

REVISTA BRASILEIRA DE
BUIATRIA



ISSN 2763-955X

Volume IV - 2021

EXAMES COMPLEMENTARES



Associação Brasileira
de Buiatria



EXAMES COPROPARASITOLÓGICOS EM RUMINANTES: UMA ABORDAGEM ESPAÇO-TEMPORAL

COPROPARASITOLOGICAL EXAMS OF RUMINANTS: A SPATIAL-TEMPORAL METHODOLOGY

Marcelo Beltrão Molento^{1,2,3} , Desiree Vera Pontarolo^{1,2} , Luciana Salini Abrahão Pires^{1,2} , Julia Dall'Anese^{1,2} ,
Douglas Luís Vieira^{1,2} , Yara de Oliveira Brandão^{1,3} , Ursula Yaeko Yoshitani Thomaz de Aquino^{1,4} 

RESUMO

O bem-estar de ruminantes, bovinos, ovinos, caprinos e bubalinos, incluindo animais selvagens, depende de um estado de equilíbrio entre nutrição, ambiente/ambiência e a condição sanitária dos animais. Para que estas condições sejam atendidas, temos a responsabilidade de suprir estes animais com a ausência de doença, utilizando os melhores protocolos sanitários disponíveis. Neste contexto, as infecções parasitárias estão presentes em todas as regiões do planeta e a manutenção da boa saúde dos ruminantes, tem sido um desafio. Os primeiros cuidados em saúde têm como base a rotina de exames clínicos específicos para cada espécie, contando ainda com amplo apoio laboratorial. O diagnóstico das endoparasitoses tem evoluído muito, desde os novos métodos de exames coproparasitológicos (ex. Mini-FLOTAC), a automação dos processos, como também o uso de técnicas imunológicas e moleculares, como os ensaios usando a PCR em Tempo Real (qPCR), entre outras novidades. Os exames têm a função de determinar a prevalência das infecções nos rebanhos e diagnosticar parasitoses em seu caráter individual, antes da decisão pelo tratamento ou não, reconhecendo a importância do fenômeno de densidade-dependência e o caráter individual de alta ou baixa resiliência animal. Neste artigo, o objetivo foi revisar e apresentar as principais técnicas coproparasitológicas disponíveis, integrando o conhecimento clínico das infecções parasitárias para auxiliar técnicos ligados à área de Buiatria no Brasil e em todos os países da América Latina e Caribe. Um dos principais problemas na tomada de decisão sobre o tratamento é a alarmante falta de eficácia dos medicamentos, após décadas de uso em massa e sem acompanhamento técnico especializado. Para isto, incluímos um tópico especial dedicado ao tema de resistência dos fármacos e o teste de eficácia dos medicamentos. Foram acrescentadas também, algumas técnicas complementares, como a coprocultura e a necropsia, que são fundamentais no processo de diagnóstico parasitológico confirmatório, incluindo a Medicina Veterinária forense. Veterinários/as devem abordar todas as doenças com responsabilidade, tendo um olhar holístico (amplo e complexo para a suspeita clínica), pois somente assim, será possível identificar as possibilidades de diagnóstico e sugerir métodos de controle viáveis, possibilitando um estado de saúde adequado e com alto grau de bem-estar animal.

Palavras-chave: amostras de fezes, animais de fazenda, endoparasitos, infecções helmintos, teste de eficácia.

ABSTRACT

The welfare of ruminants, cattle, sheep, goats and buffaloes, including wild animals, depends of a state of equilibrium between nutrition, the environment, and the sanitary condition of the animals. To meet all these conditions, we have the responsibility to offer the safety of the animals, using the best available health-related protocols. In this context, parasite infections are present in all regions of the world and to keep the health of ruminants has been a challenge. The first health care must be done using specific clinical exams to each species as a routine using a wide range of laboratorial support. The diagnostic of endoparasites has evolved considerably, from the new fecal exam coprological methods (i.e. Mini-FLOTAC), the automation of the process, as well as immunological and molecular techniques using Real-Time PCR assays (qPCR), among other innovations. These exams have the objective to determine the prevalence of the infections in the herd and flocks, to diagnose parasites, before deciding whether or not to treat the animal, recognizing the phenomena of density-dependent and the individual high or low resilience. In the present article, the objective was to revise and present the most important available coproparasitological techniques, integrating the clinical knowledge of parasitic diseases to help field professionals working in the Buiatric field in Brazil and in all Latin America and the Caribbean countries. One of the main problems in the decision making for the treatment is the alarming lack of efficacy of the compounds, after decades of suppressive use and the almost absence of technical orientation. Therefore, we have included a special topic dedicated to cover drug resistance and the efficacy test of products. It has been also included some complementary techniques, such as larval culture and necropsy, which are important in the process of confirmatory parasitological diagnosis, including forensic Veterinary Medicine. Veterinarians must confront the diseases responsibly with a holistic approach (wide and complex clinical evidence), because that is the only way he or she will be capable to identify the best diagnose and suggest feasible methods for control, monitoring animal health with high level of welfare.

Keywords: efficacy test, endoparasites, helminth infections, fecal samples, livestock.

1 Laboratório de Parasitologia Clínica Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil.

2 Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil.

3 Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia (PPMPP), Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil.

4 Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal (PPGPV), Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil.



Autor para correspondência:
molento@ufpr.br

Revista Brasileira de Buiatria
Exames Complementares,
Volume 4, Número 1, 2021

ISSN 2763-955X

DOI:10.4322/2763-955X.2021.020



Associação Brasileira
de Buiatria



INTRODUÇÃO

A cabra, *Capra aegagrus* – *C. a. hircus*, subespécie, foi a primeira espécie animal domesticada, há cerca de 8.000 anos a.c.¹. Desde então, diversos outros ruminantes passaram por este processo, tal como o gayal (*Bos frontalis*), rena, iaque, búfalo, ovino e o bovino Asiático (*B. indicus*) e o Europeu (*B. taurus*), sendo utilizados para transporte e como fonte de alimento, ganhando importância e se tornando item de trocas comerciais¹. O papel destas espécies, sobretudo de bovinos, caprinos, bubalinos e ovinos, e sua relação com seres humanos, acompanhou o desenvolvimento da sociedade e dos sistemas econômicos, tendo sua importância reconhecida principalmente em países que tinham a agropecuária como um dos pilares da economia. Ao se promover a saúde e o bem-estar destes animais, observa-se uma diminuição das doenças e um menor risco para o rebanho, com consequente aumento de sua importância para as comunidades.

A presença de endo e ectoparasitos em ruminantes é responsável por grave infecção, que pode causar um profundo estado de apatia, anemia e mortalidade de animais jovens. Neste âmbito, a manutenção de ruminantes com baixa incidência de parasitos (endo e ectoparasitos, incluindo protozoários e helmintos), apresenta-se como um grande desafio. No Brasil, os nematodas gastrintestinais representam perdas anuais de U\$ 7,1 bilhões segundo Grisi et al.². Uma doença menos diagnosticada como a fasciolose bovina, pode representar um impacto de U\$ 210 milhões por ano no Brasil³ e dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN), apontam gastos de aproximadamente U\$ 100 milhões/ano com antiparasitários, apenas para o rebanho bovino⁴.

As estratégias de controle parasitário são complexas e dependem do correto diagnóstico clínico e laboratorial dos animais, das diferenças inerentes ao ciclo biológico de cada helminto e das variações ambi-

entais e climáticas de cada região. Um impacto adicional deve ainda ser determinado, quando as espécies parasitárias são causadoras de zoonoses. Outra questão relevante é a opção pelo controle químico de parasitos e a quantidade e qualidade destes⁵, dada a ampla variedade de produtos com princípio ativo e concentrações semelhantes, porém com diferenças na sua qualidade e procedência. O técnico responsável pelos cuidados dos animais deve ter profundo conhecimento de todas estas relações e saber interpretar estes achados, para fornecer um serviço diferenciado e com o foco na melhoria das condições de saúde dos animais. Entendemos que os prejuízos relatados acima podem ser evitados, caso exista uma melhor interação e compromisso dos agentes envolvidos (veterinários, zootecnistas, produtores, indústria farmacêutica veterinária) com os animais, tendo um olhar holístico, de maior responsabilidade e pró-atividade.

Complementando as abordagens acima, o conceito “Rainha de Copas” (CRC) utilizado na área de genética evolutiva, tem a origem em uma cena do livro “Através do Espelho”, que é a segunda aventura da menina Alice, escrito por Lewis Carroll em 1871. O conceito ilustra como a coevolução pode parecer algo linear, porém pode não caminhar de modo tão rápido, com ganhos quase nulos. A ampliação do CRC aceita que ambas as espécies, parasito e hospedeiro, possam andar juntas por muito tempo, porém permanecessem evolutivamente no mesmo lugar. Extrapolando o CRC para a realidade na buiatria, ao tentar usar as melhores formas de controle parasitário, porém com as mesmas ferramentas e os mesmos propósitos antigos, poderemos andar muito e ter a sensação de estar sempre resolvendo os mesmos problemas (ex. presença de parasitos com tratamentos) (Figura 1), fechando um círculo vicioso. Isto indica claramente que devemos utilizar os melhores recursos laboratoriais e químicos, com conhecimento necessário para alcançar e melhorar o controle parasitário e ter animais saudáveis. Por isto, a tomada de decisão deve ser focada em atender a

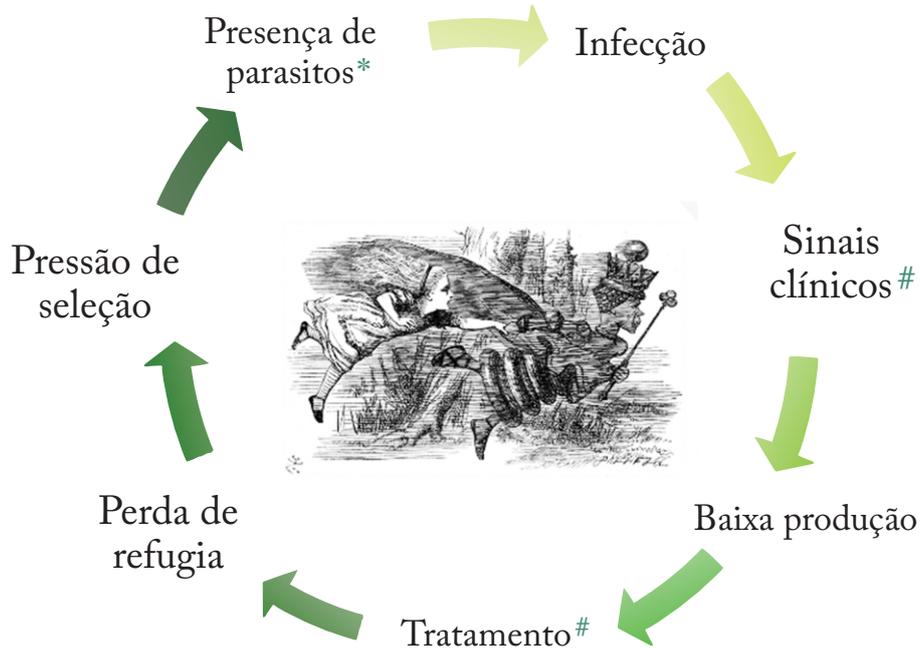


Figura 1. O conceito “Rainha de Copas” aplicado à saúde animal. Sequência de eventos com desafios frequentes para a presença de parasitos. Mesmo utilizando técnicas de controle, não existe a resolução do problema e a presença de parasitos (*) reaparece após algum tempo, com gasto de recursos fundamentais (ex. seleção de parasitos e morte dos animais). Exames coproparasitológicos podem ser realizados durante este processo (#), para identificar os agentes e determinar o sucesso do tratamento (Uso livre da imagem interna da figura pelo programa Creative Commons, licença: CC BY-CA).

demanda da saúde dos animais, sendo necessário obter dados sanitários, considerando os aspectos individuais e do ambiente.

■ Relação parasito-hospedeiro

A interação parasito-hospedeiro pode ser bastante complexa, levando a diferentes intensidades de parasitismo nos animais (Figura 2A). Tais interações são influenciadas por fatores ligados à densidade dos animais e sua capacidade de mobilidade, idade (animais jovens são mais afetados, enquanto bovinos adultos têm imunidade etária significativa), comportamento e estado nutricional⁶. Deve-se incluir ainda alguns fatores ambientais nas diferentes estações do ano, considerando a capacidade dos parasitos de instalação e desenvolvimento nos seus hospedeiros, tendo ultrapassado

as barreiras, fisiológicas e imunes, impostas por eles⁷.

Um dos melhores exemplos da interação parasito-hospedeiro é observado em ovinos parasitados por *Haemonchus contortus* (ver descrição abaixo). Em decorrência desta infecção e da espoliação sanguínea e proteica que este parasito ocasiona, os animais podem apresentar alterações clínicas como, edema submandibular e palidez da conjuntiva ocular, avaliada pelo método FAMACHA (Figura 2B). É interessante pontuar, entretanto, a existência de uma variação individual na apresentação de tais sinais, sendo possível, a longo prazo, identificar aqueles animais no rebanho que apresentem estes sinais clínicos com maior ou menor intensidade e frequência, podendo avaliar um animal sensível (graus 3, 4 e 5) de um animal resiliente (graus 1 e 2).

