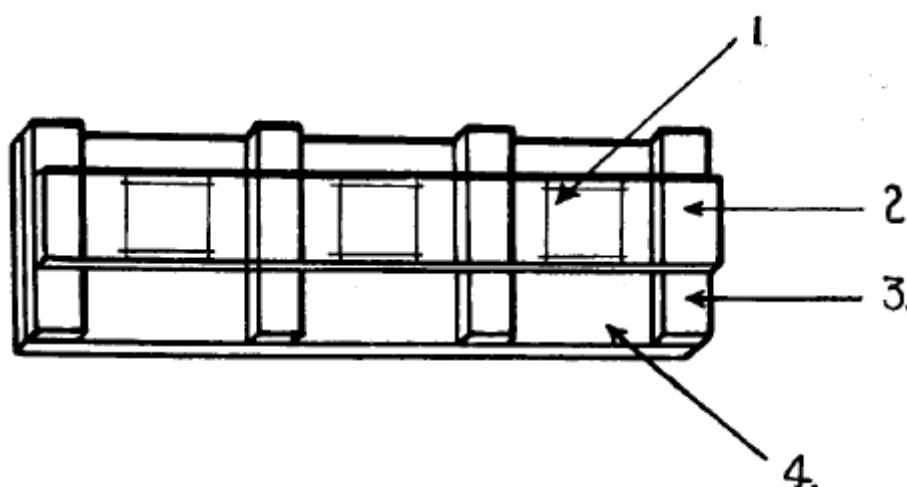


Figura 6 - Esboço da câmara de McMaster. 1) Área gradeada de 1 cm²; 2) Tampa deslizante; 3) Tira de suporte; 4) Lâmina de vidro. Adaptado de Gordon & Whitlock (1939).

Desde a primeira descrição em 1939, ocorreram muitas variações do método de McMaster, como o uso de diferentes soluções de flutuação, tempos de flotação, diluições de amostras, centrifugações adicionais para clarificação de suspensões (com diferentes tempos e velocidades de centrifugação), números de câmaras contadas na câmara de McMaster para fins de cálculo e diferentes coeficientes de interpretação (Vasconcelos-Nóbrega et al., 2017).

Este método é útil para o diagnóstico, embora seja necessário realizar culturas fecais para identificação das L3, principalmente porque os gêneros de nematodes estrongilídeos produzem ovos muito semelhantes, que não podem ser facilmente distinguidos nas contagens fecais (Zajac, 2006; Taylor et al., 2016).

3.6.2. FECPAK^{G2}

O sistema FECPAK^{G2} é um teste comercial (Figura 7), que se baseia numa abordagem modificada do método de McMaster (Bosco et al., 2014; Godber et al., 2015). Este foi desenvolvido na Nova Zelândia para fornecer um método simples de COF nas explorações, o que permite tomar decisões sobre o tratamento dos animais ou a avaliação da eficácia antiparasitária (Bosco et al., 2014).

O sistema FECPAK^{G2} tem como limite mínimo de deteção 30 opg (Godber et al., 2015). As amostras fecais são de maior volume (em média, utilizam 20g em vez dos 3g recomendados para o método de McMaster) (Bosco et al., 2014) às quais se adiciona uma solução de flutuação, sendo posteriormente colocadas numa lâmina com duas câmaras gradeadas. Tal como na câmara de McMaster, os ovos flutuam para a superfície e aqueles que se encontrem dentro da área gradeada são contados com auxílio de um microscópio (Godber et al., 2015). Este teste apresenta resultados muito confiáveis em fezes de equino, principalmente em COF mais baixas, mas também poderá ser aplicado em explorações de pequenos ruminantes desde que haja operadores especializados para a identificação de ovos nas fezes (Coles et al., 2006; Bosco et al., 2014).



Figura 7 - Teste comercial FECPAK^{G2}. De <https://www.techion.com/FECPAKG2>, acedido a 20/02/2021.

3.6.3. FLOTAC e mini-FLOTAC

As técnicas o FLOTAC e o mini-FLOTAC são metodologias alternativas mais recentes para determinar COF que têm maior sensibilidade analítica. Esta elevada sensibilidade permite resultados mais precisos, com intervalos de confiança menores e maior capacidade de detetar valores mais baixos da redução da eficácia anti-helmíntica (Kenyon et al., 2016).

O FLOTAC é uma técnica de COF baseada na flutuação centrífuga da amostra e na translação da camada superior da suspensão, onde todos os procedimentos são realizados num único aparelho, o que torna a realização da técnica muito mais fácil (Figura 8) (Bosco et al., 2014; Godber et al., 2015). Devido à sua elevada precisão e sensibilidade (1 opg), permite detetar com mais rigor o número de ovos, larvas e/ou oocistos nas amostras fecais (Cringoli et al., 2017). Assim, o FLOTAC poder utilizado para monitorizar a eficácia dos anti-helmínticos (Bosco et al., 2014).

Esta técnica tem como principal desvantagem uma elevada logística laboratorial, com a utilização de materiais especializados, tempo de processamento demorado e mão-de-obra qualificada (Cringoli et al., 2010).

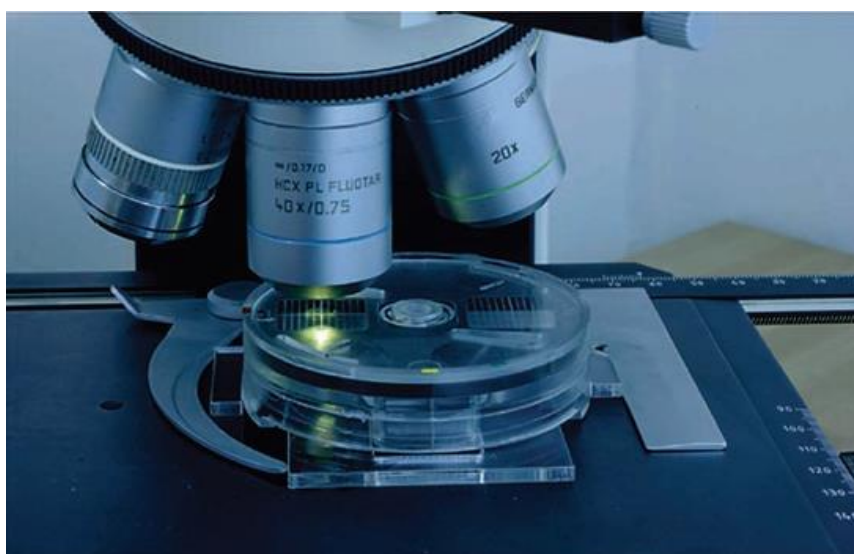


Figura 8 - Observação do sistema FLOTAC ao microscópio. Adaptado de Cringoli et al. (2010).

O mini-FLOTAC é uma evolução da técnica FLOTAC. É fácil e rápida de executar, produz resultados altamente reprodutíveis e é particularmente útil para monitorização e diagnóstico de parasitoses (Cringoli et al., 2017). O aparelho mini-FLOTAC (Figura 9) é um dispositivo em forma de disco, de termoplástico amorfo de policarbonato. Este material foi

escolhido devido à sua excelente transmissão de luz, alta resistência ao calor, robustez, alta estabilidade dimensional e boas propriedades de isolamento elétrico. Este é composto por dois componentes físicos (ou seja, a base e o disco de leitura) e dois acessórios. Tem também duas câmaras de flutuação de 1 ml (Cringoli et al., 2013).

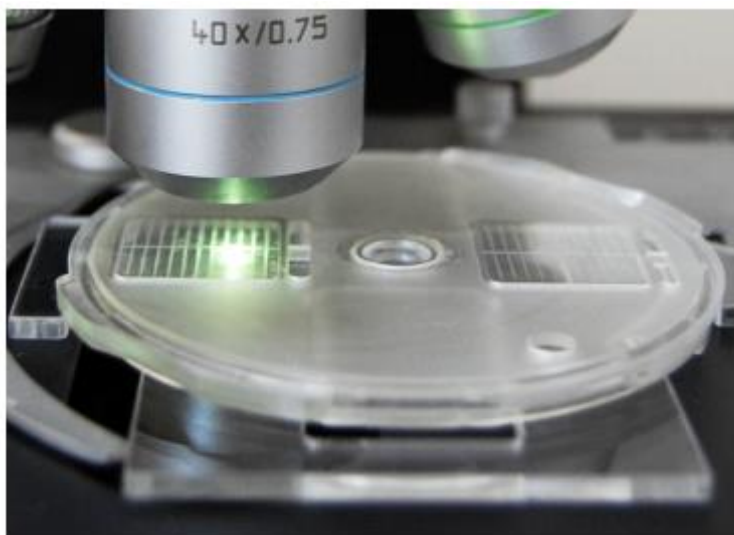


Figura 9 - Observação do aparelho do mini-FLOTAC ao microscópio. Adaptado de Cringoli et al. (2017).

O teste comercial inclui também o Fill-FLOTAC para preparação da amostra de fezes, que é composto por um recipiente, um coletor e um filtro (Figura 10) (Cringoli et al., 2013).

O mini-FLOTAC e o FLOTAC diferem na sua sensibilidade analítica. A sensibilidade do FLOTAC é de 1 opg, enquanto a sensibilidade do mini-FLOTAC é 5 opg (Cringoli et al., 2017).

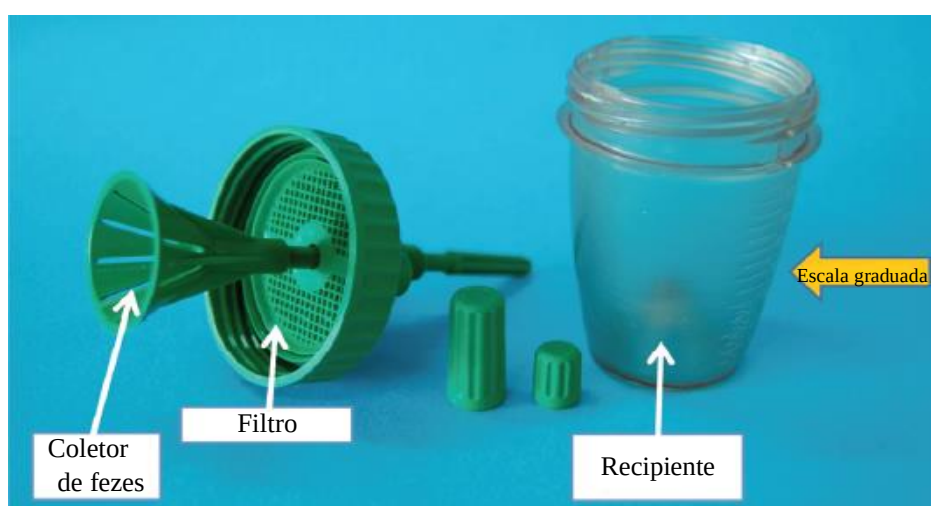


Figura 10 - Fill-FLOTAC e os principais componentes. Adaptado de Cringoli et al. (2013).

3.7. Identificação morfológica das larvas de estágio 3 (L3)

As distintas virulências dos diferentes géneros de parasitas tornam essencial a identificação larvar dos mesmos, de modo a detetar quais os responsáveis pelos casos de morbilidade nos pequenos ruminantes. O método laboratorial mais prático disponível é a identificação das larvas presentes nas fezes frescas, principalmente as larvas de vermes pulmonares, ou presentes nas culturas fecais (coprocultura), como no caso dos helmintes gastrointestinais (van Wyk & Mayhew, 2013).

Em muitos géneros de helmintes gastrointestinais, as L3 apresentam características distintivas, como o formato da extremidade anterior da larva ou o comprimento da bainha da cauda (Figura 11). Embora as L1 ou as L3 possam ser medidas, não é prático mensurar cada larva ao fazer contagens diagnósticas diferenciais de rotina (van Wyk et al., 2004).

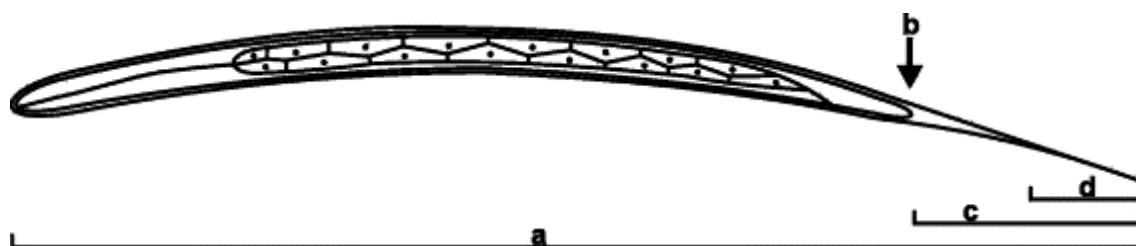


Figura 11 - Diagrama de uma larva de estágio 3 (L3) infetante. a) comprimento total da larva; b) ponta da cauda; c) comprimento da bainha da cauda; d) filamento. Adaptado de van Wyk & Mayhew (2013).

Apesar da identificação morfológica das L3, na maioria dos helmintes, ser baseada principalmente no exame das extremidades caudal e cranial, outras características, como o comprimento ou formato do esófago ou manchas cranianas refratárias, são importantes para a distinção de alguns géneros, como é possível verificar na Figura 12 (van Wyk & Mayhew, 2013).

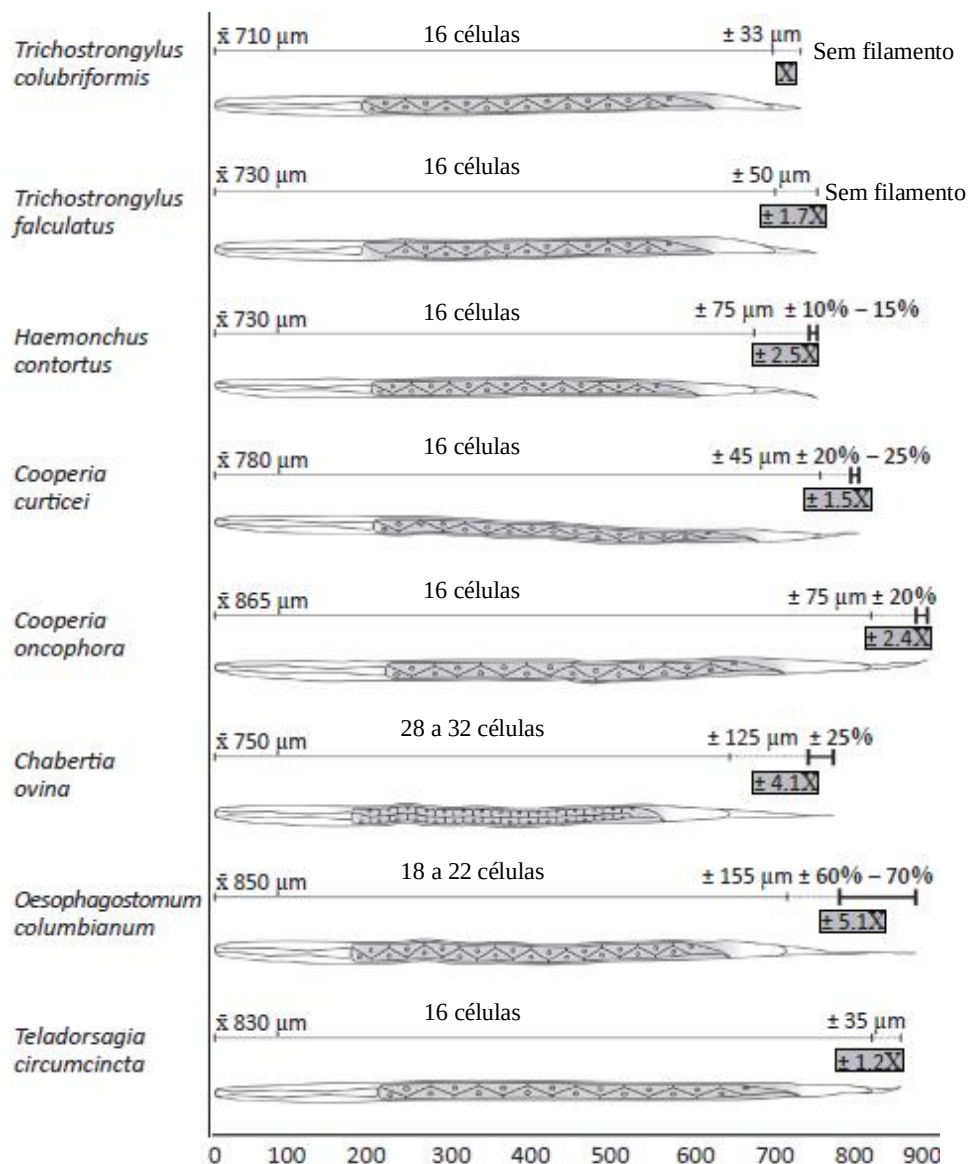


Figura 12 - L3 mais comuns dos pequenos ruminantes, medidas em micrómetros (µm). Adaptado de van Wyk & Mayhew (2013).

3.7.1. Características diferenciadoras entre L3 de nematodes gastrointestinais

A identificação entre L3 de nematodes gastrointestinais baseia-se no aspeto morfológico das mesmas após processamento através de características específicas e diferenciadoras que permitem a comparação e identificação de larvas de vários géneros.

Assim, pela sugestão de identificação dada por Bosco (2019) com a identificação das L3 por van Wyk et al. (2004) e van Wyk & Mayhew (2013), e de maneira a facilitar a identificação, as L3 foram subdivididas de acordo com o comprimento da extremidade caudal (a extensão da bainha da cauda) em: cauda curta, cauda média e cauda comprida (Tabela 1).

Tabela 1 - Comprimento da extremidade caudal das L3 (extensão da bainha da cauda), em μm . Adaptado de van Wyk & Mayhew (2013).

Comprimento da extremidade caudal (μm)			
Nematode	Comprimento médio	Pode variar entre	
<i>Trichostrongylus</i> spp.	30	18-32	Cauda curta
<i>Teladorsagia circumcincta</i>	35	30-44	
<i>Haemonchus contortus</i>	74	65-82	Cauda média
<i>Cooperia</i> spp.	46	39-52	
<i>Oesophagostomum</i> spp.	153	125-188	Cauda comprida
<i>Chabertia ovina</i>	123	101-150	

a) Cauda curta

***Trichostrongylus* spp. vs *Teladorsagia* spp.**

Nos pequenos ruminantes, a cauda da bainha do género *Teladorsagia* é apenas ligeiramente mais longa do que a de *Trichostrongylus*, o que não permite a correta distinção entre os géneros. Por outro lado, a extremidade anterior do género *Teladorsagia* possui uma “depressão” próxima à extremidade cranial (Figura 13), o que lhe confere uma aparência quadrada. Em contraste, as linhas imaginárias cranianas do ponto de inflexão da extremidade anterior do género *Trichostrongylus* são diretamente convergentes e não apresentam nenhuma “depressão” que alteram o curso como no género *Teladorsagia* (van Wyk et al., 2004).

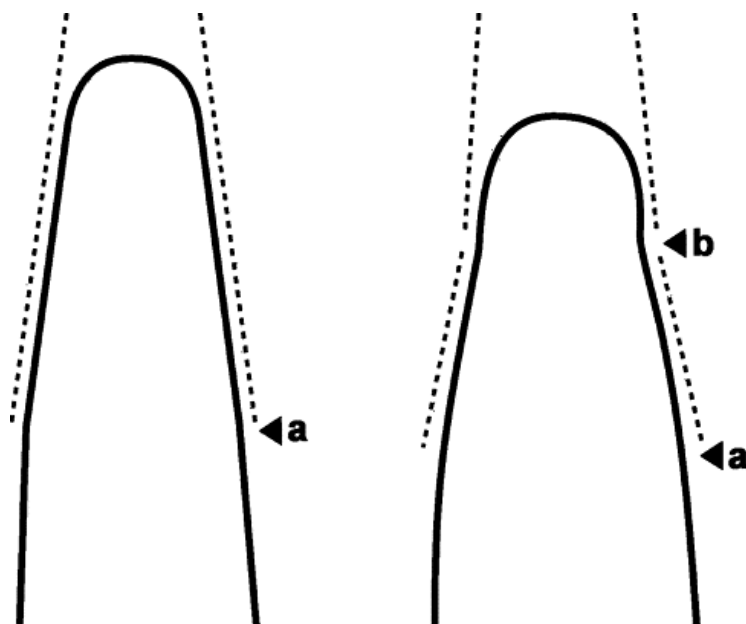


Figura 13 - Diferenças entre as extremidades anteriores dos géneros *Trichostrongylus* (à esquerda) e *Teladorsagia* (à direita). a) ponto inicial de inflexão; b) "depressão" da extremidade cranial de *Teladorsagia*. Adaptado de van Wyk et al. (2004).

b) Cauda média

***Haemonchus contortus* vs *Cooperia* spp.**

De modo a diferenciar *Haemonchus contortus* do género *Cooperia* é necessário observar o formato das extremidades craniais ou anteriores e a presença de corpos refráteis. No género *Cooperia* existem dois corpos refráteis na extremidade cranial da larva (Figura 14), que não existem em *Haemonchus contortus*. Além disso, a extremidade anterior de *Haemonchus contortus* é mais arredondada do que a do género *Cooperia*, que é mais quadrada (van Wyk & Mayhew, 2013).

