

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**TESE**

**MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO EM *Fasciola hepatica***  
**(TREMATODA: FASCIOLIDAE)**

**Milena Batista Carneiro**

**2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO EM *Fasciola hepatica*  
(TREMATODA: FASCIOLIDAE)**

**Milena Batista Carneiro**

*Sob orientação do professor*

**Fabio Barbour Scott**

*e Coorientação da professora*

**Isabella Vilhena Freire Martins**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Veterinárias**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Parasitologia Veterinária

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2014

636.2089696

Carneiro, Milena Batista, 1983-

C289m

T

Métodos de diagnóstico em *Fasciola hepatica* (Trematoda: Fasciolidae) / Milena Batista Carneiro. – 2014.

106 f.: il.

Orientador: Fabio Barbour Scott.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2014.

Bibliografia: f. 89-106.

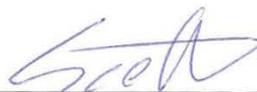
1. Ruminante - Parasito - Teses. 2. Fasciolose - Diagnóstico - Teses. 3. Fasciolose - Controle – Teses. 4. Fasciolose - Epidemiologia – Teses. 5. *Fasciola hepatica* – Teses. 6. *Lymnaea columella* – Teses. 7. Parasitologia veterinária – Teses. I. Scott, Fabio Barbour, 1966- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**MILENA BATISTA CARNEIRO**

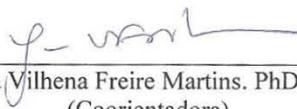
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Veterinárias**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

TESE APROVADA EM: 27/02/2014



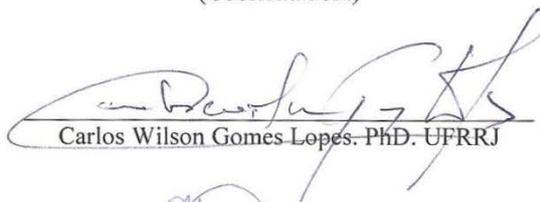
---

Fabio Barbour Scott. Dr. UFRRJ  
(Orientador)



---

Isabella Vilhena Freire Martins. PhD. UFES  
(Coorientadora)



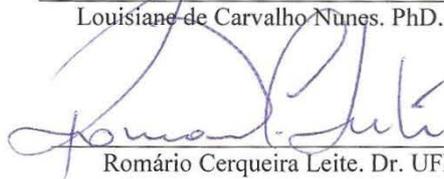
---

Carlos Wilson Gomes Lopes. PhD. UFRRJ



---

Louisiane de Carvalho Nunes. PhD. UFES



---

Romário Cerqueira Leite. Dr. UFMG

*Este trabalho é dedicado a todas as  
pessoas que passaram por minha vida e  
me tornaram o que sou hoje,  
como mulher e como profissional.*

*“Na vida não há prêmios nem castigos,  
somente consequências.”*

*Robert Green*

## AGRADECIMENTOS

Tantas pessoas foram importantes nesta etapa! Primeiro quero agradecer à força que me guia, à fé que me alimenta, o conforto nos dias difíceis e a gratidão nos dias de alegria. Agradeço a Você, meu Deus, pela forma que se manifesta em mim e me faz ser uma pessoa melhor.

À minha família, em especial, meus pais, Izabel Eliza Batista Carneiro e José Wilson Carneiro, e meus irmãos, Aline Batista Carneiro e Thiago Batista Carneiro. A todos os outros familiares que sabem o quanto são importantes na minha vida. Beatriz, obrigada pela luz.

Aos colegas de laboratório, agradeço por contribuírem para minha formação profissional e pessoal. Aos amigos de laboratório, agradeço pelas confidências, pelo abraço, pelas risadas e por esse sentimento de amor que nos une na amizade.

Aos estagiários, bolsistas, alunos de graduação e de pós-graduação da Universidade Federal do Espírito Santo, obrigada por contribuírem na etapa prática deste projeto.

Aos amigos de Vila Velha e de Alegre, sempre me acolhendo, me incentivando e entendendo a ausência. Sempre por perto, mesmo distante.

Pedro Vianna Tavares, obrigada pela compreensão e paciência. Não teria conseguido sem o seu apoio e carinho. Obrigada pela ajuda na elaboração deste livro. Meu eterno “muito obrigada!”

À minha querida amiga e co-orientadora, Isabella Vilhena Freire Martins, que tanto insistiu junto comigo para a realização deste projeto, me incentivando e me levantando quando eu queria desistir de tudo e os resultados não eram os esperados. Obrigada pela orientação e pelos momentos de alegria, e principalmente, obrigada por estar sempre presente na minha vida, contribuindo para meu amadurecimento pessoal e profissional. Você estará sempre comigo.

À Thaís Correia Ribeiro Azevedo e Katherina Coumendouros, obrigada pelos variados momentos que passamos dentro e fora do Laboratório. Obrigada pelas inúmeras recepções em casa, pelas conversas de desabafo e pela enorme contribuição para meu amadurecimento.

Ao meu orientador, Fabio Barbour Scott, que tanto agradeço por me receber como filha, seja no laboratório ou na vida pessoal. Obrigada pelos conselhos, pelo incentivo, pelo zelo. Obrigada pelo apoio e compreensão quando tudo parecia perdido. Eternamente agradecida pelo carinho e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio a Pesquisa da Universidade Rural (FAPUR) pelo apoio financeiro.

À vida, muito obrigada!

## **BIOGRAFIA**

Milena Batista Carneiro, filha de José Wilson Carneiro e Izabel Eliza Batista Carneiro, nasceu no dia 11 de fevereiro de 1983, no município de Vila Velha, Estado do Espírito Santo. cursou o ensino fundamental até o segundo ano do ensino médio no Colégio São José em Vila Velha - ES. cursou o terceiro ano do ensino médio no Colégio Nacional e o pré-vestibular no Colégio Up, ambos em Vila Velha. Em novembro de 2002 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) em Alegre-ES. Durante a graduação atuou como estagiária do laboratório de Parasitologia Veterinária sob orientação da Professora Isabella Vilhena Freire Martins e no laboratório de Patologia Animal sob orientação da professora Louisiane de Carvalho Nunes. Realizou estágios extracurriculares em clínica de pequenos animais, na Polícia Militar Montada do Estado do Espírito Santo, em Centros de Triagem de Animais Silvestres em Viçosa- MG, Seropédica-RJ e Tijucas do Sul-PR. Participou da organização da Semana de Educação Continuada em Medicina Veterinária (SECOMV) entre os anos de 2003 a 2006. Participou de projetos de extensão realizados pela UFES em Alegre-ES. Formou-se em agosto de 2007 e em março de 2008 ingressou no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFES, em nível de Mestrado. Foi bolsista FAPES, de março de 2008 a fevereiro de 2010, sob a orientação da professora Isabella Vilhena Freire Martins. Recebeu o título de Mestre em Ciências Veterinárias em março de 2010 e, neste mesmo mês, ingressou no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em nível de Doutorado, sob supervisão do Professor Fabio Barbour Scott e coorientação da Professora Isabella Vilhena Freire Martins. De março de 2011 a dezembro de 2012 realizou curso de Pós-graduação em Clínica e Cirurgia de Animais Silvestres e Exóticos pelo Instituto Qualittas de Pós-graduação, no Rio de Janeiro-RJ. Em maio de 2012 ingressou na Escola Superior São Francisco de Assis (ESFA) no município de Santa Teresa-ES como professora do curso de Medicina Veterinária responsável pelas disciplinas de Parasitologia Veterinária, Doenças Parasitárias, Patologia Animal I, Patologia Animal II e Histologia Animal. No ano de 2013, teve aprovação de dois projetos de iniciação científica para os alunos do 6º período de Medicina Veterinária recebendo auxílio financeiro da FAPES para execução dos projetos. Desde o segundo semestre de 2012 até a presente data faz parte da Comissão de Animais Selvagens do Estado do Espírito Santo, vinculado ao Conselho Regional de Medicina Veterinária deste estado. Durante a vida profissional ministrou palestras para produtores rurais e em Semanas Acadêmicas contribuindo para a melhoria da qualidade de vida animal e humana.

## RESUMO

CARNEIRO, Milena Batista. **Métodos de diagnóstico em *Fasciola hepatica* (Trematoda: Fasciolidae)**. 2014. 106p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Este trabalho objetivou estudar métodos de diagnóstico e controle de *Fasciola hepatica* em ruminantes, além de fornecer informações sobre a dinâmica populacional de *Lymnaea columella*. Na primeira etapa do trabalho, entre novembro de 2010 e junho de 2013, moluscos da espécie *L. columella* foram coletados em cinco diferentes pontos e correlacionados a dados meteorológicos como precipitação e temperatura. Não houve diferença entre o número médio de moluscos nas estações do ano. A segunda etapa do trabalho envolveu a comparação da técnica de sedimentação descrita por Foreyt (2005) com técnica de quatro tamises proposta por Girão; Ueno (1985) com infecção artificial de fezes de bovinos com ovos de *F. hepatica*, para diagnóstico quantitativo deste parasito. Após análise estatística a técnica de sedimentação apresentou resultado superior com maiores percentuais de recuperação além de possui menor custo e ser de mais fácil execução que a técnica de tamisação. Na terceira e última etapa deste trabalho, exemplares adultos de *F. hepatica* foram coletados de ovinos previamente tratados com albendazole e de um ovino controle. Os tempos de avaliação foram 48, 72 e 96 horas pós-tratamento. Os parasitos foram processados por meio de técnica histopatológica e avaliados quanto à alterações no aparelho reprodutor masculino. Observou-se que no decorrer do tempo de avaliação houve alterações significativas nas células espermatogênicas as quais incluem: rarefação celular, apoptose com células apresentando características de picnose e cariorrexe e, conseqüentemente, diminuição da produção de espermatozoides, além de vacuolização intra e extracelular. Estes resultados demonstram que o albendazole alterou a produção de espermatozoides o que interfere da produção de ovos de *F. hepatica*, demonstrando a eficácia do mesmo neste experimento. Estudos de sazonalidade do hospedeiro intermediário de *F. hepatica*, que contribuem para a escolha da melhor técnica diagnóstica deste parasito e que demonstrem eficácia e/ou resistência de medicamento são essenciais para que se estabeleçam em cada região programas estratégicos eficazes para o controle da fasciolose.

Palavras chave: fasciolose, *Lymnaea columella*, epidemiologia.

## ABSTRACT

CARNEIRO, Milena Batista. **Methods of diagnosis in *Fasciola hepatica* (Trematoda: Fasciolidae)**. 2014. 106p. Thesis (Doctorate in Veterinary Science, Veterinary, Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

This study investigated methods of diagnosis and control of *Fasciola hepatica* in ruminants, in addition provided information about the population dynamics of *Lymnaea columella*. In the first stage of labor, between November 2010 and June 2013, the mollusc species *L. columella* were collected at five different locations and compared with Meteorological data such as precipitation and temperature. There was no significant difference between the mean number of mollusks at the seasons. The second stage of the study involved the comparison of the sedimentation technique described by Foreyt (2005) with four sieves technique proposed by Girão; Ueno (1985) with artificially infected cattle feces with *F. hepatica* eggs for quantitative diagnosis of this parasite. After statistical analysis, the sedimentation technique showed better results with higher percentages of recovery in addition to having lower cost and be easier to perform than the sieving technique. In the third and final stage of this study, adult specimens of *F. hepatica* were collected from sheep previously treated with albendazole and one sheep control. The evaluation times were 48, 72 and 96 hours post-treatment. Flukes were processed for histopathologic and assessed for changes in male reproductive system. It was observed that during the evaluation period were significant changes in spermatogenic cells which include rarefaction cell, apoptosis in cells with typical pyknosis and karyorrhexis and thereby decrease sperm production, as well as intra- and extracellular vacuolation. These results demonstrate that albendazole altered sperm production which interferes with the production of fluke eggs, demonstrating the effectiveness of the drug in this experiment. Studies of seasonality intermediate host of *F. hepatica*, which contribute to the choice of the best diagnostic technique of this parasite and demonstrating efficacy and / or drug resistance are essential for the establishment, in each region, an efficient strategic program of fluke control.

Keywords: fasciolosis, *Lymnaea columella*, epidemiology.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1.** Número de exemplares de moluscos totais e de *Lymnaea columella* coletados no período de novembro de 2010 a junho de 2013. 46

**Tabela 2.** Médias e desvio padrão do número de moluscos totais e de *Lymnaea columella*, por ano, no período de novembro de 2010 a junho de 2013. 47

### CAPÍTULO II

**Tabela 1.** Número de ovos recuperados na técnica de quatro tamises proposta por Girão; Ueno (1985) em infecção leve, moderada e pesada. 66

**Tabela 2.** Números de ovos recuperados na técnica de sedimentação fecal descrita por Foreyt (2005) em infecção leve, moderada e pesada. 66

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** Distribuição sazonal de *Lymnaea columella*, precipitação (mm) e temperatura (°C) nos anos de 2011, 2012 e 2013. 49

### CAPÍTULO III

**Figura 1.** Túbulo testicular de *Fasciola hepatica* recuperada de animal controle. SG: espermatogônia, SC: espermatócito, SPTZ: espermatozoide. 79

**Figura 2.** Túbulo testicular de *Fasciola hepatica* recuperada de animal tratado com albendazole e eutanasiado 48 horas após o tratamento. SG: espermatogônia, SC: espermatócito. 80

**Figura 3.** Túbulo testicular de *Fasciola hepatica* recuperada de animal tratado com albendazole e eutanasiado 72 horas após o tratamento. SG: espermatogônia, SC: espermatócito, MCE: material celular eosinofílico. Setas: vacúolos. 81

**Figura 4.** Túbulo testicular de *Fasciola hepatica* recuperada de animal tratado com albendazole e eutanasiado 96 horas após o tratamento. SG: espermatogônia, SC: espermatócito. Seta: picnose nuclear. 82

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	3
2.1 Morfologia e Biologia de <i>Fasciola hepatica</i>	3
2.2 Epidemiologia da Fasciolose	7
2.3 Distribuição da Fasciolose	16
2.3.1 Distribuição no Brasil	16
2.3.2 Distribuição no mundo	20
2.3.3 Distribuição de casos humanos	22
2.4 Patogênese da Fasciolose	23
2.5 Diagnóstico da Fasciolose	24
2.6 Tratamento e Controle da Fasciolose	28
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>Estudo da dinâmica populacional de <i>Lymnaea columella</i> na microrregião do Caparaó-ES</b>	38
Resumo	39
Abstract	40
1 Introdução	41
2 Material e Métodos	42
2.1 Localização do Experimento	42
2.2 Coleta e Análise dos Moluscos	43
2.3 Coleta de Dados Meteorológicos	43
2.4 Análise Estatística	43
3 Resultados e Discussão	45
4 Conclusões	55
5 Referências Bibliográficas	56
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>Técnica de sedimentação (Foreyt, 2005) para diagnóstico quantitativo de ovos de <i>Fasciola hepatica</i></b>	59
Resumo	60
Abstract	61
1 Introdução	62
2 Material e Métodos	64
2.1 Obtenção de Ovos de <i>Fasciola hepatica</i> e de Amostras de Fezes Negativas	64
2.2 Determinação da Quantidade de Ovos para Contaminação Fecal	64
2.3 Técnica de Quatro Tamises Proposta por Girão; Ueno (1985)	65
2.4 Técnica de Sedimentação Fecal Descrita por Foreyt (2005)	65
2.5 Análise Estatística	65
3 Resultados e Discussão	66
4 Conclusões	70
5 Referências Bibliográficas	71
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>Alterações morfológicas das células espermatogênicas de <i>Fasciola hepatica</i> recuperadas de ovinos tratados com albendazole</b>	73
Resumo	74

Abstract	75
1 Introdução	76
2 Material e Métodos	77
3 Resultados e Discussão	78
3.1 Morfologia dos Testículos Normais (Controle)	78
3.2 Quarenta e Oito Horas Pós Tratamento	79
3.3 Setenta e Duas Horas Pós Tratamento	80
3.4 Noventa e Seis Horas Pós Tratamento	81
4 Conclusões	86
5 Referências Bibliográficas	87

<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>89</b>
-------------------------------------	-----------

## 1 INTRODUÇÃO

A fasciolose é uma enfermidade causada pelo trematódeo *Fasciola hepatica*, parasito do fígado e ductos biliares, que causa enormes prejuízos nas criações de ruminantes com distribuição cosmopolita e, sendo zoonose, assume grande importância em saúde pública. Além dos ruminantes e humanos, equinos e animais silvestres também podem ser acometidos por esta parasitose. Os primeiros relatos de *F. hepatica* no Brasil começaram na região sul, mas, hoje se encontra disseminada em vários estados.

Pode-se considerar a fasciolose uma enfermidade reemergente na qual nota-se um aumento do número de casos da doença e da disseminação da mesma além de considerável aumento na diversificação de espécies acometidas. Estudos recentes em municípios da região sul do Espírito Santo mostram que as espécies bovina, bubalina, caprina e ovina são acometidas pela fasciolose acarretando prejuízos para o produtor e conseqüentemente para o estado.

Nos animais, a doença causa perda na produtividade com baixo ganho de peso afetando a produção de leite, carne e lã. Além disso, o fígado é condenado na linha de abate, havendo também perda econômica neste setor. Os animais com doença crônica podem exibir desde anemia branda até vir a óbito sendo os pequenos ruminantes mais sensíveis que os bovinos. Trabalhos realizados em muitos países mostram a grande importância no que diz respeito ao impacto produzido por *F. hepatica* especialmente na produtividade da pecuária bovina.