Em seu trabalho com sessenta ovinos Santa Inês, em Sousa, Paraíba, Longo et al.⁸, demonstraram

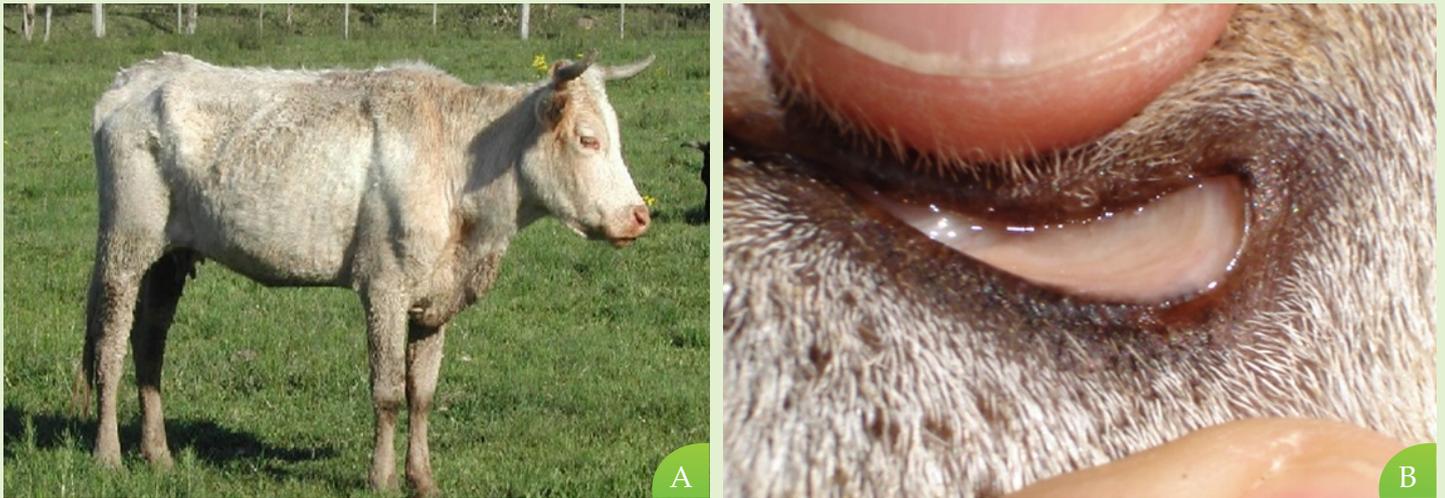


Figura 2. Avaliação clínica em ruminantes. (A) Vaca em estado avançado de fraqueza e baixo escore corporal (< 2,0) e (B) ovelha adulta em avançado estado de anemia, com mucosas profundamente pálidas (FAMACHA, grau 5) (Fotos: MB Molento).

uma alta correlação (> 0.8) entre a estação chuvosa (março a junho), a contagem de ovos de parasitos por grama de fezes (OPG) e a ocorrência de casos clínicos por *H. contortus*. Foi relatado que 27 (3%) animais foram tratados durante o período chuvoso e somente três durante a seca, avaliando o estado de anemia pelo método FAMACHA. Os autores identificaram ainda a influência da idade e estado fisiológico, uma vez que animais jovens (cordeiros) e fêmeas lactantes apresentaram uma maior contagem de OPG ($P < 0,05$), quando comparados com animais adultos mais resilientes.

■ Coevolução e resiliência do animal: a epigenética na parasitologia

A existência de hospedeiros resilientes pode ser, em parte, atribuído a um processo de coevolução com o parasito, onde um deles apresenta respostas evolutivas ao desafio imposto pelo outro, como no CRC. O desenvolvimento deste processo depende de alterações genéticas, bem como de modificações epigenéticas. Por exemplo, a suplementação alimentar que contenha aminoácidos como a metionina ou a arginina, com vitaminas do complexo B ou até mesmo com metais (ex. cobre e zinco), que estão presentes em formula-

ções comerciais de sal mineral, podem provocar modificações em mecanismos epigenéticos, resultando em alterações na produção de gametas, e melhor desenvolvimento do embrião e da prole.

A epigenética é um campo de estudo da biologia que visa elucidar como as condições ambientais interferem em características visíveis, detectáveis e herdáveis. Mecanismos epigenéticos são responsáveis também pela modulação do sistema imune do hospedeiro frente a infecções, tornando-o mais ou menos suscetível àquele agente⁹. Nos parasitos, eventos epigenéticos têm papel, por exemplo, na alternância de forma evolutiva entre taquizoíta e bradizoíta de *Toxoplasma gondii*, no desenvolvimento das larvas de *H. contortus* e no desenvolvimento de resistência aos anti-parasitários^{10,11}.

Aplicações de marcadores epigenéticos já ocorrem na prática médica, sobretudo para o diagnóstico, prognóstico e tratamento de câncer. No contexto do diagnóstico e tratamento de doenças parasitárias, tendo em vista o crescente problema de resistência a anti-helmínticos, utilizar modificações epigenéticas como marcadores para identificar animais suscetíveis ou resilientes, servir como alvo de drogas (“epidrugs”) antiparasitárias ou ainda desenhar drogas que estimu-



lem a resposta do hospedeiro contra os parasitos, tem se tornado uma meta cada vez mais promissora¹².

Embora o estudo de epigenética na relação parasito-hospedeiro seja uma área bastante interessante para o desenvolvimento de alternativas no controle parasitário e possa ainda ser aplicada a longo prazo para a seleção de um rebanho mais resiliente e com melhor condição sanitária, ainda são poucas as pesquisas que exploram este tema, sendo sua vasta maioria limitada a doenças parasitárias exclusivas de humanos ou de importância zoonótica em Saúde Única (ex. Toxoplasmose).

PARASITOS GASTRINTESTINAIS DE RUMINANTES

Nematoides gastrintestinais são os parasitos mais frequentemente encontrados em ruminantes no mundo todo, especialmente em animais de pastejo. Muito embora exista grande diferença entre a preva-

lência destes parasitos e as regiões climáticas, a infecção quase sempre tem caráter subclínico (> 80%), podendo em casos graves, causar alta morbidade (< 20%) e baixa mortalidade (< 2%). As infecções parasitárias normalmente são mistas e compreendem diversas famílias e gêneros, afetando vários órgãos (ex. pulmão, abomaso, fígado e intestinos).

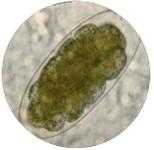
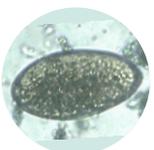
No Quadro 1, apresentamos uma descrição detalhada dos parasitos mais representativos (ovos de estrongilídeos são muito semelhantes), incluindo a patogenicidade e os sinais clínicos causados.

Muito embora a identificação clínica de animais doentes seja o ideal, é evidente que os sinais das parasitoses descritos para cada gênero parasitário têm grande semelhança. Sendo assim, enfatizamos a importância da realização de técnicas diagnósticas como a OPG e a coprocultura, que têm objetivos importantes como, a avaliação individual das contagens, a identificação de gêneros e espécies dos parasitos e ainda a possibilidade de realizar o teste de eficácia de medicamentos³⁵.

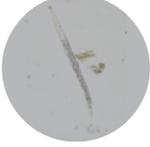
Quadro 1. Descrição do gênero e espécies de parasitos, espécies hospedeiros, patogenicidade, sinais clínicos e formas de diagnóstico.

Agente	Espécies e Hospedeiros	Patogenicidade	Sinais Clínicos	Diagnóstico
 <p><i>Haemonchus contortus</i> <i>H. placei</i></p>	Ruminantes domésticos (ovinos, caprinos, bovinos e bubalinos) ^{13,14} e selvagens.	Parasitos adultos provocam lesões no abomaso, quando este se insere na mucosa do órgão, levando à perda de sangue. Nas infecções graves são observadas úlceras na mucosa abomasal com infiltrado de leucócitos polimorfonucleares ¹⁵ .	Palidez de mucosa, anemia, hipoproteinemia, perda excessiva de ferro e edema submandibular, além de fraqueza, fezes escurecidas, anorexia, caquexia e inapetência, podendo levar o animal à morte ^{16,17} .	Sinais clínicos, OPG, seguida de coprocultura e/ou necropsia.
 <p><i>Ostertagia</i> spp.</p>	Principais espécies presentes em algumas regiões do Brasil, <i>Ostertagia ostertagi</i> e <i>O. trifurcata</i> (bovinos e bubalinos) e <i>Teladorsagia circumcincta</i> , anteriormente <i>O. circumcincta</i> (principalmente ovinos e caprinos ¹⁸), porém não são comuns no país.	Causam lesões no abomaso, danificando glândulas gástricas e causando distúrbios digestivos ¹⁹ .	Falta de apetite, diarreia, perda de peso, podendo levar o animal à morte.	Idade (pré-desmame ou acima de um ano), sinais clínicos, estação do ano e histórico de pastejo. A ostertagiose do tipo I, pode ocorrer durante o período de primeira pastagem nos animais jovens e a do tipo II, somente após meses da ingestão de larvas, as quais entrarão em hipobiose e retornarão gradualmente a se desenvolver em condições ambientais favoráveis. Identificação de ovos na OPG e de larvas. Presença de anticorpos específicos no leite (ELISA), determinação de pepsinogênio sanguíneo e alterações macroscópicas na necropsia ²⁰⁻²² .
 <p><i>Teladorsagia</i> sp.</p>				



 <p><i>Trichostrongylus</i> spp.</p>	<p>As espécies mais relevantes são <i>Trichostrongylus axei</i> e <i>T. colubriformis</i>, muito comuns em rebanhos leiteiros²³.</p>	<p>Acometem o abomaso (<i>T. axei</i>) e intestino delgado (<i>T. colubriformis</i>). A larva de <i>T. axei</i>, penetra no hospedeiro, interferindo na produção de ácido gástrico, causando gastrite catarral, com desenvolvimento de úlceras no abomaso. Os adultos de <i>T. colubriformis</i> penetram na mucosa e causam erosão intestinal²⁴.</p>	<p>Em níveis mais baixos de infecção, ocorre inapetência e baixo índice de crescimento, acompanhado de fezes amolecidas²⁵.</p> <p><i>T. axei</i>: conforme a severidade da infecção, podem aparecer edemas, diarreia, irritação da mucosa e caquexia</p> <p><i>T. colubriformis</i>: enterite catarral com abundante secreção de muco, diminuição do peristaltismo, má digestão e hipoproteïnemia, seguido de hipoalbuminemia²⁴.</p>	<p>Sinais clínicos, OPG, seguida de coprocultura e/ou necropsia.</p>
 <p><i>Bunostomum</i> spp.</p>	<p>A espécie <i>B. trigonocephalum</i>, parasita o intestino delgado de bovinos, e apesar de descrita^{26,27}, apresenta pouca relevância no país.</p>	<p>Quando ingeridos ou por penetração ativa na pele, migram através do sistema circulatório e pulmão, para finalmente se estabelecer no duodeno como adultos. Estes, prendem-se à mucosa intestinal e se alimentam de sangue.</p>	<p>Anemia, perda de peso, edema submandibular e morte em casos de infecções maciças²⁸. Podem ocasionar diarreia escurecida devido à perda de sangue no duodeno¹⁸.</p>	<p>Sinais clínicos, OPG e identificação da larva.</p>
 <p><i>Cooperia</i> spp.</p>	<p><i>Cooperia punctata</i> e <i>C. oncophora</i> (maior incidência em bovinos) e <i>C. pectinata</i> e <i>C. curticei</i>, (maior incidência em pequenos ruminantes).</p>	<p>O contato com as vilosidades intestinais causa irritação, aumentando o peristaltismo, prejudicando assim a absorção, levando à diarreia¹⁸. Ainda, nos animais parasitados, identifica-se espessamento de mucosa e hipersecreção de muco ao longo do intestino delgado.</p>	<p>Diarreia em infecções maciças, a perda de apetite e perda de peso²⁹.</p>	<p>Sinais clínicos, OPG, seguida de coprocultura e/ou necropsia.</p>
 <p><i>Strongyloides</i> sp.</p>	<p>São comuns em ruminantes e a principal espécie é o <i>Strongyloides papillosus</i>.</p>	<p>Após serem ingeridos, os parasitos migram para o sistema circulatório, pulmões e traqueia, de onde atingem o esôfago e são deglutidos. As fêmeas adultas se desenvolvem no intestino delgado.</p>	<p>Diarreia e anorexia, mais prevalentes em animais jovens³⁰. Pode ocorrer a penetração per-cutânea da larva, que quando acontece na área interdigital e/ou coronária pode predispor à podridão dos cascos³¹.</p>	<p>Sinais clínicos, OPG, seguida de coprocultura e/ou necropsia.</p>
 <p><i>Oesophagostomum</i> spp.</p>	<p><i>Oesophagostomum columbianum</i> e <i>O. radiatum</i> que afetam bovinos, ovinos, caprinos e bubalinos³²⁻³⁵.</p>	<p>É uma zoonose, sendo responsável por causar enterite e nódulos no intestino delgado e grosso³⁶.</p>	<p>Diarreia verde-escura com rápida perda de peso, edema submandibular, anorexia e emagrecimento.</p>	<p>Sinais clínicos e exame post-mortem.</p> <p>Quadro agudo: baixa OPG</p> <p>Fase crônica: ovos e larvas que podem ser identificadas por meio de coprocultura.</p>
 <p><i>Fasciola hepatica</i></p>	<p>Tem como principal espécie nas Américas a <i>Fasciola hepatica</i>. Este agente parasita a maioria dos mamíferos (ruminantes, equinos, capivaras, humanos etc). Muitos destes novos hospedeiros ainda estão no início da relação parasito-hospedeiro sofrendo muito com a fasciolose.</p>	<p>É um trematoda, transmitido pela ingestão de alimentos (ex. pastagem, rúcula, agrião) contaminados. O parasito é encontrado no parênquima hepático e vesícula biliar e quando encapsulado, pode ser encontrado nos pulmões e outros órgãos. As lesões (patogenia) incluem, atrofia do parênquima hepático por fibrose com espessamento e calcificação do revestimento interno dos</p>	<p>Sinais clínicos variam conforme a fase de desenvolvimento, sendo que a fasciola jovem evolui e faz migração, invadindo o epitélio. Causa queda no escore corporal, baixo desempenho reprodutivo, em casos agudos; fraqueza e edema submandibular. Em pequenos</p>	<p>Sinais clínicos, histórico prévio de fasciolose na propriedade, identificação de caramujos no local e ELISA (sangue, leite ou fezes). Contagem e identificação de ovos pelas técnicas de sedimentação e Quatro Tamises⁴⁰.</p>



		ductos biliares ^{37,38} .	ruminantes causa; redução da qualidade da lã e da produção de leite, perda de peso, aumento da conversão alimentar e morte súbita ³⁹ .	
 <p><i>Dictyocaulus</i> spp.</p>	A principal espécie deste gênero é <i>Dictyocaulus viviparus</i> que habita a traqueia e os brônquios de ruminantes.	A infecção pode levar a doenças clínicas, subclínicas ou graves. Muitas larvas invadindo os pulmões podem resultar em reinfeção, apresentando resposta inflamatória imunomediada grave.	Podem apresentar infecção bacteriana secundária que resulta em pneumonia, tosse, dispneia e pode levar o animal à morte ⁴¹ .	Sinais clínicos e histórico de pastejo. Larvas podem ser encontradas nas fezes através do exame de Baermann e lesões nos pulmões na necropsia ⁴² .
 <p><i>Moniezia</i> spp.</p>	Principais espécies que acometem ruminantes são a <i>Moniezia expansa</i> e a <i>M. benedenia</i> .	Cestoda que parasita o intestino delgado e eliminam suas proglótides em cadeia ou isoladas, juntamente com as fezes de seus hospedeiros ⁴³ .	Causam perda na produção de leite e carne em infecções graves, com raros episódios de mortalidade nos animais.	Epidemiologia, histórico do animal, sinais clínicos e OPG.