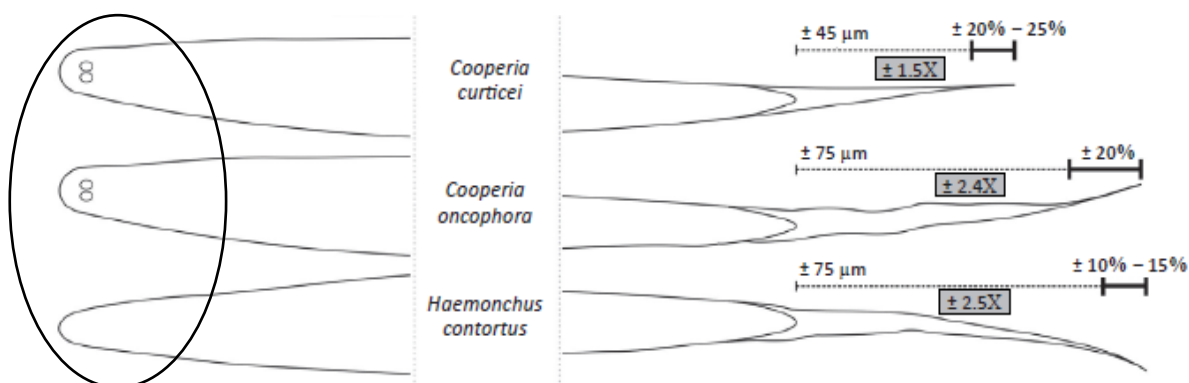


Figura 14 - Diferenças entre as extremidades anteriores das L3 de *Cooperia* spp. e *Haemonchus contortus*. Adaptado de van Wyk & Mayhew (2013).

Estes dois géneros são normalmente distinguíveis pelo número de células intestinais que possuem (Figura 15). Assim, o género *Chabertia* tem entre 28 a 32 células intestinais, enquanto em *Oesophagostomum* apenas se observam entre 18 a 22 células intestinais (Van Wyk & Mayhew, 2013).

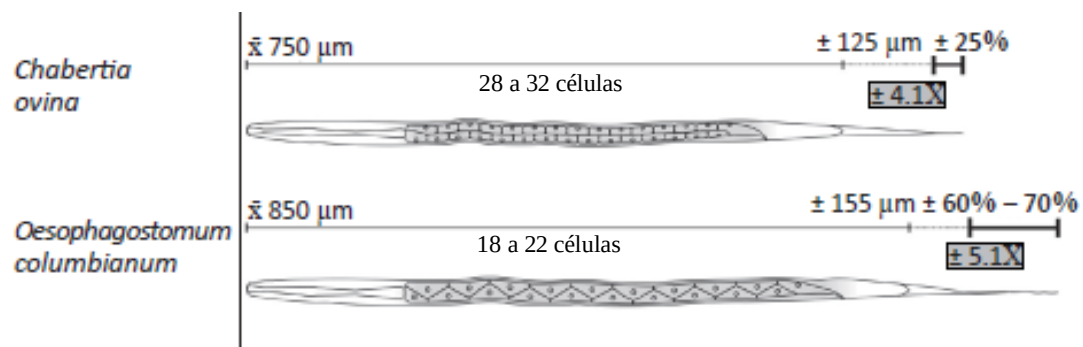


Figura 15 - Diferenças entre as células intestinais das L3 de *Chabertia ovina* e *Oesophagostomum* spp. Adaptado de van Wyk & Mayhew (2013).

4. Tratamento

Para a maioria dos produtores de pequenos ruminantes, o controlo parasitário continua a incluir tratamentos com antiparasitários, mas deve-se enfatizar a importância de métodos alternativos de controlo de parasitas que podem ser usados em combinação com os mesmos (Zajac, 2006).

O tratamento convencional de nematodes gastrointestinais baseia-se no uso de anti-helmínticos, no qual a escolha do mesmo e do momento da utilização depende do equilíbrio entre a necessidade de tratamento, o custo económico e o possível desenvolvimento de resistência (Besier et al., 2016a).

Para o tratamento dos nematodes gastrointestinais de pequenos ruminantes podem ser usados anti-helmínticos de largo espectro como os benzimidazóis, probenzimidazóis, imidazotiazóis, como o levamisol, ou lactonas macrocíclicas, como as ivermectinas e as moxidectinas (Besier et al., 2016a; Taylor et al., 2016), que eliminam os parasitas em diferentes estádios de desenvolvimento (adultos e estádios larvares); ou anti-helmínticos de estreito espectro que possuem atividade contra menos espécies de parasitas. Exemplos desses incluem naftalofos, salicilanilidas e fenóis substituídos (closantel, oxiclozanida e nitroxinil) e triclabendazol (Tariq, 2015).

Em conjunto com o tratamento farmacológico, devem também ser instauradas medidas de controlo, como evitar a introdução de animais em pastagens recentemente pastadas por outros pequenos ruminantes, pois podem ter introduzido (de novo) parasitas na pastagem, iniciando um novo ciclo de infeção; a pastagem deve ter bom valor nutricional ou os animais devem ser suplementados, de maneira a aumentar a resistência dos hospedeiros aos parasitas (Besier et al., 2016a).

Neste momento há uma grande preocupação entre os produtores pecuários com os resíduos dos fármacos nos produtos de origem animal, o aumento da prevalência de estirpes de nematodes resistentes aos anti-helmínticos e o elevado custo dos anti-helmínticos convencionais. Todos esses fatores estimularam a busca pelo desenvolvimento de alternativas sustentáveis, eficazes e seguras (Tariq, 2015).

5. Resistência a anti-helmínticos

A resistência a anti-helmínticos é um problema mundial nas explorações de pequenos ruminantes nas últimas três décadas (Domke et al., 2012). Como tal, define-se a resistência a anti-helmínticos como a capacidade hereditária do parasita de tolerar uma dose geralmente eficaz do mesmo. O parasita é considerado resistente se sobreviver à exposição com uma dose máxima padrão recomendada do anti-helmíntico e se conseguir transmitir essa capacidade aos seus descendentes (Shalaby, 2013).

A prevalência da resistência a anti-helmínticos difere consideravelmente de acordo com as diferentes regiões da Europa. Os nematodes gastrointestinais do género *Teladorsagia*, *Haemonchus* e *Trichostrongylus* são os que estão mais associadas a resistência a anti-helmínticos (Papadopoulos et al., 2012).

A diminuição na suscetibilidade ao anti-helmíntico é provocada pelo aumento nas frequências de alelos do gene que causam resistência, que resultam da seleção pelo uso repetido de um antiparasitário. Os helmintes gastrointestinais dos pequenos ruminantes possuem uma série de características genéticas que favorecem o desenvolvimento de resistência antiparasitária. Entre as mais importantes estão: taxas rápidas da evolução da sequência de nucleótidos e populações extremamente grandes resultantes da elevada fecundidade de cada helminte individual, que contribuem para um nível elevado de diversidade genética; e uma população consistente com níveis elevados de fluxo de genes (disseminação), sugerindo que o movimento do hospedeiro é importante. Assim, estes helmintes têm o potencial genético para responder rapidamente e com sucesso à ação dos anti-helmínticos e os meios para garantir a disseminação de genes resistentes pelo movimento do hospedeiro de exploração em exploração (Fleming et al., 2006).

Segundo Abbott et al. (2012), os genes (ou alelos) que permitem que os parasitas sejam resistentes aos anti-helmínticos existem em populações de vermes não selecionadas. Consequentemente, em todos os anti-helmínticos que estão a ser utilizados até o momento, parece que o desenvolvimento de resistência é uma consequência inevitável do seu uso, mas o seu desenvolvimento poderá ser atrasado. Além disso, o conhecimento do *status* de resistência nos diferentes grupos de anti-helmínticos, as espécies de parasitas envolvidas e em que estágio se encontra o parasita de acordo com a estação do ano, pode influenciar as medidas de controlo eficazes e gerir o desenvolvimento de resistência.

O desenvolvimento de resistência é influenciado por muitos fatores que podem ser classificados como genéticos, biológicos ou de manejo. Os mais importantes são os de manejo, pois dependem das ações do produtor e devem ser tidas em consideração quando se elaboram programas de controlo de parasitas. Contudo, é necessário compreender os fatores genéticos e biológicos (Jabbar et al., 2006).

O aquecimento global, que em regiões temperadas favorece o desenvolvimento parasitário, aumenta a contaminação das pastagens com estádios infetantes. No entanto, os efeitos das alterações climáticas sobre os parasitas ainda estão pouco estudados, bem como a correlação com as alterações no uso da pastagem (uso excessivo), o aparecimento da resistência a anti-helmínticos e práticas de gestão agrícola sustentável. Assim, vários autores tentaram estabelecer uma correlação entre as alterações ambientais, especialmente climáticas, e os diferentes estádios de desenvolvimento parasitário fora dos hospedeiros em modelos matemáticos preditivos, especialmente no que diz respeito à seleção da resistência antiparasitária, para tentar prever padrões de infeções futuras. Contudo, a abundância e distribuição dos helmintes gastrointestinais em pequenos ruminantes é uma questão complexa e dinâmica que é afetada por um vasto leque de parâmetros, incluindo aqueles que podem ser classificados como mudanças globais (Figura 16). Os fatores regionais, sazonais e específicos do hospedeiro podem também influenciar a epidemiologia das parasitoses. As mudanças globais são muito mais que as alterações climáticas e que por si só devem ser reconhecidas e incorporadas de forma mais completa em abordagens futuras de pesquisa de helmintes gastrointestinais (Morgan et al., 2013).

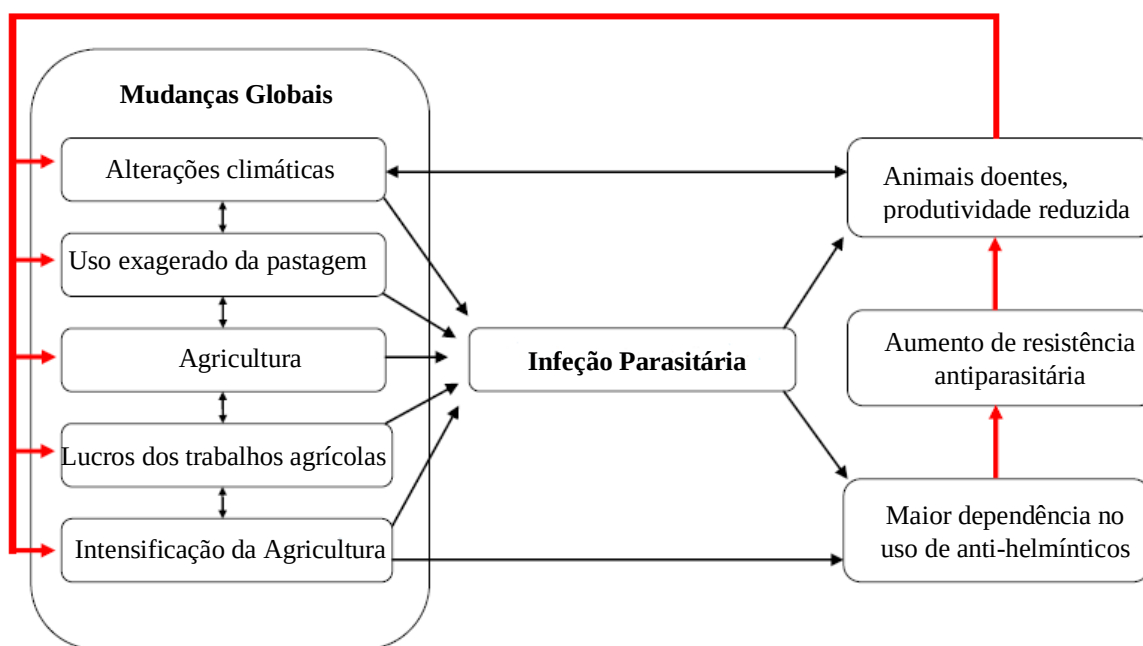


Figura 16 - Esquema ilustrador das mudanças globais que influenciam a contaminação das pastagens com helmintes gastrointestinais. As setas a preto representam o reforço positivo e as setas a vermelho mostram as potenciais associações decorrentes das mudanças globais. Adaptado de Morgan et al. (2013).

Um dos fatores mais importantes no desenvolvimento da resistência a um anti-helmíntico é a contribuição dos parasitas, que sobrevivem ao tratamento, na próxima geração. Isso, por sua vez, depende do número de parasitas *in refugia*, ou seja, da proporção da população de parasitas que não são expostos ao antiparasitário (Coles, 2002), incluindo a população de vermes de vida livre que se encontram no pasto (van Wyk, 2001). Além disso, fatores como a subdosagem (uso de uma dose inferior à recomendada pelo fabricante) e o uso frequente do mesmo grupo de antiparasitários são considerados responsáveis pelo aumento da seleção da resistência, que faz com que algumas estirpes se tornem praticamente incontroláveis (van Wyk, 2001). As possíveis razões para a subdosagem apresentam-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Possíveis razões para a subdosagem de anti-helmínticos gastrointestinais. Adaptado de Bartley (2008).

Negligência	Intencional
Incorreta estimativa do peso do animal	Dose pelo peso médio dos animais
Equipamento defeituoso	Doses inferiores às recomendadas para diminuir custos económicos
Doses diferentes para ovinos e caprinos	
Dose insuficiente para eliminar todos os parasitas existentes no hospedeiro	

Muitas vezes em países em desenvolvimento, para reduzir os custos do tratamento antiparasitário, preconiza-se o uso de dosagens inferiores à dose terapêutica recomendada e do mesmo princípio ativo para todos os parasitas do animal, parasitas esses que não vão responder de maneira igual ao princípio ativo. Outro fator que pode influenciar a resistência a anti-helmínticos são os tratamentos profiláticos em massa sem determinação prévia da presença de parasitoses, que têm contribuído para o desenvolvimento de resistência em helmintes gastrointestinais (Jabbar et al., 2006).

O tamanho da população *in refugia* vai influenciar a taxa de aparecimento de resistência numa população de vermes. Apenas as subpopulações parasitárias (os parasitas no interior dos hospedeiros) podem ser expostas a qualquer tratamento antiparasitário. Os parasitas que estão na subpopulação de vida livre (ovos, L1, L2, L3) não são expostos ao antiparasitário e dizem-se *in refugia*. Quaisquer vermes em ovinos e caprinos que não são tratados também contribuem para a subpopulação *in refugia*. Um dos fatores importantes que influenciam a taxa na qual a resistência se desenvolve em uma população parasitária é o tamanho relativo da população exposta e a população não exposta ou *in refugia*. Em geral, quanto maior a população *in refugia* em comparação com a população exposta, mais lentamente a resistência se desenvolverá. Isso é relevante em espécies parasitárias muito prolíferas, onde alguns indivíduos sobreviventes podem povoar a próxima geração rapidamente, especialmente quando a população *in refugia* é pequena, como na primavera (Abbott et al., 2012).

Como ilustrado na Figura 17, os parasitas gastrointestinais de ovinos tratados com antiparasitário são expostos ao mesmo. Os vermes na pastagem ou os adultos dos ovinos não tratados estão *in refugia*. A população *in refugia* é tipicamente 100 a 10.000 vezes maior do que a população exposta e os tamanhos relativos dessas duas populações influenciam a rapidez com que a resistência ao antiparasitário se desenvolve (Abbott et al., 2012).

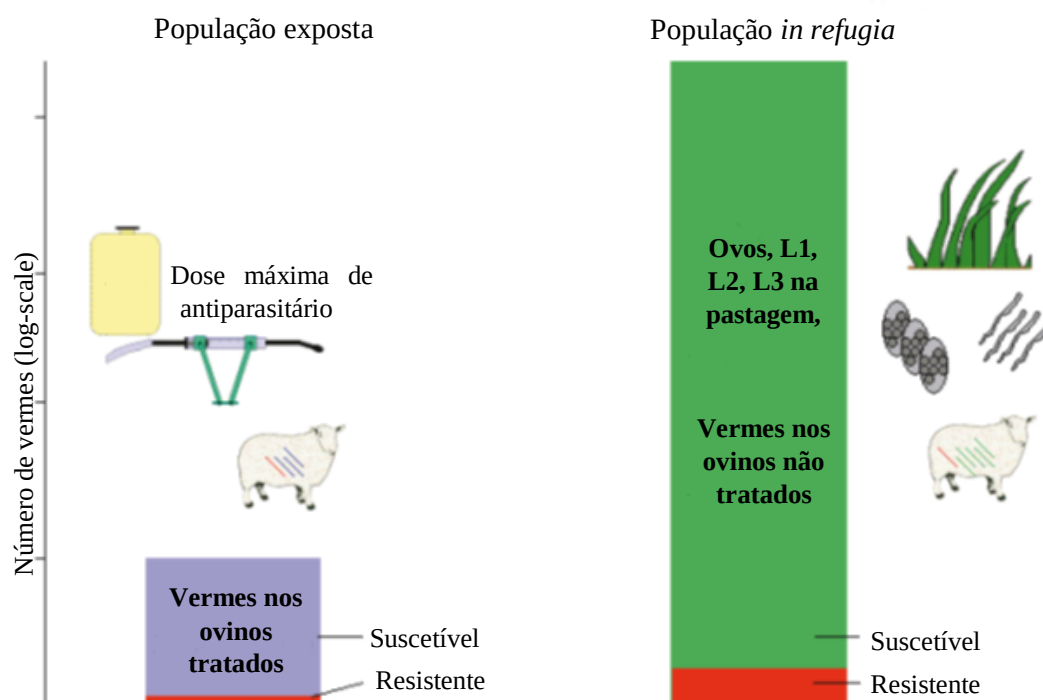


Figura 17 - População de vermes gastrointestinais expostos e *in refugia*. Adaptado de <https://www.scops.org.uk/workspace/pdfs/scops-technical-manual-4th-edition-updated-september-2013.pdf>, acessado a 25/11/2020.

O princípio básico de seleção para resistência aos anti-helmínticos é que o tratamento dá aos vermes resistentes uma vantagem reprodutiva sobre os vermes suscetíveis, por 2-3 semanas após a dosagem. Isso ocorre, pois, até que as L3 ingeridas após a dosagem se desenvolvam em adultos que depositam ovos, os únicos ovos que passam nas fezes dos pequenos ruminantes expostos ao antiparasitário são os vermes que sobreviveram ao tratamento. À medida que o intervalo entre as doses se torna cada vez mais curto, aproximando-se do período pré-patente do parasita, os vermes suscetíveis têm cada vez menos capacidade de produzir ovos e a maioria, ou todas, as contaminações das pastagens ocorrem com ovos de parasitas resistentes ao antiparasitário. Se essa estratégia for mantida, a população suscetível é progressivamente substituída por uma resistente (Abbott et al., 2012).

Geralmente há uma percepção geral de que a seleção da resistência antiparasitária é mais grave nos caprinos do que nos ovinos, dado que os caprinos requerem uma dose 1,5 a 2 vezes superior de antiparasitário em oposição aos ovinos (Papadopoulos, 2008). Isso pode ser considerado como um ponto de suporte para considerar a subdosagem um fator importante para o aumento das resistências. O raciocínio por trás dessa suposição é que, embora os caprinos exijam maiores doses do que os ovinos para perfis de nível sanguíneo semelhantes, os anti-

helmínticos são administrados na mesma dose em ambas as espécies (van Wyk, 2001). Assim, a resistência ao anti-helmíntico ocorre mais frequentemente em caprinos do que em ovinos (Papadopoulos, 2008). Dado que os ovinos e caprinos podem compartilhar as mesmas espécies de parasitas, uma pastagem mista com estes animais pode ser um potencial fator de risco para o aparecimento e propagação de resistências (Domke et al., 2012).