Especialmente no Espírito Santo o problema tem se tornado crítico nos últimos anos, com uma tendência crescente de condenação de fígados (BERNARDO et al., 2011), com percentuais de condenação chegando a 28% em 2012. Em estudos a campo na região, vários autores comprovam a presença de *F. hepatica* em bovinos, caprinos, ovinos e até bubalinos (ALVES et al., 2011; CARNEIRO et al., 2013) além de estudos malacológicos confirmarem a presença dos moluscos do gênero *Lymnaea* na região (ALMEIDA, 2010).

Tendo em vista dados citados, faz-se necessário um estudo detalhado da região, como foco endêmico de fasciolose, para o conhecimento do comportamento do hospedeiro intermediário, para melhoria do diagnóstico coproparasitológico e de novas propostas de controle para a fasciolose na região.

Atualmente no diagnóstico de *F. hepatica*, as técnicas coproparasitológicas

indicadas se mostram com baixa sensibilidade dificultando a confirmação da enfermidade antes do abate ou óbito do animal. Apesar de haver técnicas sorológicas e de detecção de antígenos nas fezes o emprego destas não condiz com a realidade das propriedades brasileiras principalmente por apresentarem custo elevado, sendo utilizadas para fins científicos. É muito importante que técnicas com boa sensibilidade e que sejam de fácil realização e baixo custo estejam disponíveis para garantir maior eficácia no diagnóstico. As técnicas coproparasitológicas utilizadas atualmente são qualitativas, sendo extremamente importante a quantificação das técnicas para auxiliar nas estimativas de perdas produtivas nos animais.

Para o controle da enfermidade, o triclabendazole é o princípio ativo mais eficaz contra este parasito, já que é capaz de eliminar as formas jovens e adultas do parasito. Como não é comercializado no Brasil, outros compostos, como o albendazole, também são utilizados no tratamento, mas com atuação somente sobre as formas adultas do parasito. O tratamento dos animais deve ser em conjunto com práticas de manejo, da pastagem e do hospedeiro intermediário.

Pelo fato do albendazole ser amplamente utilizado no controle desta e de outras parasitoses e por ser o mais utilizado na região de estudo, é importante a realização de ensaios que demonstrem o efeito deste antiparasitário no parasito. Há diversos relatos na literatura de resistência de *F. hepatica* a muitos fármacos, mas a afirmação de resistência deve ser feita com cautela já que há diferentes cepas deste parasito distribuídas pelas regiões, no Brasil e no mundo.

Este trabalho teve o objetivo de estudar métodos de diagnóstico e controle de *F. hepatica* em ruminantes, além de fornecer informações sobre a dinâmica populacional de *Lymnaea columella*, hospedeiro intermediário.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Os agentes etiológicos da fasciolose são helmintos pertencentes à Classe Trematoda da Família Fasciolidae conhecidos como *Fasciola hepatica* e *F. gigantica*, sendo este último restrito ao velho mundo (MAS-COMA, BARGUES; VALERO 2005). Originária da Europa a espécie *F. hepatica* alcançou todos os continentes possivelmente devido à colonização, ao transporte e ao livre comércio de animais (LUTZ, 1921) e é a responsável por esta enfermidade no Brasil (REID; DARGIE, 1995).

### 2.1 Morfologia e Biologia de *Fasciola hepatica*

O parasito *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) é um trematódeo pertencente ao Filo Platyhelminthes, família Fasciolidae, que parasita o fígado e as vias biliares de muitas espécies de animais domésticos e selvagens, e humanos (DITTMAR; TEEGEN, 2005). Pertence à subclasse Digenea e ordem Distomata, caracterizando-se por ser deprimido dorso-ventralmente em forma de folha, possuir duas ventosas, uma oral e outra acetabular ou ventral, e ainda apresentar cone cefálico. Alimenta-se de sangue e fragmentos tissulares do hospedeiro (URQUHART et al., 1996).

A forma jovem é caracterizada por possuir de 1 a 2 cm de comprimento e formato de lanceta e quando atinge a forma adulta nos ductos biliares, passa a ser caracterizada pelo achatamento dorso-ventral, com cerca de 3,5 cm de comprimento, que lhe confere aspecto foliáceo e coloração marrom acinzentada ou pardacenta (FAIRWEATHER; THREADGOLD; HANNA, 1999).

O parasito é hermafrodita e os órgãos do aparelho genital feminino são constituídos por um ovário ramificado, útero sinuoso, oviduto e glândulas vitelínicas. O aparelho genital masculino é constituído por dois testículos ramificados. Os ovos são de cor amarelo claro, elípticos, possuindo um opérculo em uma das extremidades (LESSA; SERRA-FREIRE; MAURE, 2007). Para sua maturação, os ovos devem encontrar condições adequadas de umidade e temperatura. São resistentes a fatores ambientais, e podem sobreviver em material fecal por cerca de um ano (URQUHART et al., 1996). Caso o ovo precise ficar armazenado por um tempo, para posterior diagnóstico, a solução de formalina a 5% foi eficaz por até seis anos sem alterar as características morfológicas que garantem o diagnóstico da fasciolose (BONITA; TAIRA, 1996).

No ciclo biológico deste parasito, os ovos são eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos, e quando em ambientes alagadiços, estes eclodem e dão origem a uma larva piriforme ciliada denominada miracídio. Esse estágio larvar não se alimenta, e possui poucas horas para penetrar nas partes moles do hospedeiro intermediário, molusco do gênero *Lymnaea* (URQUHART et al., 1996). De acordo com Beck (1993), o miracídio permanece no ambiente por até seis horas, deslocando-se rapidamente na água através de movimentação ordenada dos cílios até encontrar e penetrar de forma ativa pelas partes moles do hospedeiro intermediário.

No interior do hospedeiro intermediário, o miracídio evolui para a fase de esporocisto, rédia e depois cercária, sendo essa eliminada pelo caramujo. Uma vez livre a cercária, munida de cauda, nada ao encontro de superfícies firmes, como folhas de capins, e se encistam na vegetação como forma infectante, a chamada metacercária (BLOOD; HENDERSON; RADOSTITS, 1983). Gomes et al. (2002) em estudo sobre estabelecimento de foco de fasciolose em Campos dos Goytacazes-RJ, observaram metacercárias na superfície de conchas de moluscos, demonstrando que as metacercárias podem se encistar em substrato diferente da vegetação. As metacercárias ingeridas pelo hospedeiro definitivo desencistam-se no intestino delgado, migram através da parede intestinal até penetrarem no parênquima hepático (URQUHART et al., 1996).

O ponto chave do ciclo evolutivo desse parasito, é que sofre pedogênese no hospedeiro intermediário, ou seja, há a produção de vários indivíduos a partir de uma única forma larvar (URQUHART et al., 1996). Ueta (1980), em trabalho de infecção experimental de *L. columella* com miracídios desenvolvidos a partir de ovos recuperados de bile de bovinos e bile e fezes de coelhos obteve 200 metacercárias de caramujos infectados com dois miracídios, aproximadamente 190 metacercárias de caramujo infectado com três miracídios e 1150 metacercárias de caramujos infectados com cinco miracídios.

Considerando-se as fases de vida livre e parasitária, o ciclo da *F. hepatica* requer pelo menos quatro meses (SERRA-FREIRE et al., 1995). Cada parasito adulto pode eliminar cerca de três a sete mil ovos por dia, os quais são eliminados no meio ambiente juntamente com as fezes (LEITÃO, 1980) Estudos realizados *in vitro*, citam que na faixa de temperatura entre 10° e 15°C as metacercárias permanecem ativas durante oito meses e que na faixa de 5° ou 20°C a longevidade foi reduzida pela metade (MÜLLER et al., 1999).

Para que o ciclo ocorra, é necessária a presença de um molusco, hospedeiro intermediário. Entre as classes pertencentes ao filo Mollusca, a classe Gastropoda recebe destaque pela sua importância médica, veterinária e econômica (CORAL; MASTALIR; MASTALIR, 2007; BRASIL, 2008). Segundo Paraense (1983), no Brasil, há três espécies de moluscos da família Lymnaeidae: *L. columella*, *L. viatrix* e *L. rupestris*, sendo que as duas primeiras espécies são as que participam do ciclo da *F. hepatica*. Dessas, a *L. columella* é a que se encontra mais distribuída no Brasil, principalmente na região sudeste.

Müller (1981) e Müller; Ueno (1982) apontaram no Rio Grande do Sul a espécie *L. viatrix* como hospedeiro intermediário de *F. hepatica* em condições naturais. Esses autores encontraram o limneídeo na superfície de locais úmidos e lodosos, com ou sem vegetação. De acordo com Oliveira; Spósito Filha (2009) essa espécie é capaz de sobreviver em solos argilosos, em canais de irrigação com pouca água e em lodos e brejos. No estado do Rio de Janeiro também foi observada a presença de *L. viatrix* (ECHEVARRIA, 1985).

Acompanhamento laboratorial do ciclo biológico de *L. viatrix* em laboratório, provenientes do Rio Grande do Sul foi realizado por Müller et al. (1998) a fim de obter informações sobre postura, incubação, eclodibilidade dos ovos, crescimento e longevidade dos moluscos, potencial reprodutivo e intervalo entre gerações, demonstrando ser esta espécie também importante no ciclo da fasciolose, apesar de não ser encontrada disseminada como *L. columella*.

Os membros da família Lymnaeidae são habitantes de água doce, apresentam concha sem opérculo, com giros enrolados em hélice (convexos), forma cônica, alongada, fina, abertura oval ou arredondada e medem em torno de 11 a 15 mm de altura (THIENGO; FERNANDEZ, 2007). O enrolamento da concha é sempre dextrógiro, isto é, quando o vértice da concha está voltado para cima e o observador olha para sua abertura, esta se encontra situada à direita (REY, 2001).

Estes gastrópodes límnicos podem ser encontrados em diferentes coleções hídricas, tais como: açudes, alagados, brejos, córregos, lagoas, valas de esgoto ou drenagem, riachos e rios. As colônias, geralmente, são abundantes em águas estagnadas, sendo que em águas correntes os moluscos não formam populações (SERRA-FREIRE, 1995). Possuem hábitos anfíbios e toleram as variações de nível da água em seu habitat, permanecendo enterrados no sedimento durante a estiagem (GOMES, 2012).

Lutz (1921) relatou pela primeira vez a participação de moluscos do gênero *Lymnaea* no ciclo biológico de *Fasciola hepatica* no Brasil, no estado do Rio de Janeiro,

sendo encontrados infectados naturalmente com formas imaturas. Rezende et al.(1973) registraram a ocorrência de *L. columella* e *L. cubensis* no Rio de Janeiro. Já Paraense (1982), assinalou *L. viatrix* no Rio Grande do Sul e Minas Gerais, *L. columella* no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Distrito Federal, Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul e Paraná (LUZ; VIANA; CEZAR, 1994; QUEIROZ; LUZ, 2000) e *L. rupestris* em Santa Catarina. Na Paraíba, foi realizado primeiro registro de *L. columella* associado à macrófitas aquáticas em açudes na região (ABÍLIO; WATANABE, 1998).

O molusco *L. columella* foi encontrado em 14 municípios banhados pelas bacias hidrográficas dos rios Itapemirim, Itabapoana e Benevente no estado do Espírito Santo (ALMEIDA, 2010). E mais recentemente, Dias et al. (2013) identificou a frequência e distribuição de moluscos aquáticos em três municípios do sul do Espírito Santo, Castelo, Cachoeiro de Itapemirim e Alegre e demonstrou que a espécie *L. columella* foi o caramujo mais frequente (38,5%), sendo encontrado nos três municípios. Nas amostras coletadas, entre julho de 2009 e março de 2010, o município de Cachoeiro de Itapemirim representou 73,4% desta espécie. Os caramujos foram encontrados em pequenos córregos nas pastagens, em meio a plantações de café, em meio a bananeiras, em cachoeiras, esgoto de quintal de sítios, caixas d'água, cochos de água para dessedentação animal e esgotos.

*Fasciola hepatica* possui como principais hospedeiros definitivos os bovinos e ovinos. Além deste, pode parasitar caprinos, equinos, búfalos (PILE et al., 2001a), humanos (CALRETAS et al., 2003; SVS, 2005; CORAL; MASTALIR; MASTALIR, 2007) e animais silvestres, como a capivara e rato do banhado (EL KOUBA, 2005). Os registros de fasciolose hepática em equinos no Brasil ainda são escassos tendo ocorrências apenas no estado do Paraná (BUSETTI, 1983) e Santa Catarina (NUERNBERG; SERRA-FREIRE, 1992).

Dentre as espécies silvestres que podem ser parasitadas por *F. hepatica* estão: gamo, veado (MAIA, 2001), alpacas (PUENTE, 1997), marsupiais e ornitorrinco (FOWLER, 1993). Ménard et al. (2000) considera o roedor rato-do-banhado (*Myocastor coypus*) importante na manutenção e disseminação de *F. hepatica* em vários ambientes como confirmado por El-Kouba (2005) em estudo realizado em parques públicos em Curitiba-PR. De acordo com estudos realizados na Austrália, alguns destes animais se limitam a representarem o papel de hospedeiros temporários e, por esta razão, não mantêm o ciclo por muito tempo, tal seria o caso dos coelhos silvestres, que contaminam as

pastagens de modo insignificante (BORAY, 1969).

De acordo com Buseti (1982), a principal fonte de infecção para o homem é a ingestão de agrião, *Nasturtium officinale*, infectados com a metacercária. O autor relata a presença de bovinos positivos em áreas alagadas, hospedeiro intermediário de *F. hepatica* e plantação de agrião, relacionados a casos humanos em Curitiba. Ainda assim, a infecção humana é considerada acidental ocorrendo principalmente pela ingestão de hortaliças aquáticas e semi-aquáticas, como agrião e alface (RONDELAUD et al., 2000; ANDRADE DE FREITAS et al., 2004).

Além do consumo de plantas aquáticas, o homem pode também se infectar pelo deficiente acesso da população aos serviços de saneamento básico como relatado por Carpio e Iwashita (2008) em estudo realizado no Peru verificando uma prevalência de 1,12% de fasciolose em humanos e relacionando os casos ao saneamento deficiente.

## **2.2 Epidemiologia da Fasciolose**

A fasciolose hepática, originalmente uma doença de animais domésticos da Europa teve as primeiras referências feitas por Jeahn de Brie, 1379 (BORAY, 1969). Sua distribuição para outros continentes foi muito favorecida pela importação desses animais, pelas colônias, no período colonial. Durante este período houve uma adaptação abrupta para sobrevivência em novos habitats o que explica a diferença na dinâmica do processo parasitário em várias regiões do mundo (SERRA-FREIRE, 1995).

A epidemiologia da fasciolose está vinculada a fatores climáticos, de manejo, topográficos, além da presença no ambiente, de moluscos do gênero *Lymnaea*, necessários para a ocorrência do ciclo da doença (MATTOS et al., 1997). SERRA-FREIRE (1995) afirma que vários fatores envolvem a epidemiologia, em especial a temperatura, disponibilidade de água, densidade de hospedeiros e espécies de hospedeiros. Animais de espécies diferentes que são criados no mesmo pasto por longos períodos de tempo também são importantes na manutenção da fasciolose (CUNHA; MARQUES; MATTOS, 2007). Além disso, os que permanecem sem tratamento contribuem para a contaminação do pasto, através da eliminação de ovos nas fezes (GOMES et al., 2002).

Alves et al. (2011) verificaram que, no sul do Espírito Santo, em propriedade com bovinos positivos para *F. hepatica* a presença de ovinos, caprinos e búfalos também positivos para este parasito, com acesso ao mesmo pasto, favorecem uma ampla disseminação dos ovos no meio ambiente e, conseqüentemente, um maior risco de infecção

para o gado.

Outro ponto a ser considerado é a eliminação das descargas de abatedouros. De acordo com Araújo, Garcia e Linhares (1995), muitas vezes essas descargas são realizadas em rios e córregos havendo possibilidade de instalação de focos da parasitose nos rebanhos por contaminação do molusco transmissor e conseqüentemente dos animais.

De acordo com Boaventura et al. (2007) os moluscos tem fundamental importância no ciclo de vida dos trematódeos digenéticos atuando como hospedeiros intermediários e em alguns ciclos até mesmo como segundo hospedeiro. O habitat de moluscos do gênero *Lymnaea* é dado por canais de drenagem ou irrigação, áreas com pastagens alagadas, pantanosas ou inundadas periodicamente e que oferecem locais adequados para a presença e proliferação dos moluscos (SILVA et al., 1980, SERRA-FREIRE, 1999). Esses locais normalmente incluem circulação hídrica lenta, como bancos de areia, valões, córregos e margens de pequenos lagos (MITCHELL, 2004).

Do ponto de vista ecológico, os habitats de *Lymnaea* podem dividir-se em dois grandes grupos: os denominados focos primários (reservatórios) e aqueles denominados de áreas de disseminação. Os focos primários são locais permanentemente úmidos, como rios de pouco curso, lagos, canais, áreas de campos alagados, onde os moluscos se reproduzem de modo constante. Nestes locais, a população de moluscos se mantém uniforme, em nível quase sempre baixo. As áreas de disseminação são aquelas onde se alternam inundações e secas, e são de especial interesse epidemiológico. São ambientes de disseminação dos focos primários originais, e contêm grandes concentrações de *Lymnaea*. Os moluscos podem proceder diretamente dos focos primários, levados pelas águas de enchentes, ou procederem da reativação dos moluscos que ficaram em latência durante os períodos de seca. As chuvas (ou a irrigação), depois de um período seco, criam condições favoráveis nestes campos para a reprodução dos mesmos (ACHA; SZYFRES, 1986).