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

Existem diversos tipos de testes que podem ser empregados para o diagnóstico coproparasitológico. Incluímos ainda a técnica de necropsia e testes *in vitro*.

■ Exame parasitológico de fezes

Deve-se considerar três fases no exame parasitológico de fezes: a fase pré-analítica, analítica e pós-analítica.

Fase pré-analítica: atenção e cuidados

A fase pré-analítica equivale a todos os procedimentos realizados desde a coleta da amostra fecal até a sua chegada ao laboratório e seu processamento. Preferencialmente, a coleta de vinte a cinquenta gramas de fezes (equivalente a uma a três colheres de sopa), deve ser feita diretamente da ampola retal do animal (Figura 3).

O material deverá ser acondicionado em frascos limpos, ou na própria luva, ambos devidamente

fechados e identificados. Para pequenos ruminantes, recomenda-se a coleta de dez a vinte cíbalas de fezes, suficientes para OPG e coprocultura. As amostras devem ser imediatamente colocadas sob refrigeração (4°C), porém jamais congeladas. O envio ao laboratório deve ser em caixa térmica com gelo gel e ocorrer no menor tempo possível (até 24 horas). O exame deverá ser realizado em até quatro dias após a coleta do material, mantendo a amostra sob refrigeração (4°C).

Caso o armazenamento seja feito em frasco plástico, é importante completar o frasco com fezes para criar um ambiente de “quase” anaerobiose ou vácuo (em saco plástico) ao fechar. Assim o material poderá ficar sem refrigeração durante o transporte, por até cinco dias. A coleta de fezes do solo pode ser feita com cuidado, caso seja difícil coletar do animal ou não haja instalações apropriadas, evitando coletar material vegetal ou areia, que podem conter nematodas de vida livre e dificultar a leitura. É importante que o laboratório seja informado quanto à data da coleta, data do último tratamento anti-helmíntico e o princípio ativo utilizado, assim como a suspeita clínica e o exame requerido.



Figura 3. Coleta de fezes em ovinos e envio das amostras para análise. (A) Modo de contenção e coleta de fezes diretamente da ampola retal. (B) Materiais necessários para armazenamento e transporte de amostras de fezes, da esquerda para direita: gelo-gel, caixa de isopor e amostra de fezes. (C) Duas alternativas para coleta de fezes, com pote coletor e diretamente na luva de procedimento (Fotos: LSA Pires, DL Vieira e J Dall' Anese).

Fase analítica: técnicas e suas aplicações específicas

• *Contagem de ovos por grama de fezes (OPG)*

O exame coproparasitológico, aliado ao exame clínico do paciente, é a forma mais importante de diagnóstico das parasitoses gastrintestinais em ruminantes. O objetivo é determinar a OPG, que além da quantificação dos ovos no indivíduo, permite monitorar a eficácia dos antiparasitários.

A técnica mais difundida e utilizada para OPG é o método com a câmara McMaster (Figura 4A), proposto por Gordon e Whitlock⁴⁴.

Nesta técnica, a câmara é preenchida com um preparado da amostra fecal em solução hipersaturada de cloreto de sódio (NaCl), (Figura 5) com densidade de 1:1.200 g/ml e levada para observação em microscópio óptico. Através desta análise, é possível quantificar

rapidamente os ovos presentes na amostra. Este resultado, associado aos sinais clínicos do animal, poderá sugerir a origem da doença e indicar o componente parasitário.

A técnica deve ser executada visando uma sensibilidade de 25 OPG, pesando quatro gramas de fezes em 26 ml de solução. É possível utilizar esta diluição e conversão para todas as espécies animais quando for usar a câmara McMaster. Recentemente, a técnica com a câmara Mini-FLOTAC foi apresentada e difundida. A nova câmara alcança a sensibilidade de 5 OPG, oferecendo boa acurácia e confiabilidade ao resultado, reduzindo as contagens falso-negativas⁴⁵. A técnica Mini-FLOTAC, combina um método de flutuação, com uma translação, onde a amostra é colocada em um dispositivo em forma de disco com duas câmaras (Figura 4B) e, em seguida, visualizada em microscópio óptico (Figura 4C). Este procedimento não requer cen-



Figura 4. Sequência da preparação da amostra fecal para a leitura em microscópio óptico, para contagem de ovos de parasitos em câmara McMaster e Mini-FLOTAC. (A) Materiais e etapas do processamento da amostra, (B) câmaras Mini-FLOTAC (esquerda) e McMaster (direita) e (C) leitura da câmara Mini-FLOTAC (Fotos: LSA Pires e J Dall' Anese).



Figura 5. Preparo de solução saturada de cloreto de sódio (NaCl). (A) Materiais necessários para o preparo da solução, da esquerda para direita: água destilada, (quantidade suficiente para: QSP até 1 litro) sal comum (375g de cloreto de sódio, NaCl) e frasco com solução já preparada. (B) Frasco Erlenmeyer com água destilada + NaCl sob agitação mecânica por 10 minutos para homogeneização da solução (Fotos: LSA Pires e DL Vieira).

trifugação e, uma vez que permite a fixação da amostra, pode ser armazenado para que o processamento ocorra em dias ou até mesmo semanas após a coleta⁴⁶. As duas técnicas apresentadas são quali-quantitativas, de fácil utilização, laboriosas e de baixo custo.

É importante ressaltar que ao longo do ano, a

contagem de OPG sofre variações entre as diferentes categorias animais e de acordo com as variações climáticas de cada região, como demonstrado por Longo et al.⁸. Os autores identificaram a maior contagem de OPG em cordeiros, durante os meses com maiores índices pluviométricos. Outro ponto importante é a



possibilidade de termos animais que manifestem a densidade-dependente, reforçando que o exame de fezes deve estar aliado com a clínica do animal, pois contagens baixas de OPG poderão vir de animais com severo comprometimento clínico (ver maiores detalhes abaixo).

• *Exame direto de fezes*

Esta é, sem dúvida, a técnica coproparasitológica mais simples e básica no laboratório. É qualitativa e consiste em solubilizar uma pequena quantidade de

fezes em água ou solução fisiológica, em lâmina e lamínula, realizando a leitura em microscopia óptica (Figura 6). Apresenta como vantagens a facilidade de preparo e a não necessidade de equipamentos sofisticados para sua elaboração. Além disso permite sua execução tanto em laboratório, como a campo. No entanto, esta técnica apresenta como desvantagens a baixa sensibilidade e especificidade. Portanto, no caso de resultados negativos é aconselhável a realização de uma nova lâmina ou de outra técnica coproparasitológica para complementação do resultado.



Figura 6. Sequência do preparo do exame direto de fezes. (A) Materiais necessários para realização da técnica, da esquerda para direita: haste flexível (swab), lâmina de microscopia e amostra de fezes. (B) e (C) Demonstração de montagem de lâmina, onde com o auxílio de swab deve-se colocar uma gota do material (fezes solubilizadas em água) sobre a lâmina e cobrir com lamínula. (D) Realização da leitura da lâmina em microscopia óptica (Fotos:LSA Pires e DL Vieira).



• *Técnica de flutuação de Willis*

A técnica de Willis é um método coproparasitológico qualitativo que se fundamenta na propriedade dos ovos de algumas espécies de helmintos (ex. estrongilídeos), oocistos e cistos de protozoários, flutuarem para a superfície em soluções inertes de peso elevado (solução saturada de sacarose ou cloreto de sódio), aderindo-se a lamínula no topo do frasco⁴⁷ (Figura 7).

Para que isso ocorra, é necessário que o peso da

solução seja mais elevado que o peso do ovo/oocisto. Essa técnica possui como vantagens a facilidade de sua realização por necessitar de equipamentos e materiais comuns em qualquer laboratório, como microscópio, lâmina e lamínula, além de ter boa sensibilidade. No entanto, apresenta a desvantagem de apresentar apenas resultados qualitativos. O sistema de cruces pode ser utilizado para definir de forma indireta o grau de infecção, que pode ser de insignificante (+) até extraordinária (++++), avaliando os campos no microscópio.



Figura 7. Sequência do preparo da técnica de flutuação de Willis. (A) Materiais necessários para realização da técnica: solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), ao centro da esquerda para direita: amostra de fezes, frasco de borel e peneira; abaixo: bastão de vidro. (B) Solubilização da amostra de fezes em solução de NaCl, com auxílio de bastão de vidro para transporte e filtração do material para o frasco de borel. (C) Demonstração de lâmina sobre o menisco reverso no frasco de borel, após quinze minutos deve-se realizar a leitura da lâmina em microscopia óptica (Fotos: LSA Pires e DL Vieira).



• *Técnica de centrífugo-flutuação de Faust et al.*⁴⁸

Esse é um método rotineiro para pesquisa de cistos de *Giardia* spp., além de ser sensível também para ovos leves de helmintos e de oocistos de protozoários, como os pertencentes aos gêneros *Cystoisospora*, *Eimeria* (Figura 8) e *Sarcocystis*, que são importantes

para a saúde de ruminantes⁴⁸. Entretanto, a técnica de centrífugo-flutuação necessita de equipamentos mais sofisticados, como uma centrífuga (Figura 9).

É uma técnica qualitativa (positivo ou negativo), tendo alguma importância para a tomada de decisão clínica, principalmente nos casos de diarreias ocasionadas por infecções parasitárias.

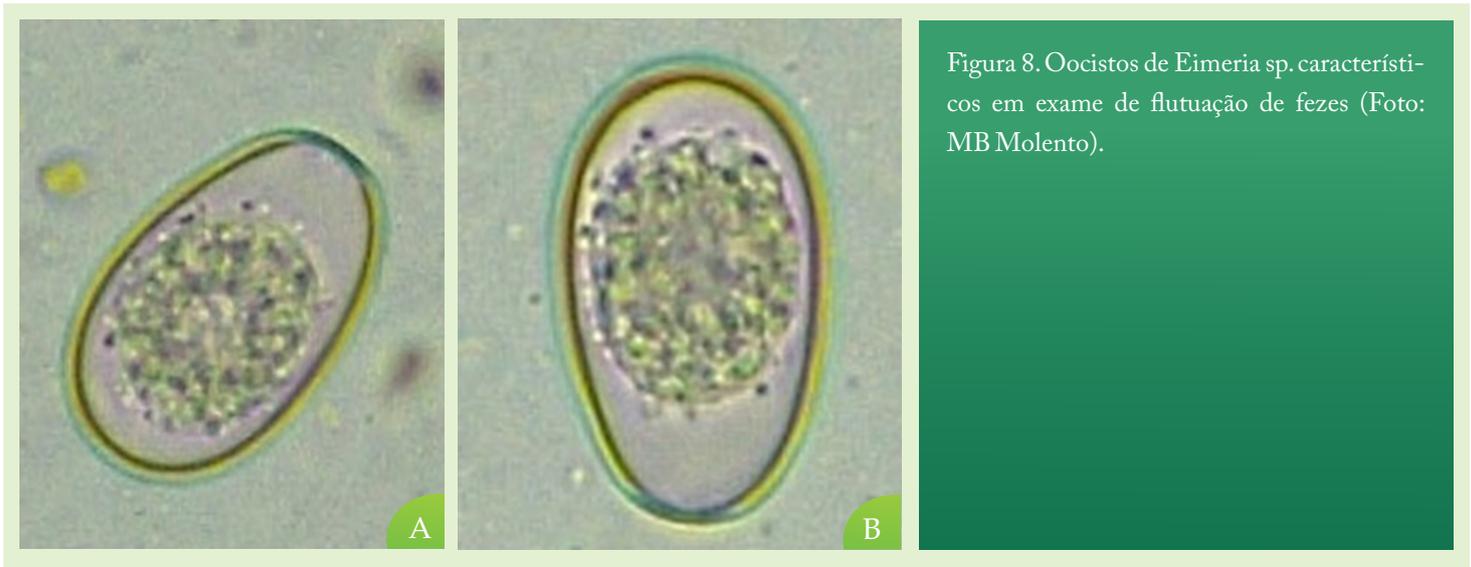


Figura 8. Oocistos de *Eimeria* sp. característicos em exame de flutuação de fezes (Foto: MB Molento).