5.1. Diagnóstico de resistência

A elevada importância do tema da resistência anti-helmínticos levou ao desenvolvimento de uma vasta gama de testes confiáveis e padronizados para pesquisa e diagnóstico da mesma (Coles et al., 1992). Porém, a maioria deles apresenta desvantagens como o custo, reprodutibilidade, aplicabilidade e interpretação dos resultados (Papadopoulos, 2008). Existem testes *in vivo*, que podem ser utilizados em todos os tipos de anti-helmínticos e outros que podem ser realizados *in vitro* e medir o efeito dos anti-helmínticos no desenvolvimento das diversas fases do ciclo dos nematodes (Jabbar et al., 2006).

De acordo com Jabbar et al. (2006), o tratamento farmacológico vai continuar a ser a base dos programas de controlo de helmintes gastrointestinais no futuro. É, por isso, essencial que a eficácia dos anti-helmínticos de amplo espectro atualmente disponíveis seja mantida e que sejam desenvolvidos métodos apropriados e confiáveis de monitorização da eficácia dos mesmos.

5.1.1. Testes *in vivo*

5.1.1.1. Teste de redução da contagem de ovos fecais (TRCOF)

O teste mais usado para detetar e monitorizar a presença de resistências aos anti-helmínticos é o TRCOF, que compara a contagem de ovos antes e depois do tratamento com um antiparasitário (Coles et al., 1992), ou seja, os ovos dos helmintes gastrointestinais são contados nas amostras fecais no momento do tratamento e depois disso, num momento definido, dependendo do antiparasitário em estudo (Papadopoulos, 2008). Este teste é barato, fácil de executar e não requer equipamento muito especializado, tornando-o adequado para uso no diagnóstico geral (Roeber et al., 2013b).

No estudo pode ser incluído um grupo de animais não tratados (grupo controlo) para monitorizar quaisquer alterações naturais na contagem dos ovos, que ocorram durante o período de teste (Jabbar et al., 2006).

Idealmente devem ser escolhidos grupos de 10 animais com valores de COF superiores a 150 opg (Papadopoulos, 2008). Os grupos de animais são distribuídos aleatoriamente, em que a um é dado o tratamento antiparasitário e a outro não se aplica nenhum tratamento, pertencendo assim ao grupo controlo. A utilização de um grupo de animais não tratados pode não ser muito prático na maioria das explorações de pequenos ruminantes (Coles et al., 2006), porque é cara, trabalhosa e frequentemente indesejada pelos produtores de pequenos ruminantes. A inclusão de um grupo de animais não tratados não afeta a avaliação da eficácia antiparasitária através do TRCOF (Peña-Espinoza et al., 2014).

A cada um dos animais tratados deve ser administrado um anti-helmíntico de acordo com o seu peso corporal, garantindo que cada animal receba a dose adequada (Coles et al., 2006).

Para a contagem dos ovos nas fezes, é útil a utilização de um método padrão para a contagem, já que existem vários métodos e diversas variações da técnica original de McMaster (Coles et al., 2006). Coles et al. (1992), descrevem o método de McMaster modificado com uma sensibilidade analítica de 50 opg, que pode ser utilizado para a contagem dos ovos neste teste.

De um modo geral, as amostras fecais devem ser recolhidas 10 a 14 dias após o tratamento, mas este período depende do anti-helmíntico utilizado. Assim, caso os animais sejam tratados com imidazotiazóis, deve-se recolher amostras fecais 3 a 7 dias depois do tratamento; se forem tratados com benzimidazóis, as amostras fecais devem ser recolhidas 8 a 10 dias após tratamento ou se forem tratados com lactonas macrocíclicas, as amostras fecais devem ser recolhidas 14 a 17 dias após tratamento (Coles et al., 2006). Idealmente, nenhum ovo de nematode deve ser encontrado nas amostras fecais após esse período (Coles et al., 1992). No entanto, este teste pode apresentar falsos negativos ou falsos positivos que pode estar relacionado com a variedade dos diferentes estádios de desenvolvimento dos parasitas (Jabbar et al., 2006). Portanto, uma das limitações deste teste é que os resultados podem não estimar com rigor a eficácia do anti-helmíntico, pois nem sempre a produção de ovos de nematodes se correlaciona corretamente com o número real de vermes adultos presentes no trato gastrointestinal, e o teste vai medir apenas os efeitos na produção de ovos por esses mesmos vermes adultos (Jabbar et al., 2006).

O recurso às culturas de larvas em amostras pré e pós-tratamento permite determinar as espécies de parasitas envolvidas, a fim de identificar a resistência dentro de uma espécie restrita (Papadopoulos, 2008), embora as condições de cultura possam favorecer o desenvolvimento de uma espécie em detrimento de outra ou espécies com elevado potencial biótico que podem

influenciar os resultados (Jabbar et al., 2006). Se uma pequena proporção de vermes sobreviver ao tratamento, isso pode indicar a presença de resistência e, portanto, deve ser monitorizado. Se a redução da contagem de ovos fecais for superior a 95%, o anti-helmíntico deve ser considerado eficaz e o seu uso pode ser continuado (Papadopoulos, 2008).

De acordo com Coles et al. (1992, 2006) e El-Abdellati et al. (2010), está recomendado usar para o cálculo do TRCOF apenas animais com COF pré-tratamento acima de 150 opg.

Para a análise dos resultados, calcula-se a média aritmética, a redução percentual e o intervalo de confiança de 95%. Normalmente, a média aritmética é preferível à média geométrica, porque é mais fácil de calcular, fornece uma estimativa melhor da produção de ovos de parasitas e é uma medida da eficácia dos anti-helmínticos (Coles et al., 1992). A média geométrica normalmente subestima a produção total de ovos e a transformação dos dados irá variar entre os laboratórios, o que vai dificultar as comparações de dados (Jabbar et al., 2006).

A fórmula mais utilizada para calcular a percentagem de redução é a seguinte:

$$TRCOF = 100 \times \left(1 - \frac{\text{Média aritmética pós-tratamento (opg)}}{\text{Média aritmética pré-tratamento (opg)}}\right) \text{ (Coles et al., 1992, 2006;}$$

Dobson et al., 2012).

Existem também diferentes variações desta fórmula de acordo com a utilização ou não de grupos de controlo (grupos de animais não tratados), mas a mais utilizada é a fórmula apresentada anteriormente na qual não se utilizam esses grupos (Dobson et al., 2012).

Normalmente considera-se que existe resistência se a redução percentual na contagem de ovos for inferior a 95% e o limite inferior do intervalo de confiança de 95% for inferior a 90%. Se estivermos perante um dos dois critérios, há suspeita de resistência (Coles et al., 1992).

No entanto, ainda existem algumas limitações óbvias que podem afetar a utilização do TRCOF. A principal limitação é o tempo e o custo para realizar COF num número representativo de animais. Uma alternativa para reduzir a carga de trabalho é examinar a COF de amostras fecais agrupadas, nas quais são misturadas quantidades iguais das amostras de fezes dos animais do grupo tratado (subgrupos de 5, 10 ou 20 animais). Esta metodologia permite avaliar a COF dos rebanhos, de modo a avaliar a quantidade de helmintes gastrointestinais em pequenos ruminantes, bem como eficácia anti-helmíntica através do TRCOF (Rinaldi, Levecke, et al., 2014).

5.1.2. Testes *in vitro*

5.1.2.1. Teste de eclosão dos ovos (TEO)

O teste de eclosão dos ovos (TEO) é utilizado para identificação de resistência parasitária a benzimidazóis (Coles et al., 1992), pois baseia-se na atividade ovicida deste grupo de fármacos (Jabbar et al., 2006).

A WAAVP define um protocolo padronizado para obtenção de resultados significativos para este teste. Assim sendo, para o teste de eclosão dos ovos, os ovos presentes nas amostras fecais devem ser processados dentro de um período máximo de 3 horas após a recolha, pois a sensibilidade ao tiabendazol diminui com os processos embrionários, logo o teste produziria um resultado falso negativo (Coles et al., 1992, 2006). Caso não seja possível, as amostras devem ser armazenadas anaerobianamente (Jabbar et al., 2006).

É possível estabelecer o estudo de diferentes doses discriminantes de anti-helmíntico que vão atuar nas diferentes espécies, de modo a impedir a eclosão dos ovos. A percentagem de ovos eclodidos, na dose utilizada para a eliminação dos mesmos, corresponde à percentagem de ovos resistentes aos benzimidazóis na amostra fecal (Papadopoulos, 2008).

A principal vantagem deste teste *in vitro* é que exige apenas uma amostra fecal (Papadopoulos, 2008).

Alguns autores descrevem fracas correlações entre os resultados do TRCOF e do TEO para helmintes gastrointestinais de pequenos ruminantes (Jabbar et al., 2006). Os dois testes, TRCOF e TEO, são amplamente utilizados para detetar resistência antiparasitária, mas apenas quando pelo menos 25% da população de vermes contem genes de resistência. Isto poderá significar que o TRCOF e o TEO são capazes de detetar resistência antiparasitária quando é tarde de mais para intervir, dado que a reversão da suscetibilidade é facilmente possível quando apenas 5% da população contem genes de resistência (Jabbar et al., 2006). Estudos de campo e experimentais em helmintes gastrointestinais de pequenos ruminantes indicam que a reversão da suscetibilidade a anti-helmínticos raramente ocorre aquando da confirmação da resistência (Papadopoulos, 2008).

Uma das desvantagens deste teste é a exigência de que os ovos não tenham eclodido aquando da realização do teste. Assim, esta tem sido um grande obstáculo na aplicação do TEO no diagnóstico de rotina. Outra limitação deste teste é que a sensibilidade ao tiabendazol diminui à medida que avançam os processos embrionários, logo as amostras têm de ser

analisadas com a devida celeridade. Apesar dos problemas associados com o TEO, este ainda é amplamente usado para determinar a resistência antiparasitária (Jabbar et al., 2006).

5.1.2.2. Teste de desenvolvimento larvar (TDL)

Diversos testes têm vindo a ser desenvolvidos para identificar resistência utilizando larvas de nematodes. Nestes incluem-se o teste de desenvolvimento larvar em (TDL) micro agar, o teste da motilidade larvar e o teste da paralisia larvar (Papadopoulos, 2008).

O teste de desenvolvimento larvar (TDL) em micro agar é mais trabalhoso e demorado do que o TEO, mas permite a deteção de resistência nos principais grupos de anti-helmínticos de largo espetro, incluindo as lactonas macrocíclicas (Papadopoulos, 2008). Neste teste, os ovos ou larvas L1 são expostas a diferentes concentrações de anti-helmínticos incorporados em poços de agar numa placa de microtitulação ou num tubo de ensaio com um meio de cultura. Posteriormente é avaliado o efeito do antiparasitário no desenvolvimento subsequente em larvas L3 (Jabbar et al., 2006). As larvas L3 podem ser identificadas, a fim de detetar as espécies de helmintes presentes nos poços de controlo e aquelas que sobrevivem à ação do antiparasitário. Aqui, também, podem empregar-se doses discriminatórias de antiparasitário que podem ser usadas para aumentar a sensibilidade do teste (Papadopoulos, 2008).

Os resultados do TDL correlacionam-se com os dos testes *in vivo* (Jabbar et al., 2006). Assim, este teste é considerado mais sensível do que o TRCOF e o TEO pois, aparentemente, deteta resistência antiparasitária quando 10% da população de vermes contem genes de resistência (Papadopoulos, 2008). Ao contrário do TEO, o tempo (idade) dos ovos usados não é importante para a obtenção dos resultados (Coles et al., 2006).

Para além do TDL, também foram desenvolvidos testes com vermes adultos, como o teste de desenvolvimento de vermes adultos e, o teste de inibição da migração de vermes adultos. Contudo, devido à complexidade das técnicas exigidas ou pela exigência do sacrifício dos animais para recolher amostras de adultos, houve pouco progresso na modernização destes testes. Adicionalmente, os ensaios bioquímicos colorimétricos foram desenvolvidos para comparar esterases não específicas e acetilcolinesterases resistentes aos benzimidazóis e a estirpes suscetíveis de tricostrongídeos, mas não foram amplamente utilizados (Papadopoulos, 2008).

5.1.3. Testes moleculares

A reação em cadeia da polimerase (“polimerase chain reaction” – PCR) é capaz de detetar 1% dos indivíduos resistentes numa população de vermes suscetíveis (Papadopoulos, 2008). Os testes moleculares, baseados na análise de polimorfismos de genes-alvo associados a resistência por PCR, costumam ser altamente sensíveis (von Samson-Himmelstjerna et al., 2009).

Neste momento, existem vários protocolos de PCR desenvolvidos, os quais fornecem alta precisão e sensibilidade quando usados para investigar parasitas específicos num animal. No entanto, podemos ter resultados significativos se testarmos um número representativo de animais (por exemplo, 100 animais). Esta abordagem é relativamente dispendiosa e tem sido utilizada essencialmente em estudos epidemiológicos (von Samson-Himmelstjerna, 2006).

O maior desafio no desenvolvimento de testes moleculares adequados é conseguir avaliar o nível de resistência a anti-helmínticos de uma população de parasitas com base numa amostra de ADN agrupada (von Samson-Himmelstjerna, 2006).

O foco dos testes moleculares baseia-se na resistência a benzimidazóis, pois, até ao momento, existe um maior conhecimento neste grupo do que noutras classes de antiparasitários (von Samson-Himmelstjerna, 2006). A resistência a benzimidazóis é causada por polimorfismos de nucleótido único no gene que codifica a β -tubulina (Papadopoulos, 2008). Este conhecimento permitiu o desenvolvimento de métodos de deteção baseados em PCR para polimorfismos associados a esta resistência. Vários desses métodos foram descritos para identificar nematodes gastrointestinais resistentes (von Samson-Himmelstjerna et al., 2009).

6. Controlo integrado e sustentável das parasitoses gastrointestinais nos pequenos ruminantes

No passado, os métodos de controlo de parasitas eram baseados no uso frequente de anti-helmínticos. Embora essa abordagem tenha sido bem-sucedida durante algum tempo, provou-se que a falta de adoção de outras medidas de controlo de helmintes gastrointestinais, assim como a formulação de novos grupos de antiparasitários, levou a um aumento das resistências. Por outro lado, nenhum dos métodos de manejo para controlo parasitário é suficientemente eficaz sem suporte antiparasitário (Papadopoulos, 2008).

De um ponto de vista clínico é importante perceber que a resistência é uma característica genética que só se expressa fenotipicamente quando as frequências alélicas dos genes de resistência atingem níveis elevados. Por exemplo, a resistência a benzimidazóis não pode ser detetada por métodos fenotípicos (TEO ou TRCOF) até que 25% dos nematodes gastrointestinais sejam resistentes. Por isso, a prevenção da resistência deve ter como objetivo a redução da taxa de acumulação dos alelos que provocam resistência e a adoção de estratégias concebidas para retardar o desenvolvimento da mesma, antes que haja qualquer evidência clínica da redução do efeito do anti-helmíntico (Fleming et al., 2006).

A resistência anti-helmíntica está disseminada em muitas áreas de criação de pequenos ruminantes de todo mundo e, portanto, são necessárias estratégias para controlar a resistência existente ou limitar o desenvolvimento dos mesmos (Vercruysse et al., 2018). Na Grã-Bretanha, por exemplo, foi reunido um grupo de especialistas que trabalham para os interesses da indústria de pequenos ruminantes, principalmente de ovinos, que reconhece que a resistência a anti-helmínticos é um dos desafios futuros para a saúde e rentabilidade do setor. Portanto, elaboraram diretrizes para o uso de anti-helmínticos de forma estratégica para o controlo sustentável das parasitoses dos pequenos ruminantes em áreas temperadas do Norte (“Sustainable Control of Parasites in Sheep” - SCOPS). O grupo SCOPS foi formado para desenvolver estratégias sustentáveis para o controlo de parasitas em pequenos ruminantes, facilitar e supervisionar a entrega dessas recomendações à indústria e garantir que novas pesquisas e desenvolvimentos sejam incorporados para refinar e melhorar os conselhos dados à indústria ovina (Abbott et al., 2012).

Os principais fatores que definem a taxa de desenvolvimento de resistência a anti-helmínticos, nos quais se baseiam as diretrizes da SCOPS são:

- A proporção de vermes de uma exploração que têm alelos resistentes;
- A frequência de utilização de cada antiparasitário;
- A eficácia de cada tratamento;
- A proporção da população total de vermes no animal no momento do tratamento;
- A velocidade com que os parasitas resistentes são “diluídos” com parasitas não selecionados *in refugia* (Abbott et al., 2012).

As medidas de controlo integrado e sustentável parasitário nos pequenos ruminantes podem basear-se nas seguintes diretrizes, de acordo com as orientações do grupo SCOPS apresentam-se a seguir.

1. **Elaborar uma estratégia de controlo em colaboração com o veterinário assistente.** Desenvolver uma estratégia económica, confiável e sustentável para o controlo parasitário, com consultas frequentes e atualizações recorrentes, interpretação de análises, como testes de resistência aos anti-helmínticos, que vão fornecer informações atualizados sobre o estado sanitário do rebanho.
2. **Usar estratégias de quarentena eficazes para prevenir a introdução de vermes resistentes.** Todos os animais novos que cheguem à exploração devem permanecer em quarentena e ser desparasitados.
3. **Avaliar a presença de resistência aos anti-helmínticos na exploração.** Detetar precocemente a redução de eficácia do anti-helmíntico e identificação das espécies de helmintes gastrointestinais, uma vez que os resultados dos testes variam de acordo com a espécie e, da estação do ano em que o teste é realizado.
4. **Administrar anti-helmínticos de maneira eficaz.** Administrar a dose correta de acordo com o fabricante, de modo a garantir a eficácia do anti-helmíntico utilizado.
5. **Usar anti-helmínticos apenas quando necessário.** Compreender a importância da presença de algum nível de parasitismo e minimizar a seleção para a resistência a anti-helmínticos. A monitorização da COF é essencial.
6. **Selecionar o anti-helmíntico adequado para o rebanho.** Usar um anti-helmíntico de estreito espectro sempre que possível, assim como evitar o uso de produtos combinados que não sirvam para a eliminação das espécies de parasitas presentes no rebanho.
7. **Adotar estratégias para preservar vermes suscetíveis na exploração (população *in refugia*).** Reduzir a pressão de seleção de resistência aos anti-helmínticos nos animais

com forte imunidade adquirida ou em pastagens com baixa contaminação, através, por exemplo, de tratamentos direcionados.

8. **Reduzir a dependência do uso de anti-helmínticos.** Aplicar, quando possível, medidas de controlo alternativas que incluem o manejo e avaliações de risco das pastagens, seleção de animais naturalmente resistentes aos vermes, uso de forragens com propriedades anti-helmínticas e adoção de tratamentos direcionados.

Atualmente, a resistência aos anti-helmínticos é um tema de grande importância para a indústria pecuária, pois representa uma ameaça para o bem-estar e para a produção de pequenos ruminantes em todo o mundo (Jabbar et al., 2006; Vercruysse et al., 2018). Assim, as estratégias de controlo sustentável para as parasitoses gastrointestinais requerem uma abordagem integrada que inclua o manejo ambiental, tendo em consideração o clima e as diferentes espécies de parasitas presentes nas diferentes áreas, bem como o uso de anti-helmínticos, de modo a minimizar a pressão de adaptação do parasita (Papadopoulos, 2008; Ruano et al., 2017).

Estas estratégias de controlo integrado e sustentável devem ter em conta que não se quer a erradicação total dos parasitas, mas sim manter o nível de infeção em níveis razoáveis, de modo a que os animais adquiram imunidade, que permita a redução dos níveis de mortalidade, e assim ter melhores taxas de conversão alimentar, e, portanto, maior ganho de peso, maior produção leiteira e aumento da fertilidade (Ruano et al., 2017).

6.1. Tratamento seletivo direcionado (TSD) e tratamento direcionado (TD)

Em face a todos os problemas de seleção para resistência antiparasitária devido aos tratamentos frequentes e abrangentes dos animais, quando há poucos ou nenhuns vermes *in refugia*, outros métodos de tratamento de pequenos ruminantes foram desenvolvidos, incluindo o tratamento seletivo direcionado (TSD) e o tratamento direcionado (TD) (Bath & van Wyk, 2009).