Em períodos em que as condições climáticas são desfavoráveis os moluscos podem entrar em estivação, se enterrando na lama ou barro e assim permanecer por vários meses (SILVA et al., 1980; SERRA-FREIRE, 1995). É notavelmente marcante, como na estação seca, uma grande aglomeração de moluscos em determinados locais pode assegurar a transmissão do parasito, uma vez que nestes, o estoque de água é menor, diminuindo assim a área de vazão do corpo de água em questão, favorecendo encontros ocasionais entre o parasito e o hospedeiro. Na estação chuvosa, estas áreas aumentam em tamanho e proporção, o que garante uma maior exposição do hospedeiro definitivo ao parasito

(SERRA-FREIRE, 1995).

Segundo estudos de Souza et al. (2008), sistemas de planícies de inundação são os mais dinâmicos do planeta e determinam a existência e a manutenção de uma grande e complexa biodiversidade (POWER et al., 1995), pela formação de uma ampla variedade de habitat permanentemente aquático (rio principal, lagoas marginais e canais) associado a ambientes de transição entre o ambiente aquático e o terrestre (JUNK, BAYLEY e SPARKS, 1989). Estas áreas mostram alterações na dinâmica populacional da fauna autóctone, principalmente nas faunas malacológica e íctica, tendo reflexos diretos na estrutura e composição das populações de parasitos (PAVANELLI et al., 1997) e, conseqüentemente, em seus ciclos de vida.

Para o desenvolvimento da fasciolose, as temperaturas devem variar entre 10 e 25°C. A precipitação pode favorecer o acúmulo de água o qual normalmente ocorre em terreno mais plano ou menos montanhoso, onde as elevações são mais baixas. Por isso, além das variáveis climáticas, outras condições como altitude, alta umidade do solo, proximidade com extensas áreas hidrográficas inundadas ou pântanos, também contribuem para a proliferação dos moluscos do gênero *Lymnaea* (MÜLLER et al., 1999).

Martins et al. (2012) em estudo com utilização do Sistema de Informação Geográfica para análise de risco de fasciolose no sul do Espírito Santo concluíram que mais de 50% do sul do Espírito Santo apresentam risco alto ou muito alto para fasciolose. Os autores descreveram comparativamente que estas áreas se caracterizam por apresentar alta temperatura, com média acima de 20°C, mas relativamente baixa declividade, baixa precipitação e baixa altitude correspondente à inundação periódica das pastagens e/ou solos que promovem a retenção de água, favorecendo o desenvolvimento do molusco hospedeiro intermediário.

As regiões de maior altitude não são consideradas de maior risco devido ao relevo ser mais montanhoso, dificultando o acúmulo de água, principalmente em época de alta pluviosidade, onde pode ser formado o habitat ideal para o caramujo (MAS-COMA; FUNATSU; BARGUES, 2001). No entanto, vale ressaltar que os limites de distribuição da doença não são estritamente fixos e podem flutuar de acordo com clima e outros componentes do meio ambiente (MALONE et al., 1998).

Esses limneídeos reproduzem-se exponencialmente, apresentam postura de ovos que eclodem e possibilitam a formação de outra geração de moluscos jovens em cerca de 30 dias, em condições climáticas adequadas e temperatura ambiente acima de 10°C

(SILVA et al., 1980; SERRA-FREIRE, 1995).

No período de altas temperaturas há um declínio na população de *L. columella*, porém, o efeito negativo desta variação de temperatura é minimizado pelo aumento das chuvas. Isto significa que variações nas condições do ambiente influenciam na presença do hospedeiro intermediário, estando assim relacionada com a variação regional e anual da prevalência e incidência enzoótica da fasciolose (BRASIL, 2008).

Neste sentido, Prepelitchi et al. (2011) em um estudo realizado na Argentina sobre a influência da temperatura e da umidade nas populações de caramujos do gênero *Lymnaea*, encontraram uma abundância maior de moluscos no período do inverno, entre os anos de 2002 à 2005. Eles atribuíram estes resultados aos efeitos nocivos que um período de seca observado no verão anterior ao estudo atribuiu aos espécimes, neste caso foi necessário cerca de três meses após a chegada das chuvas para uma completa recuperação da população de *Lymnaea*. Em períodos secos quando a água dos açudes e lagos chegam à situação crítica, muitos moluscos recorrem a estratégias que assegurem sua sobrevivência enterrando-se em áreas de banhado entrando em estado de estivação.

Em estudo controlado sobre o efeito da temperatura no desenvolvimento do molusco da espécie *L. viatrix* foi possível observar que em temperaturas abaixo de 10°C, o crescimento do molusco é bem lento aumentando rapidamente quando a temperatura atinge em torno de 25°C, mas logo diminui o crescimento quando mantido nessa temperatura. Ao final do experimento, os autores confirmaram que em temperaturas que variam durante 24 horas e em situações com manutenção de temperatura constante, como realizado pelos autores, não afetou significativamente na taxa de crescimento dos moluscos. Apesar de que os autores encontraram taxas de crescimento abaixo do esperado em todas as situações demonstrando que pode estar relacionada à particularidade da espécie estudada (CLAXTON et al., 1999).

Maure et al. (1998) estudaram por seis anos os fatores que afetam e influenciam na dinâmica populacional de *L. columella* na pastagem. Eles observaram um grande número de moluscos no período seco (maio-outubro) em uma fazenda localizada no município de Piquete, no estado de São Paulo. Os estudos constataram ainda, para o mesmo período, em outro município, que o maior número de moluscos foi encontrado no período das chuvas (janeiro-março), concluindo assim que, a dinâmica da população de moluscos está estreitamente relacionada a fatores ecológicos e climáticos e estes diferem de uma localidade para outra.

Em relação à infecção dos hospedeiros vertebrados, observa-se que os maiores índices de contaminação dos herbívoros acontecem geralmente na medida em que as temperaturas aumentam no final da primavera e início do verão, associados às grandes quantidades de chuvas que acompanham a estação. Esta estreita relação revela como a dinâmica das populações de moluscos e de parasitos estão intimamente intrincados em uma rede de fatores ecológicos e climáticos (MITCHELL, 2004).

A presença de plantas proporciona ao molusco condições microclimáticas favoráveis, pois oferece proteção contra a radiação solar, altas temperaturas e correntezas (BRASIL, 2008). Rangel; Izquierdo; Nogueira (1999) sugerem que altas temperaturas podem causar redução da umidade, facilitando a desidratação dos moluscos e a dessecação do solo o que inibe o desenvolvimento de plantas e algas que são os principais alimentos desses moluscos.

Coelho; Lima (2003) realizaram estudo sobre a dinâmica populacional e infecção natural de *L. columella* por *F. hepatica* entre setembro de 1999 a dezembro de 2000 em uma área de baixa altitude perto de Itajubá-MG. Os autores observaram uma redução no número de molusco de 5,2% para 3,9% justificada pelo fato de ter ocorrido uma remoção, por parte dos agricultores, de plantas aquáticas da área alagada além da drenagem de parte dessa área, causando uma drástica redução na população do molusco.

Cruz-Mendoza et al. (2005) demonstraram correlação entre a presença de ovos de *F. hepatica* em fezes de bovinos e a umidade do solo, porém não houve relação com a temperatura do ambiente. A baixa umidade afeta a estivação, e, como consequência, o número total de hospedeiros intermediários infectados ou não. A maior temperatura do solo registrada foi um pouco acima de 30°C entre os meses de outubro e novembro. A presença do hospedeiro intermediário *Lymnaea (Fossaria) humilis*, infectado com as formas larvares de *F. hepatica*, foi relatada em todos os meses do ano, mas eram especialmente abundantes nos meses de julho a novembro. Este estudo realizado durante 19 meses na região central do México demonstrou que a prevalência de fasciolose em bovinos diminuiu de cerca de 50% em março para 30% em julho, em seguida, aumentou em agosto, atingindo o patamar de 100% em novembro e janeiro, antes diminuir gradualmente em seguida, corroborando com os achados citados.

Determinadas regiões, em época de chuva, na qual há transbordamento das águas dos rios, ficam totalmente alagadas propiciando a dispersão dos caramujos às áreas circunjacentes (BUSETTI, 1982). Queiroz et al. (2002) relacionaram a distribuição da

fasciolose em 12 propriedades de dois municípios no Paraná com a ocorrência das enchentes que disseminavam os moluscos entre as propriedades.

Van Dijk et al. (2010) relatam que áreas antes livres de fasciolose podem apresentar a doença a partir do momento em que há mudanças no clima da região, principalmente em relação à temperatura e à chuva, estabelecendo-se um ambiente favorável ao desenvolvimento do hospedeiro intermediário e conseqüentemente ao ciclo do parasito. Regiões com altas taxas pluviométricas durante muitos meses do ano proporcionam ótimas condições para a infecção dos moluscos pelo miracídio de *F. hepatica* (MEKROUD et al., 2004).

Silva et al. (2011), durante o ano de 2006, analisaram a distribuição espacial da fasciolose bovina no estado de Santa Catarina, e, apesar dos casos de fasciolose não estarem relacionados com a altitude, constataram que a porcentagem das doenças foi maior nas cidades de menor altitude. Já a correlação entre precipitação e casos de fasciolose, sugeriu que existe uma tendência de aumento dos casos de fasciolose conforme haja maior volume de precipitação.

Alves et al. (2011) também não encontraram associação entre altitude e propriedade com bovinos positivos para *F. hepatica* no sul do estado do Espírito Santo, porém os autores afirmam que a maior parte das propriedades estudadas encontra-se em regiões de relevo geralmente plano, que favorece o desenvolvimento do hospedeiro intermediário. Este fato demonstra coerência com os registros de Lemma (1985) que comprovou a influência de diferentes altitudes na maior frequência de infecção em bovinos em regiões de pastagens localizadas em terras planas.

Costa et al. (2006) avaliaram os reflexos do regime e da variabilidade espacial e interanual das precipitações nas condições hídricas dos biótopos, na densidade populacional dos moluscos de água doce e no risco de infecção por trematódeos. Os autores verificaram que a distribuição espacial dos biótopos depende da repartição das precipitações e que o ciclo biológico anual dos moluscos e parasitas depende do comportamento da estação das chuvas. Assim, locais antes com alta prevalência de infecção por *F. hepatica*, com a diminuição das precipitações pode haver, conseqüentemente, diminuição da prevalência desta parasitose.

Porém, devem-se considerar regiões de clima semi-árido na ocorrência de fasciolose já que em muitas dessas áreas pode haver canais de água potável para os animais permitindo que haja condições adequadas para a adaptação e desenvolvimento do

hospedeiro intermediário e, portanto, do ciclo de *F. hepatica*. Ao mesmo tempo, locais onde há preparo da terra para agricultura com sistema de irrigação pode contribuir para o desenvolvimento do molusco (MUNGUÍA-XÓCHIHUA et al., 2007).

Pritchard et al. (2005) demonstraram que no decorrer dos anos houve um aumento da taxa de precipitação numa região de clima seco no leste de Anglia, Inglaterra, o que foi favorável à manutenção do hospedeiro intermediário de *F. hepatica*, *L. truncatula*, e dos estágios de vida livre desse parasito.

Serra-Freire et al. (1995) em estudo sobre a distribuição de *F. hepatica* no Brasil, no período de maio de 1994 a janeiro de 1995, não notou interferência de temperaturas elevadas assim como diversificação de solos e topografia sobre a viabilidade deste parasito. Propriedades com animais positivos para *F. hepatica* na região Sul (Santa Catarina e Rio Grande do Sul) e Sudeste (Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais) apresentaram topografias contrastantes e solos diferenciados, variando de argiloso a arenoso, sob temperatura e estações climáticas diferentes. Mas, as características geográficas, a composição do solo e os fatores climáticos determinam o ritmo da reprodução dos moluscos do gênero *Lymnaea* e, por conseguinte, a dinâmica epidemiológica (EL-KOUBA, 2005; MARTINS et al., 2012).

Em regiões tropicais, normalmente as melhores condições térmicas para o desenvolvimento da doença são encontradas em locais onde as altitudes são menores (MALONE et al., 1998). Na verdade, a associação encontrada entre a proporção de casos de fasciolose e a altitude das áreas estudadas está relacionada também à temperatura encontrada nestes locais. Em regiões mais baixas o ciclo de vida da doença é completado mais rapidamente, pois as temperaturas podem ser ideais para o rápido desenvolvimento do parasita em seu hospedeiro intermediário. Em regiões mais elevadas o ciclo pode demorar até mais de um ano para ser completado (YILMA; MALONE, 1998).

Normalmente, locais de alta altitude são marcados por distribuição sazonal das chuvas, com uma estação seca longa coincidindo com as menores temperaturas mínimas e uma longa estação chuvosa em que as chuvas são concentradas. Os corpos d'água normalmente são temporários de curta duração, principalmente no período seco. A radiação solar é elevada não apenas por causa da altitude, mas também pela falta de árvores e arbustos (FUENTES et al., 1999). Mesmo assim, os moluscos podem habitar os corpos d'água permanentes e, dependendo das características do solo e do clima, pode haver possibilidade de transmissão de *F. hepatica* durante todo o ano (MAS-COMA;

ESTEBAN; BARGUES, 1999) como demonstrado por Fuentes; Malone; Mas-Coma (2001) que caracterizaram áreas livres e endêmicas de fasciolose nos Andes, uma região de alta altitude, pela presença do hospedeiro intermediário, pessoas e animais infectados na área.

Dutra et al. (2010) em estudo de prevalência de *F. hepatica* por meio da condenação de fígados de bovinos abatidos nos estados de Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul encontraram as maiores taxas de infecção em Santa Catarina (10,1%) e Rio Grande do Sul (18,7%) e que os bovinos provenientes de municípios de baixa altitude foram e estão mais propensos a desenvolver a doença do que os de alta altitude. Porém, os autores não encontraram correlação com a temperatura ambiental, ou seja, esta não influenciou no número de animais com fasciolose, apesar da taxa de precipitação favorecer o desenvolvimento do molusco.

Em estudo realizado em planícies de baixa altitude no sul da Patagônia demonstraram que o tempo frio, típico dessa região promove uma restrição acentuada na sazonalidade de *F. hepatica* devido à baixa temperatura (BARGUES et al., 2012) confirmando que manifestação e a proliferação da doença podem ser atrasadas ou até mesmo minimizadas.

A diversidade de espécies de moluscos em determinada área pode ser considerada como medida de capacidade de uma espécie em transmitir a enfermidade. Isso é demonstrado em um estudo sobre a distribuição e preferência de habitats de moluscos hospedeiros intermediários de *F. hepatica* em Cuba. As duas espécies mais importantes no ciclo da *F. hepatica* neste país são *Fossaria cubensis* (*Physa cubensis*) e *Pseudosuccinea columella* (*Lymnaea columella*). A primeira está mais distribuída em locais antrópicos, principalmente em área de pecuária e, a espécie *P. columella* está distribuída em áreas naturais e, em menor quantidade, em locais pouco antrópicos, porém em locais de maior diversidade de moluscos. Apesar da diversidade de habitat estabelecida pela espécie *P. columella*, *F. cubensis* é considerada o principal hospedeiro intermediário de *F. hepatica* em Cuba, pois além de ter maior distribuição, quando há inundação do ambiente é a espécie que prevalece sobre as outras. Além disso, esse predomínio da população em épocas de chuva, nos locais onde há elevada atividade humana favorece a infecção de homens e animais. (PERERA; NODA; JIMÉNEZ, 2009).

Muitas vezes, os estudos sobre distribuição espacial de *F. hepatica* são baseados principalmente em amostragens individuais e concentraram-se na análise de fatores

climáticos e ambientais. Bennema et al. (2011) investigaram as associações entre manejo da propriedade, os fatores climáticos e ambientais afetando a distribuição espacial da infecção por *F. hepatica* em rebanhos leiteiros em uma zona de clima temperado em Flandres, Bélgica durante três anos consecutivos. A análise do leite a granel para detecção do anticorpo pelo método de ELISA foi usado para medir os níveis de infecção em uma amostra aleatória de 1.762 bovinos leiteiros nos outonos de 2006, 2007 e 2008. A prevalência e distribuição espacial de *F. hepatica* foi relativamente estável, com pequenas diferenças interanuais. Os autores afirmam que para avaliação da distribuição espacial de *F. hepatica* além de considerar precipitação anual, altitude, inclinação e tipo de solo é importante estabelecer a relação com o manejo das pastagens, proporção de pastagem na dieta animal e a duração da estação de pastejo dos animais. Os resultados indicam que em zonas climáticas temperadas sem grande variação climática e ambiental, os fatores de manejo da propriedade afetam a distribuição espacial de *F. hepatica* e devem ser incluídos em futuros estudos.

A compreensão dos efeitos das condições ambientais sobre a sobrevivência e longevidade das metacercárias de *Fasciola* spp., forma infectante deste parasito, fornece uma base sobre quais recomendações podem ser feitas para evitar que o animal consuma forragem contaminada. Estudo realizado por Suhardono et al. (2006) sobre a viabilidade de metacercárias de *F. gigantica*, demonstrou que essas formas possuem tempo de sobrevivência reduzido em condições de aumento de temperatura, diminuição da umidade relativa e exposição a luz solar direta. Metacercárias submersas em água a 13°C sem exposição direta de luz solar foram viáveis para infecção em animais. A exposição direta de luz solar, com baixa umidade promoveu a morte das metacercárias em oito horas. Os autores demonstram a importância dos resultados em regiões de várzea dos arrozais irrigados da Indonésia. Relatam que as metacercárias imersas na água podem sobreviver por até cinco semanas enquanto as expostas a luz solar direta sobrevivem menos de duas semanas. Estas informações, juntamente com as opções de expor os talos de arroz frescos à luz solar direta antes de fornecê-los aos animais pode ajudar os agricultores a reduzir a infecção dos bovinos por *F. gigantica*.