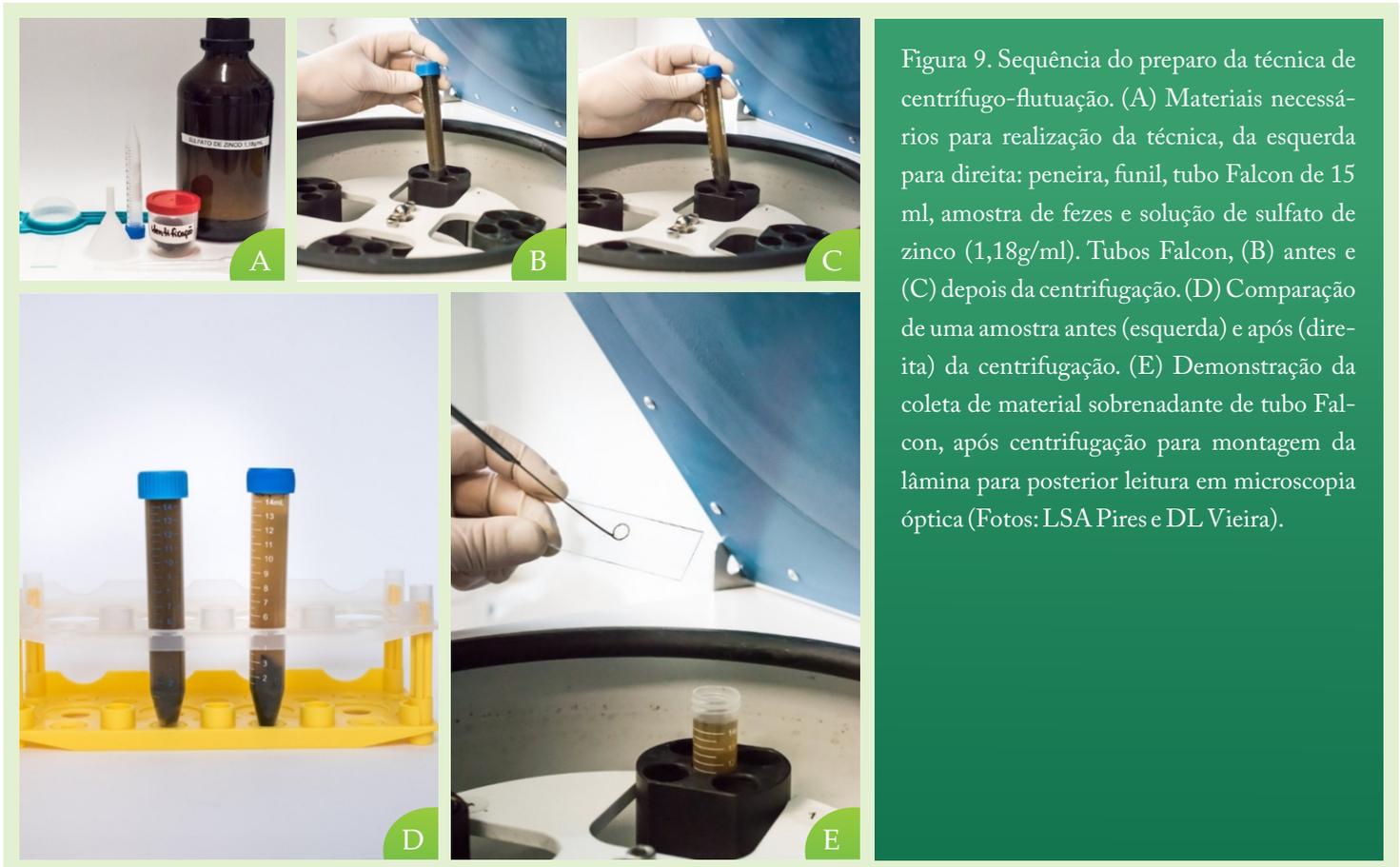


Figura 9. Sequência do preparo da técnica de centrífugo-flutuação. (A) Materiais necessários para realização da técnica, da esquerda para direita: peneira, funil, tubo Falcon de 15 ml, amostra de fezes e solução de sulfato de zinco (1,18g/ml). Tubos Falcon, (B) antes e (C) depois da centrifugação. (D) Comparação de uma amostra antes (esquerda) e após (direita) da centrifugação. (E) Demonstração da coleta de material sobrenadante de tubo Falcon, após centrifugação para montagem da lâmina para posterior leitura em microscopia óptica (Fotos: LSA Pires e DL Vieira).



- *Técnica de sedimentação espontânea de Hoffmann et al.*⁴⁹

Utilizada para identificação das diversas infecções parasitárias, como ovos e larvas de helmintos, cistos de protozoários e na triagem das infecções intestinais. É indicada principalmente para a detecção de ovos pesados como de cestódeos, de parasitos do gênero *Fasciola* e de larvas de *Dictyocaulus* spp⁴⁹. A técnica de sedimentação espontânea, baseia-se no fato dessas estruturas parasitárias sedimentarem em água (Figura 10), sendo possível sua observação em microscopia óptica. Como vantagens, esta técnica qualitativa apresenta a não necessidade de centrifugação e de reagentes, além de fácil execução e baixo custo. Nessa técnica, os organismos são sedimentados pela gravidade. A sedimentação apresenta uma ação contrária, quando comparada com a flutuação, onde cistos, oocistos, ovos e larvas são retidos no fundo do recipiente, enquanto os detritos serão suspensos na superfície, não interferindo

no diagnóstico final.

- *Técnica de centrifugo-flutuação de Stoll*⁵⁰

A técnica de Stoll é qualitativa e quantitativa, utilizada para obter um resultado mais preciso da OPG, por usar um menor fator de conversão (x2 ou x5), usando uma maior quantidade de amostra de fezes⁵⁰. Além disso, a centrifugação pela qual a amostra passa e a utilização de solução hipersaturada de sacarose como soluto, permite a separação de ovos mais pesados (ex. cestodas), que muitas vezes não seriam identificados pelo método de Gordon e Whitlock⁴⁴. Apresenta como vantagem, uma maior sensibilidade em comparação com as técnicas rotineiras de OPG, no entanto é uma técnica trabalhosa e que depende de maior estrutura laboratorial.

- *Técnica de Baermann*⁵¹

Baermann é um método de análise coproparasitológica que detecta larvas vivas, a partir de hidrotro-



Figura 10. Sequência do preparo da técnica de sedimentação espontânea de Hoffmann et al.⁴⁹. (A) Materiais necessários para o preparo da técnica, da esquerda para direita: amostra de fezes, cálice de sedimentação com fezes solubilizadas em água, água destilada, abaixo: peneira. (B) Coleta de material sedimentado com auxílio de pipeta Pasteur. O material deve ser depositado em lâmina de vidro com lamínula, para posterior leitura em microscopia óptica (Fotos: LSA Pires e DL Vieira).



Figura 11. Sequência do preparo da técnica de Baermann. (A) Cálice de sedimentação com aparato e amostra de fezes para recuperação de larvas. (B) Representação da coleta de material sedimentado com auxílio de pipeta Pasteur, material deve ser depositado em lâmina para posterior leitura em microscopia óptica (Fotos: LSA Pires e DL Vieira).

pismo e termotropismo positivo⁵¹. Usualmente utilizada para detecção de larvas de parasitos dos gêneros *Strongyloides*, *Aelurostrongylus* e *Dictyocaulus*, pode também ser usada para outras larvas de estrongilídeos. Consiste em um teste qualitativo direto (Figura 11). Como a eliminação de larvas nas fezes pode ocorrer de forma intermitente, recomenda-se a realização de exames seriados (3x) para aumentar a sensibilidade do diagnóstico. Apesar do seu baixo custo, eficácia e simplicidade, esta técnica continua sendo pouco utilizada na rotina diagnóstica. A técnica também pode ser apli-

cada para diagnóstico de outros nematodas, cujas larvas de primeiro estágio são eliminadas nas fezes e ainda para a determinação da eficácia de produtos químicos⁵².

- *Técnica de Tamisação ou 4 Tamises*⁵³

Esta técnica é empregada para diagnóstico quantitativo e qualitativo de ovos de *F. hepatica* nas fezes de ruminantes⁵³ em regiões endêmicas, como o Sul do Brasil. Requer uma série de peneiras de malhas conhecidas (Figura 12), podendo ser executada tanto em laboratório, quanto em condições de campo. Com



Figura 12. Técnica de 4 tamises (Tamisação). (A) Sequências de peneiras (tamises) utilizadas na técnica. (B) Na esquerda, material obtido após a tamisação; na direita, solução de lugol que auxilia na coloração de ovos de Fasciola. (C) Imagem aproximada do aspecto do material a ser pesquisado em microscopia óptica (Fotos: LSA Pires e DL Vieira).



um tempo médio de quinze minutos por exame, dispensa uso de produtos químicos e vidraria. O material consiste em um conjunto de quatro tamises, disponíveis no comércio e que também podem ser confeccionados com anéis de PVC e telas metálicas ou nylon de 100, 180, 200 e 250 malhas por polegada. Os três primeiros tamises permitem a passagem de ovos de *F. hepatica*, retendo os materiais que dificultariam a leitura. Após a tamisação, o material obtido possui pouco sedimento, facilitando a detecção e contagem dos ovos, após coloração com azul de metileno em placa de Petri

e observação em microscópio. Existe grande variação entre a contagem de ovos e a taxa de infecção, então o profissional deverá associar o laudo do laboratório com o histórico clínico e a origem dos animais. É ainda importante descobrir dados anteriores de abatedouro, pois neste caso, a infecção tende a ser prevalente na região.

- *Técnica de coprocultura*

Embora o uso da câmara McMaster ou Mini-FLOTAC sejam corriqueiras na determinação dos



Figura 13. Técnica de coprocultura para obtenção de larvas de terceiro estágio. (A) Material necessário, (B) frasco de coprocultura em estufa de demanda biológica (BOD) à 27° C, (C) frasco invertido para obtenção de L3 por termotropismo e hidrotropismo e (D e E) coleta de solução para Baermanização e recuperação das L3 (Fotos: LSA Pires e DL Vieira).



parasitos, há grande semelhança na morfologia dos ovos de estrongilídeos (ver Quadro 1), excetuando-se os gêneros *Nematodirus* sp. e *Bunostomum* sp.

Tal similaridade dificulta a identificação da população parasitária de cada gênero. A fim de solucionar este problema, Roberts e O'Sullivan⁵⁴ propuseram a técnica de coprocultura, que é utilizada com algumas adaptações no mundo todo. Nesta técnica, uma amostra de cinquenta a cem gramas de fezes proveniente de um ou mais animais, com alta contagem de OPG deve ser colocada em um frasco de boca larga, juntamente com vermiculite (ou fezes autoclavadas) (Figura 13A), que será mantido em temperatura próxima de 28° C e 70% de umidade, para que ocorra o desenvolvimento das larvas até seu terceiro estágio (L3) em até oito a dez dias (Figura 13B).

Ao término do período de incubação, as L3 são recuperadas pelo método de decantação (princípio de Baermann) durante quatro horas ou *overnight* (Figura 13C a E). Após isto, uma alíquota da amostra será usada para identificação das L3 em microscópio, sob aumento de 10, 20 e 40x. A identificação é feita a partir das características morfológicas das L3 (Figura 14)^{55,56}, sendo possível chegar no gênero ou espécie de parasito, uma vez que se associe o animal hospedeiro. A técnica de Baermann é regularmente usada para o diagnóstico de L1 de *Dictyocaulus* spp. em ruminantes e segue um protocolo com trinta gramas de fezes frescas, sem estufa. A coprocultura é realizada a partir do conjunto de fezes coletadas na propriedade, de modo que seu resultado será representativo para todos os animais.

A complexidade deste método reside na identificação das larvas, pois requer pessoal treinado. Apesar da aparente dificuldade, a coprocultura fornece dados epidemiológicos muito importantes para a propriedade, sendo utilizada para determinar os percentuais de gêneros na população de parasitos (ex. *Haemonchus* spp., *Cooperia* spp.), para nortear o tratamento, inclusive sobre a escolha do medicamento, e ainda para estabelecer épocas de mais alto risco sanitário ao rebanho.

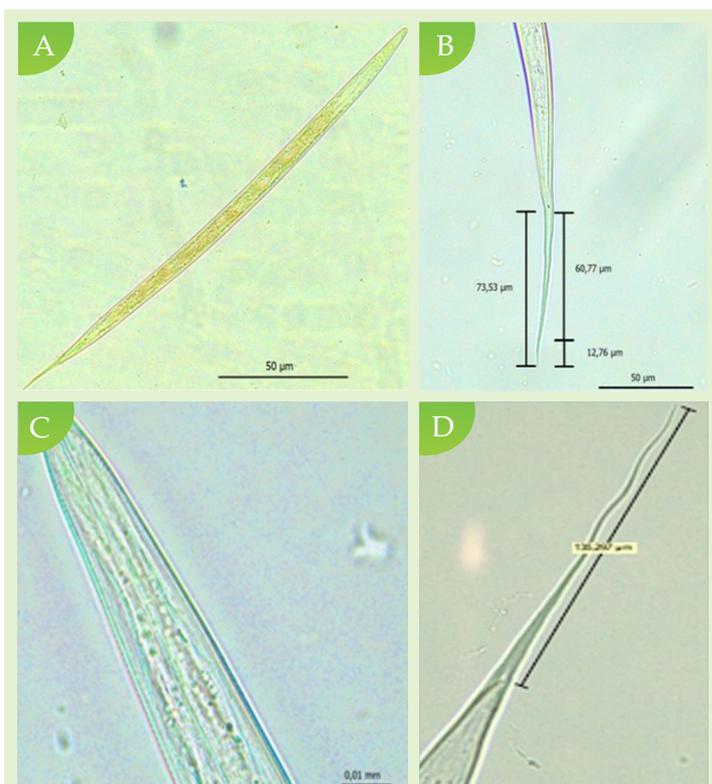


Figura 14. Morfologia e identificação de larvas de *Haemonchus contortus*. (A) Corpo da larva de *H. contortus* - Lugol. 10x. (B) Detalhe da cauda, com medidas da bainha (73 µm), da área livre da bainha (60 µm) e do filamento (12 µm). Notar uma pequena torção no terço-médio da cauda, característica da espécie - Lugol. 40x. (C) Porção anterior da larva, evidenciando a cabeça em forma de bala, característica da espécie - Lugol. 100x. (D) Morfologia da cauda de larva de *Oesophagostomum radiatum*, (156 µm) com comprimento do filamento da cauda, 92 µm (Fotos: YO Brandão e C Santos).

Fase pós-analítica: quando o número encontra a clínica

A realização de exames diagnósticos é uma oportunidade para determinar o que está ocorrendo no momento, como uma fotografia e tem o objetivo de monitorar a condição de saúde dos animais. Os resultados de exames coproparasitológicos, identificação de larvas e os testes moleculares (ver abaixo) não podem ser analisados de maneira isolada, para não incorrer na falta de conexão com a avaliação clínica, e consequentemente, no uso de tratamentos desnecessários. É sabido que existem muitos fatores que interferem nas con-



dições clínicas do animal e ao analisar um único resultado laboratorial como referência, técnicos deixam de olhar para a condição do animal amostrado e para o ambiente no qual está inserido. Para isso, a avaliação dos resultados dos exames deve estar associada com a avaliação das condições físicas, como o escore da condição corporal, estado nutricional (peso, oferta de pasto com qualidade), acesso à água, idade (imunidade etária em bovinos), raças, prenhez, clima e ainda com o histórico de tratamentos.

A fase pós-analítica também é de extrema importância, pois requer a interpretação mais fiel possível dos exames. Ruminantes são naturalmente infectados por uma população mista, ou seja, há a ocorrência de diferentes espécies de strongilídeos (poliparasitismo) em um animal. Estas populações de parasitos sofrem interferências ambientais (pluviosidade e temperatura), verificadas também através da OPG e da identificação dos gêneros de L3 na coprocultura, em diferentes épocas do ano. Percebe-se ainda, que há uma correlação do aparecimento de ovos de determinadas espécies, com a época do ano (primavera/verão e outono/inverno) e esse fator está intimamente relacionado com a sobrevivência de fases de vida livre, influenciando a taxa de infecção (maior ou menor taxa de translação).