O TSD define-se como qualquer sistema que seleciona animais individualmente para tratamento, onde se usam critérios específicos para a seleção, como a contagem de ovos fecais (COF), ganho de peso, produção de leite ou condição corporal (Charlier et al., 2014). Uma das vantagens do TSD é que todos os animais com maior probabilidade de beneficiar do tratamento são incluídos na seleção e aqueles com menor probabilidade de benefício são excluídos (Bath & van Wyk, 2009). Por outro lado, como se recorre a uma seleção aleatória para tratamento, os

animais aparentemente saudáveis podem ser tratados, enquanto os que estão realmente doentes podem não ser escolhidos para tratar (Fleming et al., 2006)

O TD, em oposição, compreende o tratamento de todos os animais, nos momentos, circunstâncias ou categorias de animais mais benéficos para o manejo parasitário sustentável (Bath & van Wyk, 2009; Charlier et al., 2014).

O objetivo do TD e do TSD é controlar o impacto dos nematodes gastrointestinais na produção animal, preservando a eficácia antiparasitária, mantendo um *pool* de parasitas não tratados *in refugia* nos hospedeiros e nas pastagens, de modo a poderem completar o seu ciclo de vida normal e, deste modo, passar genes associados à suscetibilidade aos anti-helmínticos à próxima geração (Charlier et al., 2014).

Assim, o TSD é amplamente aceite como a forma de retardar o desenvolvimento de resistência antiparasitária, mas para ser aplicável nas explorações, o sistema deverá ser rápido, confiável, seguro e barato. O único método implementado até o momento com resultados positivos é o sistema FAMACHA[®] (Bath & van Wyk, 2009).

O sistema FAMACHA[®] é uma estratégia para o tratamento antiparasitário direcionado para parasitas hematófagos, como é o caso de *Haemonchus contortus*. Este baseia-se na avaliação do estado anémico dos animais parasitados e no tratamento dos animais anémicos que estão a sucumbir aos efeitos da doença (Tariq, 2015). Para a rápida identificação dos níveis de anemia, compara-se o exame das membranas mucosas oculares dos pequenos ruminantes com um cartão colorimétrico e com uma escala (Figura 18). O sistema usa uma escala que varia de um a cinco, sendo que um corresponde a um animal saudável e cinco a um animal com anemia grave. O tratamento antiparasitário é, assim, recomendado em animais com pontuação de quatro e cinco e deverá ser considerado, tendo em conta outras variáveis, em animais com pontuação de três. Os animais com pontuação inferior a três são considerados animais que não requerem tratamento antiparasitário (Bartley, 2008).



Figura 18 - Sistema FAMACHA[®].
 Adaptado de
https://www.farmersweekly.co.za/wp-content/uploads/recov/Farmers_Weekly/Supplied_pics/FAMACHA-system.jpg.

Esta abordagem requer avaliações frequentes para garantir a detecção precoce e o tratamento de animais com hemoncosse subclínica, através de um cronograma de avaliações em intervalos de 7 a 10 dias, uma vez que a anemia é mais facilmente detetada num pequeno grupo de animais (Besier et al., 2016a).

Em comparação com os tratamentos anti-helmínticos convencionais onde todos os animais são tratados, o sistema FAMACHA[®] permite uma grande proporção de animais não tratados. Estes animais vão excretar ovos de vermes suscetíveis na pastagem, o que resulta na manutenção do reservatório das larvas suscetíveis *in refugia*, ou seja, a proporção de parasitas que não são expostos a uma medida específica de controlo, escapando da seleção para resistência (Tariq, 2015).

Em geral, as decisões relativas ao tratamento com base nas pontuações FAMACHA[®] variam, dependendo da situação da exploração, sendo que o fator mais importante é o número de anti-helmínticos que permanecem eficazes. Ao utilizar esta abordagem, o número de tratamentos farmacológicos será muito reduzido, o que vai resultar em pressão de seleção significativamente diminuída para resistência e redução concomitante nos custos dos fármacos. No entanto, como os animais precisam de ser examinados em intervalos de tempo frequentes, os custos de mão-de-obra vão aumentar. Além disso, recomenda-se que esta abordagem seja aplicada apenas a animais adultos. Os cordeiros e cabritos apresentam um volume de sangue comparativamente pequeno em relação aos adultos, imaturidade do sistema imunitário e baixa resiliência, logo a anemia pode progredir rapidamente de moderada a grave (Fleming et al., 2006).

A principal limitação deste sistema, na Europa, deve-se principalmente à ubiquidade de infeções mistas de parasitas e a presença de outros parasitas hematófagos, como parasitas do fígado, como é exemplo *Fasciola hepatica*, logo a anemia por si só pode não refletir a presença de nematodes gastrointestinais no animal (Charlier et al., 2014).

III. COMPONENTE PRÁTICA

1. Introdução

Durante os meses de setembro de 2020 a fevereiro de 2021 foi efetuado o estágio curricular no Laboratório de Parasitologia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), com a deslocação às explorações de montanha de pequenos ruminantes no Norte de Portugal, onde foram recolhidas todas as amostras fecais incluídas neste estudo.

Posteriormente, a análise das amostras foi realizada no Laboratório de Parasitologia. A escolha dos animais foi realizada de forma aleatória, em animais aparentemente saudáveis, em diferentes explorações. Recorrendo à análise coprológica utilizando o método de Willis-Mollay o método de McMaster e, para a identificação morfológica das larvas de terceiro estágio (L3), fez-se coprocultura. Dos métodos mencionados, apenas o método de McMaster permite quantificar a infeção parasitária, possibilitando comparações e avaliações da eficácia do anti-helmíntico através do Teste de redução da contagem de ovos fecais (TRCOF).

Adicionalmente, nos meses de novembro de 2020 a fevereiro de 2021 foi possível assistir e participar à prática clínica da VALPATAS – Clínica Veterinária de Valpaços. Este é um centro de atendimento médico-veterinário de pequena capacidade, com atendimento exclusivo de cães e gatos, de segunda-feira a sábado, que abrange as vertentes de aconselhamento nutricional, reprodução, geriatria, cirurgia, entre outras. O corpo clínico é composto apenas por um médico veterinário e uma enfermeira, que realizam consultas durante o horário de atendimento. O seu diretor clínico é o Dr. Miguel Fernandes Lopes.

Na Clínica Veterinária de Valpaços foi possível acompanhar consultas e contactar de perto com os tutores realizando anamneses e exames clínicos. Lidar diariamente com a preparação e administração de medicação aos animais internados e auxiliei na realização de pensos em animais com feridas e fraturas. Ajudar em todas as tarefas propostas, executando-as de forma rotineira. Auxiliar no acompanhamento pré-operatório, operatório e pós-operatório, cuidados intensivos, assim como na preparação anestésica de animais para cirurgia. Acompanhar e assistir a um elevado número de cirurgias, não apenas de tecidos moles, como também ortopédicas. Realizar, com ajuda, várias projeções radiográficas e acompanhei ultrassonografias.

Foi também possível acompanhar consultas, ovariectomias em gatas e cadelas e orquiectomias em gatos. Realizar a colheita de várias amostras biológicas como sangue e/ou urina, para posterior análise das mesmas, efetuar ecografias de confirmação de gestação e aconselhamento nutricional, sempre com a supervisão do médico veterinário.

2. Objetivos

Este trabalho teve como principais objetivos a identificação dos principais nematodes gastrointestinais nos pequenos ruminantes de explorações de montanha localizadas no Norte de Portugal, bem como avaliar a eficácia dos anti-helmínticos usados e identificar possíveis resistências. Com este estudo pretendeu-se também:

- a) Aplicar técnicas de diagnóstico para a identificação de parasitas nas amostras fecais;
- b) Identificar os anti-helmínticos mais utilizados em parasitoses gastrointestinais;
- c) Consolidar conhecimentos anteriormente adquiridos nas diversas áreas clínicas, assim como vertentes de consulta externa, desparasitação, vacinação, doenças infecciosas, anestesiologia, cirurgia, métodos de diagnóstico, entre outros.

3. Materiais e métodos

3.1. Caracterização das explorações em estudo

Neste estudo foram incluídos pequenos ruminantes de três explorações diferentes, nas quais foram recolhidas amostras fecais de um grupo de animais selecionado. A exploração A (Figura 19) localiza-se em Murgido, na serra do Marão e compreende caprinos de carne. A exploração B (Figura 20) localiza-se em Sta. Leucádia, na serra da Aboboreira e contém caprinos e ovinos de carne. A exploração C localiza-se em Serradelas, na serra da Aboboreira e compreende ovinos de carne.



Figura 19 - Caprinos da raça Bravia da exploração A. Imagem gentilmente cedida pela Doutora Filipa Teixeira Rodrigues.



Figura 20 - Caprinos, ovinos e bovinos na exploração B. Imagem gentilmente cedida pela Doutora Filipa Teixeira Rodrigues.

Os animais que participaram neste estudo estavam aparentemente saudáveis. Na exploração A foram selecionados 32 animais, aos quais se recolheram amostras fecais para análise. Já na exploração B iniciamos o estudo com 19 animais, mas apenas foram analisados o nível de sensibilidade do anti-helmíntico em 13 animais. Na exploração C selecionamos 14 animais, dos quais apenas em 9 foram analisados o nível de sensibilidade do anti-helmíntico.

Para cada animal foi possível recolhida a seguinte informação: espécie caprina (*Capra aegagrus hircus*) ou ovina (*Ovis aries*), raça (Bravia ou Cruzada), sexo (masculino ou feminino), idade [jovem (1-2 anos) e adulto (>3 anos)], condição corporal (normal/ótimo ou magro), regime (intensivo ou extensivo), aptidão (leite ou carne), antiparasitário normalmente administrado (fenbendazol, ivermectina/closantel, ivermectina/clorsulon), realização regular da COF (sim ou não) e pastagem com outras espécies (bovinos, equinos ou exclusivo).

A caracterização geral de cada exploração encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Caracterização geral das explorações em estudo.

Identificação da exploração	A	B	C
Nº total de animais	360	70	16
Espécie	Caprina	Ovina e Caprina	Ovina
Raça	Bravia	Cruzada	Cruzada
Regime	Extensivo	Extensivo	Extensivo
Aptidão	Carne	Carne	Carne
Antiparasitário utilizado por rotina	Fenbendazol	Ivermectina/ Closantel	Ivermectina/ clorsulon
Realização regular da COF	Não	Não	Não
Pastagem com outras espécies	Não	Bovinos	Equinos

COF – Contagem de ovos fecais.

3.2. Recolha e conservação de amostras

As amostras fecais foram recolhidas diretamente da ampola retal dos animais, com o auxílio de uma luva (Figura 21). De seguida, as amostras recolhidas foram acondicionadas, individualmente, em sacos de plástico, devidamente identificados, refrigeradas e analisadas num período máximo de 24 a 72h, após a recolha.



Figura 21 - Recolha de fezes frescas a partir da ampola retal de um caprino, da exploração A. Imagem gentilmente cedida pela Doutora Filipa Teixeira Rodrigues.

3.3. Análise coprológica

A pesquisa e identificação das formas parasitárias, como ovos de helmintes gastrointestinais foram efetuadas no Laboratório de Parasitologia da UTAD através de vários métodos coprológicos, nomeadamente: o método de Willis - Mollay, método de McMaster e coprocultura.

3.3.1. Método de Willis - Mollay

O método de Willis - Mollay é um método qualitativo, que permite a pesquisa de ovos ou oocistos de parasitas nas amostras fecais através do princípio de flutuação. Este método tem como princípio as densidades específicas das formas parasitárias e dos detritos fecais, ou seja, a densidade de ovos e oocistos de determinados parasitas, presentes numa amostra fecal, flutuam quando colocada num líquido com gravidade superior. O método foi realizado de acordo com o protocolo do Laboratório de Parasitologia da UTAD (Figura 22).

a) Material:

- Pequena amostra de fezes (duas a três grama)
- Espátula
- Solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) com gravidade específica superior a 1,20
- Almofariz
- Pilão
- Funil
- Tamis de rede metálica
- Frasco de vidro de boca larga
- Lamelas de 22x22mm
- Lâminas



Figura 22 - Material utilizado no método de Willis - Mollay. a) tamis de rede metálica; b) funil; c) almofariz; d) pilão; e) solução saturada de cloreto de sódio (NaCl); f) frasco de vidro de boca larga; g) lamelas. Original.

b) Procedimento:

1. Colocar no almofariz, com o auxílio de uma espátula, uma pequena amostra de fezes (2 a 3 grama).
2. Adicionar um pouco da solução de NaCl e, com auxílio de um pilão macerar até obter uma massa homogênea.
3. Adicionar mais um pouco de solução de NaCl até obter uma massa líquida homogênea.
4. Filtrar, para o frasco de vidro, a massa líquida com o auxílio do tamis, até formar, na boca do frasco, um menisco convexo.
5. Colocar a lamela sob o menisco convexo, evitando a formação de bolhas de ar.
6. Deixar repousar cerca de 15 minutos.
7. Retirar a lamela num movimento firme e preciso, elevando-a verticalmente e colocar na lâmina de microscópio (Figura 23).
8. Procurar as formas parasitárias ao microscópio (Figura 24), em pequena ampliação (100x) e identificar em média ampliação (400x).

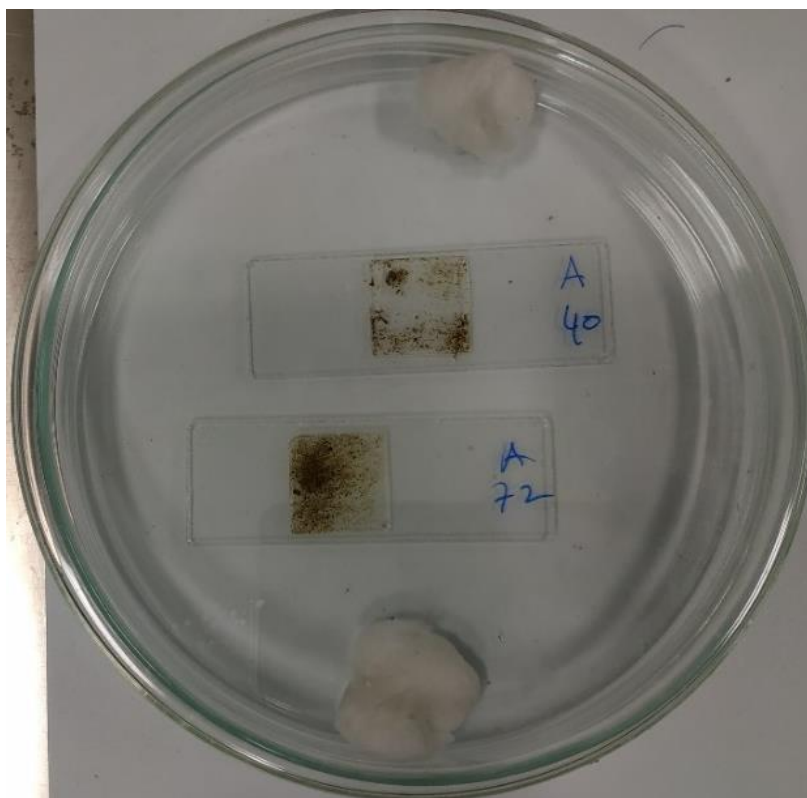


Figura 23 - Lâminas em câmara húmida prontas a serem visualizadas ao microscópio. Original.



Figura 24 - Ovos do tipo trichostrongilídeo. Ampliação 100x. Original.

Os resultados da amostra consideram-se negativos, caso não se encontre nenhuma forma parasitária. Quando se encontram formas parasitárias considera-se o resultado como positivo e as formas parasitárias podem ser observadas num campo de observação com ampliação média de 400x (Figura 25 e 26).



Figura 25 - Ovos do tipo trichostrongilídeo (setas). Ampliação 100x. Original.

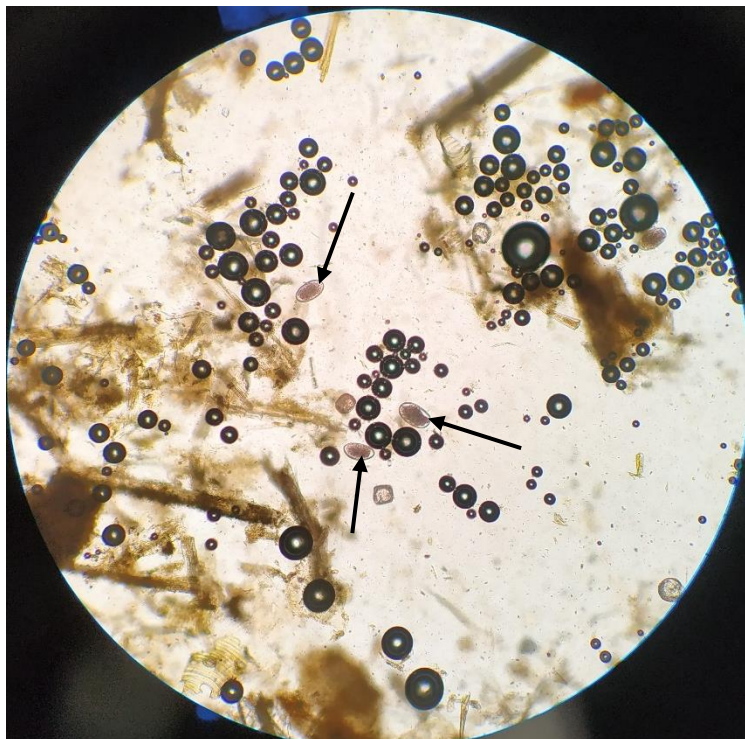


Figura 26 - Ovos do tipo trichostrongilídeo (setas). Ampliação 100x. Original.

3.3.2. Método de McMaster

O método de McMaster é um método quantitativo, que permite a contagem de ovos por grama de fezes (opg) utilizando uma câmara de McMaster, que possui uma grelha ou retículo que facilita a contagem pelo operador. A partir de uma quantidade específica de amostra fecal misturada com uma solução saturada de sulfato de zinco (ZnSO_4) a 33%, é retirado 1ml e colocado na câmara de McMaster para análise microscópica. O método foi realizado de acordo com o protocolo do Laboratório de Parasitologia da UTAD.

a) Material (Figura 27):

- Amostra de fezes (2 gramas)
- Pinças
- Papel
- Balança
- Solução de sulfato de zinco (ZnSO_4) a 33%
- Proveta de vidro de 100ml
- Vareta de vidro
- Pipeta de Pasteur de 1ml
- Câmara de McMaster



Figura 27 - Material utilizado no método de McMaster. a) amostra de fezes e papel; b) pinça; c) proveta de vidro de 100ml; d) vareta de vidro; e) Solução de sulfato de zinco (ZnSO_4) a 33%. Original.

b) Procedimento:

1. Com o auxílio de uma balança, de um quadrado de papel e de uma pinça, pesa-se 2g e coloca-se na proveta.
2. Adicionar um pouco de solução de ZnSO_4 a 33%.
3. Com a ajuda de uma vareta de vidro, macerar até formar uma massa homogênea.
4. Adicionar a solução de ZnSO_4 a 33% até perfazer 30ml e agitar num movimento repetitivo de 360° .
5. Com o auxílio da pipeta de Pasteur, aspirar 1ml do líquido superficial do preparado anterior (para diminuir o número de detritos) e colocar na câmara de McMaster.
6. Aguardar 10 minutos, para que ocorra flutuação das formas parasitárias e a adesão à face interior da lamela superior da câmara de McMaster (Figura 28).
7. Procurar as formas parasitárias ao microscópio em pequena ampliação (100x) e quantificar todas as formas que se encontram no interior do retículo (área de contagem) (Figura 29 e 30).

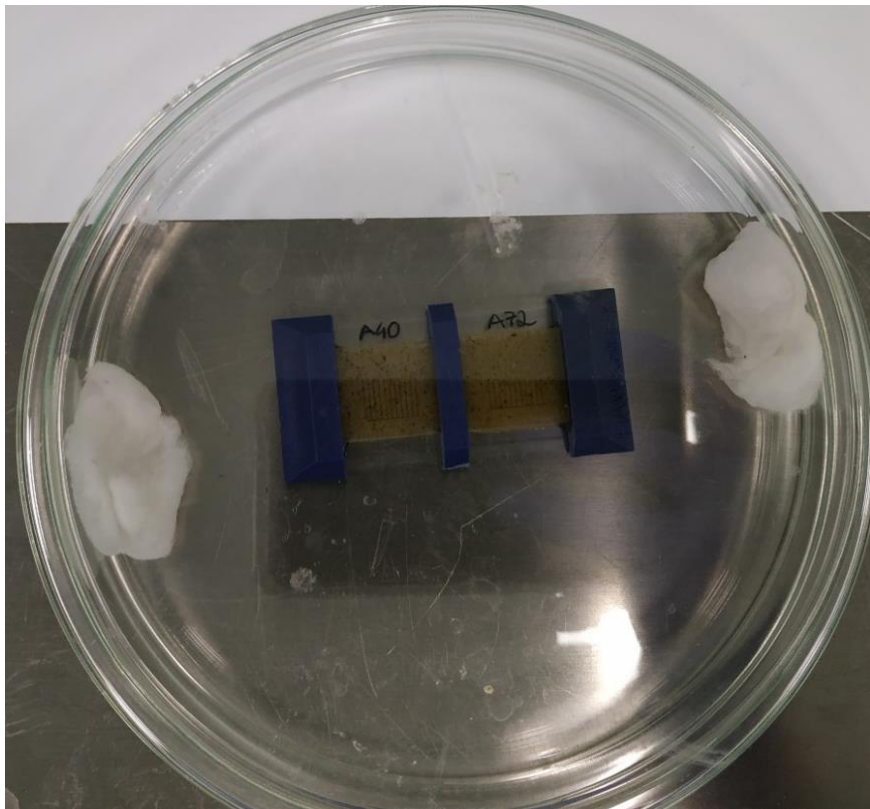


Figura 28 - Câmara de McMaster, em câmara húmida, pronta para observação. Original.