Em estudo semelhante realizado por Müller et al. (1999) objetivou-se analisar a influência da temperatura na longevidade infectiva de metacercárias de *F. hepatica*, com infecção de ratos wistar. Os autores observaram que a faixa de temperatura entre 10° e 15°C manteve as metacercárias ativas por oito meses, decrescendo com o afastamento

desse ponto. Na faixa de cinco e 20°C a longevidade foi reduzida pela metade em relação ao melhor desempenho. A viabilidade por dois meses foi a 30°C, sendo recomendado pelos autores testar a temperatura máxima para total controle da forma infectante de *F. hepatica*.

Quando uma análise de características ecológicas for realizada, é importante ter em mente possíveis variações ambientais que possam afetar a dinâmica epidemiológica do evento estudado (SOUZA et al., 2010) já que os coeficientes de prevalência nas infecções por *F. hepatica* são normalmente acompanhados pelas características próprias de cada região e suas variações ocorrem de acordo com as condições geográficas e climáticas, presença de áreas alagadas ou com inundações periódicas, composição do solo, presença de hospedeiros vertebrados, fatores relacionados com o manejo dos animais e principalmente com a presença de hospedeiros intermediários, que caracterizam a dinâmica epidemiológica (GAASENBÉCK et al., 1992; BECK, 1993, MATTOS et al., 1997).

## **2.3 Distribuição da Fasciolose**

### **2.3.1 Distribuição no Brasil**

No Brasil, os estados de maior registro desta parasitose são: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (COSTA et al., 1986) e a distribuição de casos humanos acompanha os casos animais, diferente do que acontece em muitos países (MAS-COMA; ESTEBAN; BARGUES, 1999). Os registros também indicam que há casos nas regiões Sul, Centro Oeste e Sudeste, com maior número de casos na região Sul e aumento na região Sudeste (SERRA-FREIRE et al., 1995).

Segundo Serra-Freire (1995), historicamente, os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, reportam incidência da fasciolose bovina, notadamente na forma crônica, com dados de propriedades, matadouros e por meio de exames coprológicos.

Segundo Serra-Freire (1999) foi Lutz que fez o primeiro registro de fasciolose no Brasil, em 1921, assinalando o bovino como hospedeiro vertebrado no Rio de Janeiro, mas considerou provável que o parasitismo ocorresse no Rio Grande do Sul, próximo ao Rio da Prata. Pêcego, em 1925, confirmou a ocorrência desse parasito no Rio Grande do Sul e registrou alta frequência com que o mesmo era encontrado em animais de matadouro.

Mello; Mello, em 1934, apontando problemas na suinocultura em São Paulo registraram caso de *F. hepatica* em suíno. Silva, em 1936, descreveu o parasitismo de

bovinos por *F.hepatica* como já estabelecido em animais criados no estado do Rio de Janeiro, e Carvalho, em 1940, descreveu um caso de fasciolose hepática em touro nativo, em Minas Gerais. Giovannoni; Kubiak, em 1947, registraram a fasciolose hepática em bovinos no Paraná, ao estudarem a fauna parasitária do estado (EL-KOUBA, 2005).

No litoral paranaense registraram-se ocorrências de fasciolose em bubalinos criados comercialmente. De 70 animais abatidos em frigoríficos, 75% tiveram seus fígados descartados por estarem parasitados por *F.hepatica* (BUSETTI et al., 1983). Na mesma região, Fernandes; Hamann encontraram, em 1985, de 340 amostras de fezes de bubalinos, 45 (12,23%) positivas para ovos de *F.hepatica*.

Em 1992, Serra-Freire; Nuernberg analisaram amostras de fezes de bovinos, búfalos, ovinos e caprinos em Santa Catarina, por 12 anos. Encontraram prevalência de animais positivos para *F. hepatica* de 24,72% em búfalos; 16,92% em ovinos e 15,66% em caprinos. Os autores afirmam que em determinados municípios estudados pode-se correlacionar o clima sempre úmido com verão morno como um fator favorável para a presença do parasito na região. Neste mesmo ano, em Santa Catarina, foi feito o primeiro registro de fasciolose em um equino, neste estado, diagnosticado pela técnica de Quatro Tamises.

Em estudo realizado por Serra-Freire et al. (1995) nas regiões Sul e Sudeste, no período de maio de 1994 a janeiro de 1995, observou-se que das 904 propriedades envolvidas no estudo 25% estavam positivas notadamente no Rio Grande do Sul (região de fronteira), Santa Catarina (Vale do Itajaí e região de litoral), São Paulo (Vale do Paraíba) e Rio de Janeiro (região dos lagos) demonstrando que mesmo dentro de estados tradicionais quanto à presença de *F. hepatica* a mesma vem se expandindo.

Em pesquisas realizadas no Vale do Ribeira, situado na região sul do Estado de São Paulo, Fujii et al. (1993) observaram, pela primeira vez, a ocorrência de *F. hepatica* parasitando búfalos oriundos do município de Iguapé. Também no Vale do Ribeira, Fujii et al. (1998) desenvolveram pesquisas relacionadas à fasciolose hepática em diversos municípios onde havia criações de búfalos. Os autores observaram que das 587 amostras de fezes examinadas, 42 (7,16%) se mostraram positivas relacionando a ocorrência da parasitose com a presença do molusco do gênero *Lymnaea* e pelos animais se situarem em área de várzea.

Também analisando amostras de fezes de búfalos, no município de Pariqueira-Açu-SP, Oliveira et al. (1994) encontraram prevalência de 18,89% de animais contaminados por

*F. hepatica* confirmando que a disseminação da fasciolose está intimamente ligada à presença de moluscos do gênero *Lymnaea*.

A presença de fasciolose no estado de Goiás foi verificada em bovinos e humanos. Os autores observaram animais positivos na linha de abate e relacionaram os casos com a presença do hospedeiro intermediário da espécie *L. columella* além da possibilidade de contaminação de rios e córregos por descargas de matadouros realizadas nos mesmos promovendo instalação do foco de fasciolose por contaminação do molusco e consequentemente dos animais (ARAÚJO; GARCIA; LINHARES, 1995).

No período de 2000 a 2005, Cunha, Marques e Mattos (2007) verificaram a prevalência de *F. hepatica* em ovinos por meio de avaliação de fígados condenados na linha de abate e verificaram um percentual de 8,87%, considerando grande perda para produtores, frigorífico e governo.

Pile et al. (2001a) demonstrou a presença de ovos de *F. hepatica* em búfalos jovens e adultos no município de Maricá, no Rio de Janeiro. Este foi o primeiro relato desta parasitose na espécie bubalina no Estado, registrando um índice de ocorrência de 2,5%, na amostra avaliada. Os autores ainda ressaltam que entre os animais positivos foram encontrados alguns com menos de um ano de idade.

Em uma propriedade no município de Campos dos Goytacazes-RJ foi observada a presença de *L. columella* naturalmente infectada por formas larvais de *F. hepatica*, assim como de ovos do parasito em amostras fecais dos bovinos, caracterizando dessa forma o estabelecimento de um foco da enfermidade neste município (GOMES et al., 2002).

Em Presidente Prudente-SP, foi registrado o primeiro caso autóctone de fasciolose bovina em uma propriedade a partir de dados obtidos no abatedouro de condenação do fígado. A propriedade avaliada, além de possuir animal comprovadamente positivo para *F. hepatica* no exame de fezes, possuía o molusco da espécie *L. columella* e ambiente favorável para o desenvolvimento do mesmo e consequentemente do ciclo do parasito. Os autores relatam que como se trata de uma região expressiva na pecuária estadual e nacional é importante avaliar as perdas econômicas atuais e futuras decorrentes deste parasitismo (TOSTES et al., 2004).

El-Kouba et al. (2005) registraram a presença de *F. hepatica* em capivaras e rato-banhado no Parque Barigüí em Curitiba-PR com identificação de ovos em exames coproparasitológicos. O autor destaca que não foram encontrados exemplares de *Lymnaea* no local o que pode caracterizar infecção crônica, mas não diminui a importância em se tratar

os animais antes que populações desse molusco possam povoar a área. Além disso, destaca o papel desses animais como reservatórios e disseminadores da parasitose.

Já em Santa Catarina, no município de Timbó, Bellato et al. (2009) registraram a presença de ovos de *F. hepatica* em fezes de bovinos de propriedades rurais distintas e de capivaras de vida livre. Os autores reforçam a marcante influência das capivaras como hospedeiros definitivos no ciclo biológico de *F. hepatica*.

Em 2007, casos autóctones de fasciolose hepática foram registrados em fígado de bovinos abatidos sob Inspeção Federal no estado de Goiás. Os autores afirmaram que pelos dados obtidos do Serviço de Inspeção Federal e da Superintendência Federal de Agricultura (SFA-GO) do MAPA, assim como informações prestadas por criadores permitiram a identificação de casos de fasciolose em bovinos nascidos e criados neste estado (ARAÚJO et al., 2007).

Nos Estados de Minas Gerais, Goiás, Bahia e Espírito Santo estão surgindo novas áreas de ocorrência de *F. hepatica*, caracterizadas pela presença dos hospedeiros intermediários e vertebrados naturalmente infectados. Estudos recentes, realizados em 13 municípios em diferentes regiões do Estado de Minas Gerais demonstraram o aumento da prevalência à infecção natural por *F. hepatica*. Os autores relacionaram este fato à presença de limneídeos positivos com as formas larvares de *F. hepatica* (LIMA et al., 2009).

Dados relacionados aos impactos econômicos ocasionados pela fasciolose no Espírito Santo ainda são insuficientes, mas sabe-se que desde o primeiro relato oficial da doença registrado em 2005 pelo Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF), os pecuaristas vêm acumulando inúmeras perdas devido a condenação de fígados em matadouros, diminuição do peso de carcaças, retardo no desenvolvimento e queda na produção leiteira (BAPTISTA, 2008).

Carneiro et al. (2010) relataram pela primeira vez no estado a presença de *F. hepatica* em búfalos em uma propriedade no município de Jerônimo Monteiro, região Sul do Espírito Santo. De um total de 15 amostras, 46,67% apresentaram-se positivas para ovos de *F. hepatica*. Foi registrada ainda a presença do molusco do gênero *Lymnaea* no entorno da propriedade, além de bovinos e ovinos infectados.

Alves et al. (2011) uma vez estudando 10 municípios também localizados na região Sul do estado, constataram que de 717 amostras de fezes coletadas, em diferentes propriedades, 153 foram consideradas positivas para *F. hepatica* resultando em uma

frequência observada de 21,33% para fasciolose naquelas localidades.

Bernardo et al. (2011) registraram prevalências de fígados de bovinos condenados por fasciolose no sul do Espírito Santo e encontraram percentuais médios de 15,24% em 2006, 23,93% em 2007, 28,57% em 2008 e de 28,24% em 2009. Os autores afirmam que a tendência histórica da condenação de fígados é crescente, indicando que este parasitismo estabeleceu-se no rebanho como um problema na região com prevalência similar a de regiões tradicionalmente endêmicas. As condenações ocorreram o ano todo com maior prevalência nos meses de abril e maio e com diferenças significativas entre os períodos seco e chuvoso. As perdas econômicas devido à condenação de fígados podem ser consideradas altas.

Em estudo epidemiológico realizado em 10 municípios do sul do Estado do Espírito Santo foram coletadas 815 amostras de fezes sendo 424 de ovinos, 349 de caprinos e 42 amostras de bubalinos. Um total de 58 (13,68%) amostras de ovinos, 76 (21,78%) amostras de caprinos e 10 (23,81%) amostras de bubalinos foram positivas para ovos de *F. hepatica* (CARNEIRO et al., 2013).

### **2.3.2 Distribuição no mundo**

Em estudo realizado em matadouros no Irã entre 1999 e 2000, encontraram-se prevalências de 3,89%; 3,20% e 2,63% e entre 2003 e 2004, de 1,07%; 0,59% e 0,24% para bovinos, ovinos e caprinos, respectivamente. Os autores observaram que houve um declínio dos casos nos bovinos, ovinos e caprinos abatidos e relacionaram ao fato da temperatura na região ter aumentado, apresentando clima seco e quente, o que não favoreceu a manutenção do ciclo do parasito. Estes autores incentivaram a conscientização dos produtores da região em relação ao uso correto de medicamentos no tratamento da infecção nos animais, criando estratégias de controle antihelmíntico para a fasciolose (ANSARI-LARI; MOAZZENI, 2006).

Na África, Mekroud et al. (2004), observaram bovinos e ovinos parasitados por *F. hepatica* pela avaliação de fígados condenados nas cidade de Constantine e Jijel. Os autores sugerem que para o controle da doença seja feito um isolamento por cerca nas áreas habitadas pelos moluscos. Além disso, o excesso de umidade dessas áreas deve ser suprimido para eliminação dos moluscos.

Phiri et al. (2005) encontraram prevalência de fasciolose em bovinos de 53,9% com análise de fígado ao abate e 48,9% com análise de fezes, em Zâmbia, África. Os autores

encontraram maior percentual de fêmeas positivas do que machos e demonstraram que a origem dos animais influenciou no resultado. A espécie *L. natalensis* foi apontada como a única espécie de molusco responsável pela transmissão de fasciolose em Zâmbia e que *L. columella*, amplamente reportada na África do Sul, mas originária da América, não foi avaliada quanto à possibilidade de transmissão de *F. hepatica* e *F. gigantica* nesta região.

Em Queensland, na Austrália, Molloy; Anderson (2006) analisaram propriedades de gado leiteiro e gado de corte e, por análise de soro (ELISA) para diagnóstico de *F. hepatica*, demonstraram predominância de fasciolose somente no sudoeste do país, mas, nem todas as propriedades positivas tinham o hospedeiro intermediário e, algumas propriedades com o molusco, não apresentavam animais positivos. Os autores relatam que a presença de hospedeiros intermediários nesta região não influenciou na distribuição da fasciolose na região mesmo que outros trabalhos demonstrem que há correlação. Porém, mais estudos devem ser realizados na área.

Rapsch et al. (2006) demonstraram a presença de *F. hepatica* em bovinos na Suíça com acompanhamento dos animais ao abate. Os autores confirmaram os resultados por diversas formas de diagnóstico, como inspeção visual, análise de fezes, teste de ELISA, exame coprológico e análise de ovos na bile e identificaram uma prevalência de fasciolose bovina maior do que a prevista já que anteriormente a avaliação era feita somente com inspeção visual, o que muitas vezes não confirma a doença.

Neste mesmo ano, na China foi feito relato de ovinos infectados por *F. hepatica* por meio de análise de fígados condenados ao abate. Os autores consideram importante a investigação para auxiliar em futuras estratégias de controle dessa parasitose em ovinos na região (WANG et al., 2006).

Em estudo epidemiológico de *F. hepatica* em Gafsa Oases, Sudoeste da Tunísia, foi demonstrada uma prevalência de 6,6% de fasciolose em humanos, 14,3% em bovinos, 35% em ovinos e 68,4% em caprinos. No hospedeiro intermediário, da espécie *Galba truncatula*, foi demonstrada uma prevalência de infecção pelas formas larvares da *F. hepatica* de 19,2%. Foi o primeiro relato de fasciolose na região num estudo desenvolvido entre julho de 2004 a junho de 2005 (HAMMANI; HAMED; AYADI, 2007).

Em região semidesértica no nordeste do México foram encontradas prevalências de *F. hepatica* entre 11,4 e 43% em bovinos, ovinos e caprinos, com análise de amostras de soro por teste de ELISA e análise de fezes por sedimentação. Apesar do clima não favorecer o desenvolvimento do molusco os autores relataram as prevalências aos canais

de irrigação na região que mantinham condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento do molusco (MUNGUÍA-XÓCHIHUA et al., 2007).

Ali et al. (2008) observaram, por meio de caracterização genética, a existência de *F. hepatica* e *F. gigantica* em ovinos e bovinos na Nigéria, sendo o primeiro relato da ocorrência de ambas as espécies de *Fasciola*.

### **2.3.3 Distribuição de casos humanos**

Segundo Acha; Szyfres (1977), a infecção humana, por *F. hepatica* já foi registrada em muitos países do mundo, mais é na América Latina, em que tem ocorrido o maior número de casos. Tem-se subestimado a frequência da infecção na América Latina (EL-KOUBA, 2005). Somente em Cuba, foram registrados 100 casos até 1944 e no Chile, 82 até 1959. Além destas, ocorreram infecções humanas na Argentina, Uruguai, Peru, Venezuela, Costa Rica, Porto Rico, República Dominicana e México. Em 1978, foram diagnosticados 42 casos clínicos em Turrialba, Costa Rica (MORA et al., 1980).

A fasciolose humana ocorre de forma esporádica ou em surtos, e além dos casos na América há registros em numerosos países da Europa, África e Ásia. As epidemias mais extensas ocorreram na França, entre 1956-1957, que afetaram cerca de 700 pessoas. A fonte comum de infecção era o agrião contaminado com metacercárias. A infecção também é comum na Itália, Polônia e Inglaterra. Neste último país, o maior surto afetou 40 pessoas em 1972 (MALEK, 1980).

Os casos humanos foram relatados pela primeira vez no Brasil em 1958 (REY et al., 1958). Posteriormente ocorreram casos na região do vale do rio Paraíba do Sul, em São Paulo e em Uruçuca, na Bahia (CORRÊA; FLEURY, 1971). Em 1977, ocorreram casos em Caçapava-SP e em Curitiba-PR (AMATO NETO; SILVA, 1977; BARANSKY et al., 1977).

Serra-Freire (1999) assinalou o primeiro caso humano comprovado e tratado, ocorrido no município de Piquete, São Paulo, que faz limite com o estado de Minas Gerais. No mesmo ano, Andrade Neto et al. (1999) totalizaram 50 casos de fasciolose no Brasil no ano de 1999 desde o primeiro relato por Rey et al. (1958).