No momento da análise coproparasitológica, utiliza-se uma quantidade de fezes que representa uma pequena alíquota (<1%) do total que é liberado pelo animal por dia. O número de ovos de parasitos presentes nas fezes também pode variar de uma amostragem para outra, devido a espécie, ao ciclo biológico e a qualidade da pastagem (fibras com mais água)⁸. Devido aos fatores descritos acima, não é possível quantificar precisamente a taxa de infecção do animal através da OPG, pois também não se sabe o número real de fêmeas adultas de strongilídeos presentes no trato gastrintestinal de cada animal, em cada momento (ver abaixo algumas definições e exemplos). Uma outra forma de tentar quantificar o grau de parasitismo é a partir da

contagem de larvas L1 presentes nas fezes, como é o caso de *Dictyocaulus* sp. No entanto, esta metodologia de quantificação também não permite demonstrar com exatidão (somente uma aproximação), o grau de infecção parasitária, confirmação esta que será possível apenas com a realização de necropsia parasitária.

Ao observar somente o número de ovos de strongilídeos presentes nas fezes para a seleção de tratamento, não se considerará a resposta imune do animal, o desafio de diferentes espécies de parasitos com diferentes graus de agressão ao hospedeiro, as interações interespecíficas e intraespecíficas desta relação e a quantidade de parasitos por animal. Um laudo que tenha animais com baixa contagem de OPG, pode indicar cautela, assim como laudos com alta OPG, devido a possibilidade da ocorrência do fenômeno de densidade-dependente. Então, sempre que possível, os exames devem ser interpretados por animal, sem que haja uma extrapolação para os demais indivíduos do rebanho, principalmente para a indicação de tratamento. Sabendo-se que, quanto maior o volume de dados disponíveis para a avaliação, mais fidedigna será sua interpretação. Assim como um desafio, uma boa avaliação deverá analisar a relação parasito-hospedeiro-ambiente em cada propriedade, respeitando-se as especificidades de cada um dos fatores.

Nestes casos, quanto melhor a assertividade e precisão durante a observação de cada um dos fatores, melhor a acurácia na eventual escolha do tratamento. É importante ressaltar aqui um fator pouco considerado, chamado de substituição (Figura 15A e B). Este processo indica uma alteração da dinâmica populacional de parasitos mais prevalentes presentes no animal. Isto significa que, por exemplo, ao definir um tratamento contra *Haemonchus* spp. em pequenos ruminantes, o profissional poderá facilitar a presença de *Cooperia* spp. ou *Trichostrongylus* spp. ou outra espécie de strongilídeo, dependendo da aptidão e da capacidade de invasão/interação da nova espécie, no que se chama de coevolução cooperativa⁵⁷. Nesse caso, é importante desta-



car que a contagem de OPG pode não apresentar diferenças em relação ao exame anteriormente realizado (Figura 15C e D). Uma rápida solução para esta situação seria o uso de um medicamento nematicida ou mesmo de amplo espectro. Entretanto, poderemos pressionar ainda mais todas as populações e acelerar o processo de seleção de todas as espécies envolvidas, uma vez que elas podem apresentar respostas diferentes ao controle químico, devido à intensidade e à frequência de tratamentos anteriormente realizados.

O profissional deverá então saber quais gêneros ou espécies de parasitos, com base em OPG e coprocultura, estão presentes e procurar uma solução enten-

dendo a relação parasito-hospedeiro, visto que alguns parasitos não agridem tanto algumas categorias animais. Todo este processo de rearranjo adaptativo espacial e uso do recurso (hospedeiro) após o tratamento, pode ser revertido, após um determinado tempo (t), uma vez que sejam definidas novas (ou velhas) condições para que *Haemonchus* spp. (P1) retorne ao seu posto de equilíbrio inicial, como descrito no CRC. Isto porque P1 é a espécie que mais se adaptou ao hospedeiro e tem o melhor desempenho (*fitness*) para continuar o processo de coevolução, com pequenas mutações para ambos. Este processo adaptativo permite que cada vez mais, o animal e sua diversa fauna parasitária, tenha mais

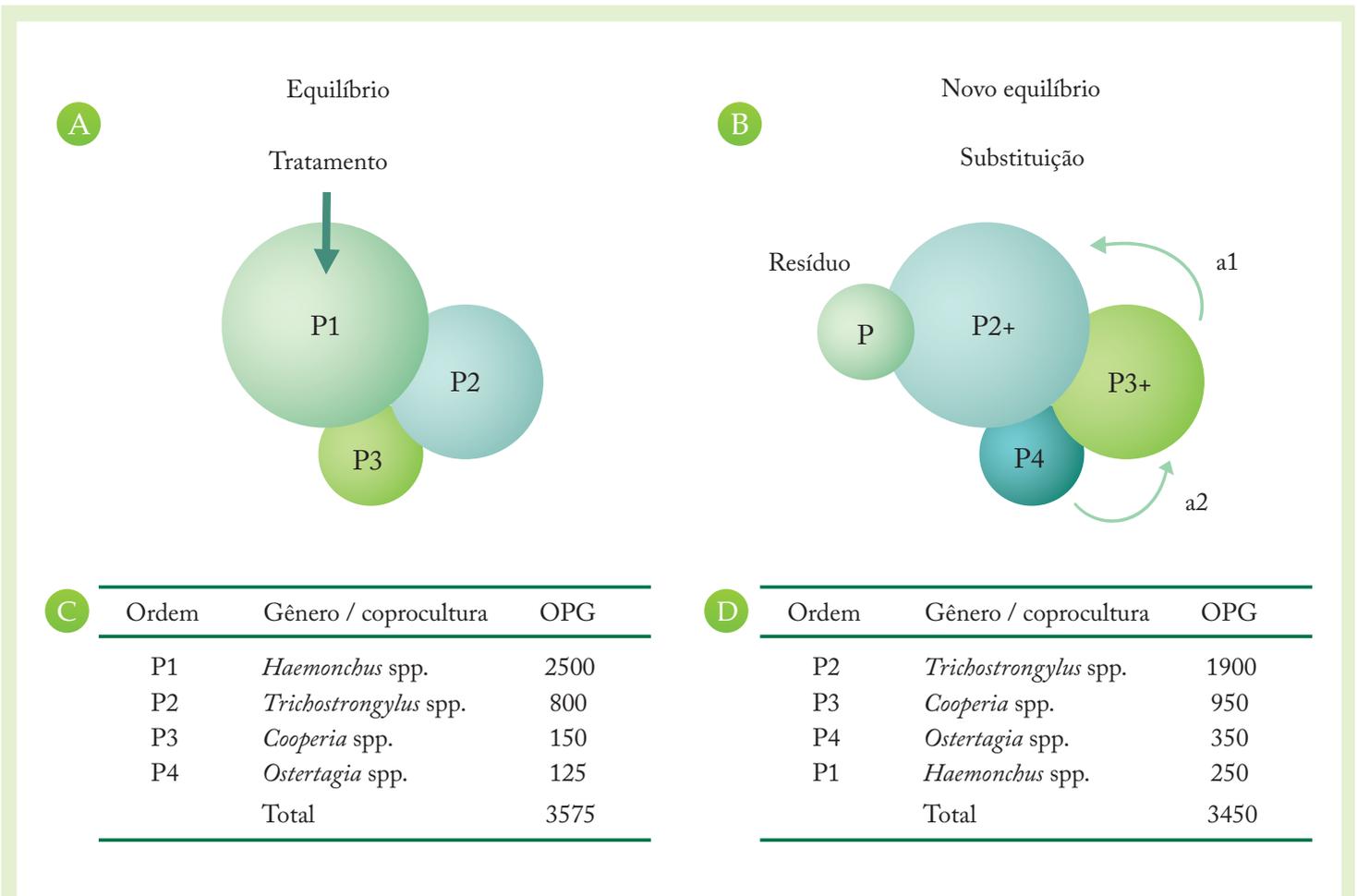


Figura 15. Efeito de um tratamento antiparasitário, (A) sobre a principal espécie de parasito (P1) e sua substituição, (B) por uma outra população (P2 e P3), gerando um novo equilíbrio dos parasitos no animal. Após a redução de P1, existe a alteração na densidade de P2 e demais espécies. A contagem de OPG pode não apresentar diferenças na contagem geral (C), pois poderá existir uma significativa alteração entre as populações parasitárias (D) com o processo de alteração das populações (a1 e a2). Este processo pode ser reversível após um determinado período de tempo (t), não incluído na Figura.



sucesso e habilidade de sobrevivência e manutenção. Concluindo, toda esta abordagem é para esclarecer, como uma boa parte da população animal pode ser considerada resiliente, podendo trazer benefícios ao indivíduo e ao grupo, uma vez que se possa identificar o animal (ex. exame clínico, FAMACHA, OPG).

■ Necropsia como método de diagnóstico

O exame *post mortem* é de grande relevância, sobretudo para os casos em que há suspeita de morte decorrente do parasitismo, servindo como exame complementar para a confirmação da suspeita clínica. Este exame é o único capaz de identificar a real carga parasitária, obtida através da contagem e da identificação das espécies de parasitos encontrados (Figura 16). Para a contagem e identificação dos exemplares no abomaso e intestino, deve-se abrir o órgão com uma tesoura (abo-

maso pela curvatura maior), lavar sob água corrente fraca, depositando o conteúdo de cada órgão em um recipiente (balde plástico). A fim de obter os parasitos aderidos à mucosa, esta deve ser raspada com o auxílio de uma lâmina ou faca e este material também deve ser depositado em outro balde. Todo o material deve ser encaminhado ao laboratório onde será realizada a passagem do material por uma série de peneiras para a obtenção dos espécimes que serão quantificados e identificados em 10% da solução homogeneizada. Ao término deste processo será possível determinar a carga parasitária^{58,59}.

Fígado, pulmão e encéfalo também devem ser inspecionados na busca por parasitos, devendo-se realizar cortes longitudinais no fígado, com especial atenção para as vias biliares para busca de *F. hepatica* e realizar a abertura do pulmão com auxílio de uma tesoura, a partir da traqueia, entrando pelos brônquios e bron-



Figura 16. Avaliação clínica e órgãos na necropsia. Condição visível de (A) edema submandibular em ovino e de (B) profunda perda de peso (caquexia) em bovino. Abomaso de ovino, (C) retirado na necropsia e (D) aberto pela curvatura maior, com a exposição da região glandular e identificação de parasitos adultos (aproximadamente 550 *H. contortus*). (E e F) Observação de espécimes de *F. hepatica* em cortes exploratórios no fígado de bovino. Observar o grave espessamento da parede dos vasos e do tecido hepático (Fotos: MB Molento).



Figura 17. Sinais clínicos e lesões por *Dictyocaulus viviparus* na necropsia. (A) Pneumonia verminótica clássica com corrimento nasal mucopurulento, por infecção secundária. (B) Corte histológico evidenciando a presença de parasitos nos bronquíolos. (C) Presença massiva de vermes adultos com muco seroso na região da traqueia e brônquios e (D) aspecto do pulmão, com várias alterações macroscópicas (atelectasia, hemorragia) (Fotos: MB Molento e C Barros).

quíolos, quando a suspeita for *D. viviparus* (Figura 17). Fragmentos dos órgãos podem ser armazenados em formol 10% e enviados para exame histopatológico. O dado da carga parasitária, deve ser interpretado juntamente com os sinais clínicos, a fim de determinar a participação do(s) parasito(s) na morte do animal.



RESISTÊNCIA PARASITÁRIA

dos antes e após o tratamento, aplicando uma fórmula matemática, que permite avaliar o percentual de eficácia do princípio ativo do anti-helmíntico, interpretando o resultado segundo a porcentagem obtida, sendo:

Acima de 95%	Alta eficiência
Entre 80 e 95%	Eficiente
Menor que 80%	Falha de eficácia e potencial resistência dos parasitos ^{59,61} .

Existe uma alta correlação entre as condições climáticas (pluviosidade e temperaturas altas) e de manejo (extensivo e semiextensivo), com altas taxas de parasitismo e mortalidade de animais no Brasil e países de clima tropical e subtropical. Devido ao alto risco para os animais, o controle das infecções gastrintestinais é feito com produtos antiparasitários de forma constante. Assim, também não é nenhuma surpresa que existam relatos de resistência múltipla (mais de dois grupos químicos) para várias espécies de parasitos de ruminantes e outras espécies⁶⁰. O cenário atual requer que profissionais saibam como utilizar a tecnologia disponível dos testes *in vitro*, de campo e moleculares e que também possam realizar a avaliação da eficácia das drogas, para propor medidas sanitárias de médio e longo prazo. Medidas estas que visem reduzir o número e a frequência dos tratamentos, valorizando a resiliência dos animais com o uso de técnicas de avaliação seletiva, para preservar a vida útil dos produtos químicos, buscando um ambiente sustentável.

■ Teste de redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF)

A resistência desenvolvida pelos parasitos aos anti-helmínticos é, como já mencionado, um dos grandes entraves para o controle parasitário mais eficiente. O teste de redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF), consiste em comparar dados de OPG obti-

Neste âmbito, o resultado do TRCOF torna-se essencial para a escolha do princípio ativo, bem como para a vigilância do início da ocorrência de resistência parasitária na propriedade. A partir destes dados, o técnico poderá adotar medidas que visem desacelerar o estabelecimento de parasitos resistentes aos anti-helmínticos, escolhendo por exemplo, o tratamento seletivo com o método FAMACHA para pequenos ruminantes.

Entretanto, a sensibilidade e a confiabilidade do TRCOF também dependem de um bom planejamento e execução. Para isso, faz-se necessário um exame prévio de OPG e coprocultura, a fim de selecionar os animais que participarão do teste, bem como determinar a população parasitária predominante, permitindo uma interpretação mais precisa do resultado. Para a correta realização do TRCOF é importante que:

1. Animais avaliados não estejam sob efeito de anti-helmínticos aplicados a mais de trinta dias.
2. As técnicas de OPG e coprocultura sejam executadas da mesma maneira, em todas as etapas.
3. Ao menos 80% dos animais apresentem OPG entre 200 e 1.000.
4. Distribuição dos grupos (tratamento ou controle) considerando a homogeneidade dos valores.
5. Utilização de ao menos seis animais por grupo (Tabela 1).
6. Média da OPG no dia zero, semelhante estatisticamente entre os grupos.
7. Desvio padrão menor do que a metade da média para cada grupo^{59,61}.



Tabela 1. Condição hipotética de OPG para confecção de grupos para teste da eficácia de produtos.