A determinação do valor de opg de uma amostra individual é feita pela contagem de todas as formas parasitárias que se observam no interior do retículo, assim como as que tocam nas duas linhas exteriores contíguas (área de contagem = 15ml) (Figura 29). Num 1g de fezes, ou seja, em 15ml da suspensão, há 100 vezes mais formas parasitárias do que em 0,15ml.

Assim, o cálculo de ovos por grama de fezes (opg) é feito através da seguinte fórmula:

$$opg = \text{Número de ovos no interior do retículo} \times 100$$

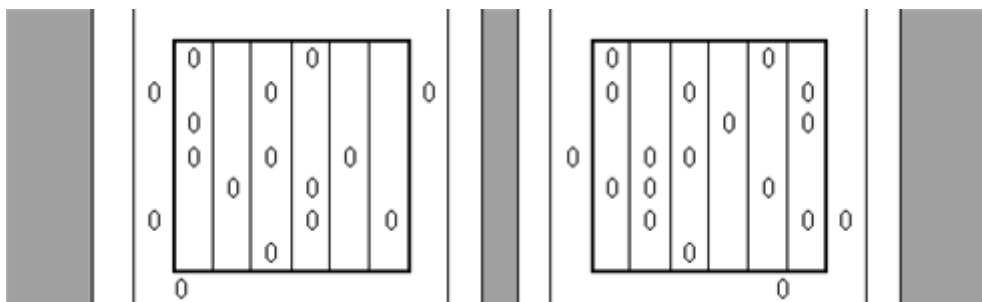


Figura 29 - Esquema representativo dos ovos nos retículos da câmara de McMaster. Adaptado de <https://www.rvc.ac.uk/Review/Parasitology/EggCount/Calculation.htm>. Acedido em 22/02/2021.

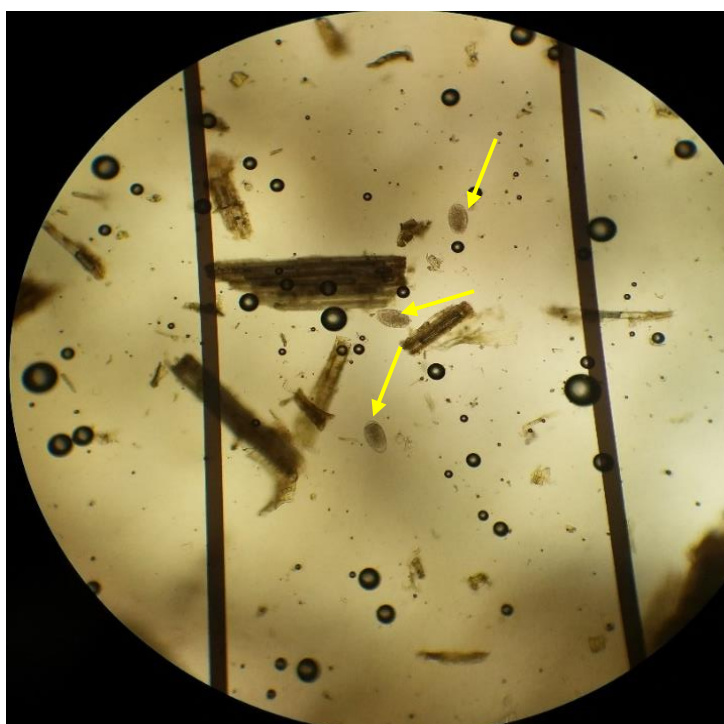


Figura 30 - Ovos do tipo tricostrongilídeo (setas a amarelo) na câmara de McMaster. Ampliação 100x. Imagem gentilmente cedida pela Doutora Filipa Teixeira Rodrigues.

De acordo com a quantidade de formas parasitárias observadas e contadas na câmara de McMaster, o resultado pode ser apresentado como infecção ligeira, moderada ou maciça (Tabela 4)

Tabela 4 - Grau de infecção de acordo com as diferentes espécies de nematodes. Adaptado de Taylor et al. (2016).

Espécies	Grau de infecção (opg)		
	Ligeira	Moderada	Maciça
Infeção mista*	<250	1000	≥ 2000
Mista (sem <i>Haemonchus contortus</i>)	<150	500	1000
<i>H. contortus</i>	100-250	2500-8000	≥ 8000
<i>Teladorsagia circumcincta</i>	50-200	200-2000	≥ 2000
<i>Trichostrongylus</i> spp.	100-500	500-2000	≥ 2000
<i>Nematodirus</i> spp.	50-100	100-600	≥ 600
<i>Strongyloides papillosus</i>		-	10000

*Mais do que uma espécie de helmintes gastrointestinais no mesmo animal

3.3.3. Coprocultura

Um dos métodos indicados para identificar as espécies ou o género dos parasitas é a cultura das amostras fecais, através da identificação morfológica das L3. Foi usado o seguinte protocolo:

a) Material:

- Amostra de fezes
- Placa de Petri
- Sacos de celofane
- Filtros de 250 µm
- Filtros de malha fina
- Tubos de centrífuga
- Estufa
- Aparelho de Baermann
- Lâminas de microscópio

- Lamelas 22x22mm
- Solução de Lugol (iodeto de potássio)
- Microscópio ótico, se possível, com escala micrométrica

b) Procedimento:

1. Colocar numa placa de Petri uma quantidade suficiente de fezes e fechar com um saco de celofane. O saco deverá ter uns pequenos furos para permitir a entrada do ar (Figura 31).
2. Incubar na estufa durante 10 dias a 24-27°C.
3. Após a incubação, remover o saco de celofane e adicionar água morna até cobrir completamente as fezes. Incubar por 4h à temperatura ambiente.
4. Filtrar com um filtro de 250 µm, de maneira a eliminar os detritos e obter uma suspensão com as L3.
5. Filtrar novamente a suspensão com um filtro de malha fina que retenha as L3.
6. Colocar o filtro na parte superior do aparelho de Baermann, após estar cheio de água, e incubar de um dia para o outro.
7. Abrir o aparelho de Baermann e retirar 15ml para um tubo de centrífuga.
8. Centrifugar o tubo e remover o sobrenadante.
9. Colocar umas gotas da suspensão numa lâmina de microscópio e adicionar uma gota da solução de Lugol. Colocar uma lamela por cima e identificar as L3 no microscópio (Figura 32).

De acordo com o método experimental apresentado em Rinaldi, Morgan, et al., (2014), na identificação das L3 devem-se identificar todas as larvas se o número total das mesmas for igual ou inferior a 100. Se estiverem presentes mais de 100 larvas, apenas se identificam as primeiras 100.

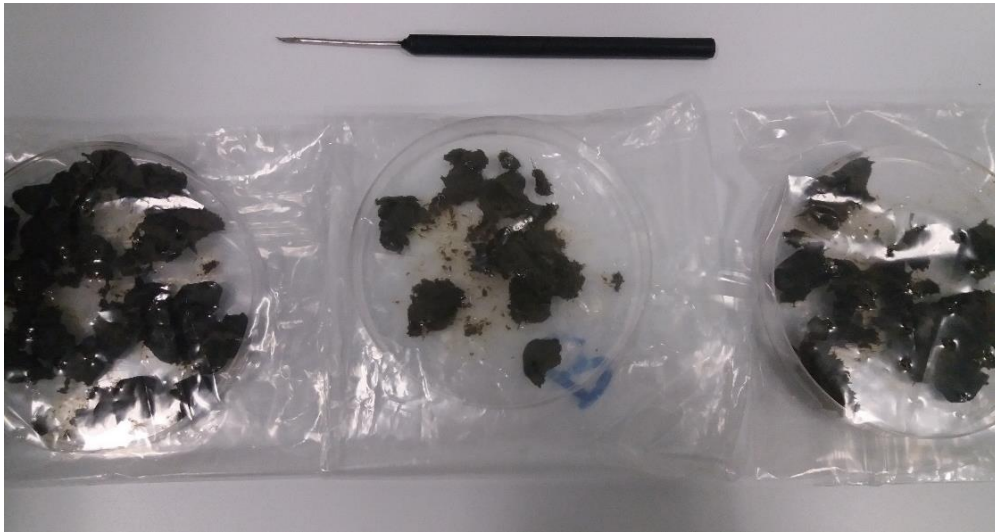


Figura 31 - Coprocultura: amostras fecais prontas a seguir para a estufa. Imagem gentilmente cedida pela Doutora Filipa Teixeira Rodrigues.



Figura 32 - Observação de L3 (setas) ao microscópio. Ampliação 100x. Original.

3.4. Análise de dados

Para a análise dos resultados foi efetuada uma comparação de proporções de positividade através do teste de qui-quadrado ou do teste exato de Fisher, utilizando o conjunto de programas IBM® SPSS® Statistics 28, sendo um valor de probabilidade (p) $<0,05$ considerado como estatisticamente significativo.

4. Resultados

Ao longo dos cinco meses de estágio foram recolhidas amostras fecais nas três diferentes explorações de montanha (exploração A, B e C), de modo a identificar nematodes gastrointestinais e avaliar o nível de infeção, bem como estimar a eficácia dos anti-helmínticos utilizados e detetar possíveis resistências aos mesmos.

4.1. Caracterização da população em estudo

Dos 65 pequenos ruminantes incluídos no estudo, 41 (63,1%) eram caprinos (*Capra aegagrus hircus*) e 24 (36,9%) eram ovinos (*Ovis aries*) (Gráfico 1).

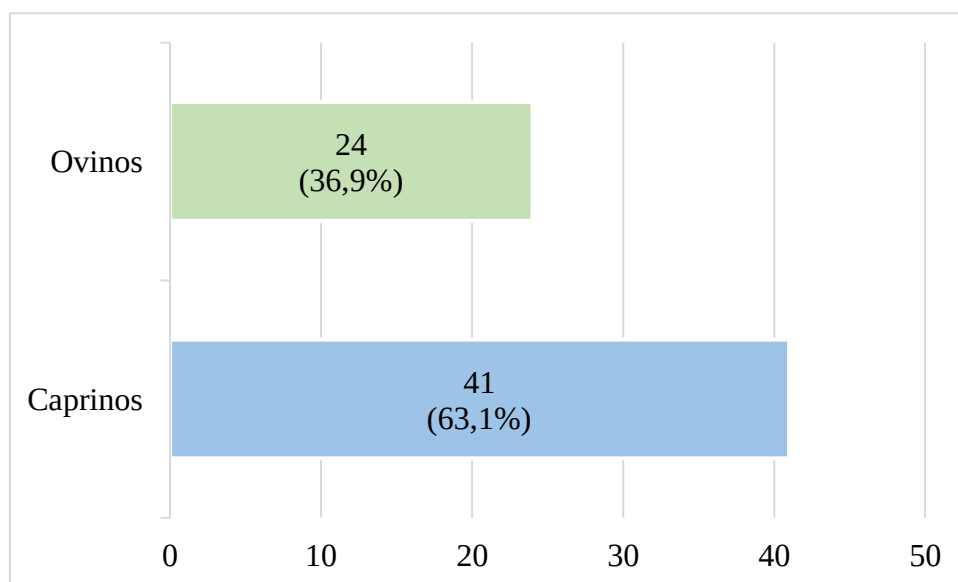


Gráfico 1 - Distribuição geral dos animais incluídos no estudo de acordo com a espécie.

Quanto à variável raça, verificou-se que 33 (50,8%) dos pequenos ruminantes eram de raça Bravia e 32 (49,2%) da raça cruzada (Gráfico 2).

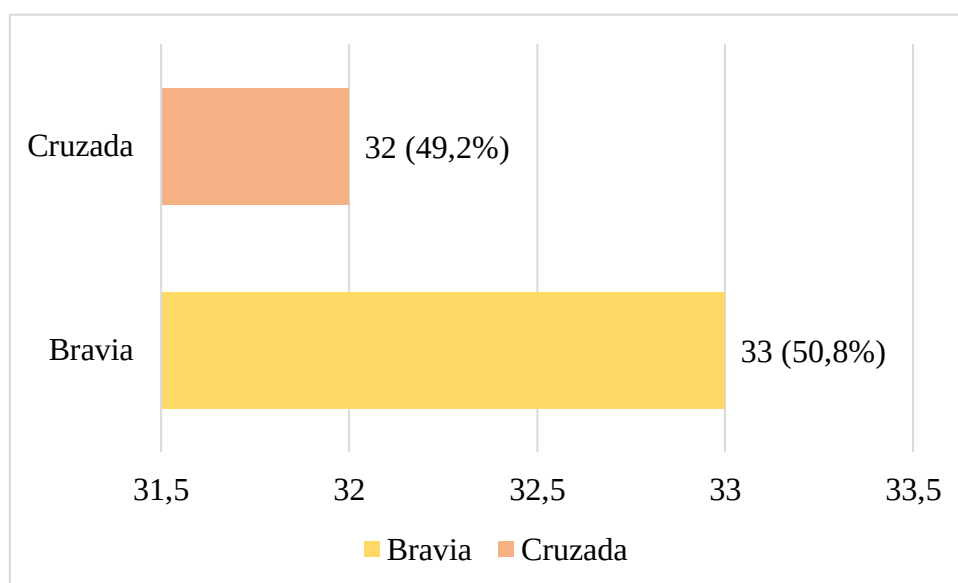


Gráfico 2 - Distribuição dos animais incluídos no estudo de acordo com a raça.

O Gráfico 3 representa o sexo dos pequenos ruminantes, aos quais se recolheram amostras, sendo que 95,4% eram fêmeas (n = 62) e 4,6% eram machos (n = 3).

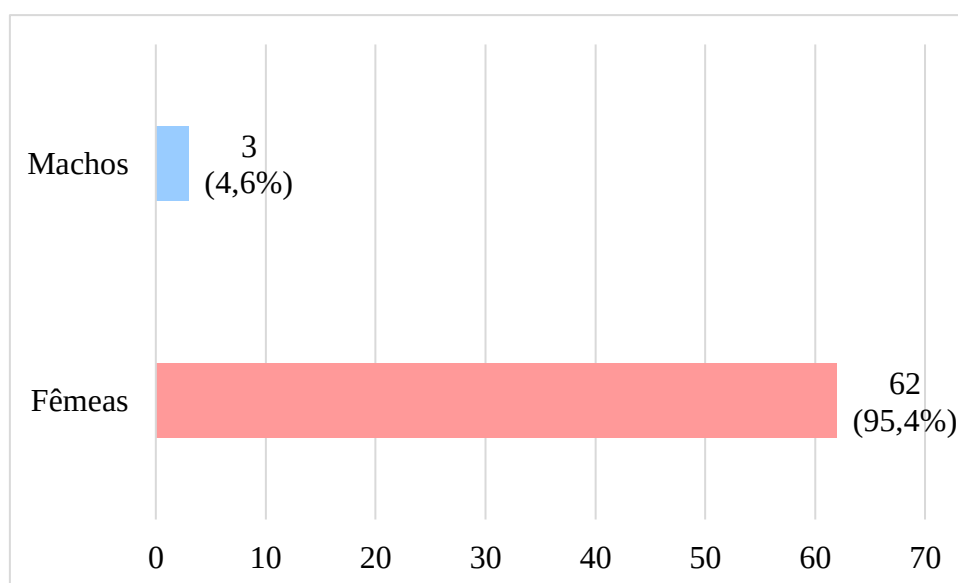


Gráfico 3 - Distribuição geral dos animais incluídos no estudo de acordo com o sexo.

A distribuição dos ovinos e caprinos por sexo, encontra-se no Gráfico 4.

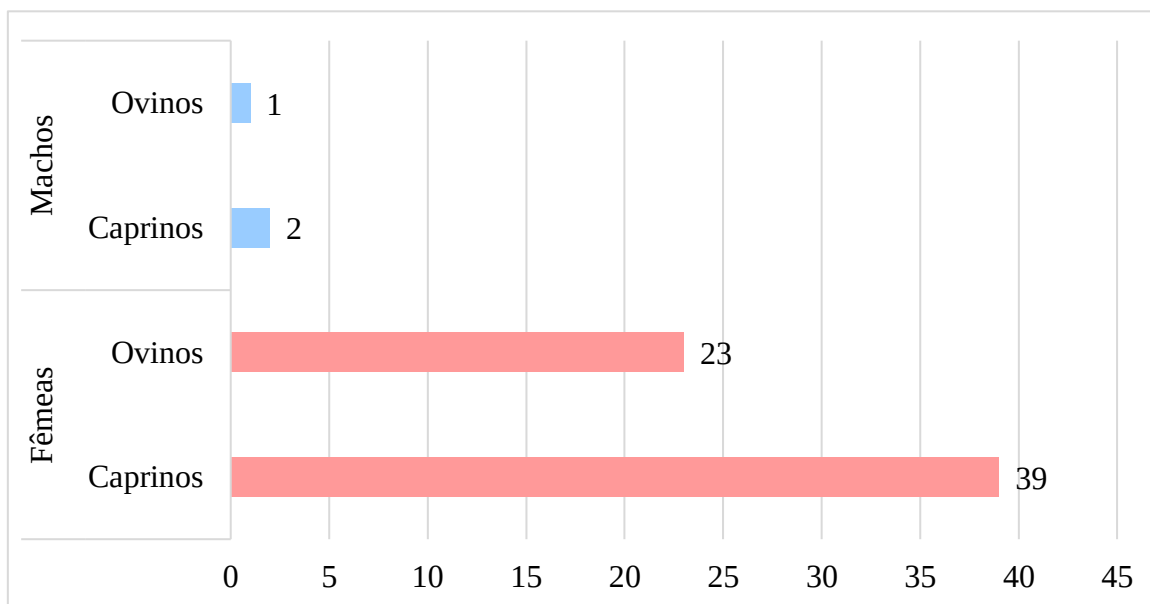


Gráfico 4 - Distribuição dos caprinos e ovinos incluídos no estudo de acordo com o sexo.

Quanto à variável idade definiram-se duas categorias, jovem (1-2 anos) e adulto (> 3 anos). A distribuição desta variável encontra-se no Gráfico 5, sendo que 76,9% eram adultos (n = 50) e 23,1% eram jovens (n = 15).

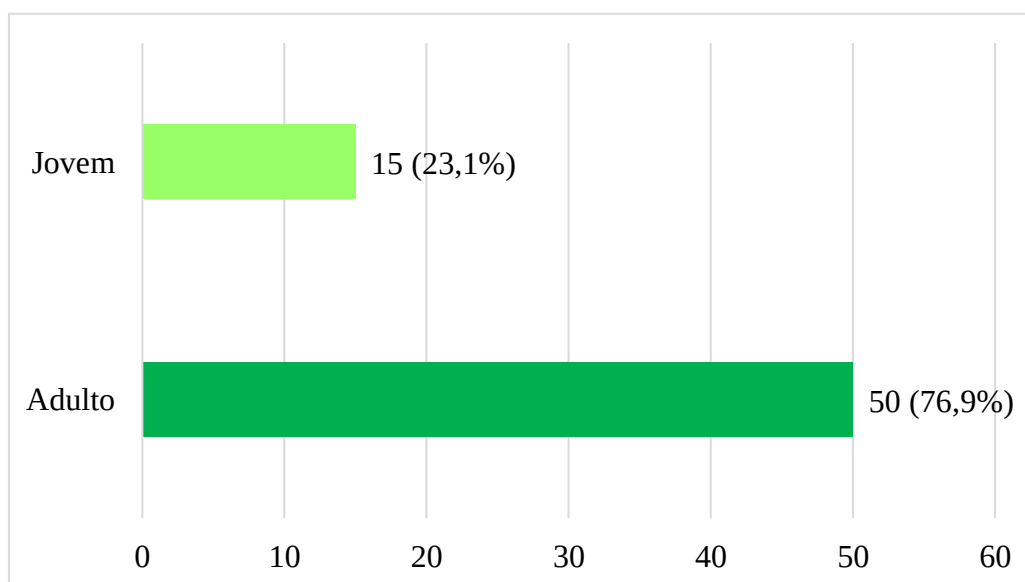


Gráfico 5 - Distribuição dos ovinos e caprinos incluídos no estudo de acordo com a idade.