Por meio de resultado de exames coprológicos realizados em 500 pacientes atendidos em postos de saúde e hospitais do município de Volta Redonda, assinalou-se a primeira ocorrência da fasciolose humana no Estado do Rio de Janeiro, com dois resultados positivos para este parasito (PILE et al., 2000).

Nos municípios de Paracambi e Sumidouro, ambos no Rio de Janeiro, foram diagnosticados dois casos de fasciolose em humanos nos anos de 2001 e 2003, respectivamente. Os achados ocorreram mediante inquérito coproparasitológico das regiões, sem que as pessoas demonstrassem qualquer sinal clínico grave e característico da enfermidade (IGREJA; BARRETO; SOARES, 2004).

Oliveira et al. (2007) registraram pela primeira vez a prevalência de *F. hepatica* em humanos no município de Canutama, estado do Amazonas. Por meio de inquérito parasitológico este foi um dos primeiros relatos de fasciolose na região Norte do país.

## **2.4 Patogênese da Fasciolose**

A patogenia do parasito está baseada na sua capacidade de lesionar o fígado desde o momento que chega ao mesmo, gerando uma hepatite aguda hemorrágica durante a fase larvar até espessamento dos ductos biliares com ou sem obstrução dos mesmos na fase adulta. Nas infestações maciças, há destruição do tecido hepático com danos extensos, como fibrose, e hemorragias severas, que podem ser fatais (SERRA-FREIRE, 1995; MARCOS et al., 2007). Segundo Serra-Freire et al. (1995), na fase crônica da doença são observados efeitos depressores no crescimento do animal, assim como queda na produção leiteira. A sintomatologia depende do número de parasitos presentes no fígado dos animais infectados (EL-KOUBA, 2005).

A fasciolose pode ser classificada como aguda, raramente observada em bovinos, subaguda ou crônica (RADOSTISTS, 2000). Os surtos da fasciolose aguda em geral se manifestam com morte súbita, mas ao inspecionar o restante do rebanho se observa apatia, fraqueza, falta de apetite, mucosas e conjuntivas pálidas e edemaciadas. O fígado normalmente está aumentado, associado à dor à palpação na região hepática e ascite. Os animais apresentam ainda perda de peso, diarreia e diminuição da produção de leite (PRITCHARD et al., 2005).

Na doença subaguda, são ingeridas metacercárias por mais tempo, e enquanto algumas já atingiram os ductos biliares, onde causam colangite, outras ainda estão migrando e provocando lesões menos graves (URQUHART et al., 1996). A fasciolose crônica é a forma mais comum da doença e cursa com infertilidade (OAKLEY; OWEN; KNAPP, 1979; CHARLIER et al., 2007), anemia, perda de peso, queda na produção e condenação do fígado ao abate (FOREYT, 2005), além de predispor o animal ao aparecimento de infecções secundária. Há ainda relatos de glomerulonefrite em búfalos

infectados por *F. hepatica* devido à deposição de imunocomplexos circulantes produzidos em resposta a presença do parasito (TIETZ MARQUES; SCROFERNEKER; EDELWEISS, 2004).

Em humanos, os sinais e sintomas são variáveis, diferindo conforme a fase e duração da infecção e o número de parasitas. Na fase aguda, pode ocorrer dor abdominal, febre, vômito, diarreia, urticária, má digestão e absorção, icterícia, hepatomegalia e alterações de enzimas hepáticas, leucocitose e eosinofilia. Na fase crônica, os sinais e sintomas mais evidentes são os relacionados com a obstrução biliar intermitente e inflamação (ACHA; SZYFRES, 1977; GUIMARÃES, 2003).

## 2.5 Diagnóstico da Fasciolose

Esta parasitose causa em seus hospedeiros condenação do fígado em abatedouros-frigoríficos, perda de peso, anemia, redução na produção de lã, carne e leite, infecções secundárias, interferência na fertilidade e outros sinais inespecíficos, o que torna o diagnóstico clínico da doença difícil de ser realizado (ECHEVARRIA, 1985; ROSS; DOW; TODD, 1997).

Por apresentar sinais inespecíficos é necessária a realização do diagnóstico laboratorial baseado na observação de ovos de *F. hepatica* nas fezes dos animais (BORAY, 1985; KLEIMAN et al., 2005) e de humanos. O diagnóstico pode também estar baseado em pesquisa de anticorpos e antígenos circulantes (MOLLOY et al., 2005; MUNGUÍA-XÓCHIHUA et al., 2007), na detecção de coproantígenos (MEZO et al., 2004), por ovos obtidos na vesícula biliar (BRAUN; WOLFENSBERGER; HERTZBERG, 1995), na própria observação de parasitos nos canais biliares durante necropsia e/ou abate (SERRA-FREIRE, 1995), teste de ELISA no leite de animais suspeitos (MOLLOY et al., 2005; CHARLIER et al., 2008) e dosagem plasmática de algumas enzimas. Além disso, é de grande utilidade a mensuração de outros parâmetros hematológicos como anemia, eosinofilia e hipoalbuminemia, comuns na infecção parasitária (FAIRWEATHER, 2011).

Nas infecções por *F. hepatica*, normalmente, os níveis plasmáticos das enzimas Glutamato Desidrogenase (GLDH) e Gama Glutamil Transpeptidase (GGT) apresentam-se aumentados. GLDH sete a 14 dias pós-infecção pela destruição dos hepatócitos, e GGT seis a oito semanas, devido à lesão das células epiteliais dos canais biliares (ACOSTA, 1994; URQUART et al., 1996).

Diversos autores, entre eles Dennis; Stone; Swason (1954), Happich; Boray (1969)

e Bendezu; Landa (1973) preconizam o exame coproparasitológico como a forma mais segura para o diagnóstico da fasciolose crônica. Estes autores relatam que o exame determina a presença de ovos de *Fasciola* indicando a existência de trematódeo adulto nos ductos biliares. As desvantagens desses testes são que detectam somente casos de infecção patente, os ovos não são eliminados nas fezes de forma regular e, com a contagem de ovos nas fezes, não se determina o número de parasitos adultos no fígado (ANDERSON et al., 1999; FLANAGAN et al., 2011b). Além disso, a presença de uma ou nenhuma forma adulta no fígado dificulta a presença de ovos nas fezes (BERNARDO et al., 2007).

É importante realizar o diagnóstico diferencial de outras hepatites agudas, levando-se em consideração os antecedentes epidemiológicos e a presença, no hemograma, de eosinofilia (DUMENIGO; ESPINO; FINLAY, 1996). Rapsch et al. (2006) demonstram que o exame coproparasitológico pode ser muito eficiente com três amostras seriadas do mesmo animal resultando numa sensibilidade de aproximadamente 92%.

Há na literatura muitas técnicas para diagnóstico coproparasitológico da fasciolose baseadas em flutuação, sedimentação e tamisação. De acordo com Girão; Ueno (1985), muitas das técnicas originais quase sempre são modificadas por pesquisadores que visam melhorá-las ou adaptá-las de acordo com as necessidades e disponibilidades. Estes autores desenvolveram técnica de diagnóstico coproparasitológico quantitativo da fasciolose em ruminantes baseados no uso de quatro tamises e foi por muitos anos a técnica de eleição para diagnóstico desta parasitose sendo utilizada em diversos estudos (SERRA-FREIRE; NUERNBERG, 1992; ABIDU et al., 1996; PILE et al., 2000; PILE et al., 2001a; GOMES et al., 2002; KLEIMAN et al., 2005). A técnica de Hoffman também foi utilizada em alguns estudos como o realizado por Queiroz et al. (2002) que diagnosticou fasciolose em bovinos e ovinos.

Em estudo para diagnóstico de fasciolose em ovinos no Rio Grande do Sul, a prevalência obtida na técnica de Girão; Ueno (1985) foi de 88,8% e a de Dennis; Stone; Swanson (1954) foi de 75,6%, demonstrando maior sensibilidade da primeira técnica para diagnóstico de *F. hepatica* (MATTOS; CUNHA; MARQUES, 2009).

Porém, Martins et al. (2008) afirmam que a técnica de sedimentação fecal descrita por Foreyt (2005) mostrou-se mais sensível em comparação aos dados de Girão; Ueno (1985) além de ter execução mais simples e menor custo. Das 155 amostras processadas para ambas as técnicas, 71 apresentavam-se positivas para a técnica de quatro tamises e 85 amostras positivas para a técnica descrita por Foreyt (2005), determinando sensibilidade de

45,80% e 54,83%, respectivamente.

Vários métodos foram desenvolvidos com o objetivo de diagnosticar a fasciolose a partir da detecção de anticorpos contra componentes do parasito. No Brasil, estas técnicas sorológicas ainda não estão disponíveis para avaliações populacionais, estando restritas às pesquisas experimentais, para as quais muitos kits ainda estão sob testes de validação para ovinos, bovinos e bubalinos (MATTOS; CUNHA; MARQUES, 2009). Em estudo realizado na Austrália por Reichel (2002) com teste de Kit comercial por ELISA, o autor concluiu que o mesmo é recomendado para bovinos já que houve dificuldade em discriminar ovinos positivos e negativos para fasciolose.

Um teste sorológico comercial com sensibilidade e especificidade maior que 98% foi reportado (MOLLOY et al., 2005). Porém, este teste foi avaliado em duas populações separadas de animais e o resultado pode estar sujeito ao erro, já que a sensibilidade e a especificidade do teste podem variar de acordo com a população testada (LACHS et al., 1992; WHITING et al., 2004; LEEFLANG; BOSSUYT, 2005).

Sinclair; Wassall (1988) afirmam que a detecção de anticorpos específicos de *F. hepatica* ocorre duas semanas pós infecção o que é uma vantagem sobre o exame coproparasitológico que detecta os ovos nas fezes a partir de oito a dez semanas pós infecção. Por outro lado, a presença de anticorpos específicos no soro sanguíneo não significa que o hospedeiro encontra-se em infecção ativa já que os anticorpos podem persistir no soro do animal mesmo após ter terminado a infecção, como, por exemplo, após tratamento (FAIRWEATHER, 2011).

Munguía-Xóchihua et al. (2007) em estudo em área semi-desértica a noroeste do México compararam a prevalência de fasciolose em bovinos, ovinos e caprinos utilizando a técnica de ELISA indireta e coprológica e identificaram maior prevalência na técnica sorológica em todas as espécies, mas com moderada concordância em ambos os testes. Em bovinos, a prevalência foi de 11,4% na técnica de sedimentação fecal e de 24,4% para ELISA indireta, em caprinos foi de 24,5% na análise fecal e 43% para ELISA e por fim, em ovinos a prevalência foi de 19,4% e 30,6% para ambas as técnicas, respectivamente.

Flanagan et al. (2011a e 2011b) citam que os testes para detecção de coproantígenos diagnosticam a doença mais precocemente do que os exames coproparasitológicos. Em comparação com pesquisa de anticorpos específicos, que detecta a infecção precocemente, a técnica por coproantígenos tem a vantagem de detectar infecção várias semanas antes da doença se manifestar (FAIRWEATHER, 2011). Ambos

os testes são utilizados para se diagnosticar resistência a medicamentos contra *F. hepatica*, como foi demonstrado por Flanagan et al. (2011b), que obteve resultados satisfatórios para diagnóstico de resistência.

Porém, de acordo com Kleiman et al. (2005), embora novos métodos de detecção de coproantígenos venham sendo empregados para o diagnóstico da fasciolose, principalmente em seu estágio inicial, esses não geram informações epidemiológicas importantes para o conhecimento da dinâmica da transmissão de *F. hepatica*, não substituindo, assim, o diagnóstico por exame de fezes.

Um trabalho realizado por Rapsch et al. (2006) para estimar a prevalência de *F. hepatica* em bovinos abatidos na Suíça utilizou quatro tipos de diagnósticos diferentes já que não há um teste diagnóstico absoluto na identificação deste parasito. Os autores realizaram identificação visual do fígado, técnica de sedimentação fecal, teste comercial de ELISA para detecção de anticorpos específicos e, após o abate, detecção de ovos na bile. A sensibilidade do exame coproparasitológico, do exame da bile, do teste de ELISA e do exame do fígado foram 69%, 93,4%, 91,7% e 63,2%, respectivamente. O autor demonstrou que a prevalência de fasciolose foi maior do que previsto já que a inspeção do fígado, normalmente realizada no abate, obteve uma baixa sensibilidade, podendo estar relacionada com lesão causada pelo parasito, mas, sem presença do mesmo, já que esta não se regenera.

Charlie et al. (2008) avaliaram qualitativa e quantitativamente técnicas coproparasitológicas e sorológicas (coproantígenos e utilização de soro) para diagnóstico de fasciolose em duas estações do ano, primavera e outono estabelecendo o nível de infecção durante o abate do animais. Demonstraram que não houve diferença significativa em relação à época do ano de coleta do material e que os testes sorológicos de ELISA utilizados foram significativamente melhores do que os coproparasitológicos. Porém, ressaltam que é mais provável a obtenção de resultados positivos nos exames coproparasitológicos quando o animal apresenta uma infecção maciça ( $> 10$  parasitos no fígado) do que quando apresenta baixa infecção ( $\leq 10$  parasitos no fígado).

No Brasil, a maioria dos casos de fasciolose é diagnosticada em matadouros e frigoríficos fiscalizados pelos Serviços de Inspeção Federal (SIF/MARA) (FILGUEIRA et al., 2006; GOMES et al., 2006; RABELLO et al., 2006). Este diagnóstico *post mortem*, baseado na observação direta dos parasitos no fígado, é a análise mais precisa na fase aguda da doença animal, permitindo visualizar as lesões típicas no parênquima hepático

(causadas pela migração das formas imaturas e sua presença) e demais lesões descritas na patologia. Na fase crônica, os ductos biliares apresentam-se espessados, salientes e com calcificações (no caso de bovinos) e as formas adultas estão presentes (ECHEVARRIA, 1985).

No que diz respeito à realização de levantamentos epidemiológicos para o diagnóstico da fasciolose sabe-se que a utilização de animais traçadores é útil para estimar o grau de contaminação da pastagem com metacercárias (PILE et al., 2001b), identificar as épocas de sua maior disponibilidade no ambiente, além de permitir a identificação de focos autóctones da doença (SUON et al., 2006). Além disso, é importante que se faça coleta, identificação e dissecação de moluscos (GOMES et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2002).

Gomes et al. (2008) confirmaram presença de três focos autóctones de *F. hepatica*, em meses de estiagem, no município de Campos dos Goytacazes-RJ utilizando ovinos como animais traçadores. Os autores também coletaram moluscos em algumas propriedades e identificaram como pertencentes ao gênero *Lymnaea*, mas nenhum apresentou formas evolutivas do parasito pressupondo que a pastagem estava contaminada com metacercárias antes da introdução dos animais na pastagem.

## **2.6 Tratamento e Controle da Fasciolose**

Os benzimidazóis são os compostos antihelmínticos de amplo espectro usados em humanos e em medicina veterinária para o controle de infecções causadas por nematódeos, cestódeos e trematódeos (MCKELLAR; SCOTT, 1990). Somente algumas moléculas químicas dentro da família dos benzimidazóis demonstram atividade contra *F. hepatica* (LANUSSE; PRICHARD, 1993).

Essas drogas têm como mecanismo de ação principal uma potente inibição da formação de microtúbulos do parasito (STITT; FAIRWEATHER, 1990; MARTIN; ROBERTSON; BJORN, 1997) que tem como funções a formação do fuso mitótico, motilidade e secreção celular, absorção de nutrientes e transporte celular (LACEY, 1988; JASMER et al., 2000). Devido ao papel crucial desempenhado pelos microtúbulos em alguns dos processos celulares, esta destruição induzida pela droga levará a morte do organismo (KÖHLER, 2001), pois uma cascata de mudanças bioquímicas e fisiológicas, que podem ser diretas ou indiretas, resulta na perda da homeostasia celular (LACEY, 1988). Secundariamente pode inibir a enzima fumarato redutase no transporte de glicose, alterando os mecanismos energéticos do parasito (LANUSSE, 1996). Foi observado ainda

que ocorre interrupção e/ou diminuição da produção de ovos dos nematóides (MARTIN; ROBERTSON; BJORN, 1997).

O triclabendazole é o mais eficaz devido a sua excelente ação contra formas jovens e adultas do parasito (BORAY et al., 1983). Porém, há no mercado, muitos medicamentos utilizados no tratamento de *F. hepatica* como closantel, nitroxinil, clorsulon, rafxanida e albendazole e, apesar de terem ação restrita à forma adulta, desempenham importante papel no controle da fasciolose (FAIRWEATHER, 2011).

A combinação de drogas é comumente utilizada no controle de parasitos normalmente para tratar infecções helmínticas mistas. Além da praticidade e facilidade na administração as combinações diminuem o desenvolvimento de resistência (SANGSTER et al., 2001). O triclabendazole pode ser comercializado associado ao levamisol, ivermectina, abamectina ou moxidectina para alcançar melhor controle contra *Fasciola* e nematódeos. Esse uso combinado, especialmente quando os compostos têm ações diferentes, permite um efeito sinérgico entre as drogas e possibilita a utilização de menores concentrações do fármaco no protocolo de tratamento (FAIRWEATHER, 2011).

Para se determinar a eficácia ou a resistência do tratamento contra *F. hepatica* não há um protocolo padronizado, dificultando a interpretação dos resultados. Isso se torna um grande problema já que há um aumento do número de casos e distribuição da fasciolose além de muitas informações sobre existência e distribuição da resistência (FAIRWEATHER, 2011). O teste de redução da contagem de ovos nas fezes normalmente é o mais utilizado, porém foi originalmente desenvolvido para nematóides (WOOD et al., 1995). O tratamento químico é considerado um sucesso quando há redução de 95% na contagem de ovos nas fezes 14 dias após o tratamento no teste coproparasitológico ou a ausência de coproantígenos nas amostras de fezes coletadas 14 dias após o tratamento no teste para detecção de coproantígenos (FAIRWEATHER, 2011).