Grupos/OPG*	Grupo Controle	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Animal 1	1300	1300	1250	1200
Animal 2	950	900	950	1000
Animal 3	950	800	800	775
Animal 4	700	725	750	750
Animal 5	600	575	550	550
Animal 6	300	300	400	400
Média	800	767	783	779
Desvio padrão	345	335	299	291

* As OPGs devem ser distribuídas em ordem decrescente e em sequência para os grupos. Pode existir flutuação da média, porém, deve-se seguir a regra de manter o desvio padrão do grupo, menor do que a metade da média.

Na Tabela 1, está um exemplo, esclarecendo que testes que utilizem um desvio padrão muito alto, devido a inclusão de animais com OPG altos, podem fragilizar a correta interpretação, devido à alta amplitude desta variação, dando um resultado falso-negativo.

Após a distribuição dos grupos, o tratamento com anti-helmíntico pode ser realizado. Neste momento, é importante garantir que sejam tomados todos os cuidados para a máxima absorção do princípio ativo, como utilizar a via de administração indicada (deixar os animais em jejum de 12h para medicação oral) e assegurar a inoculação de todo o volume correspondente à dose calculada com base no peso do animal. A coleta de fezes após o tratamento deverá ser realizada no intervalo de tempo preconizado para cada princípio ativo (Tabela 2). O cálculo da eficácia dos produtos tem a base da OPG do grupo controle, utilizando o programa RESO 2.0 modificado⁶². Caso o número de animais no rebanho permita, é possível testar mais de um produto com princípios ativos diferentes, seguindo o intervalo indicado.

Tabela 2. Recomendação do intervalo de tempo (dias), para a realização das amostragens do teste de eficácia (TRCOF) para os diferentes anti-helmínticos.

Anti-helmínticos	Dias de tratamento
Levamisol	3 a 7 ⁶³
Benzimidazóis	8 a 14 ⁶⁴
Ivermectina	14 a 17 ⁶⁴
Moxidectina	Mais de 21 ⁶⁴
Monepantel	7 a 14 ⁶⁵
Nitroxinil	21 ⁶⁶
Associações*	14 ⁶⁴

* Produtos comerciais disponíveis no mercado.



■ Teste de inibição da migração larval (TIML)

O monitoramento da resistência anti-helmíntica é um requisito fundamental para o controle sustentável de helmintos na pecuária e diferentemente do TRCOF, que é um teste *in vivo*, uma outra série de técnicas *in vitro* também servem para determinar a eficácia de produtos, incluindo o TIML. Ao longo dos anos, o TRCOF sempre foi utilizado como o padrão ouro, porém, a desvantagem desse método é que os animais testados devem ser amostrados em pelo menos duas novas ocasiões, aumentando o tempo e o custo do processo. A detecção de resistência parasitária pelo TRCOF é ainda mais dificultada pelo fato de que a liberação de ovos pelas fêmeas não é suficientemente relacionada com a carga parasitária, além da distribuição não uniforme de ovos em amostras fecais e pela distribuição variável da população de helmintos no hospedeiro⁶⁷.

Alternativas *in vitro* e bioensaios são mais econômicos e foram desenvolvidos para a detecção de resistência e testes de prospecção para novos produtos, incluindo fitoterápicos^{68,69}. Entre eles, TIML e o teste de desenvolvimento larval (TDL) e suas modificações, estão sendo refinadas para a detecção de resistência para os principais princípios ativos, entre eles: benzimidazóis, levamisol e lactonas macrocíclicas⁶⁷. O TIML é uma ferramenta razoavelmente rápida e econômica para a determinação dos efeitos de produtos que atuam sobre a motilidade de nematodas. Apresenta ainda, outras vantagens, como a facilidade da coleta e consequentemente a disponibilidade do uso de L3 de poucos animais doadores, bem como a capacidade para avaliação de efeitos de interação farmacológica (ex. sinergia, adição, antagonismo e efeito nulo), sem a necessidade de testar diretamente no hospedeiro⁷⁰. As desvantagens recaem na necessidade de se obter um número suficiente de L3 para o teste completo, da

variedade de espécies presentes na coprocultura e de laboratórios que executem os testes.

■ Métodos moleculares

A intervenção na fase aguda das doenças parasitárias depende da detecção rápida e segura do agente envolvido. As ferramentas moleculares de diagnóstico apresentam diferenças das técnicas mais tradicionais de diagnóstico, pois permitem a identificação preliminar da doença, antes mesmo do estabelecimento da infecção e danos clínicos. Os testes imunológicos e sorológicos, tais como ELISA e imunocromatografia, são ideais para realizar estudos de prevalência, entretanto, apresentam resultados relativos, seja pela falta de marcadores específicos, como pela possibilidade de reações cruzadas⁷¹.

Neste sentido, ferramentas moleculares podem propiciar avanços no reconhecimento precoce das infecções, identificar as espécies parasitárias e demonstrar de forma precisa mutações genéticas que levam à ocorrência da resistência parasitária. A descoberta de mutações concorrentes com a resistência permite que decisões, quanto ao uso de medicamentos sejam mais assertivas, evitando não somente que o fenômeno se consolide na propriedade⁷², como também diminuindo a contaminação ambiental.

A reação em cadeia da polimerase (PCR - do inglês *Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica qualitativa (Figura 18), empregada na detecção de patógenos parasitários⁷³, permitindo sua especialização, da mesma forma que a coprocultura e posterior identificação das larvas, mas de uma forma mais precisa e rápida⁷². A técnica possui variações, como a PCR multiplex, LAMP (do inglês *Loop Mediated Isothermal Amplification*), qPCR (do inglês *quantitative PCR*, também conhecida como PCR em tempo real), RT-PCR (do inglês *Reverse Transcriptional PCR*) e a *nested-PCR*.

A PCR multiplex consiste em uma expansão da

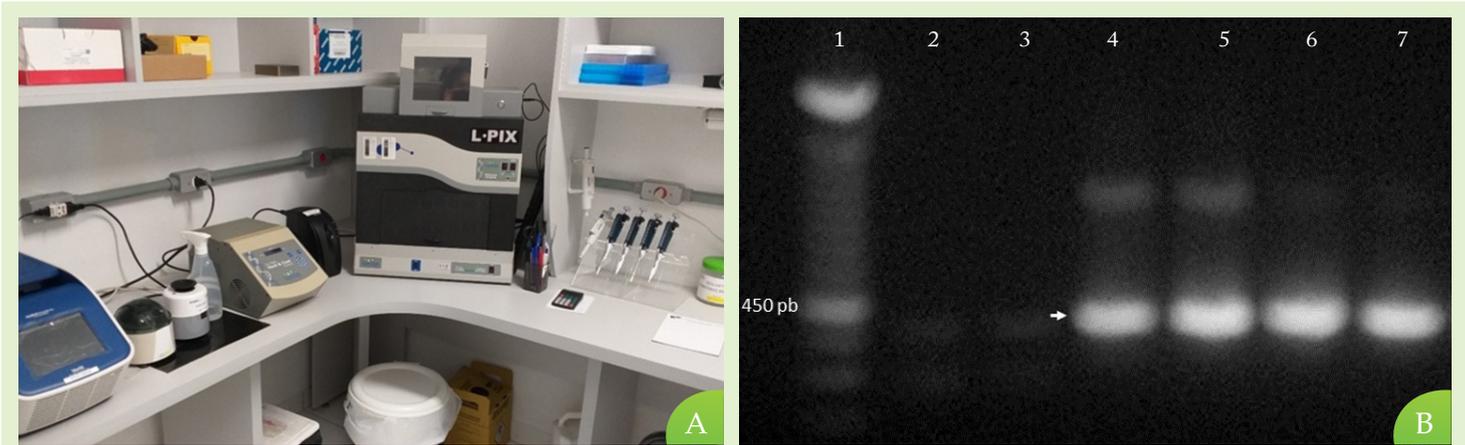


Figura 18. Estrutura de um laboratório de biologia molecular. (A) Equipamentos, da esquerda para a direita: termociclador, centrífuga para microtubos, agitador, banho-seco, fotodocumentador, jogo de micropipetas e demais materiais de consumo para extração de DNA. (B) Foto de gel de agarose com bandas: 1: Marcador de massa molecular; 2 e 3: controles negativos e 4 a 7 (seta): identificação de fragmento do gene da proteína intestinal H11 em *H. contortus*, com aproximadamente 450 pares de base (pb) (Fotos: G Bueno e MB Molento).

PCR. Nela, diversos materiais genéticos são testados simultaneamente em um único ciclo de reação, tornando-a mais eficiente do que a PCR convencional⁷⁴. Para a identificação das espécies de nematódeos por PCR multiplex é realizada a extração de DNA de larvas recuperadas da coprocultura, seguida por uma PCR utili-

zando iniciadores específicos para amplificação de fragmentos do DNA de cada espécie pesquisada. O produto da PCR é aplicado em gel de agarose e revelado sob luz UV, sendo possível identificar bandas referentes aos fragmentos de DNA amplificados (Figura 19).

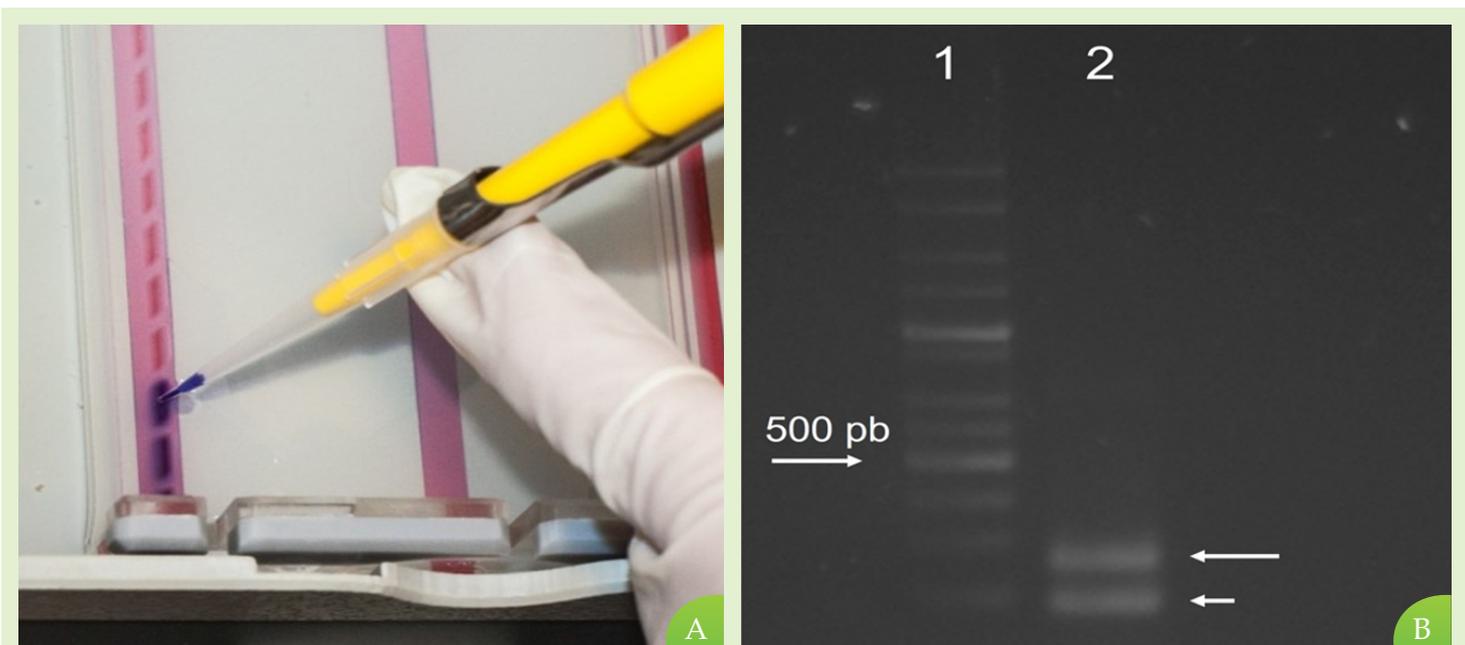


Figura 19. PCR multiplex. (A) Aplicação da solução contendo DNA no poço de gel de agarose, em cuba para eletroforese (B) 1: Marcador de massa molecular, 2: amostra, banda de 500 pares de bases (pb) (seta ao lado esquerdo), fragmento de 189 pb (*H. contortus*) (seta maior ao lado direito) e fragmento de 243 pb (*T. colubriformis*) (seta menor ao lado direito). Não foi observada banda de 329 pb referente ao *O. radiatum* sendo, portanto, ausente nesta amostra (Fotos: LSA Pires e YO Brandão).



O método LAMP baseia-se no mecanismo de autossíntese do DNA, a partir da adição de enzimas adequadas (polimerases), que permitem a replicação desta molécula e, por meio de diferença de cor, a identificação de sua presença. Esta técnica, mais simples e fácil de se realizar, tem menor exigência de equipamentos, o que diminui drasticamente seu custo. Todavia, apesar da possibilidade de também ser executada em condições de campo, apresenta a desvantagem de depender de métodos de detecção indiretos, como turbidez e corantes, não específicos, o que pode levar à detecção de resultados falsos-positivos⁷⁵.

A qPCR é um método utilizado para quantificar o material genético e quando aplicado às doenças parasitárias, aprimora seu diagnóstico. A qPCR combina amplificação e detecção por PCR em uma única etapa. A quantificação é obtida a partir do aumento da fluorescência do fragmento alvo a cada ciclo de amplificação. Esta técnica é utilizada tanto para a identificação das espécies de parasitos, como para a determinação de níveis quantitativos de parasitos em amostras biológicas⁷⁶.

A PCR e suas variações apresentam algumas dificuldades, tais como: contaminação cruzada, resultados falsos-positivos e falsos-negativos, especialmente quando a técnica é utilizada como método único e definitivo de diagnóstico. A aplicação da técnica de qPCR e sequenciamento de genomas permitiu a identificação do nemabioma, a partir da quantificação precisa da proporção relativa de larvas de parasitos nas fezes⁷⁷, sem requerer suposições antecedentes sobre quais espécies de parasitos estão presentes em uma amostra. A técnica também pode ser usada para verificar o impacto desta proporção sobre os tratamentos⁷⁸, buscando-se contornar o desenvolvimento de resistência parasitária.