A distribuição dos animais do estudo de acordo com a variável condição corporal encontra-se no Gráfico 6. Para esta variável definiram-se duas categorias: magro, que corresponde a uma condição corporal entre 2 e 2,5; normal ou ótimo, que corresponde a uma condição corporal entre 3 e 3,5. De notar que não há informação recolhida (ND – não definido) sobre a condição corporal em 3 dos 65 animais.

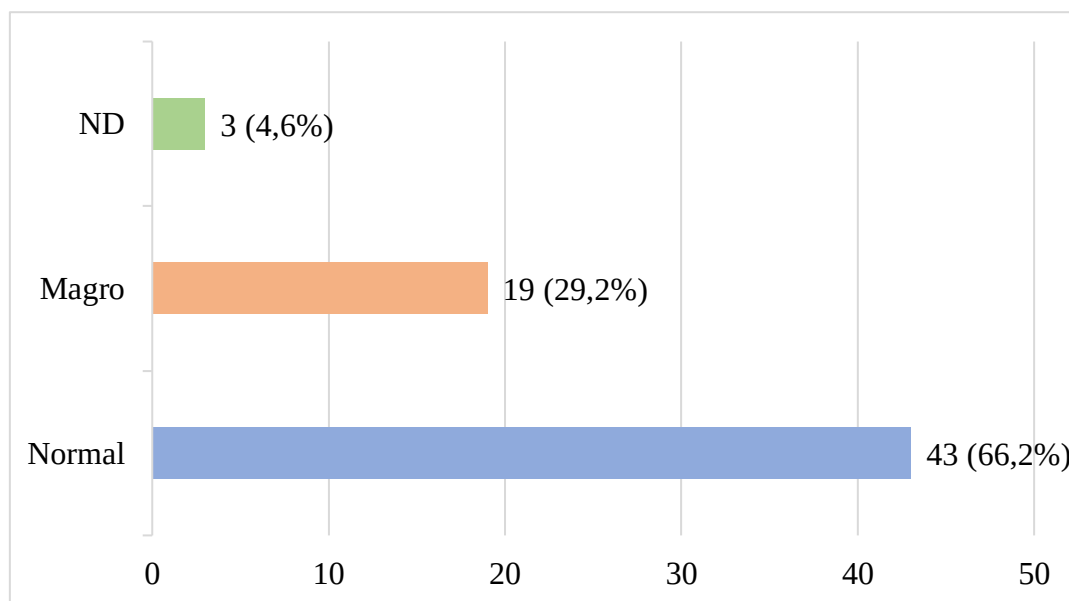


Gráfico 6 - Distribuição dos animais incluídos no estudo de acordo com a condição corporal.

4.2. Identificação dos ovos de helmintes gastrointestinais

Após a realização do método de Willis - Mollay observaram-se diversos ovos do tipo tricostrongílideo (Figura 33, 34I e 34II). Esta designação deve-se ao facto de que os ovos de nematodes gastrointestinais, embora distintos entre si, não se conseguem identificar com certeza a(s) espécie(s) a que pertencem utilizando unicamente a observação microscópica, mesmo com a medição dos mesmos através do micrómetro.

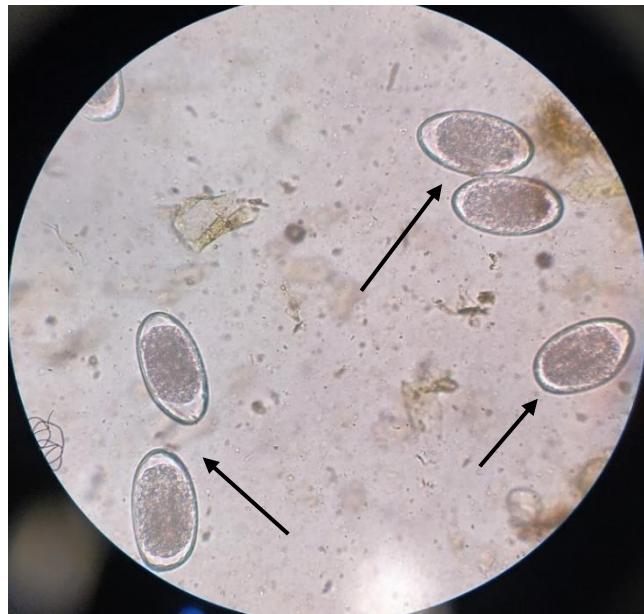


Figura 33 - Ovos do tipo tricostrongílideo (setas).
Ampliação 400x. Original.

Outros ovos também foram identificados durante a realização das análises coprológicas, incluindo ovos do nematode *Strongyloides* (Figura 34 I) e do cestode *Moniezia* (Figura 34 II).

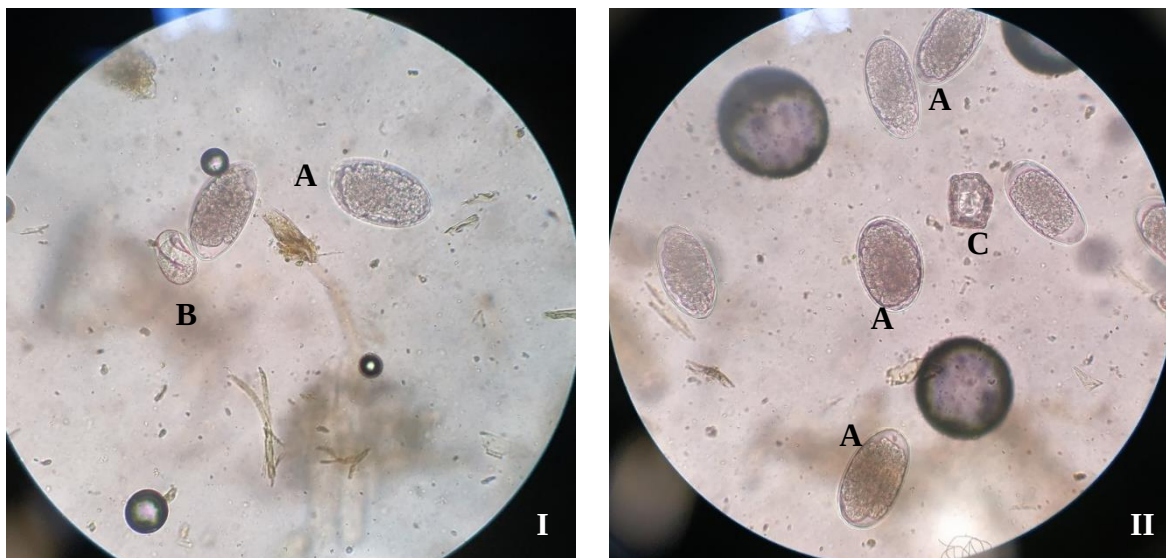


Figura 34 – I. A) Ovos do tipo tricostrongilídeo. B) Ovo de *Strongyloides* sp. II. C) Ovo de *Moniezia*. Ampliação 400x. Original.

Embora também pertencentes aos ovos do tipo tricostrongilídeo, os ovos do género *Nematodirus* são distinguíveis dos restantes devido a várias características morfológicas, incluindo o seu maior tamanho (Figura 35).

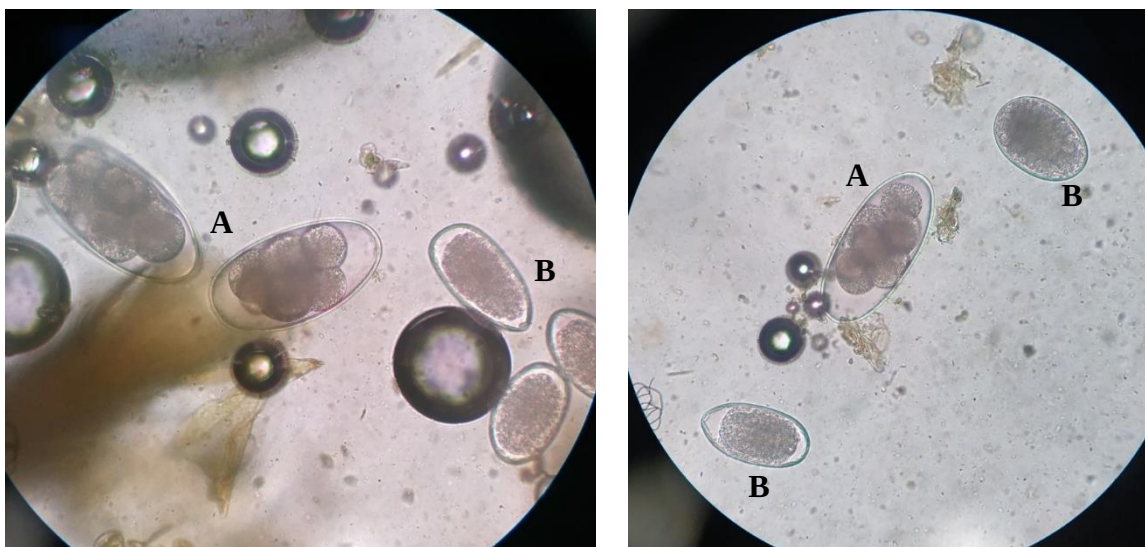


Figura 35 - A) Ovos de *Nematodirus* spp. B) Ovos do tipo tricostrongilídeo. Ampliação 400x. Original.

Nas Figuras 36 e 37 é possível identificar diversas formas parasitárias, incluindo ovos do tipo tricostrongilídeo dos géneros *Nematodirus* e ovos do cestode *Moniezia*, e oocistos de *Eimeria*.

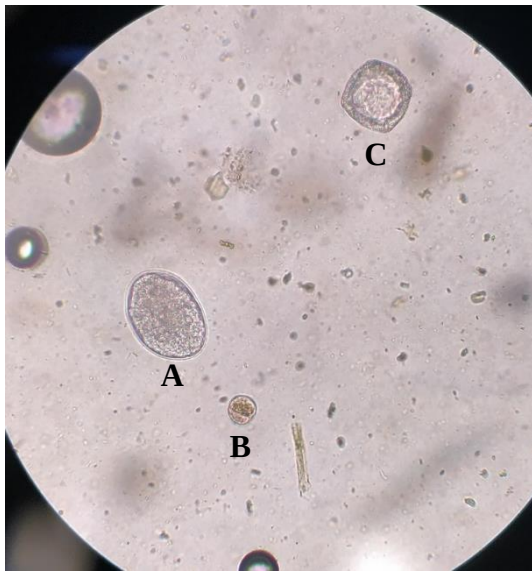


Figura 36 - A) Ovo do tipo tricostrongilídeo. B) Oocisto de *Eimeira* spp. C) Ovo de *Moniezia benedeni*. Ampliação 400x. Original.



Figura 37 - A) Ovos do tipo tricostrongilídeo. B) Ovo do gênero *Nematodirus*. C) Oocistos de *Eimeira* spp. Ampliação 400x. Original.

A análise das formas parasitárias ao microscópio deve ser cuidadosa e minuciosa, pois, como se trata de fezes, a quantidade de detritos é elevada e pode levar a diagnósticos errados.

No método de Willis - Mollay ou método de McMaster, os pseudoparasitas são estruturas que podem ser confundidas com algumas formas parasitárias. Nestes incluem-se grãos de pólen, bolhas de ar, esporos, pelos, gotículas de gordura, entre outros (Bowman, 2014). A Figura 38 contém um exemplo de alguns pseudoparasitas que se podem encontrar nas observações.

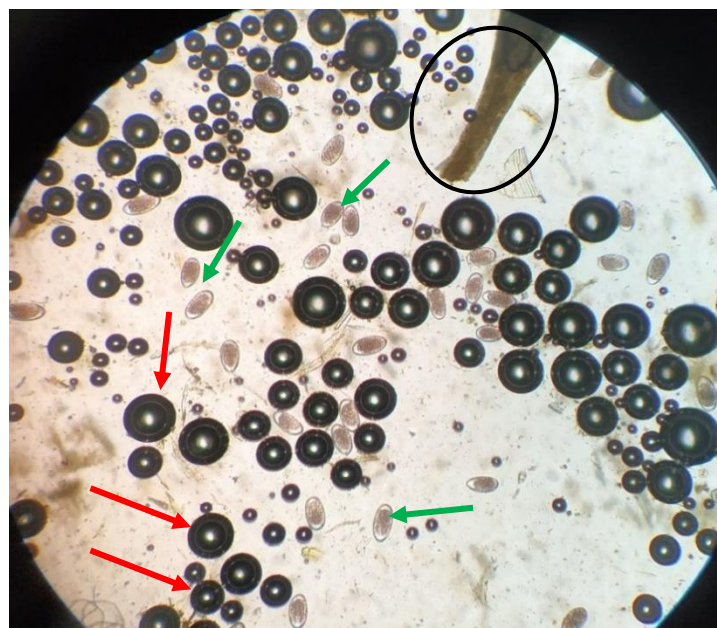


Figura 38 - Pseudoparasitas: bolhas de ar (setas a vermelho) e estrutura vegetal (círculo a preto). Ovos de tricostrongilídeos (setas a verde). Ampliação 100x. Original.

4.3. Prevalência de nematodes gastrointestinais

Na Tabela 5 encontram-se descritas as espécies de nematodes gastrointestinais em pequenos ruminantes das explorações de montanha do Norte de Portugal assim como as associações encontradas no decorrer do trabalho, o número de casos e a respetiva positividade geral.

Foi observada uma prevalência de infeção por ovos do tipo tricostrongilídeo de 90,8%, por ovos de *Nematodirus* de 41,5% e por *Strongyloides* de 15,4%.

Após a comparação das proporções de positividade verificou-se que a espécie estava correlacionada ($p= 0,020$) com a presença de ovos de *Nematodirus*, verificando-se uma prevalência mais elevada nos caprinos do que nos ovinos. Verificou-se também que a raça estava correlacionada ($p= 0,004$) com a presença de ovos de *Nematodirus*, verificando-se uma prevalência mais elevada na raça Bravia do que na raça Cruzada. Para além disso, observou-se que a raça estava correlacionada ($p= 0,006$) com a presença de ovos de *Strongyloides*, verificando-se uma prevalência mais elevada na raça Cruzada do que na Bravia.

Nas restantes variáveis sexo, idade, condição corporal e positividade geral não se observaram diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 5 - Prevalência de infecção por ovos de nematodes gastrointestinais em pequenos ruminantes das explorações de montanha de acordo com a espécie, raça, sexo, idade e condição corporal.

Variáveis	Animais (n)	Animais positivos (n)			Prevalência (%)			Positividade geral (%)
		T	N	S	T	N	S	
Espécie								
Ovinos	24	23	5	6	95,8	20,8	25	95,8
Caprinos	41	36	22	4	87,8	53,7	9,8	97,6
					$p= 0,400$	$p= 0,020$	$p= 0,154$	$p= 1,000$
Raça								
Cruzada	32	31	7	9	96,9	21,9	28,1	96,9
Bravia	33	28	20	1	84,8	60,6	3,0	97
					$p= 0,197$	$p= 0,004$	$p= 0,006$	$p= 1,000$
Sexo								
Fêmea	62	56	26	9	90,3	41,9	14,5	96,8
Macho	3	3	1	1	100	33,3	33,3	100
					$p= 1,000$	$p= 1,000$	$p= 0,399$	$p= 1,000$
Idade								
Jovem	15	15	5	4	100	33,3	26,7	100
Adulto	50	44	22	6	88,0	44,0	12,0	96,0
					$p= 0,322$	$p= 0,662$	$p= 0,221$	$p= 1,000$
CC								
Magro	19	18	6	3	94,7	31,6	15,8	94,7
Normal	43	38	21	7	88,4	48,8	16,3	97,7
ND	3	-	-	-	-	-	-	-
					$p= 0,657$	$p= 0,324$	$p= 1,000$	$p= 0,522$
Total	65	59	27	10	90,8	41,5	15,4	96,9

CC – Condição corporal. N – *Nematodirus*. ND – Não Definido. n – Número. S – *Strongyloides*. T – Tipo Tricostongilídeo.

4.4. Avaliação da eficácia dos anti-helmínticos

De modo a avaliar a eficácia dos anti-helmínticos usados em cada exploração e detetar possíveis resistências a esses anti-helmínticos recorreu-se ao TRCOF e ao intervalo de confiança 95%. O método coprológico utilizado para determinar a COF de cada exploração foi o método de McMaster, com uma sensibilidade analítica de 100 opg.

Tendo em consideração o valor médio de COF de cada exploração, só foram desparasitados animais das explorações B e C.

a) Exploração A

Na exploração A procedeu-se à recolha de amostras fecais de 32 caprinos selecionados aleatoriamente e foi determinado o valor de COF pré-tratamento.

A COF média desta exploração foi de 132 opg pré-tratamento o que indicava um nível ligeiro de infeção, segundo Taylor et al. (2016).

Tendo em conta esse facto, e de acordo com Coles et al. (1992, 2006) está recomendado apenas o uso do cálculo do TRCOF em animais com COF pré-tratamento acima de 150 opg. Sendo assim, não se procedeu ao tratamento dos caprinos, com a administração de um antiparasitário, nem à COF pós-tratamento.

Assim, e dado que os animais estavam em geral com boa condição corporal e o nível de infeção era ligeiro, não foi necessário proceder à desparasitação do efetivo.

b) Exploração B

Na exploração B recolheram-se amostras fecais a 19 animais (ovinos e caprinos). Para o cálculo do TRCOF procedeu-se à COF pré-tratamento, pelo método de McMaster. Após análise dos resultados, seis dos animais apresentavam COF pré-tratamento abaixo dos 150 opg, não sendo, portanto, selecionados para tratamento, o que os coloca no grupo dos “não desparasitados”, com o objetivo de preservar uma população de parasitas *in refugia*. Os restantes 13 animais exibiam valores superiores a 150 opg, com uma COF média pré-tratamento de 769 opg. Assim, administrou-se fenbendazol por via oral aos 13 animais. Após 15 dias, como recomendado no caso dos benzimidazóis, recolheram-se novamente amostras fecais destes animais e procedeu-se à COF pós-tratamento, também pelo método de McMaster. A COF média pós-tratamento foi de 262 opg.

Aplicando a fórmula em baixo, obteve-se um TRCOF de 66%.

$$TRCOF = 100 \times \left(1 - \frac{\text{Média aritmética pós - tratamento (opg)}}{\text{Média aritmética pré - tratamento (opg)}}\right) = 100 \times \left(1 - \frac{262}{769}\right) = 66\%$$

As amostras de fezes (amostra agrupada) pré e pós-tratamento foram submetidas a coprocultura.

c) Exploração C

Na exploração C foram recolhidas amostras fecais de 14 ovinos e procedeu-se à COF pré-tratamento, pelo método de McMaster. O resultado de COF pré-tratamento de dois animais apresentava valores abaixo de 150 opg, logo estes animais foram selecionados para fazer parte do grupo da população *in refugia*. Não foi possível obter amostras fecais de 3 animais no pós-tratamento, pois já não se encontravam na exploração. Assim sendo, foram usadas as amostras de fezes de 9 animais, com uma COF média pré-tratamento de 578 opg.

O anti-helmíntico usado foi o fenbendazol, administrado por via oral e após 15 dias, como foram recolhidas novamente amostras fecais destes animais, e procedeu-se à COF pós-tratamento. A COF média pós-tratamento foi de 0 opg.

Aplicando a fórmula abaixo, obteve-se um TRCOF de 100%.

$$TRCOF = 100 \times \left(1 - \frac{\text{Média aritmética pós - tratamento (opg)}}{\text{Média aritmética pré - tratamento (opg)}}\right) = 100 \times \left(1 - \frac{0}{578}\right) = 100\%$$

O resultado de TRCOF na exploração C foi de 100%, o que indica que o fenbendazol nesta exploração foi eficaz.

A Tabela 6 apresenta, em resumo, as explorações em estudo neste trabalho, assim como o resultado do teste de sensibilidade ao antiparasitário.

Tabela 6 - Avaliação da eficácia do anti-helmíntico das explorações B e C.