Flanagan et al. (2011a) padronizaram um protocolo de redução de coproantígenos, 14 dias após o tratamento, usando o kit comercial BIO K201 de ELISA para diagnóstico de resistência ao triclabendazole. Utilizando cepas de *F. hepatica* sensível e resistente ao triclabendazole, além da análise do coproantígeno nas fezes, foi realizada necropsia nos ovinos tratados para confirmação da eficácia do tratamento. Ao final do experimento, os autores concluíram que o kit comercial se mostrou sensível para detecção de antígenos nas fezes de ovinos.

Flanagan et al. (2011b) confirmam esses dados em teste controlado utilizando cepas

de *F. hepatica* adultas sensíveis e resistentes ao triclabendazole para diagnóstico de resistência ao mesmo em ovinos. Os animais foram tratados com triclabendazole na dose de 10mg/Kg e obtiveram redução de 95% na contagem de ovos nas fezes e ausência de coproantígenos 14 dias após o tratamento. Com os resultados os autores discriminaram as cepas sensíveis e resistentes, mas, ressaltam que é importante estabelecer estes testes a campo para confirmação do mesmo resultado.

Em uma propriedade de ovinos no oeste da Irlanda foi avaliada a eficácia de quatro antihelmínticos contra infecções naturais por *F. hepatica*. Os animais foram tratados com triclabendazole, closantel, oxiclozanida e nitroxinil, todos na dose de 10mg/Kg exceto oxiclozanida que foi administrado na dose de 15mg/Kg. Amostras de fezes foram obtidas de cada animal no dia do tratamento e aos sete, 14, 21 e 56 dias após o tratamento e processadas utilizando a técnica de sedimentação. A eficácia de cada anti-helmíntico foi calculada em relação ao percentual de redução na contagem de ovos em cada tempo. Os resultados para closantel, oxiclozanida e nitroxinil indicam que estes medicamentos possuem eficácia de 100% na redução da contagem de ovos nas fezes 14 dias após o tratamento. No entanto, os resultados para o triclabendazole produziram níveis de eficácia inferiores, com reduções de contagem de ovos fecal entre 49 % e 66 % com base na média aritmética, durante o período de sete a 56 dias após o tratamento. Estes resultados são altamente indicativos de resistência ao triclabendazole em ovinos naturalmente infectados por *F. hepatica* nesta fazenda (MOONEY et al., 2009).

Análise de desenvolvimento de ovos incubados também pode ser considerada outro tipo de teste para detecção de resistência (ALVAREZ et al., 2009). Pode haver uma exposição a curto ou a longo prazo à droga. Estes testes têm a capacidade de distinguir entre cepas sensíveis e resistentes, podendo tornar-se método simples de diagnóstico além de serem cada vez mais necessários (FAIRWEATHER, 2011).

Fairweather et al. (2012) realizaram teste para avaliar a sensibilidade de diferentes cepas ao sulfóxido de triclabendazole com análise do desenvolvimento dos ovos. Os ovos oriundos de cepas diferentes de *F. hepatica* foram expostos por 14 dias ao sulfóxido de triclabendazole na concentração de 60µg/mL e, foram analisados em diferentes estágios: mortos, vazios, não embrionados, em divisão, com desenvolvimento larvar, eliminando o miracídio e eclodidos. Algumas cepas demonstraram resistência ao triclabendazole, obtendo desenvolvimento da maioria dos ovos e outros com maioria sem desenvolvimento, conferindo sensibilidade à droga. Os autores afirmam que este teste é importante para

avaliar a sensibilidade de cepas a campo ainda desconhecidas quanto à eficácia da droga.

Um trabalho a campo em uma propriedade de ovinos e caprinos em Almirante Tamandaré no estado do Paraná, Brasil, naturalmente infectados por *F. hepatica*, verificou a presença de resistência ao triclabendazole. Os animais foram tratados com triclabendazole na dose de 15mg/Kg após constatação de que 100% dos ovinos e 81% dos caprinos estavam parasitados. Após o tratamento foi verificada uma eficácia de apenas 66,3% em ovinos e 57,3% em caprinos por meio de exame de sedimentação. Porém, os autores afirmam que há necessidade de estratégias alternativas como o controle biológico, o qual pode reduzir a contaminação da pastagem e o contato com o hospedeiro intermediário reduzindo as perdas causadas pela persistência do parasito no ambiente (OLIVEIRA et al., 2008).

Para realmente se estabelecer um diagnóstico de resistência, dentro de uma população em relação à determinada cepa, é importante que se realize teste controlado nos animais do estudo com infecção artificial e número fixo de metacercárias por animal além de monitorar o impacto do tratamento medicamentoso por uma série de testes. É essencial que os resultados e conclusões não sejam baseados em apenas um teste, para não gerar informações erradas (FAIRWEATHER, 2011).

É importante considerar a origem e o genótipo de metacercárias usadas em investigações experimentais e ensaios clínicos, antes de afirmar resistência ou eficácia de determinada droga. Como demonstrado por Hanna et al. (2008) que analisaram por histopatologia o testículo de cepas laboratoriais de *F. hepatica* e demonstraram que haviam cepas com características celulares habituais associadas à espermatogênese, o que era esperado, enquanto outra cepa apresentou sinais de apoptose e ausência de espermatozoides maduros, porém com desenvolvimento de miracídios de aparência normal, provavelmente se desenvolvendo sem fertilização, por partenogênese, segundo os autores.

Hanna et al. (2010) desenvolveram trabalho envolvendo o exame morfológico do parasito por meio de histologia com particular ênfase nas respostas do aparelho reprodutor ao tratamento químico e demonstraram que cepas de *F. hepatica* conhecidamente resistentes às drogas não apresentam alterações enquanto as conhecidamente sensíveis apresentam consideráveis mudanças particularmente na formação de espermatozoides e na produção de ovos, em avaliações nos tempo de 24, 48 e 72 horas após o tratamento. Estes testes demonstram a utilidade das técnicas histológicas em ensaios de campo para validar

resistência às drogas ou testar a eficácia de novos medicamentos ou medicamentos sensíveis.

A mesma avaliação foi realizada em fascíolas recuperadas de ovinos nos tempos de 48, 72 e 96 horas após o tratamento com triclabendazole na dose de 10mg/Kg. A interrupção da atividade das células espermatozóides foi progressiva ao longo de 96 horas com início de alterações a partir de 48 horas pós-tratamento. Os autores afirmam que estes resultados indicam que o triclabendazole altera severamente espermatogênese de *F. hepatica* a partir de 48 horas pós-tratamento (TONER et al., 2011).

Hanna et al. (2012) demonstraram que as alterações morfológicas no aparelho reprodutor iniciaram a partir de 24 horas após o tratamento de ovinos com triclabendazole na dose de 10mg/Kg e, neste mesmo período, houve interrupção na produção de ovos. Os autores sugerem que o mecanismo de produção de ovos parece ser afetado antes mesmo de qualquer alteração morfológica evidente nos tecidos envolvidos no processo de formação do ovo, ocorrendo logo após a administração do medicamento.

Um estudo morfológico da superfície tegumentar externa e interna foi realizado por Buchanan et al. (2003) para determinar o efeito do tratamento *in vitro* com metabólito de sulfóxido de albendazole sobre exemplares adultos de *F. hepatica*. Os exemplares foram recuperados da vesícula biliar de ratos, lavados por solução antibiótica e transferidos para uma cultura fresca contendo sulfóxido de albendazole na concentração de 10µg/mL, que é comparável à concentração sanguínea plasmática *in vivo* na dose oral de 20mg/Kg, por 12 e 24 horas. Os exemplares foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e análise de tubulina por imunocitoquímica (ICC). Na avaliação de 24 horas foram observadas vesiculações por todo o tegumento e no interstício, um pouco acima da membrana basal. Os resultados obtidos foram consistentes com o esperado para inibição de microtúbulos, que é o modo de ação dos benzimidazóis.

Halferty et al. (2008) realizaram tratamento de ovinos com 10mg/Kg de triclabendazole e analisaram a superfície tegumentar de exemplares jovens de *F. hepatica* em resposta ao tratamento *in vivo*, por meio de MEV. Observaram que as alterações tegumentares se iniciaram a partir de 72 horas após o tratamento e no tempo de 96 horas todos os parasitos estavam mortos, desprovidos de tegumento com lesões profundas expondo os tecidos internos. Isso demonstra que nesse experimento, o triclabendazole foi capaz de matar todos os exemplares jovens de *F. hepatica* quatro dias após o tratamento.

Já Toner et al. (2010) realizaram o mesmo experimento porém com exemplares adultos de *F. hepatica*. A partir de 72 horas após o tratamento todas as fascíolas estavam mortas e, em 96 horas, todos os exemplares estavam mortos e desprovidos do sincício da superfície tegumentar. Os autores afirmam que a morte de exemplares adultos e expulsão dos mesmos dos canais biliares se iniciaram entre 48 e 72 horas após o tratamento, o que consideram um ótimo resultado. Além disso, é notável que as alterações tegumentares progrediram com o tempo e em 96 horas após o tratamento essas alterações causaram deformações da superfície dos parasitos adultos.

É importante salientar quem em ambos os experimentos o grupo controle apresentou todos os parasitos, jovens (HALFERTY et al., 2008) e adultos (TONET et al., 2010) vivos e com tegumento intacto, como o conteúdo intestinal repleto e todos os tecidos internos morfológicamente normais.

Por ser o antihelmíntico mais utilizado contra *F. hepatica*, o uso do triclabendazole gerou um processo de seleção de cepas e surgimento de populações de parasitos resistentes a essa droga (FAIRWEATHER, 2005, 2009) exigindo a criação de drogas alternativas que possuam atividade semelhante ao mesmo (FAIRWEATHER, 2011).

Alvarez et al. (2009) realizaram teste *in vitro* do efeito do triclabendazole, sulfóxido de triclabendazole, albendazole e sulfóxido de albendazole sobre ovos de cepas resistentes e suscetíveis de *F. hepatica*, e relataram que o albendazole e sulfóxido de albendazole tiveram um efeito inibitório sobre o desenvolvimento de ovos enquanto o triclabendazole e sulfóxido de triclabendazole, que são extensivamente usados no controle da fasciolose, não afetaram a eclosão de ovos mesmo na população de cepas suscetíveis aos compostos.

Um fascioloscida derivado do triclabendazole, chamado composto Alfa, tem sido desenvolvido pela Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM), como uma possível alternativa ao uso do triclabendazole (HERNÁNDEZ-CAMPOS et al., 1990, 2002). Estruturalmente é um benzimidazol derivado do triclabendazole e que possui uma margem de segurança de até 15 vezes a dose clínica recomendada (VERA et al., 2006). Alguns testes têm sido realizados para demonstrar a eficácia do composto Alfa sobre todos os estágios parasitários de *F. hepatica*.

Velarde et al. (2000) selecionaram entre quatro veículos o(s) mais apropriado para formular o composto Alfa. Dentre os quatro, dois mostraram ser 100% eficazes contra formas adultas e jovens de *F. hepatica*. Os animais utilizados no experimento foram ovinos

infectados artificialmente em dois tempos distintos para fornecimento de parasitos jovens e adultos e a avaliação foi realizada com base no percentual de redução de fascíolas, por necropsia. A síntese e formulação de veículos para o composto Alfa foi realizado na Faculdade de Química da UNAM no México (HERNÁNDEZ-CAMPOS et al., 1990). Os veículos I e II são compostos por pectina, carboximetilcelulose de baixa e média viscosidade, sacarina, metilparabeno e propilparabeno, porém em quantidades diferentes. De acordo com os autores todos os ingredientes são de fácil aquisição assim como os reativos para a realização da síntese do composto. A quantidade de cada ingrediente pode ser observado em Velarde et al. (2000).

McConville et al. (2008) realizaram tratamento de ovinos com 15mg/Kg de composto Alfa e analisaram a superfície e o tegumento interno de exemplares jovens de *F. hepatica* em resposta ao tratamento *in vivo*, por MEV e MET. Os efeitos do medicamento se tornaram evidentes sobre a superfície do parasito a partir de 48 horas após o tratamento com observação de edema e vesículas, além disso, neste mesmo tempo, foi possível observar vacúolos autofágicos e interrupção de atividade mitocondrial que se estenderam no decorrer do tempo até a avaliação de 72 horas.

Ovinos parasitados por *F. hepatica* após infecção artificial foram tratados com 15mg/Kg do composto Alfa 12 semanas após a infecção. Os parasitos adultos foram recuperados dos ductos biliares 24, 48 e 72 horas após o tratamento e foram analisados por histologia e MET. Alterações severas na espermatogênese foram observadas no decorrer do tempo e se iniciaram 24 após o tratamento (McCONVILLE et al., 2010).

Scarcella et al. (2011) realizaram estudo baseado na análise da viabilidade reprodutiva, por meio de estudo histopatológico, de *F. hepatica* em bovinos artificialmente infectados tratados por via subcutânea com uma nova formulação de triclabendazole a 25%. Os animais foram tratados na dose de 8mg/Kg e 12 mg/Kg obtendo eficácias de 69% e 95,6%, respectivamente. Na dose mais baixa alguns espécimes permaneceram viáveis, mas eram inférteis, o que compromete seriamente o ciclo biológico do trematódeo. Nos túbulos testiculares poucas células foram presentes e glândulas vitelínicas foram significativamente reduzidas em tamanho apresentando poucas células. De acordo com os autores, esses resultados têm implicações diretas para a patogênese da parasitose já que o desenvolvimento de uma formulação que produz uma redução substancial da carga parasitária pode promover ao mesmo tempo, que os espécimes sobreviventes estimulem o hospedeiro a desenvolver uma

resposta imune e a diminuição a eliminação de ovos do parasito no ambiente.

Não se estabelecem programas de controle eficazes sem conhecer profundamente a epidemiologia da enfermidade que se baseia nas análises dos dados climáticos e nas pesquisas sazonais sobre os hospedeiros. A implantação de um programa de controle contra a fasciolose pode ocorrer em qualquer região ou país mediante um sistema de manejo integral bem planejado e executado que deve combinar a administração de antihelmínticos no hospedeiro no momento mais conveniente de prevenir a contaminação das pastagens, a diminuição do número de hospedeiros intermediários mediante drenagem ou outras medidas agrícolas, e a redução da possibilidade de infecção do animal mediante um bom manejo de pastagem (ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN, 1994).

Este controle requer uma correta integração na redução do número de hospedeiros intermediários, pelo emprego de métodos químicos, físicos e biológicos. É importante considerar que os medicamentos fasciolídeos empregados no controle desta parasitose sejam de fácil aplicação, baixo custo, atóxico, que não deixem resíduos e que sejam altamente eficazes no combate às formas adultas e imaturas do parasito. Adquirir animais com certificação de sanidade é de extrema importância em regiões endêmicas (CUNHA; MARQUES; MATTOS, 2007).

A época do ano, ou mais precisamente, os meses em que se deve administrar o tratamento preventivo variam com as condições ecológicas, em especial climatológicas, de cada região. Além disto, estes tratamentos podem requerer dosificações táticas quando as condições climatológicas (umidade e calor) favoreçam uma rápida multiplicação dos moluscos. Um manejo bem estruturado é base para todo programa de controle. Existem inúmeros meios para se manter a sanidade de rebanhos, mas, a imensa maioria dos métodos em prática visa principalmente animais de produção, o que não impede a realização de adaptações, quando se trata de animais silvestres, já que em alguns casos esses animais são importantes na manutenção do ciclo no ambiente (EL-KOUBA, 2005).

Os programas de controle integrado recomendam medidas estratégicas preventivas associadas ao tratamento de pessoas doentes e à melhoria das condições socioeconômicas e de saneamento básico, além do uso de moluscicidas. No entanto, os moluscicidas acarretam prejuízos ao ambiente, e a recolonização das áreas afetadas tornam o processo de aplicação dispendioso e operacionalmente impossível de ser realizado. Estas razões levaram à necessidade de desenvolver medidas alternativas de controle. Algumas dessas

medidas são baseadas na possibilidade do uso de plantas ou de seus derivados como moluscicida (PILE et al., 2001b).

Pile et al. (2001b) confirmaram eficácia moluscicida do látex da “coroa-de-Cristo” (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*) observando diminuição do número de moluscos na pastagem e, conseqüentemente, diminuição na prevalência de animais positivos nos exames de fezes pela técnica de quatro tamises.

A utilização do esterco liquefeito de bovinos parasitados por *F. hepatica* não deve ser feita *in natura* sobre o solo e pastagens. Para que o seu emprego como fertilizante não acarrete riscos à saúde animal e humana, o período de retenção do material em biodigestão anaeróbia fechada não deve ser inferior a 42 dias, antes do seu retorno ao ambiente evitando o risco de contaminação do solo com ovos viáveis antes desse tempo (MENTZ; WIEST; GONÇALVES, 2004) .

O controle de *F. hepatica* é confrontado por dois grandes desafios: como lidar com o provável aumento do número de casos da doença e como lidar com a ameaça de resistência das drogas disponíveis no mercado. Há uma necessidade constante de se acompanhar as mudanças no clima e o caminho que a doença vai seguir. Essas informações vão direcionar os esforços de controle onde eles serão mais necessários (FAIRWEATHER et al., 2011).

Kenyon et al. (2009) em sua revisão sobre como as mudanças climáticas afetariam a epidemiologia de *Haemonchus contortus*, *Nematodirus battus*, *Teladorsagia circumcincta* e *F. hepatica* em ovinos na Escócia chegaram a conclusão que aumentos na temperatura poderiam influenciar negativamente a produção de ovinos naquela região.