A área de diagnóstico coprológico na Parasitologia vem sendo amplamente renovada, com a chegada de técnicas mais inovadoras, que oferecem maior confiabilidade nos dados. A execução e a interpretação se

tornam mais diretas e objetivas, porém existe maior custo, com a aquisição de equipamentos e insumos. A automação e a robótica, assim como a inteligência artificial já são utilizadas em laboratórios do mundo todo e devem ser uma realidade na área. Estas inovações devem ser incorporadas na rotina dos laboratórios, auxiliando o diagnóstico clínico e quem sabe nas consultas virtuais e com laudos entre diferentes locais de realização e interpretação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

■ Exame de fezes: um recurso limitado e com várias aplicações

Naturalmente, parasitos têm a capacidade de regular o crescimento da população de hospedeiros, apresentando um grande número de interações entre as populações⁷⁹. A maior presença de parasitos por hospedeiro, pode impactar negativamente nos animais, necessitando de um controle externo. Assim, um melhor conhecimento da taxa de infecção por animal permite mais segurança para utilizar estratégias de redução desta população. O uso de medidas de controle, como o uso de antiparasitários, com o objetivo de “erradicar” os parasitos, pode alterar a situação de equilíbrio em curto prazo, com prejuízo significativo para a população de parasitos. Entretanto, a médio e a longo prazo, a carga parasitária por animal pode permanecer a mesma (efeito Substituição), causando alta mortalidade de animais, exigindo a necessidade da continuidade do tratamento químico. Este método de controle pode selecionar parasitos resistentes que detêm ampla vantagem reprodutiva e que serão responsáveis pela manutenção da população parasitária, como explicado no CRC.

A relação entre fecundidade e carga parasitária pode alterar a relação entre a condição clínica e a contagem de ovos de parasitos nas fezes⁸⁰, como veremos a



seguir. A Lei de Taylor⁸¹ é definida pela relação exponencial entre o crescimento da população de um animal e o direto crescimento de uma única espécie de parasito (dados em log de indivíduos e log do número de parasitos por indivíduo) (Figura 20A). Já a densidade-dependente ocorre quando estes mecanismos agem proporcionando altas contagens de OPG (alta fecundidade) com baixa taxa de contaminação ou ainda quando existirem altas taxas de infecção com baixa OPG (baixa fecundidade), resultando em contagens semelhantes de OPG (Figura 20A e área central da C). Uma sugestão perigosa para “acertar” os dados de OPG é analisar as contagens após uma transformação logarítmica, porém deve-se evitar tal estratégia, visto que para se usar este ajuste, a amostragem deve conter um grande número (mais de quinze) de indivíduos, para cada categoria animal.

A relação entre a OPG e a fecundidade / intensidade dos parasitos vai depender da comunidade de parasitos presentes, que é diretamente proporcional à

susceptibilidade/resiliência do hospedeiro. Esta variação entre hospedeiros é descrita como distribuição binomial negativa (DBN) (Figura 20B). Por isto, é interessante usar dados de categorias semelhantes de animais, devido à grande variação intra-espécie (ex. imunidade/IgA, reação local de hipersensibilidade) e entre ambientes (ex. clima), alterando a distribuição da fauna parasitária. A DBN é uma ferramenta extremamente útil para determinar a distribuição de parasitos entre os animais⁸² e caracterizar animais resilientes e susceptíveis ao associar dados clínicos e de OPG.

O efeito da fecundidade variável e o valor da OPG podem ser influenciadas por fatores como o histórico da infecção, da espécie do parasito, época do ano, estado fisiológico do animal e ainda a sua idade e raça. Na clínica, o uso da OPG em indivíduos deve ser realizado com três medidas repetidas para apoiar a suspeita. Muito embora exista grande interesse em se relacionar a OPG com a carga parasitária, mesmo reconhecendo a importância do efeito de densidade-

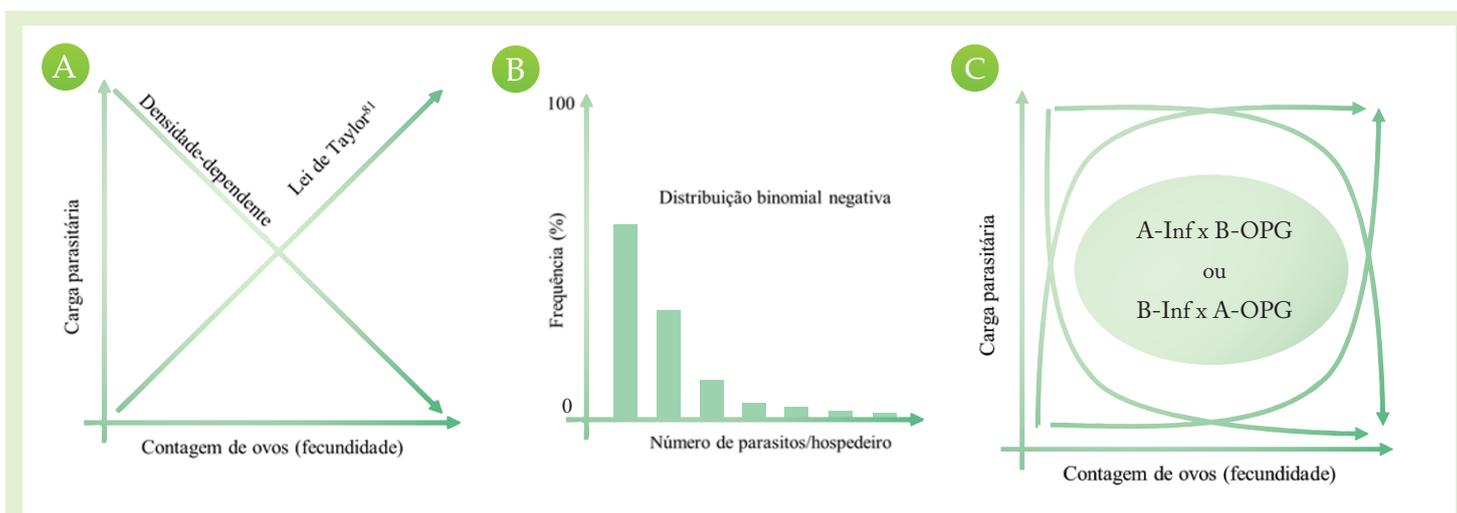


Figura 20. Fatores e possibilidades de representação da relação parasito-hospedeiro. (A) Relação inversa do efeito da Lei de Taylor⁸¹ e de densidade-dependente sobre a carga parasitária e a fecundidade dos parasitos, representado pela contagem de OPG. (B) Distribuição média de parasitos em hospedeiros e a frequência de parasitos por animal - distribuição binomial negativa. (C) Relação da contagem de ovos nas fezes e a carga parasitária, com n possibilidades de diagnóstico por OPG. As linhas representam os valores de k mais altos. A área central demonstra a possibilidade da contagem de OPG ser devido a uma das possíveis condições: alta taxa de infecção parasitária (A-inf), com baixa contagem de OPG (B-OPG), ou baixa taxa de infecção parasitária (B-inf), com alta contagem de OPG (A-OPG). Nota: A densidade-dependente é o principal fator em biologia, responsável por manter o equilíbrio entre as populações envolvidas.



dependente, a OPG pode ser utilizada em grupos e em rebanhos, reconhecendo a existência de uma grande área nebulosa para sua interpretação (Figura 20C).

O valor de k (grau de densidade) é observado em categorias animais com maior amplitude na OPG (animais jovens). Outro fato é que, quanto mais a população de parasitos colocar pressão sobre a população de hospedeiros (animais jovens), menor será a resposta deste e maior será a chance de se observar sinais clínicos e alta OPG (Figura 20C). Nesta categoria, existe grande correlação entre a prevalência de infecção e a média de parasitos, incluindo alto valor de k .

Entretanto, uma pequena alteração dos fatores listados acima, pode alterar esta dinâmica relação. Como a DBN é uma característica sólida, mais estudos são necessários para determinar, por exemplo, se existe uma distribuição homogênea de transmissão entre hospedeiros, ou mesmo uma distribuição homogênea de diferentes estágios parasitários.

■ Distribuição espacial dos parasitos

Uma outra forma de analisar a presença de uma infecção parasitária é observar a relação intra-hospedeiros e a sua potencial carga parasitária, para tentar determinar a variação espacial da densidade da população de parasitos⁸³. Existe uma grande possibilidade de que cargas parasitárias em diferentes animais, dentro de uma mesma área, ou áreas próximas, apresentem ser mais semelhantes entre si, do que animais em áreas distintas (Figura 21).

Os autores descrevem a existência de *hotspots* de infecção ou fatores de risco comuns para esses animais, mesmo em uma pequena escala (área de repouso, topografia/microambientes no pasto, tipo de pasto). Assumindo uma escala entre 0 e 1, para a diferença entre áreas e a taxa de contaminação, animais da mesma área nunca terão índice 1, estando entre 0 e 1. Este conceito é baseado em um hospedeiro, infectado por um parasito. Além disto, o número total de parasi-

tos em uma área será a soma dos parasitos em todos os animais naquele lugar. Assim, o número médio de parasitos e a distribuição de animais entre áreas são probabilidades independentes, com valores podendo ser próximos de 1 entre animais em áreas próximas. O conhecimento desta distribuição pode ser interessante para o estabelecimento de medidas de controle direcionadas contra uma espécie de parasito ou uma categoria animal. Novos estudos deverão revelar os fatores para determinar esta situação, medindo a relação intra-hospedeiros e seus efeitos.

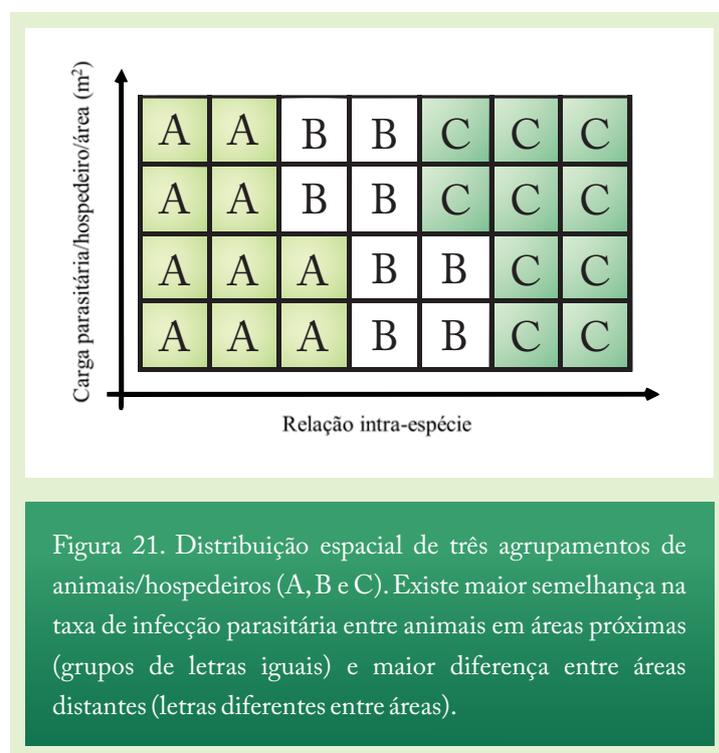


Figura 21. Distribuição espacial de três agrupamentos de animais/hospedeiros (A, B e C). Existe maior semelhança na taxa de infecção parasitária entre animais em áreas próximas (grupos de letras iguais) e maior diferença entre áreas distantes (letras diferentes entre áreas).



CONCLUSÃO

As técnicas coparasitológicas abordadas neste material são amplamente utilizadas em rotina laboratorial para auxiliar profissionais em seus projetos de ensino, pesquisa e extensão universitária. A área de parasitologia clínica veterinária é muito dinâmica e os profissionais de laboratório devem estar atualizados nas mais recentes novidades, incluindo os dados de nemabioma e a relação parasito-hospedeiro e a sua interessante interação com o microbioma. Portanto, a responsabilidade técnica de realizar um exame coparasitológico, não termina ao entregar o laudo para o veterinário responsável. Os profissionais devem acompanhar a tomada de decisão para a indicação de medidas sanitárias para cada caso, incluindo o sucesso do tratamento indicado. Sugerimos neste material, um protocolo para o teste de eficácia de medicamentos antiparasitários, diferentes métodos de exames coprológicos, esclarecimentos de como realizar a interpretação destes exames, em um complexo e holístico modo de avaliação. O objetivo final foi fornecer estas informações para que profissionais possam utilizar estas técnicas em protocolos de avaliação seletiva (ex. FAMACHA e exame clínico) com ampla margem de segurança para os animais.

Em pesquisa, estas técnicas podem ser escolhidas para compor um completo desenho experimental, um amplo banco de dados e ainda realizar uma profunda análise estatística. Dados de campo e de laboratório podem ser reunidos e compilados, rodando análises de regressão, com o objetivo de divulgar estes dados para toda a sociedade, no formato de artigos técnicos ou científicos. Falando sobre o uso social, projetos de extensão também utilizam estas técnicas rotineiramente para estabelecer a prevalência de infecção de animais urbanos e rurais. Assim, todos os envolvidos devem estar a par de novas interpretações e dos possíveis fatores de risco (variáveis bióticas) em cada situação.

Esperamos atingir um número considerável de profissionais que trabalham com a Buiatria no Brasil e na América Latina e Caribe, focando na solução de problemas com inovação, responsabilidade técnica e dedicação para a melhoria da qualidade de vida dos animais, medicina veterinária forense, ecotoxicidade e a potencial influência na Saúde Global/Global Health.

REFERÊNCIAS

1. HACKMANN, T.J.; SPAIN, J.N. Invited review: ruminant ecology and evolution: perspectives useful to ruminant livestock research and production. *Journal of Dairy Science*, v.93, n.4, p.1320-1334, 2010.
2. GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.23, n.2, p.150-156, 2014.
3. MOLENTO, M.B. et al. Bovine fascioliasis in Brazil: economic impact and forecasting. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, v.12, p.1-3, 2018.
4. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal - Mercado Veterinário, 2017.
5. MORRIS, R.S.; MEEK, A.H. Measurement and evaluation of the economic effects of parasitic disease. *Veterinary Parasitology*, v.6, n.1-3, p.165-184, 1980.