Exploração	B	C
Espécies	Ovina e caprina	Ovina
Número de amostras	13	9
Anti-helmíntico	Fenbendazol	Fenbendazol
COF média pré-tratamento (opg)	769	578
COF média pós-tratamento (opg)	262	0
TRCOF (%)	66	100
Intervalo de confiança 95%	44,5 - 79,2	*
Nível de eficácia do antiparasitário	R	E

COF – Contagem de ovos fecais. E – Eficaz. TRCOF – Teste de redução da contagem de ovos fecais. R – Resistente.

* - Intervalo de confiança 95% não calculado pois o TRCOF foi de 100%.

4.5. Coprocultura (exploração B)

A realização da coprocultura permite a identificação morfológica das L3 dos nematodes gastrointestinais. Assim, na exploração B, tal como foi referido anteriormente, realizou-se coprocultura com as amostras fecais agrupadas utilizadas também para determinar o TRCOF, provenientes tanto do pré-tratamento, como do pós-tratamento com fenbendazol.

De modo a classificar as L3 de uma forma uniforme e clara, recorreu-se à chave de identificação dada por Bosco (2019) e de Van Wyk & Mayhew (2013). Numa primeira observação as L3 foram subdivididas de acordo com o comprimento da extremidade caudal (a extensão da bainha da cauda) em: cauda curta (*Trichostrongylus* spp. e *Teladorsagia* spp.), cauda média (*Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp.) e cauda comprida (*Oesophagostomum* spp. e *Chabertia* spp.).

Os resultados da coprocultura da exploração B estão descritos na Tabela 7. Devido à dificuldade de identificar e/ou diferenciar certas características morfológicas, foi necessário, em alguns casos, agrupar géneros.

Tabela 7 - Resultados da coprocultura das amostras fecais da exploração B pré e pós-tratamento com fenbendazol.

Gêneros	Nº L3 observadas pré-tratamento	Nº L3 observadas pós-tratamento
<i>Trichostrongylus</i>	21 (26,3%)	28 (66,7%)
<i>Teladorsagia</i>	22 (27,5%)	10 (23,8%)
<i>Trichostrongylus/Teladorsagia</i>	5 (6,3%)	1 (2,4%)
<i>Cooperia</i>	5 (6,3%)	1 (2,4%)
<i>Haemonchus</i>	8 (10,0%)	2 (4,8%)
<i>Cooperia/Haemonchus</i>	4 (5,0%)	-
<i>Oesophagostomum/Chabertia</i>	15 (18,8%)	-
Número total de larvas observadas	80	42

Antes do tratamento com fenbendazol, os animais apresentavam um vasto leque de gêneros de L3 de nematodes gastrointestinais, sendo que as pertencentes aos gêneros *Trichostrongylus* e *Teladorsagia* eram as que se destacam nas amostras fecais (26,3% e 27,5%, respectivamente). Mesmo após a aplicação do anti-helmíntico (pós-tratamento), a percentagem das L3 destes gêneros manteve-se elevada (66,7% e 23,8%, respectivamente).

Ambas as L3 dos gêneros *Trichostrongylus* (Figura 39) e *Teladorsagia* têm bainhas da cauda curtas, mas podem ser facilmente confundidas, pois a diferença entre elas é um ponto de inflexão muito subtil na extremidade cranial, característico do género *Teladorsagia* (Figura 40).



Figura 39 - Larva L3 do género *Trichostrongylus*. Ampliação 400x. Imagem gentilmente cedida pela Doutora Filipa Teixeira Rodrigues.

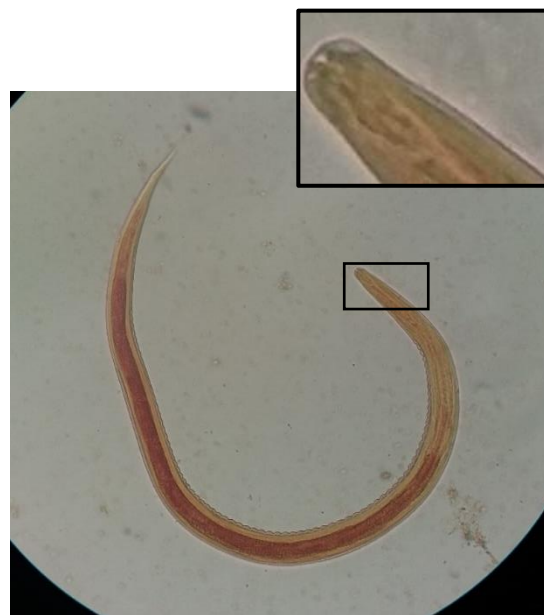


Figura 40 - Larva L3 do género *Teladorsagia*, com o pormenor da extremidade cranial. Ampliação 400x. Imagem gentilmente cedida pela Doutora Filipa Teixeira Rodrigues.

As larvas dos restantes géneros tiveram percentagens relativamente baixas no pré-tratamento, de tal forma que mesmo após a aplicação do anti-helmíntico estes valores continuaram reduzidos.

A diferenciação entre as L3 dos géneros *Haemonchus* (Figura 41) e *Cooperia* faz-se através da extremidade cranial, pela presença de dois corpos refráteis no género *Cooperia* (Figura 42) que não são visíveis no género *Haemonchus*.



Figura 39 - Larva L3 de *Haemonchus contortus*. Ampliação 400x. Original.



Figura 40 - Larva L3 do género *Cooperia*. Presença de dois corpos refráteis (círculo a preto). Ampliação 400x. Original.

As larvas dos géneros *Chabertia* e *Oesophagostomum* diferenciam-se pelo número de células intestinais, 28 a 32 e 18 a 22 respetivamente, mas por vezes pode ser difícil a sua correta observação e contagem (Figura 43).



Figura 41 - Larva L3 do género *Chabertia* ou *Oesophagostomum*. Ampliação 400x. Imagem gentilmente cedida pela Doutora Filipa Teixeira Rodrigues.

Perante os resultados obtidos do TRCOF da exploração B (66%), podemos concluir que as L3 de nematodes gastrointestinais observadas resultantes da coprocultura pós-tratamento, pertencem a géneros resistentes ao fenbendazol, neste caso os géneros *Trichostrongylus* e *Teladorsagia*. Assim, estes géneros podem, provavelmente, conter alelos de resistência aos benzimidazóis, passível de confirmação através de testes moleculares específicos.

5. Discussão

As parasitoses gastrointestinais em pequenos ruminantes são um importante desafio à saúde e bem-estar animal e potencialmente causadores de elevadas perdas produtivas e económicas na produção pecuária, principalmente em animais jovens (Claerebout et al., 2020). Assim, o controlo dessas doenças tem uma elevada importância e valorização. No entanto, atualmente o controlo destas parasitoses ainda recorre quase exclusivamente a tratamentos anti-helmínticos regulares. Esta estratégia é cada vez menos eficaz e promove o desenvolvimento de resistências (Vercruysse et al., 2018).

A realização deste estudo permitiu um melhor conhecimento sobre a utilização dos anti-helmínticos para controlo dos helmintes gastrointestinais em pequenos ruminantes, assim como a identificação de resistências destes parasitas aos mesmos.

Ruano et al. (2019) realizaram estudos com o objetivo de verificar a presença e prevalência de nematodes gastrointestinais em pequenos ruminantes no nordeste de Portugal. Em relação ao tema de resistências aos anti-helmínticos existe pouca informação disponível que sirva como comparação para este estudo.

No presente trabalho todas as amostras fecais foram recolhidas em ovinos e caprinos de explorações de montanha localizadas no Norte de Portugal, mais exatamente na serra do Marão e na serra da Aboboreira. Estes animais eram aparentemente saudáveis (não apresentavam sinais clínicos), aos quais era realizado desparasitações regulares, mas não se efetuava a COF regularmente.

Neste estudo foi observada uma prevalência geral de infeção por ovos do tipo tricostrongilídeo de 90,8%, por ovos de *Nematodirus* de 41,5% e por ovos de *Strongyloides* de 15,4%.

Após a comparação das proporções de positividade verificou-se que a espécie estava correlacionada com a presença de ovos de *Nematodirus*, verificando-se uma prevalência mais elevada nos caprinos do que nos ovinos. De acordo com Torres-Acosta & Hoste (2008), os caprinos são geralmente infetados mais gravemente do que os ovinos, pela sua menor capacidade de desenvolver uma forte resposta imunitária contra os nematodes gastrointestinais. Além disso, a metabolização dos anti-helmínticos nos caprinos é diferente, sendo que precisam de doses 1,5 a 5 vezes maiores para eliminar os nematodes gastrointestinais (Craig, 2009).

No que diz respeito à raça, verificou-se uma prevalência mais elevada de ovos de *Nematodirus* na raça Bravia do que na raça Cruzada. Para além disso, observou-se que a raça estava correlacionada com a presença de *Strongyloides*, verificando-se uma prevalência mais elevada na raça cruzada do que na Bravia. Segundo Tariq (2015), as diferentes raças de ovinos e caprinos apresentam suscetibilidade diferente à infeção por nematodes gastrointestinais. Por outro lado, Ruano et al. (2019) referem que a prevalência de nematodes gastrointestinais é mais elevada em raças exóticas do que em raças autóctones.

Relativamente à variável sexo não se observou diferenças significativas em relação à prevalência de ovos do tipo tricostrongilídeo, de *Nematodirus* ou de *Strongyloides*. Tariq (2015) refere que os pequenos ruminantes exibem maior prevalência e intensidade de infeção por helmintes gastrointestinais devido a fatores do próprio parasita, características específicas dos hospedeiros, como a resistência de origem genética, o género, a raça, a idade e a condição corporal do animal e fatores ambientais, como o clima, a disponibilidade de alimento, a densidade animal e o manejo.

Em relação à variável idade, não houve uma diferença significativa entre o grupo etário (jovens e adultos) e a presença de ovos de nenhuns dos três grupos de parasitas em estudo. Contudo, verificou-se uma elevada prevalência de ovos do tipo tricostrongilídeo e *Strongyloides* nos animais jovens, e uma elevada prevalência de ovos de *Nematodirus* nos adultos. Segundo Kumar et al. (2013), a suscetibilidade dos animais às infeções parasitárias varia com a idade, por isso é recomendado pastorear animais de diferentes faixas etárias em pastagens diferentes.

No que diz respeito à variável condição corporal não se observaram diferenças significativas entre as várias categorias e a prevalência dos ovos de parasitas em estudo. Contudo, verificou-se uma elevada prevalência de ovos do tipo tricostrongilídeo em animais magros. Também os animais com condição corporal normal apresentaram uma elevada prevalência de ovos de *Nematodirus* e *Strongyloides*.

Em relação às explorações em estudo, na exploração A, após a recolha das amostras fecais e determinação da COF pré-tratamento, verificou-se a presença de um nível ligeiro de infeção, ou seja, 132 opg. Coles et al. (1992, 2006) recomendam apenas o cálculo da TRCOF em animais cuja COF pré-tratamento seja acima de 150 opg, pois abaixo desse valor não se considera uma avaliação objetiva da sensibilidade do antiparasitário. Deste modo, não se administrou nenhum antiparasitário nesta exploração. El-Abdellati et al. (2010) alertam que o impacto da COF pré-tratamento na confiabilidade do TRCOF ainda está pouco estudado, mas sabe-se que depende

da sensibilidade analítica da técnica usada para determinar essas COF. Uma vez que o método de McMaster tem uma sensibilidade analítica de 50 opg poderá não detetar valores mais baixos, e, deste modo, afetar o resultado da fórmula para avaliar a eficácia do anti-helmíntico (Coles et al., 1992).

A diminuição da eficácia dos benzimidazóis, como é o caso do fenbendazol, foi identificada na exploração B. Segundo Coles et al., (1992), considera-se que existe resistência se a redução percentual na contagem de ovos for inferior a 95% e o limite inferior do intervalo de confiança de 95% for inferior a 90%. Na exploração B a redução percentual na contagem de ovos foi inferior a 95% (66%) e o limite inferior do intervalo de confiança de 95% foi inferior a 90% (44,5%). Perante estes resultados, confirma-se que na exploração B existe uma diminuição da eficácia do fenbendazol. Diversos estudos na Europa indicam que a resistência aos benzimidazóis nos nematodes gastrointestinais de pequenos ruminantes é comum (Baltrušis et al., 2018), com prevalências de quase 100% nas populações de vermes testados (Traversa & von Samson-Himmelstjerna, 2016).

Devido aos resultados do TRCOF na exploração B (66%) realizou-se coprocultura com amostras agrupadas, em que se observou que os géneros *Trichostrongylus* e *Teladorsagia*, apresentavam uma percentagem pós-tratamento de 66,7% e 23,8%, respetivamente. Na Europa, a resistência aos benzimidazóis, ao levamisol e às lactonas macrocíclicas foi observada em *H. contortus*, *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus* spp., e a multirresistência nesses três géneros está presente em pelo menos 10 países europeus (Claerebout et al., 2020). Papadopoulos et al. (2012) referem que a presença de nematodes gastrointestinais resistentes aos anti-helmínticos tem sido relatada repetidamente, em particular nos três géneros mais importantes de nematodes gastrointestinais, *Teladorsagia*, *Haemonchus* e *Trichostrongylus*. Também Ploeger & Everts (2018) detetaram que a resistência a benzimidazóis afetava principalmente os géneros *Teladorsagia* e *Trichostrongylus*, mas também, em 30% dos casos, o género *Haemonchus*. A observação de um possível desenvolvimento de resistência a benzimidazóis por *Teladorsagia circumcincta* é alarmante pois é uma das espécies de nematodes gastrointestinais mais prevalentes e virulentas.

De acordo com Palcy et al. (2010), a resistência a benzimidazóis em nematodes gastrointestinais surge quando a pressão de seleção é alta, de modo que os vermes suscetíveis são eliminados e apenas os resistentes sobrevivem ficando estes com vantagem reprodutiva.

Estes géneros podem conter alelos de resistência aos benzimidazóis, sendo isto possível de confirmar através de testes moleculares, como a PCR. No entanto, de acordo com Coles et

al. (2006) e von Samson-Himmelstjerna (2006), a resistência aos benzimidazóis é de tal forma comum em várias partes do mundo, que os testes moleculares são limitados a pesquisas e para a estruturação de estratégias de manejo para evitar ou retardar o desenvolvimento de resistências. Já Roeber et al. (2017) consideram que técnicas mais avançadas de PCR representam uma ferramenta ideal, que para além de poderem ser usadas em investigações epidemiológicas, podem auxiliar no diagnóstico de nematodes resistentes aos anti-helmínticos, em conjunto com os TRCOF, em pequenos ruminantes.

Na exploração C, os resultados do TRCOF foram de 100%, o que indica que o fenbendazol nesta exploração é eficaz. Segundo Coles et al. (1992), considera-se os parasitas são sensíveis ao anti-helmíntico se a redução percentual na contagem de ovos for inferior a 95% e o nível de confiança de 95% for inferior a 90%. Se estivermos perante um dos dois critérios, há suspeita de resistência. Neste caso, estamos perante uma redução percentual na contagem de ovos superior a 95% (100%). Assim, sendo consideramos que os parasitas presentes nos animais da exploração C apresentam elevada sensibilidade ao anti-helmíntico utilizado.

De acordo com a situação atual na Europa, Traversa & von Samson-Himmelstjerna (2016) indicam que as lactonas macrocíclicas, como a ivermectina e a moxidectina, são os anti-helmínticos mais eficazes, enquanto os benzimidazóis e os imidazotiazóis, como o levamisol, apresentam uma reduzida eficácia contra nematodes gastrointestinais em pequenos ruminantes.

Na exploração B e C recorreu-se a um tratamento seletivo direcionado (TSD), não se administrando o anti-helmíntico a alguns animais de modo a manter uma população parasitária *in refugia*, de acordo com a análise da COF. Esta abordagem permite o alívio da pressão seletiva para o aumento da resistência a anti-helmínticos (Traversa & von Samson-Himmelstjerna, 2016). Assim, o objetivo do controlo das principais parasitoses gastrointestinais dos pequenos ruminantes nunca é com vista à erradicação total dos parasitas, mas sim manter os níveis de infeção em valores relativamente razoáveis (população *in refugia* sem pressão seletiva), de modo a reduzir a mortalidade e as perdas produtivas (leite e carne) associadas a elevados níveis de infeção.

A comparação das taxas de prevalência de resistência a anti-helmínticos entre os países europeus é difícil de estabelecer, uma vez que a prevalência estimada varia entre regiões e classe de anti-helmínticos utilizados. Contudo, a resistência foi identificada em 16 países europeus (Rose et al., 2015). Em Espanha, a presença de resistência aos benzimidazóis apresenta valores entre 18 a 35%. Os principais géneros envolvidos na resistência são *Teladorsagia* e *Trichostrongylus* (Papadopoulos et al., 2012). Palcy et al. (2010) referem que em França,

Trichostrongylus axei foi identificada como resistente aos benzimidazóis em dois grupos de pequenos ruminantes. Na Bélgica e na Holanda, os valores de prevalência de resistência a benzimidazóis são de 73% (Ploeger & Everts, 2018). Papadopoulos et al. (2012) aludem que na Grécia, *Teladorsagia* spp. é o nematode gastrointestinal que mais afeta pequenos ruminantes e 16% destes géneros estudados foram considerados resistentes aos benzimidazóis. De acordo com o estudo realizado por Claerebout et al., (2020) em explorações de ovinos na Bélgica, verificou-se a presença de resistência aos benzimidazóis em todas as explorações onde foi usado este anti-helmíntico.

A resistência simultânea a várias classes de anti-helmínticos (“multi-drug resistance”) foi descrita em 10 países da Europa (Rose et al., 2015). Os resultados do estudo de Ploeger e Everts (2018) sugere que a resistência a múltiplos anti-helmínticos está disseminada em explorações holandesas de ovinos.

No presente trabalho, os resultados obtidos podem não ser representativos da população real, dado que apenas foi incluído no estudo um grupo exclusivo de explorações, com um número relativamente baixo de amostras fecais, de tal forma que não podemos extrapolar completamente os dados em populações com efetivos maiores. No entanto, pode ser considerado um estudo preliminar, fornecendo informações relevantes para estudos futuros.

Os resultados deste estudo confirmam a importância da elaboração de programas de controlo parasitário baseado em critérios clínicos e epidemiológicos, de modo a aumentar a sustentabilidade do controlo de parasitas em rebanhos. Nesse contexto, e de acordo com Cezar et al. (2010), os tratamentos devem ser aplicados na frequência mínima viável e acompanhados de medidas de manejo, de forma a desacelerar o desenvolvimento das resistências.

Vercruysse et al. (2018) referem que até 2030 ainda se dependerá de anti-helmínticos como forma de tratamento, mas de uma forma muito mais seletiva. Isto deve-se ao facto de se terem tornado disponíveis abordagens de controlo mais avançadas e a utilização de melhores ferramentas de diagnóstico, que permitem a adoção de estratégias de tratamento seletivo direcionado.

As infeções por nematodes gastrointestinais são uma restrição importante à produção eficiente dos pequenos ruminantes, dado que a maior parte das perdas económicas deve-se a efeitos subclínicos que não são imediatamente percebidos pelos proprietários (Jabbar et al., 2006). Estima-se que o custo anual das infeções por estes parasitas é de vários milhões de euros, em que 81% desse custo é devido a perdas de produção e 19% devido aos custos do tratamento

anti-helmíntico. O custo anual das infecções por helmintes gastrointestinais resistentes é estimado em 38 milhões de euros (Charlier et al., 2020).

De modo a manter a produtividade e reduzir os riscos para a saúde pública devem ser implementados cuidados veterinários eficazes e vigilância epidemiológica de rotina, assim como a construção de campanhas educativas reforçadas sobre zoonoses (Ruano et al., 2019).

O controlo das infecções por helmintes gastrointestinais poderá ser melhorado através de medidas direccionadas, entre elas os tratamentos direccionados, com a correta aplicação do anti-helmíntico. O médico veterinário tem um papel importante a desempenhar na melhoria das medidas a adequar, assim como no fornecimento de conselhos específicos e apropriados para a exploração e as ferramentas de diagnóstico a realizar. O uso de testes de eficácia dos anti-helmínticos, como a COF após o tratamento, melhoraria a consciência dos produtores sobre a presença de resistência nas explorações, o que facilitaria o desenvolvimento de estratégias de controlo mais adequadas (Morgan et al., 2012).

IV. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Este estudo incidiu sobre a identificação das infeções provocadas por nematodes gastrointestinais que afetam pequenos ruminantes em explorações de montanha no Norte de Portugal, bem como sobre a avaliação da eficácia dos anti-helmínticos e identificação de possíveis resistências.