Mas-Coma; Valero; BARGUES (2009) estudaram os impactos que as mudanças climáticas poderiam ocasionar sobre as formas larvais de trematódeos e seus hospedeiros intermediários e concluíram que os trematódeos em geral são grupos que tenderão a sofrer profundamente os efeitos das mudanças no clima devido a suas características evolutivas.

O conhecimento epidemiológico sobre quando, onde e qual intensidade de risco de infecção por *F. hepatica* é essencial para o desenvolvimento de programas de controle estratégicos (KLEIMAN et al., 2007).

Fox et al. (2011) validaram um modelo de previsão para o risco da fasciolose no Reino Unido e observaram que os mapas de risco demonstraram altos níveis de risco para a doença com sérias epidemias no País até o ano de 2050.

Martins et al. (2012) utilizaram atributos considerados importantes na

epidemiologia da fasciolose como declividade, uso da terra, tipo do solo, temperatura, altitude e precipitação, e assim, por meio do Sistema de Informações Geográficas (SIG), geraram mapas de risco para doença na região sul do Espírito Santo. Neste estudo, os autores observaram que mais de 50% das áreas localizadas nesta região apresentaram um risco elevado ou muito elevado para fasciolose. De acordo com os autores esses estudos contribuem para o desenvolvimento de estratégias de controle da doença.

## **CAPÍTULO I**

### **ESTUDO DA DINÂMICA POPULACIONAL DE *Lymnaea columella* NA MICRORREGIÃO DO CAPARAÓ-ES**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a dinâmica populacional de *Lymnaea columella* sob condições naturais. Entre novembro de 2010 a junho de 2013, foram realizadas coletas de moluscos em cinco locais diferentes: bebedouro de bezerros, área alagada, açude e dois bebedouros de caprinos. Também foram obtidos dados meteorológicos da região no período de estudo. Foram coletados 2.038 moluscos, sendo 1.558 (76,45%) da espécie *L. columella*, encontrada em todos os locais de coleta, mas, predominantemente no bebedouro de bezerros e em um bebedouro de caprinos. Os resultados indicam que não houve diferença no número de moluscos no período seco e chuvoso e a temperatura se mostrou sem grandes variações interferindo somente em três meses de análise, na qual apresentou resultados acima da média anual. Programas de controle eficazes de *Fasciola hepatica* podem ser realizados em qualquer região a partir do momento que estudos de dinâmica de populações do hospedeiro intermediário deste parasito sejam realizados, a fim de interromper parte importante do ciclo desta parasitose.

Palavras-chave: molusco aquático, sazonalidade, precipitação.

## ABSTRACT

The aim of this work was to study the population dynamics of *Lymnaea columella* at natural conditions. Between November 2010 and June 2013, samples of molluscs were collected in five different locations : calves trough, wetland, pond fountains and two goats trough. Meteorological data of the region were also obtained during the study. In the period 2.038 molluscs were collected, 1.558 (76.45%) of the species *L. columella*, found in all the sampling sites, but predominantly in one of the goats trough and of the calves. The results indicate that there was no difference in number of clams in the dry and rainy season and temperature showed no major variations interfering in only three months of analysis, which showed results above the annual average. Effective control of *Fasciola hepatica* programs can be conducted in any region from the time that population dynamics of the intermediate host of this parasite are carried out in order to interrupt important part of this parasitic disease cycle.

Keywords: aquatic mollusks, seasonality, precipitation.

## 1 INTRODUÇÃO

Para a ocorrência do ciclo de vida de *Fasciola hepatica* é necessário presença dos hospedeiros definitivos, eliminando ovos no ambiente, do molusco do gênero *Lymnaea*, hospedeiro intermediário, além de condições ideais de temperatura e umidade que garantem a sobrevivência do molusco e das formas larvares no ambiente.

No Brasil, a espécie *L. columella* é a principal envolvida no ciclo da fasciolose estando distribuída em todas as regiões. Os animais se infectam com a ingestão de metacercária encistada na vegetação ou até mesmo em outros substratos no ambiente, enquanto o homem se infecta com a ingestão de vegetais frescos contaminados com a forma infectante.

Para a sobrevivência das formas larvares no ambiente e do molusco o local precisa ser úmido, com temperatura entre 10 e 25°C, além da presença de substratos para alimentação dos moluscos. Em épocas de clima seco os moluscos entram num período de latência e permanecem enterrados até que as condições de temperatura e umidade voltem a ser ideais.

É importante considerar que além das áreas permanentemente úmidas como rios, lagos, lagoas e açudes há influência das precipitações na umidade do solo ou até mesmo na ocorrência de enchentes que contribuem para a disseminação dos moluscos entre as propriedades. Assim, normalmente, observa-se aumento da população de moluscos após o período de precipitação. Temperaturas muito altas ou muito baixas promovem redução na população de moluscos.

O conhecimento da época de maior ocorrência do molusco é importante para que se saiba quando há maior possibilidade de infecção dos animais e, conseqüentemente, para que se estabeleçam programas de controle eficazes.

O objetivo deste trabalho foi estudar a dinâmica populacional de *L. columella* na microrregião do Caparaó, no Espírito Santo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Localização do Experimento

Durante o período novembro de 2010 a junho de 2013, foram realizadas visitas mensais em cinco locais de amostragem e coleta estabelecidos em áreas de drenagem e bebedouros nos setores de bovinocultura e caprinocultura do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, localizado no município de Alegre, na microrregião do Caparaó- ES. Os locais foram marcados com quatro estacas de madeira de aproximadamente 30 cm e delimitados com tinta verde, totalizando uma área equivalente a 1m<sup>2</sup>, perpendiculares a sua fonte, medidos com uma fita métrica. Estes locais foram identificados como:

Local 1: bebedouro de bezerros do setor de bovinocultura (GPS, sob as coordenadas de: S 20°45'880'', WO 41°27'319'' elevação 127m). Neste local em particular foi considerada a parte interna do bebedouro (onde foi feita raspagem da borda) e remoção de moluscos na parte externa do mesmo. Foram coletadas plantas e porções de terra úmida.

Local 2: região alagada próximo aos bebedouros dos bezerros, ainda no setor de bovinocultura, no córrego (GPS, sob as coordenadas de: S 20°45'879'', WO 41°27'270'', elevação 116m). A área foi delimitada com as estacas paralelas a um poste. Esta região compreende uma área de pasto que ficava totalmente alagada em alguns meses do ano comprometendo a inspeção. Trata-se de um local que há intensa passagem de animais e consequentemente consumo de plantas próximas ao córrego.

Local 3: açude do setor de caprinocultura (GPS, sob as coordenadas de: S 20°45'692'', WO 41°27'556'', elevação 120 m). A área delimitada estava paralela a uma marcação na cerca e compreendeu a uma porção de terra marcada com duas estacas próximas à margem do açude e uma porção de água onde se encontra uma vegetação aquática, desta forma, dando atenção especial à coleta de plantas deste ponto.

Local 4: bebedouro do capril, abrangeu a área ao redor da caixa de água que abastece os bebedouros individuais dos animais. Analisou-se principalmente a terra úmida e o interior do bebedouro, fazendo uma raspagem da caixa (GPS, sob as coordenadas de: S 20°45'691'', e WO 41°27'544'', elevação 117m).

Local 5: bebedouro de outro capril no mesmo setor e nas mesmas orientações do local 4. Compreendeu o espaço ao redor da caixa de água que abastece os bebedouros individuais dos animais e também foi realizada coleta dentro da própria caixa e da terra úmida ao redor da mesma (GPS, sob as coordenadas de: S 20°45'682'' e WO 41°27'529'', elevação 120m).

## **2.2 Coleta e Análise dos Moluscos**

Durante as coletas foram observadas a localização dos moluscos na superfície do solo ou bebedouro, submersos, em terra úmida ou aderidos às plantas aquáticas ou terrestres. Também foi observada a quantidade de água represada no solo e foram coletadas plantas dentro do limite, para observação de presença de postura.

Todos os moluscos dentro do limite de um metro quadrado foram coletados com auxílio de peneiras, redes ou manualmente com uso de luvas de borracha, armazenados separadamente em tubos com extremidade superior aberta, tampados com tiras de gaze úmidas e preenchidos com a própria água do local onde se encontravam.

Os moluscos foram direcionados ao Laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), separados por local de coleta, contados, medidos com auxílio de um paquímetro e identificados segundo o manual de controle de moluscos (PARAENSE, 1975, 1983, 1986).

Os exemplares foram expostos à luz artificial direta durante quatro horas e depois analisados quanto à presença de estágios larvares de *F. hepatica* segundo manual de vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica (BRASIL, 2008).

## **2.3 Coleta de Dados Meteorológicos**

Os dados meteorológicos do período estudado foram cedidos pelo Instituto Capixaba de Pesquisa e Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), analisados e relacionados com a presença dos moluscos nos mesmos períodos.

## **2.4 Análise Estatística**

Foi realizada análise estatística descritiva relatando a frequência dos moluscos encontrados durante todo o período estudado.

A oscilação mensal de temperatura, precipitação e frequência de moluscos do gênero *Lymnaea* foi analisada graficamente como parcelas da média mensal ao longo do

período avaliado.

Ao analisar a relação entre o número de moluscos e a estação do ano, que se dividiu em estação seca (abril a setembro) e estação chuvosa (outubro a março), os dados foram testados quanto a sua normalidade e avaliados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, considerando  $p \leq 0,05$  para amostras com diferença significativa.

Todos os testes foram realizados utilizando-se nível de significância de 5%.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre novembro de 2010 e junho de 2013, foram coletados 2.038 moluscos, sendo 1.558 (76,45%) do gênero *Lymnaea*, 240 (11,78%) do gênero *Physa* e 240 (11,78%) do gênero *Biomphalaria*. A espécie do gênero *Lymnaea* foi identificada como sendo *L. columella* e concorda com os resultados demonstrados por Paraense (1983) que relata que esta espécie é a que se encontra mais distribuída no Brasil, principalmente na região sudeste, local do presente estudo.

Os bebedouros dos locais 1 e 5 apresentaram o maior número de moluscos coletados com predominância da espécie *L. columella*. O bebedouro do local 4 apresentou predominância do gênero *Biomphalaria* assim como do local 3 que corresponde ao açude, porém, este último, com valores próximos de exemplares de *Lymnaea*. Por fim, o local 2, que corresponde a área alagada apresentou número maior de exemplares do gênero *Physa* e nenhum exemplar do gênero *Biomphalaria*. A espécie *L. columella* foi a utilizada para estudo da sazonalidade por corresponder ao hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica*. Nenhum exemplar desta espécie apresentou estágios larvares deste parasito.

Os cinco locais escolhidos para as coletas estão relacionados aos habitat dos moluscos, e os cochos de água para dessedentação foram apontados por Dias et al. (2013) como sendo locais de grande frequência de moluscos em municípios no sul do Espírito Santo. Apesar da fixação das cercárias ser descrita principalmente na vegetação Serra-Freire (1995) relata que essas podem fixar-se em qualquer objeto inanimado além das plantas aquáticas.

Isso foi demonstrado por Gomes et al. (2002) que observaram metacercárias na superfície de conchas de moluscos, confirmando assim a importância de estudos epidemiológicos de *Lymnaea* em bebedouros no presente trabalho, além da área alagada e açude que são mais frequentemente descritos na literatura. Os bebedouros, independente da frequência de precipitação são locais permanentemente úmidos que garantem a permanência dos moluscos durante todo o ano, o que será discutido mais adiante.

O número de exemplares de moluscos totais e de *L. columella* no período de novembro de 2010 a junho de 2013 pode ser observados na Tabela 1 e as médias e desvio padrão do número de moluscos totais e de *L. columella*, por ano, nos anos de estudo podem ser observados na Tabela 2.

**Tabela 1.** Número de exemplares de moluscos totais e de *Lymnaea columella* coletados no período de novembro de 2010 a junho de 2013.

Mês/Ano	Total de moluscos	Total de <i>Lymnaea</i>
nov/10	104	90
dez/10	176	119
jan/11	67	28
fev/11	25	16
mar/11	29	26
abr/11	26	10
mai/11	29	12
jun/11	99	14
jul/11	48	15
ago/11	45	15
set/11	36	25
out/11	45	43
nov/11	73	70
dez/11	96	94
jan/12	135	120
fev/12	57	34
mar/12	9	4
abr/12	61	52
mai/12	51	45
jun/12	42	34
jul/12	100	53
ago/12	24	20
set/12	69	69
out/12	32	32
nov/12	57	41
dez/12	134	134
jan/13	159	159
fev/13	32	32
mar/13	9	9
abr/13	27	27
mai/13	52	52
jun/13	90	64
<b>Total</b>	<b>2038</b>	<b>1558</b>

**Tabela 2.** Número de moluscos totais e de *Lymnaea columella*, por ano, no período de novembro de 2010 a junho de 2013.

Ano	Total	
	Moluscos	<i>Lymnaea</i>
2010	140 ± 50,91 <sup>A</sup>	104,5 ± 20,51 <sup>A</sup>
2011	51,5 ± 26,35	30,67 ± 26,16
2012	64,25 ± 40,08	53,17 ± 38,34
2013	61,5 ± 55,18	57,17 ± 53,49
<b>Total</b>	<b>63,69 ± 42,73</b>	<b>48,69 ± 39,85</b>

A: Média e desvio padrão

Nota-se que a média de exemplares de *L. columella* decresceu com menor valor no ano de 2011, com 30,67 exemplares. Apesar de ter tido apenas dois meses de avaliação, o ano de 2010 apresentou a maior média com 104,5 exemplares de *L. columella*. Os anos de 2012 e 2013 apresentaram valores semelhantes, não apresentando muita variação da média total. Esse decréscimo do número de moluscos pode estar relacionado à interferência antrópica nos locais 2 e 3 durante o período de estudo.

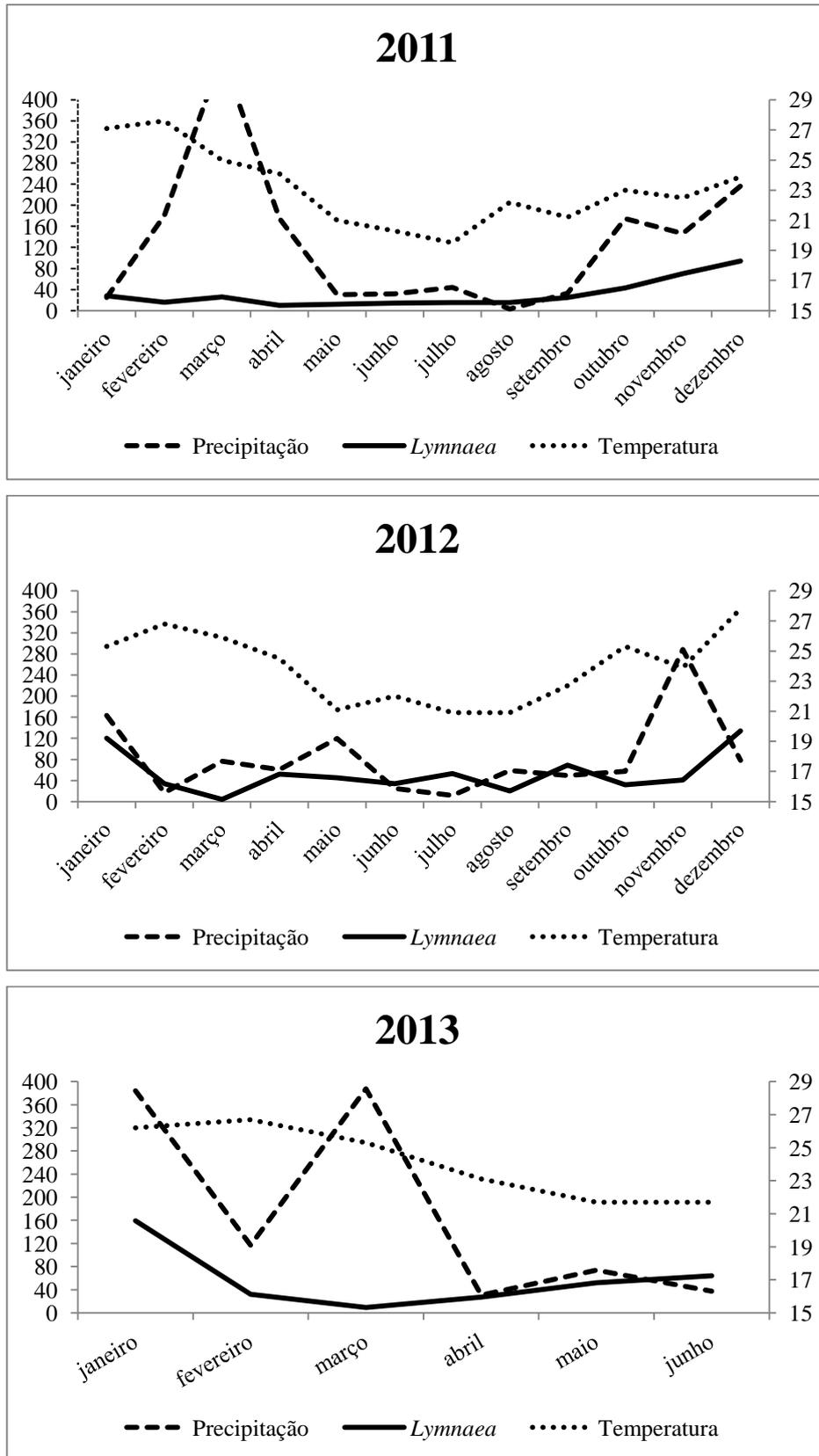
No local 2 foi realizada drenagem da área alagada a partir de novembro de 2011 dificultando a coleta de moluscos. Sabe-se que o habitat dos moluscos são as diferentes coleções hídricas principalmente em água estagnada (SERRA-FREIRE, 1995), portanto, a drenagem deste local proporciona condições desfavoráveis à sobrevivência do molusco uma vez que permite que o mesmo esteja exposto à radiação e às altas temperaturas, com consequente morte.