6. BORDES, F. et al. Rodent sociality and parasite diversity. *Biology Letters*, v.3, n.6, p.692-694, 2007.
7. KRASNOV, B.R. et al. Gender-biased parasitism in small mammals: patterns, mechanisms, consequences. *Mammalia*, v.76, n.1, p.1-13, 2012.
8. LONGO, V. et al. Sustainable agriculture: the use of FAMACHA method in Santa Ines sheep in the Semi-arid region of Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v.42, n.3, Supl.1, p.1647-1662.
9. EMAM, M. et al. Genetic and epigenetic regulation of immune response and resistance to infectious diseases in domestic ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.35, n.3, p.405-429, 2019.
10. JEFFERS, V. et al. A latent ability to persist: differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.75, n.13, p.2355-2373, 2018.
11. MARKS, N.D. et al. Profiling microRNAs through development of the parasitic nematode *Haemonchus* identifies nematode-specific miRNAs that suppress larval development. *Scientific Reports*, v.9, n.1, p.1-15, 2019.
12. NAWAZ, M. et al. Modifications of histones in parasites as drug targets. *Veterinary Parasitology*, v.278, 109029, 2020.
13. HOBBERG, E.P. et al. Phylogeny for species of *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongyloidea): considerations of their evolutionary history and global biogeography among Camelidae and Pecora (Artiodactyla). *Journal of Parasitology*, v.90, n.5, p.1085-1102, 2004.
14. ALI, Q. et al. Emergence and the spread of the F200Y benzimidazole resistance mutation in *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* from buffalo and cattle. *Veterinary Parasitology*, v.265, p.48-54, 2019.
15. DUTTA, B. et al. Occurrence and pathology of *Haemonchus contortus* infection in goats. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, v.5, n.3, p.1284-1287, 2017.
16. LAING, R. et al. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biology*, v.14, R88, 2013.
17. FELIPPELLI, G. et al. Nematode resistance to ivermectin (630 and 700µg/kg) in cattle from the Southeast and South of Brazil. *Parasitology International*, v.63, n.6, p.835-840, 2014.
18. MONTEIRO, S.G. Parasitologia na Medicina Veterinária. 2ªed. São Paulo: Roca, 2017, 348p.
19. TAYLOR, M.A. et. Parasitologia Veterinária. 4ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017, 1052p.
20. CLAEREBOU, E.; VERCRUYSSSE, J. The immune response and the evaluation of acquired immunity against gastrointestinal nematodes in cattle: a review. *Parasitology*, v.120, Supl., p.25-42, 2000.
21. CHARLIER, J. et al. Evaluation of anti-*Ostertagia ostertagi* antibodies in individual milk samples as decision parameter for selective anthelmintic treatment in dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, v.93, n.2-3, p.147-152, 2010.
22. DELAFOSSE, A. The association between *Ostertagia ostertagi* antibodies in bulk tank milk samples and parameters linked to cattle reproduction and mortality. *Veterinary Parasitology*, v.197, n.1-2, p.212-220, 2013.
23. DOS SANTOS, T.R. et al. Helminth fauna of



- bovines from the Central-Western region, Minas Gerais State, Brazil. *Ciência Rural*, v.40, n.4, p.934-938,2010.
24. MAIA, D.; MATTOS, M.J.T. Nematodeoses gastrintestinais em bovinos no Brasil: revisão de artigos publicados no período de 2012 a 2020. *Revista Agrária Acadêmica*, v.3, n.3, p.296-307, 2020.
25. CRAIG, T.M. Gastrointestinal nematodes, diagnosis and control. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.34, n.1, p.185-199, 2018.
26. SCHMIDT, E.M.S. et al. Epidemiologia dos endoparasitas em bovinos. *Veterinária e Zootecnia*, v.24, n.4, p.662-679, 2017.
27. LINS, J.G.G. et al. Prevalence of gastrointestinal helminths in sheep raised in intermediary geographical region of Paraíba state, Brazil. *Veterinária e Zootecnia*, v.26, p.1-9, 2019.
28. LI, Y. et al. The complete mitochondrial genome of the beef cattle hookworm *Bunostomum phlebotomum* (Nematoda: Bunostominae). *Mitochondrial DNA Part B*, v.6, n.2, p.617-619, 2021.
29. STROMBERG, B.E. et al. *Cooperia punctata*: effect on cattle productivity? *Veterinary Parasitology*, v.183, n.3-4, p.284-291, 2012.
30. THAMSBORG, S.M. et al. *Strongyloides* spp. infections of veterinary importance. *Parasitology*, v.144, n.3, p.274-284, 2017.
31. JALETA, T.G.; LOK, J.B. Advances in the molecular and cellular biology of *Strongyloides* spp. *Current Tropical Medicine Reports*, v.6, n.4, p.161-178, 2019.
32. TESSELE, B. et al. Lesões parasitárias encontradas em bovinos abatidos para consumo humano. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, n.7, p.873-889, 2013.
33. COSTA-JUNIOR, L.M. et al. Nemabiome metabarcoding reveals differences between gastrointestinal nematode species infecting co-grazed sheep and goats. *Veterinary Parasitology*, v.289, 109339, 2021.
34. Costa, V.M.M. et al. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.31, n.1, p.65-71, 2011.
35. SANTOS, L.L. et al. Molecular method for the semiquantitative identification of gastrointestinal nematodes in domestic ruminants. *Parasitology Research*, v.119, p.529-543, 2020.
36. ZHAO, G.H. et al. The complete mitochondrial genomes of *Oesophagostomum asperum* and *Oesophagostomum columbianum* in small ruminants. *Infection, Genetics and Evolution*, v.19, p.205-211, 2013.
37. CUNHA, F.O.V. et al. Prevalence of slaughter and liver condemnation due to *Fasciola hepatica* among sheep in the state of Rio Grande do Sul, Brazil 2000 and 2005. *Parasitología Latinoamericana*, v.62, n.3-4, p.188-191, 2007.
38. ROSSATO, C.K.; SALAZAR, L.N. et al. Lesões hepáticas encontradas em bovinos abatidos para alimentação humana. *Higiene Alimentar*, v.31, n.266-267, p.123-129, 2017.
39. MARQUES, L.T. et al. Chemical composition of various plant extracts and their in vitro efficacy in control of *Fasciola hepatica* eggs. *Ciência Rural*, v.50, e20190363, 2020.
40. LAMANN, G.V. *Veterinary Parasitology*. Nova Iorque: Nova Science Publishers, p.323, 2010.



41. ENGDAWORK, A. Lungworms of sheep and cattle slaughtered at abattoir. *International Journal of Agriculture & Agribusiness*, v.2, n.2, p.104-114, 2019.
42. PANCIERA, R.J.; CONFER, A.W. Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.26, n.2, p.191-214, 2010.
43. TAM, T.T. et al. Morphological differences and molecular phylogenetic relationship of two tapeworm species, *Moniezia expansa* and *Moniezia benedeni*, collected from domestic ruminants in northern Vietnam. *Parasitology International*, v.74, 101998, 2020.
44. GORDON, M.M.C.L.; WHITLOCK, H.V.A. Technique for counting trematode eggs in sheep faeces. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research*, v.12, n.1, p.50-52, 1939.
45. CASTRO, L.L.D. et al. Comparison of McMaster and Mini-FLOTAC fecal egg counting techniques in cattle and horses. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, v.10, p.132-135, 2017.
46. CRINGOLI, G. et al. The Mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals. *Nature Protocols*, v.12, n.9, p.1723-1732, 2017.
47. WILLIS, I. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *The Medical Journal of Australia*, v.2, n.18, p.375-376, 1921.
48. FAUST, E.C. et al. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. *Journal of Parasitology*, v.25, n.3, p.241-262, 1939.
49. HOFFMANN, W.A. et al. The sedimentation-concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. *American Public Health Association*, v.9, p.281-298, 1934.
50. STOLL, N.R. An effective method of counting hookworm eggs in feces. *American Journal of Hygiene*, v.3, p.59-70, 1923.
51. BAERMANN, G. Eine einfache methode zur auffindung von Ancylostomum (Nematoden) larven in erdproben. *Geneesk Tijdschr Ned Indie*, v.57, p.131-137, 1917.
52. MOLENTO, M.B. et al. Suppressive treatment of abamectin against *Dictyocaulus viviparus* and the occurrence of resistance in first-grazing-season calves. *Veterinary Parasitology*, v.141, n.3-4, p.373-376, 2006.
53. GIRÃO, E.S.; UENO, H. Técnica de quatro tami- ses para o diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose dos ruminantes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.20, n.8, p.905-912, 1985.
54. ROBERTS, F.; O'SULLIVAN, P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, v.1, n.1, p.99-102, 1950.
55. VAN WYK, J.A. et al. Morphological identifica- tion of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. *Veterinary Parasitology*, v.119, n.4, p.277-306, 2004.
56. VAN WYK, J.A.; MAYHEW, E. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v.80, n.1, p.593, 2013.
57. MITCHELL, M. et al. The role of space in the success of coevolutionary learning. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE SIMULATION AND SYNTHESIS OF LIVING SYS-



TEMS, 10, 2006, Bloomington, Estados Unidos da América. *Proceedings... Artificial Life*, p.118-124, 2006.

58. MINHO, A.P. et al. Manual de técnicas laboratoriais e de campo para a realização de ensaios experimentais em parasitologia veterinária: foco em helmintos gastrintestinais de ruminantes. *Documentos (Embrapa Pecuária Sudeste)*, v.148, p.1-33, 2005.

59. CAVALCANTE, L.S.V. Doenças Parasitárias de Caprinos e Ovinos Epidemiologia e Controle. 1ªed. Distrito Federal: Embrapa Informação Tecnológica, 2009, 603p.

60. RAMOS, F. et al. Field and molecular evaluation of anthelmintic resistance of nematode populations from cattle and sheep naturally infected pastured on mixed grazing areas at Rio Grande do Sul, Brazil. *Acta Parasitology*, v.65, n.1, p.118-127, 2020.

61. NICIURA, S.C.M. et al. Determinação da eficácia anti-helmintica em rebanhos ovinos: metodologia de colheita de amostras e de informações de manejo zootécnico. *Documentos (Embrapa Pecuária Sudeste)*, v.91, p.1-29, 2009.

62. WURSTHORN, L.; MARTIN, P. Reso: faecal egg count reduction test (FECRT) Analysis Program. 2.01. Parkville: CSIRO Animal Health Research Laboratory, 1990.

63. GRIMSHAW, W.T. Potential for misinterpretation of the faecal egg count reduction test for levamisole resistance in gastrointestinal nematodes of sheep. *Veterinary Parasitology*, v.62, n.3-4, p.267-273, 1996.

64. COLES, G.C. et al. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, v.136, n.3-4, p.167-85, 2006.

65. HAMER, K. Lack of efficacy of monepantel against trichostrongyle nematodes in a UK sheep flock. *Veterinary Parasitology*, v.257, p.48-53, 2018.

66. WOOD, I.B. et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*, v.58, p.181-213, 1995.

67. DEMELER, J. et al. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastrointestinal nematodes of ruminants. *Veterinary Parasitology*, v.174, n.1-2, p.58-64, 2010.

68. BORTOLUZZI, B.B. et al. Fitoterapia no controle de parasitos gastrintestinais de ruminantes: ênfase no gênero *Mentha* e seus componentes bioativos. *Ars Veterinaria*, v.36, n.4, p.253-270, 2020.

69. GARBIN, V.P. et al. Chemical characterization and *in vitro* anthelmintic activity of *Citrus bergamia* Risso and *Citrus X paradisi* Macfad essential oil against *Haemonchus contortus* Kirby isolate. *Acta Tropica*, v.217, 105869, 2021.

70. MOLENTO, M.B.; PRICHARD, R.K. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.21, n.3, p.117-121, 2001.

71. CAVALCANTI, M.D.P. et al. Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas. *Revista de Patologia Tropical*, v.37, n.1, p.1-14, 2008.

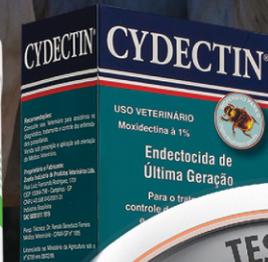
72. HUNT, P.W.; LELLO, J. How to make DNA count: DNA-based diagnostic tools in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology*, v.186, n.1-2, p.101-108, 2012.



73. BELL, A.S.; RANFORD-CARTWRIGHT, L.C. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitology*, v.18, n.8, p.337-342, 2002.
74. VERWEIJ, J.J. et al. Real-time PCR for the detection of *Dientamoeba fragilis* in fecal samples. *Molecular and Cellular Probes*, v.21, n.5-6, p.400-404, 2007.
75. GADKAR, V.J. et al. Real-time detection and monitoring of Loop Mediated Amplification (LAMP) reaction using self-quenching and de-quenching fluorogenic probes. *Scientific Reports*, v.8, n.1, 5548, 2018.
76. ZARLENGA, D.S.; HIGGINS, J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology*, v.101, n.3-4, p.215-230, 2001.
77. REDMAN, E. et al. Validation of ITS-2 rDNA nemabiome sequencing for ovine gastrointestinal nematodes and its application to a large-scale survey of UK sheep farms. *Veterinary Parasitology*, v.275, 108933, 2019.
78. AVRAMENKO, R.W. et al. The use of nemabiome metabarcoding to explore gastro-intestinal nematode species diversity and anthelmintic treatment effectiveness in beef calves. *International Journal of Parasitology*, v.47, n.13, p.893-902, 2017.
79. MAY, R.M.; ANDERSON, R.M. Regulation and stability of host-parasite population interactions: II. Destabilizing processes. *Journal of Animal Ecology*, v.47, n.1, p.249-267, 1978.
80. CABARET, J. et al. Faecal egg counts are representative of digestive-tract strongyle worm burdens in sheep and goats. *Parasite*, v.5, n.2, p.137-142, 1998.
81. TAYLOR, L.R. et al. Behavioral dynamics. *Nature*, v.303, p.801-804, 1983.
82. SHAW, D.J. et al. Patterns of macroparasite aggregation in wildlife host populations. *Parasitology*, v.117, n.6, p.597-608, 1998.
83. COHEN, J.E. Linking parasite populations in hosts to parasite populations in space through Taylor's law and the negative binomial distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.114, n.1, p.47-56, 2017.



ACESSE NOSSA LANDING PAGE E SAIBA MAIS.



CHEGOU A HORA DE FINALIZAR O PROTOCOLO 5-8-11 APLIQUE TREO ACE EM NOVEMBRO



O Controle 5-8-11 Zoetis é um protocolo inovador que consiste na aplicação de Treo ACE (maio e novembro) e Cydectin (agosto). Ao combater os principais vermes, possibilita uma melhoria no bem-estar animal e na produtividade.



zoetis