Foram observadas diferenças significativas em relação à espécie e raça correlacionada com a presença de ovos de *Nematodirus*. Os caprinos da raça Bravia apresentaram uma maior prevalência de ovos deste género. Para além disso, a raça apresentava-se correlacionada com a presença de ovos de *Strongyloides*, verificando-se uma prevalência mais elevada na raça Cruzada do que na raça Bravia.

Os resultados da avaliação da eficácia do anti-helmíntico utilizado indicam que na exploração B o fenbendazol não foi eficaz. Após coprocultura das amostras fecais pós-tratamento desta mesma exploração, foram observadas L3 de *Trichostrongylus* spp., e *Teladorsagia circumcincta*.

O desenvolvimento de resistências aos anti-helmínticos é uma consequência inevitável do uso de anti-helmínticos. Nas últimas décadas tem havido um uso excessivo e irracional de anti-helmínticos por várias razões. Devido ao custo relativamente baixo em comparação com o benefício potencial e a busca pela maximização da produtividade, o uso frequente e consistente de anti-helmínticos tornou-se uma prática comum. No entanto, agora aprendemos a “verdade inconveniente” sobre as consequências. Dado que o desenvolvimento de resistência aos anti-helmínticos quase certamente ultrapassará a introdução de novas classes de medicamentos, agora e no futuro, os programas de controlo do parasitismo devem ser projetados para que o seu uso seja mais sustentável e muito menos intensivo. Além disso, a COF e os TRCOF devem ser um componente de rotina dos programas de controlo e prevenção. Apenas quando se adotar uma abordagem racional, baseada em evidências para o controlo parasitário com a sustentabilidade como objetivo, a indústria pecuária poderá garantir que os medicamentos anti-helmínticos permanecerão eficazes no futuro.

Embora o presente trabalho possa ser considerado um estudo preliminar, em Portugal são necessários mais estudos sobre o desenvolvimento de resistências aos anti-helmínticos e de que maneira é que esta temática irá afetar futuramente a maneira como mantemos a população parasitária estável, bem como uma boa população *in refugia*.

No futuro, as estratégias de controlo sustentável para nematodes gastrointestinais de pequenos ruminantes requerem uma abordagem integrada que inclua programas de controlo do parasitismo de maneira a introduzir “melhores práticas” e reduzir o uso indiscriminado de anti-helmínticos, de modo a minimizar a pressão de adaptação dos parasitas, assim como uso de ferramentas de diagnóstico, de forma a melhorar a tomada de decisões.

V. BIBLIOGRAFIA

- Abbott, K. A., Taylor, M. A., & Stubbings, L. A. (2012). *Sustainable Worm Control Strategies for Sheep: A Technical Manual for Veterinary Surgeons and Advisers* (4th edn). <https://www.scops.org.uk/workspace/pdfs/scops-technical-manual-4th-edition-updated-september-2013.pdf>
- Aimulajiang, K., Cao, M., Liao, S., Naqvi, M. A.-H., Tian, X., Li, Z., Lu, M., Lakho, S. A., Li, X., Xu, L., Song, X., & Yan, R. (2020). Development and Potential Application of Ras Domain Containing Protein from *Haemonchus contortus* for Diagnosis of Goat Infection. *Animals*, 10(1), 138. <https://doi.org/10.3390/ani10010138>
- Baltrušis, P., Halvarsson, P., & Höglund, J. (2018). Exploring benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* by next generation sequencing and droplet digital PCR. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 8(3), 411–419. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.09.003>
- Bartley, D. J. (2008). *Prevalence, characterisation and management of anthelmintic resistance in gastro-intestinal nematodes of Scottish sheep* [The University of Edinburgh, Edinburgh, UK]. https://www.researchgate.net/publication/228736030_Prevalence_characterisation_and_management_of_anthelmintic_resistance_in_gastro-intestinal_nematodes_of_Scottish_sheep
- Bath, G. F., & van Wyk, J. A. (2009). The Five Point Check© for targeted selective treatment of internal parasites in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 86(1–3), 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.09.009>
- Besier, R. B., Kahn, L. P., Sargison, N. D., & van Wyk, J. A. (2016a). Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. *Advances in Parasitology*, 93, 181–238. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.024>
- Besier, R. B., Kahn, L. P., Sargison, N. D., & van Wyk, J. A. (2016b). The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. *Advances in Parasitology*, 93, 95–143. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.022>
- Bosco, A. (2019). Coproculture and morphological identification of third stage larvae (L3) of gastrointestinal nematodes in ruminants. *COMBAR - Combating Anthelmintic Resistance in Ruminants*, 23.
- Bosco, A., Rinaldi, L., Maurelli, M. P., Musella, V., Coles, G. C., & Cringoli, G. (2014). The comparison of FLOTAC, FECPAK and McMaster techniques for nematode egg counts in cattle. *Acta Parasitologica*, 59(4), 625–628. <https://doi.org/10.2478/s11686-014-0282-7>
- Bowman, D. (2014). *Georgis' Parasitology for Veterinarians* (10th Ed.). Elsevier, St. Louis, Saunders.
- Cezar, A. S., Toscan, G., Camillo, G., Sangioni, L. A., Ribas, H. O., & Vogel, F. S. F. (2010). Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. *Veterinary Parasitology*, 173(1–2), 157–160. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.013>
- Charlier, J., Morgan, E. R., Rinaldi, L., vvan Dijk, J., Demeler, J., Höglund, J., Hertzberg, H.,

- van Ranst, B., Hendrickx, G., Vercruysse, J., & Kenyon, F. (2014). Practices to optimise gastrointestinal nematode control on sheep, goat and cattle farms in Europe using targeted (selective) treatments. In *Veterinary Record* (Vol. 175, Issue 10, pp. 250–255). British Veterinary Association. <https://doi.org/10.1136/vr.102512>
- Charlier, J., Rinaldi, L., Musella, V., Ploeger, H. W., Chartier, C., Vineer, H. R., Hinney, B., von Samson-Himmelstjerna, G., Băcescu, B., Mickiewicz, M., Mateus, T. L., Martinez-Valladares, M., Quealy, S., Azaiz, H., Sekovska, B., Akkari, H., Petkevicius, S., Hektoen, L., Höglund, J., ... Claerebout, E. (2020). Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*, 182, 105103. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105103>
- Charlier, J., Thamsborg, S. M., Bartley, D. J., Skuce, P. J., Kenyon, F., Geurden, T., Hoste, H., Williams, A. R., Sotiraki, S., Höglund, J., Chartier, C., Geldhof, P., van Dijk, J., Rinaldi, L., Morgan, E. R., von Samson-Himmelstjerna, G., Vercruysse, J., & Claerebout, E. (2018). Mind the gaps in research on the control of gastrointestinal nematodes of farmed ruminants and pigs. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(November), 217–234. <https://doi.org/10.1111/tbed.12707>
- Claerebout, E., De Wilde, N., van Mael, E., Casaert, S., Velde, F. Vande, Roeber, F., Veloz, P. V., Levecke, B., & Geldhof, P. (2020). Anthelmintic resistance and common worm control practices in sheep farms in Flanders, Belgium. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 20, 100393. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100393>
- Coles, G. C. (2002). Sustainable use of anthelmintics in grazing animals. *Veterinary Record*, 151(6), 165–169. <https://doi.org/10.1136/vr.151.6.165>
- Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H. M., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A., & Waller, P. J. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44(1–2), 35–44. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90141-U](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90141-U)
- Coles, G. C., Jackson, F., Pomroy, W. E., Prichard, R. K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M. A., & Vercruysse, J. (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. In *Veterinary Parasitology* (Vol. 136, Issues 3–4, pp. 167–185). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.11.019>
- Craig, T. M. (2009). Helminth Parasites of the Ruminant Gastrointestinal Tract. In *Current Veterinary Therapy* (pp. 78–91). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-141603591-6.10022-3>
- Cringoli, G., Maurelli, M. P., Levecke, B., Bosco, A., Vercruysse, J., Utzinger, J., & Rinaldi, L. (2017). The Mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals. *Nature Protocols*, 12(9), 1723–1732. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.067>
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Albonico, M., Bergquist, R., & Utzinger, J. (2013). Geospatial (s)tools: Integration of advanced epidemiological sampling and novel diagnostics. *Geospatial Health*, 7(2), 399–404. <https://doi.org/10.4081/gh.2013.97>
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M. P., & Utzinger, J. (2010). FLOTAC: New multivalent

- techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nature Protocols*, 5(3), 503–515. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.235>
- Dobson, R. J., Hosking, B. C., Jacobson, C. L., Cotter, J. L., Besier, R. B., Stein, P. A., & Reid, S. A. (2012). Preserving new anthelmintics: A simple method for estimating faecal egg count reduction test (FECRT) confidence limits when efficacy and/or nematode aggregation is high. *Veterinary Parasitology*, 186(1–2), 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.049>
- Domke, A. V. M., Chartier, C., Gjerde, B., Höglund, J., Leine, N., Vatn, S., & Stuen, S. (2012). Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep and goats in Norway. *Parasitology Research*, 111(1), 185–193. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2817-x>
- El-Abdellati, A., Charlier, J., Geldhof, P., Levecke, B., Demeler, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Claerebout, E., & Vercruysse, J. (2010). The use of a simplified faecal egg count reduction test for assessing anthelmintic efficacy on Belgian and German cattle farms. *Veterinary Parasitology*, 169(3–4), 352–357. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.015>
- Fleming, S. A., Craig, T., Kaplan, R. M., Miller, J. E., Navarre, C., & Rings, M. (2006). Anthelmintic resistance of gastrointestinal parasites in small ruminants. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(2), 435–444. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2006\)20\[435:AROGPI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2006)20[435:AROGPI]2.0.CO;2)
- Godber, O. F., Phythian, C. J., Bosco, A., Ianniello, D., Coles, G., Rinaldi, L., & Cringoli, G. (2015). A comparison of the FECPAK and Mini-FLOTAC faecal egg counting techniques. *Veterinary Parasitology*, 207(3–4), 342–345. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.029>
- Gordon, H. M., & Whitlock, H. V. (1939). A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research.*, 12(1), 50–52.
- Jabbar, A., Iqbal, Z., Kerboeuf, D., Muhammad, G., Khan, M. N., & Afaq, M. (2006). Anthelmintic resistance: The state of play revisited. In *Life Sciences* (Vol. 79, Issue 26, pp. 2413–2431). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.08.010>
- Kenyon, F., Rinaldi, L., McBean, D., Pepe, P., Bosco, A., Melville, L., Devin, L., Mitchell, G., Ianniello, D., Charlier, J., Vercruysse, J., Cringoli, G., & Levecke, B. (2016). Pooling sheep faecal samples for the assessment of anthelmintic drug efficacy using McMaster and Mini-FLOTAC in gastrointestinal strongyle and Nematodirus infection. *Veterinary Parasitology*, 225, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.03.022>
- Kumar, N., Rao, T. K. S., Varghese, A., & Rathor, V. S. (2013). Internal parasite management in grazing livestock. In *Journal of Parasitic Diseases* (Vol. 37, Issue 2, pp. 151–157). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12639-012-0215-z>
- Mesquita, J., Esteves, F., Santos, C., Mega, C., Coelho, C., Cruz, R., Vala, H., & Vasconcelos-Nóbrega, C. (2017). ABC series on diagnostic parasitology part 1: the Willis method. *The Veterinary Nurse*, 8(7), 398–402. <https://doi.org/10.12968/vetn.2017.8.7.398>
- Morgan, E., Charlier, J., Hendrickx, G., Biggeri, A., Catalan, D., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Müller, E., van Dijk, J., Kenyon, F., Skuce, P., Höglund, J., O’Kiely, P.,

- van Ranst, B., de Waal, T., Rinaldi, L., Cringoli, G., Hertzberg, H., Torgerson, P., ... Vercruysse, J. (2013). Global Change and Helminth Infections in Grazing Ruminants in Europe: Impacts, Trends and Sustainable Solutions. *Agriculture*, 3(3), 484–502. <https://doi.org/10.3390/agriculture3030484>
- Morgan, E. R., Hosking, B. C., Burston, S., Carder, K. M., Hyslop, A. C., Pritchard, L. J., Whitmarsh, A. K., & Coles, G. C. (2012). A survey of helminth control practices on sheep farms in Great Britain and Ireland. *Veterinary Journal*, 192(3), 390–397. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.08.004>
- Morgan, E. R., & van Dijk, J. (2012). Climate and the epidemiology of gastrointestinal nematode infections of sheep in Europe. *Veterinary Parasitology*, 189(1), 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.028>
- O'Connor, L. J., Walkden-Brown, S. W., & Kahn, L. P. (2006). Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. In *Veterinary Parasitology* (Vol. 142, Issues 1–2, pp. 1–15). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.035>
- Palcy, C., Silvestre, A., Sauve, C., Cortet, J., & Cabaret, J. (2010). Benzimidazole resistance in *Trichostrongylus axei* in sheep: Long-term monitoring of affected sheep and genotypic evaluation of the parasite. *Veterinary Journal*, 183(1), 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.09.012>
- Papadopoulos, E. (2008). Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Ruminant Research*, 76(1–2), 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.12.012>
- Papadopoulos, E., Gallidis, E., & Ptochos, S. (2012). Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A selected review. *Veterinary Parasitology*, 189(1), 85–88. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.036>
- Peña-Espinoza, M., Thamsborg, S. M., Demeler, J., & Enemark, H. L. (2014). Field efficacy of four anthelmintics and confirmation of drug-resistant nematodes by controlled efficacy test and pyrosequencing on a sheep and goat farm in Denmark. *Veterinary Parasitology*, 206(3–4), 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.10.017>
- Ploeger, H. W., & Everts, R. R. (2018). Alarming levels of anthelmintic resistance against gastrointestinal nematodes in sheep in the Netherlands. *Veterinary Parasitology*, 262, 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.09.007>
- Rinaldi, L., Catelan, D., Musella, V., Cecconi, L., Hertzberg, H., Torgerson, P. R., Mavrot, F., de Waal, T., Selemetas, N., Coll, T., Bosco, A., Biggeri, A., & Cringoli, G. (2015). *Haemonchus contortus*: Spatial risk distribution for infection in sheep in Europe. *Geospatial Health*, 9(2), 325–331. <https://doi.org/10.4081/gh.2015.355>
- Rinaldi, L., Hendrickx, G., Cringoli, G., Biggeri, A., Ducheyne, E., Catelan, D., Morgan, E., Williams, D., Charlier, J., von Samson-Himmelstjerna, G., & Vercruysse, J. (2015). Mapping and modelling helminth infections in ruminants in Europe: Experience from GLOWORM. *Geospatial Health*, 9(2), 257–259. <https://doi.org/10.4081/gh.2015.347>
- Rinaldi, L., Levecke, B., Bosco, A., Ianniello, D., Pepe, P., Charlier, J., Cringoli, G., & Vercruysse, J. (2014). Comparison of individual and pooled faecal samples in sheep for the assessment of gastrointestinal strongyle infection intensity and anthelmintic drug efficacy using McMaster and Mini-FLOTAC. *Veterinary Parasitology*, 205(1–2), 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.06.011>

- Rinaldi, L., Morgan, E. R., Bosco, A., Coles, G. C., & Cringoli, G. (2014). The maintenance of anthelmintic efficacy in sheep in a Mediterranean climate. *Veterinary Parasitology*, 203(1–2), 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.006>
- Roeber, F., Jex, A. R., & Gasser, R. B. (2013a). Next-Generation Molecular-Diagnostic Tools for Gastrointestinal Nematodes of Livestock, with an Emphasis on Small Ruminants. A Turning Point? In *Advances in Parasitology* (Vol. 83, pp. 267–333). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407705-8.00004-5>
- Roeber, F., Jex, A. R., & Gasser, R. B. (2013b). Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. In *Biotechnology Advances* (Vol. 31, Issue 8, pp. 1135–1152). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.008>
- Roeber, F., Morrison, A., Casaert, S., Smith, L., Claerebout, E., & Skuce, P. (2017). Multiplexed-tandem PCR for the specific diagnosis of gastrointestinal nematode infections in sheep: an European validation study. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2165-x>
- Rose, H., Rinaldi, L., Bosco, A., Mavrot, F., de Waal, T., Skuce, P., Charlier, J., Torgerson, P. R., Hertzberg, H., Hendrickx, G., Vercruysse, J., & Morgan, E. R. (2015). Widespread anthelmintic resistance in European farmed ruminants: a systematic review. *Veterinary Record*, 176(21), 546–546. <https://doi.org/10.1136/vr.102982>
- Ruano, Z. M., Carolino, N., Mateus, T. L., & Ruano, Z. (2017). Gastrointestinal parasites as a threat to grazing sheep. In *Animal Review* (Vol. 23).
- Ruano, Z. M., Cortinhas, A., Carolino, N., Gomes, J., Costa, M., & Mateus, T. L. (2019). Gastrointestinal parasites as a possible threat to an endangered autochthonous Portuguese sheep breed. *Journal of Helminthology*, 94, e103. <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000968>
- Sargison, N. D., Wilson, D. J., & Scott, P. R. (2012). Observations on the epidemiology of autumn nematodiosis in weaned lambs in a Scottish sheep flock. *Veterinary Record*, 170(15), 391. <https://doi.org/10.1136/vr.100145>
- Shalaby, H. A. (2013). Anthelmintics resistance; how to overcome it? *Iranian Journal of Parasitology*, 8(1), 18–32. <http://ijpa.tums.ac.ir>
- Tariq, K. A. (2015). A Review of the Epidemiology and Control of Gastrointestinal Nematode Infections of Small Ruminants. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 85(2), 693–703. <https://doi.org/10.1007/s40011-014-0385-9>
- Taylor, M. A. (2012). Emerging parasitic diseases of sheep. *Veterinary Parasitology*, 189(1), 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.027>
- Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2016). *Veterinary Parasitology* (4th ed.). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781119073680>
- Torres-Acosta, J. F. J., & Hoste, H. (2008). Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 77(2–3), 159–173. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.03.009>
- Traversa, D., & von Samson-Himmelstjerna, G. (2016). Anthelmintic resistance in sheep

- gastro-intestinal strongyles in Europe. In *Small Ruminant Research* (Vol. 135, pp. 75–80). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.12.014>
- Urban, J., Tauchen, J., Langrova, I., & Kokoska, L. (2014). In vitro motility inhibition effect of Czech medicinal plant extracts on *Chabertia ovina* adults. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 21(2), 3293–3302. <http://www.m.elewa.org/JAPS>;
- van Dijk, J., & Morgan, E. R. (2008). The influence of temperature on the development, hatching and survival of *Nematodirus battus* larvae. *Parasitology*, 135(2), 269–283. <https://doi.org/10.1017/S0031182007003812>
- van Wyk, J. A. (2001). Refugia - Overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 68(1), 55–67. <https://repository.up.ac.za/handle/2263/18482>
- van Wyk, J. A., Cabaret, J., & Michael, L. M. (2004). Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. *Veterinary Parasitology*, 119(4), 277–306. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.11.012>
- van Wyk, J. A., & Mayhew, E. (2013). Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 80(1), 14 pages. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v80i1.539>
- Vasconcelos-Nóbrega, C., Santos, C., Mega, C., Coelho, C., Cruz, R., Vala, H., Esteves, F., & Mesquita, J. (2017). ABC series on diagnostic parasitology part 2: the McMaster method. *The Veterinary Nurse*, 8(8), 458–462. <https://doi.org/10.12968/vetn.2017.8.8.458>
- Vercruysse, J., Charlier, J., van Dijk, J., Morgan, E. R., Geary, T., von Samson-Himmelstjerna, G., & Claerebout, E. (2018). Control of helminth ruminant infections by 2030. *Parasitology*, 145(13), 1655–1664. <https://doi.org/10.1017/S003118201700227X>
- von Samson-Himmelstjerna, G. (2006). Molecular diagnosis of anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 136(2), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.12.005>
- von Samson-Himmelstjerna, G., Walsh, T. K., Donnan, A. A., Carrière, S., Jackson, F., Skuce, P. J., Rohn, K., & Wolstenholme, A. J. (2009). Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing. *Parasitology*, 136(3), 349–358. <https://doi.org/10.1017/S003118200800543X>
- Willis, H. H. (1921). A SIMPLE LEVITATION METHOD FOR THE DETECTION OF HOOKWORM OVA. *Medical Journal of Australia*, 2(18), 375–376. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1921.tb60654.x>
- Zajac, A. M. (2006). Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants: Life Cycle, Anthelmintics, and Diagnosis. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 22, Issue 3, pp. 529–541). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2006.07.006>