No local 3, a partir de janeiro de 2011, houve utilização do açude para outros fins com alternância de pouca água e muita água que pode ter contribuído para a diminuição da população devido à redução de substratos disponíveis para os mesmos. Rangel; Izquierdo; Nogueira (1999) relataram que plantas e algas são os principais alimentos desses moluscos, portanto, na ausência dos mesmos, além de perderem fonte de alimento também há exposição dos moluscos à radiação e às altas temperaturas, como relatado anteriormente, o que levaria a morte dos mesmo justificando a redução do número de exemplares.

Em ambos locais primeiro houve redução do número de exemplares até sua completa ausência, resultados semelhantes aos descritos por Coelho; Lima (2003) que observaram redução de 5,2 para 3,9% na população de moluscos pela remoção de plantas aquáticas e drenagem da área. Isso demonstra o quanto a drenagem de áreas alagadas, as

quais os animais tem acesso, e a remoção de plantas que são fonte de alimento, interferem na redução da população de moluscos, afetando, conseqüentemente, a cadeia epidemiológica da doença.

Durante os quatro anos de estudo, a temperatura variou pouco com média de 23,7°C com maior variação da precipitação que atingiu média de 141 mm. Os meses com picos de precipitação e posteriores a eles, acompanharam o aumento do número de *L. columella*. A distribuição sazonal de *L. columella*, precipitação e temperatura nos anos de 2011, 2012 e 2013 podem ser observadas na Figura 1.



**Figura 1.** Distribuição sazonal de *Lymnaea columella*, precipitação (mm) e temperatura (°C) nos anos de 2011, 2012 e 2013.

No ano de 2010, com uma média de 104,5 exemplares de *L. columella* nos dois meses de coleta, a média de precipitação foi de 465 mm e de temperatura 25°C. Observa-se que os aumentos da precipitação e da temperatura favoreceu o aumento do número dos moluscos uma vez que criam condições favoráveis ao seu desenvolvimento.

No ano de 2011, a média de precipitação foi de 130 mm e da temperatura 23°C. Neste ano, é bem notável grande período de precipitação na estação chuvosa (outubro a março) com queda acentuada na precipitação na estação seca (abril a setembro). Apesar disso, o aumento do número de *L. columella* foi observado a partir de setembro com pequeno decréscimo em janeiro, fevereiro e março, os meses mais quentes do ano, com temperaturas de 27,1°C, 27,6°C e 25°C, respectivamente. A redução no número de exemplares de *Lymnaea* pode estar relacionando ao aumento da temperatura neste período, independente do período ser chuvoso.

Müller et al. (1999) afirmaram que temperatura entre 10 e 25°C são favoráveis ao desenvolvimento do molusco, fato confirmando por Claxton et al. (1999) que relataram que o crescimento do molusco em temperatura abaixo de 10°C é bem lento aumentando rapidamente até atingir 25°C, diminuindo quando mantido nessa temperatura. Barges et al. (2012) em estudo no sul da Patagônia relataram que a baixa temperatura característica do clima frio dessa região promove uma restrição acentuada a sazonalidade de *F. hepatica*.

Martins et al. (2012) também afirmaram que um dos fatores que favorecem o desenvolvimento do hospedeiro intermediário no sul do Espírito Santo é a temperatura média acima de 20°C. Mas-Coma; Valero; Barges (2009) relataram que as mudanças climáticas com aumento de temperatura podem influenciar negativamente no desenvolvimento das formas larvares e dos hospedeiros intermediários dos trematódeos. No presente estudo, temperaturas iguais ou superiores a 25°C confirmaram a redução no número de moluscos na área. Nenhum mês de avaliação apresentou média de temperatura abaixo de 20°C confirmando que não houve taxa de crescimento reduzido por baixas temperaturas neste estudo.

No ano de 2012, a média de precipitação diminuiu para 84 mm com temperatura média de 24°C. A população de *L. columella* apresentou dois picos, em janeiro 120 exemplares e em dezembro 134 exemplares, coincidindo com os maiores picos de precipitação. Neste ano, a estação seca e chuvosa não ficou tão definida como no ano anterior ocorrendo aumento na precipitação durante alguns meses do período de seca, principalmente no mês de maio, mas não interferindo no aumento de exemplares de

moluscos logo após a precipitação neste mês.

Por fim, no ano de 2013, até o mês de junho, a média de precipitação foi de 171 mm com média de temperatura de 24°C. Neste ano, assim como em 2011, a estação chuvosa (janeiro a março) compreendeu o período com maior taxa de precipitação, enquanto na estação seca (abril a junho) houve as menores taxas, com diminuição também da temperatura neste período. O aumento e diminuição do número de *L. columella* acompanharam estes dados exceto no mês de março no qual houve maior taxa de precipitação com menor número de exemplares do molusco, apenas nove. Isso pode estar relacionado ao fato dos moluscos terem sido deslocados pela água da chuva e/ou enchentes para fora do local de coleta, o que é comum acontecer em locais com altas taxas pluviométricas, como relatado por Acha; Szyfres (1986) que afirmam que moluscos podem ser levados pelas águas de enchentes.

Ao analisar a relação entre o número de moluscos e a estação do ano, seca e chuvosa, constatou-se que os dados não diferiram significativamente ( $p=0,30$ ). Isso mostra que independente da estação, mesmo apresentando maior média no período da estação chuvosa, há presença de *L. columella* durante todo o ano no ambiente o que seria suficiente para a manutenção do ciclo da fasciolose nestes locais. Estes resultados podem estar relacionados ao fato de na estação chuvosa, em alguns meses, a precipitação ser forte o suficiente para arrastar alguns moluscos para fora da área de coleta e/ou ainda pelo fato da coleta ter sido realizada em locais considerados focos primários de moluscos.

Estes dados concordam com Buseti (1982) que relata que em determinadas regiões, em época de chuva, há dispersão dos moluscos às áreas circunjacentes. Além disso, de acordo com Acha; Szyfres (1986), os focos primários se caracterizam por serem locais permanentemente úmidos e onde os moluscos se reproduzem de modo constante mantendo-se em número quase sempre uniforme e com o aumento da precipitação os moluscos podem se disseminar para outras áreas seja por enchentes indo para áreas mais longes ou para áreas próximas, o que pode ter interferido nos resultados do presente estudo.

Apesar de não apresentar diferença significativa entre o número de moluscos encontrados nas duas estações, o número médio de exemplares na estação chuvosa nos anos 2011, 2012 e 2013 foi sempre superior ao da estação seca. O hábito anfíbio do molusco que durante o período seco entra em um período de estivação ficando enterrado na areia até que as condições ambientais se tornem favoráveis para sua reprodução,

diminuindo a população do mesmo no período seco e aumentando no período chuvoso, fato confirmado por Acha; Szyfres (1986).

Serra-Freire (1995) também relata sobre este período de estivação do molusco, mas diz que é importante considerar que as populações de hospedeiro intermediário sofrem com o parasitismo por *F. hepatica*, que chega a determinar a morte ou outras alterações como gigantismo e diminuição da capacidade reprodutiva, o que regula as infestações com reflexos epidemiológicos. No presente trabalho, os locais de estudo não apresentavam animais positivos para *F. hepatica* atribuindo assim, a menor quantidade de moluscos no período seco ao hábito de estivação dos mesmos.

A análise gráfica da distribuição de *Lymnaea* nos anos de 2011, 2012 e 2013 e a análise estatística dessa distribuição nas estações seca e chuvosa demonstraram que a precipitação foi um dos fatores que mais influenciou no aumento ou redução do número de exemplares de *L. columella* nos locais estudados. Nota-se que, exceto em um mês no ano de 2013, o aumento da taxa de precipitação é logo seguida por um aumento no número de moluscos. A precipitação aumenta em tamanho e proporção áreas preexistentes, como as do presente estudo, podendo favorecer a ocorrência de inundações, além de contribuir para uma alta umidade do solo.

Martins et al. (2012) em estudo de análise de risco de fasciolose no sul do Espírito Santo, o que incluiu a região do presente estudo, afirmaram que as inundações periódicas das pastagens e/ou solos promoveram uma retenção de água, o que favoreceu o desenvolvimento do molusco hospedeiro intermediário. Mesmo locais inundados periodicamente tornam-se importantes áreas para a presença e proliferação dos moluscos, como afirmado por Serra-Freire (1999).

A alta umidade do solo é importante por proporcionar ambiente adequado para reprodução dos moluscos além de permitir que os mesmos entrem no processo de estivação quando as condições ambientais não são favoráveis. Isso é confirmado por Cruz-Mendoza et al. (2005) que afirmaram que a baixa umidade afeta a estivação e, como consequência, o número de hospedeiros intermediários. Van Dijk et al. (2010) também confirmaram este fato ao estabelecer que áreas antes livres de fasciolose podem apresentar a doença com o aumento das taxas pluviométricas e que além de proporcionar um ambiente favorável à manutenção do hospedeiro garante que haja ótimas condições para a infecção do molusco pelo miracídio de *F. hepatica*.

É importante considerar que a distribuição das chuvas não ocorre de forma regular

em todos os anos e que nem sempre é possível observar estação seca e chuvosa de forma característica. Isso é comprovado no trabalho realizado por Prepelitchi et al. (2011), na Argentina, no qual os autores relatam maior predominância de *Lymnaea* no período do inverno, o que não era o esperado, resultado de um efeito nocivo do período de seca no verão anterior. Além disso, foi necessário cerca de três meses após a chegada das chuvas para uma completa recuperação da população de *Lymnaea*.

No presente estudo, no ano de 2012 houve altas taxas pluviométricas em ambas as estações o que afeta a dinâmica populacional dos moluscos nos meses subsequentes. Costa et al. (2006) afirmaram que o ciclo biológico anual dos moluscos depende do comportamento da estação das chuvas, e que, assim como a precipitação cria um ambiente favorável para os moluscos, a diminuição e/ou ausência dela promove redução do número dos mesmos podendo haver inclusive, diminuição da prevalência de fasciolose.

Normalmente, a precipitação favorece o acúmulo de água em locais que apresentem terreno mais plano, ou menos montanhoso, o que pode ser observado no presente estudo, que se caracteriza por apresentar terreno mais plano, sendo também considerado um local de baixa altitude. Müller et al. (1999) descreveram que além de considerar as variáveis climáticas, outras condições como altitude, umidade do solo e áreas inundadas também contribuem para a proliferação de moluscos do gênero *Lymnaea*.

Em estudos realizados em estados do sul do país, Dutra et al. (2010) e Silva et al. (2011) relacionaram a distribuição de fasciolose bovina com maior percentual da doença em locais de menor altitude além de mostrarem uma tendência do aumento dos casos de fasciolose conforme haja maior volume de precipitação. Esses achados estão relacionados à manutenção de um ambiente favorável à presença do molusco hospedeiro intermediário e das formas larvares no ambiente. Lemma (1985), Alves et al. (2011) e Martins et al. (2012) também relacionam a frequência de infecção de bovinos em regiões de pastagens localizadas em terras planas, já que este tipo de relevo favorece o desenvolvimento do hospedeiro intermediário.

Regiões de baixa altitude normalmente apresentam clima tropical, demonstrando que não é somente o fato dessas regiões favorecerem o acúmulo de água, mas, também, da temperatura ser favorável a um rápido desenvolvimento do parasito no hospedeiro intermediário, como afirmam Yilma; Malone (1998). Os autores relataram ainda que em regiões mais elevadas o ciclo pode demorar até mais de um ano para ser completado.

As regiões de maior altitude não são consideradas de maior risco, pois há

dificuldade no acúmulo de água na época das precipitações (MAS-COMA; FUNATSU; BARGUES, 2001), mas sempre se deve levar em consideração outros fatores ambientais e climáticos. Como relatado por Fuentes; Malone; Mas-Coma (2001) que caracterizaram áreas endêmicas para fasciolose nos Andes, uma região de alta altitude, com presença do hospedeiro intermediário. Mas-Coma; Esteban; Bargues (1999) afirmaram que os moluscos podem habitar corpos d'água permanentes, o que pode ter ocorrido nesta região.

A compreensão da sazonalidade de *L. columella* é muito importante para que se estabeleçam programas de controle e tratamento da fasciolose. De acordo com Serra-Freire (1995) no início do período chuvoso um elevado número de ovos de *F. hepatica* eliminados pelos hospedeiros durante o período seco, eclode e posteriormente grande número de cercárias é liberado pelos moluscos nos focos primários. Com a maior disponibilidade de água, as populações de moluscos aumentam e expandem-se pelos focos de disseminação. Essa situação acaba sendo grave já que neste início de período chuvoso os bovinos vêm de escassa alimentação e enfrentam uma alta infecção pela ingestão de metacercárias abundantes na pastagem.

Assim, de acordo com os resultados do presente estudo é importante que se estabeleçam programas estratégicos de controle, com tratamento dos animais no período seco, para que haja uma menor eliminação de ovos no ambiente, e no início da estação chuvosa, época em que os moluscos saem do processo de estivação e muitos são transportados por toda a pastagem, o que facilitaria a infecção dos animais pelo contato com a forma infectante em um período que os animais não estão em plena condição corporal.

Apesar do difícil controle, Serra-Freire (1990) afirmou que a fasciolose hepática é uma parasitose bem regulada e com uma estabilidade sensível às variações do ambiente. Portanto, situações que afetem a umidade do solo, como precipitação e temperatura vão alterar a dinâmica populacional de *L. columella* e, conseqüentemente, interferir no ciclo biológico de *F. hepatica*.

Programas de controle eficazes de *F. hepatica* podem ser realizados em qualquer região a partir do momento que estudos da dinâmica populacional do hospedeiro intermediário deste parasito sejam realizados, a fim de interromper parte importante do ciclo desta parasitose.

#### **4 CONCLUSÃO**

No local de estudo, a dinâmica populacional de moluscos da espécie *Lymnaea columella* está relacionada a fatores climáticos, principalmente precipitação, já que a temperatura se manteve sem variações drásticas, e a fatores ambientais, como a mudança de manejo do ambiente, os quais interferem na umidade do solo e afetam diretamente a população dos moluscos.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales*. Organización Panamericana de La Salud, Washington, D. C., E.U.A., 1986.

ALVES, D.P.; CARNEIRO, M.B.; MARTINS, I.V.F.; BERNARDO, C.C.; DONATELE, D.M.; PEREIRA JÚNIOR, O.S.; ALMEIDA, B.R.; AVELAR, B.R.; LEÃO, A.G.C. Distribution and factors associated with *Fasciola hepatica* infection in cattle in the south of Espírito Santo State, Brazil. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v.17, n.3, p.271-276, 2011.

BARGUES, M.D.; MERA, Y.; SIERRA, R.L.; ARTIGAS, P.; MAS-COMA, S. DNA multigene sequencing of topotypic specimens of the fascioliasis vector *Lymnaea diaphana* and phylogenetic analysis of the genus *Pectinidens* (Gastropoda). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.107, n.1, p.111-124, 2012.

BRASIL. Ministério da saúde. *Vigilância de controle de moluscos de importância epidemiológica*, Brasília, Brasil, 2008.

BUSETTI, E.T. Informações adicionais sobre a fasciolose hepática em Curitiba (Estado do Paraná, Brasil). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.24, n.2, p.102-106, março-abril, 1982.

CLAXTON, J.R.; SUTHERST, J.; ORTIZ, P.; CLARKSON, M.J. The Effect of Cyclic Temperatures on the Growth of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea viatrix*. *The Veterinary Journal*, v. 157, n.2, p.166-171, 1999.

COELHO, L.H.L.; LIMA, W.S. Population dynamics of *Lymnaea columella* and its natural infection by *Fasciola hepatica* in the State of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Helminthology*, v.77, n.1, p.7-10, 2003.

COSTA, F.L.; ROSA, F.; CRESCO, M.V.; CORREIA, E. Evolução dos biótopos aquáticos de trematódeos/moluscos em Cabo Verde, 1ª Conferência Lusófona sobre o Sistema Terra, Cluster, FC-UL. Lisboa, Portugal, 2006.

CRUZ-MENDOZA, I.; IBARRA-VELARDE, F.; QUINTERO-MARTÍNEZ, M.T.; NARANJO-GARCÍA, E.; LECUMBERRI-LÓPEZ, J.; CORREA, D. Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in cattle and *Lymnaea (Fossaria) humilis* snails in central Mexico. *Parasitology Research*, v.95, n.4, p.283-286, 2005.

DIAS, A.S.; SOBREIRA, R.R.; AGUIAR, G.B.; MELOTTI, V.D.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; PUPPIN, A.C.; PERBONI, W.R.; BERTONCELI, R.M.; SILVA, R.G.; RAMOS, R.F. Estudo da distribuição de moluscos aquáticos no sul do estado do Espírito Santo. *Acta Veterinária Brasileira*, v.7, n.2, p.154-157, 2013.

DUTRA, L.H.; MOLENTO, M.B.; NAUMANN, C.R.C.; BIONDO, A.W.; FORTES, F.S.; SAVIO, D.; MALONE, J.B. Mapping risk of bovine fasciolosis in the south of Brazil using Geographic Information Systems. *Veterinary Parasitology*, v.169, n.1, p.76–81, 2010.

FUENTES, M.V.; MALONE, J.B.; MAS-COMA, S. Validation of a mapping and prediction model for human fasciolosis transmission in Andean very high altitude endemic areas using remote sensing data. *Acta Tropica*, v.79, n.1, p.87–95, 2001.

GOMES, F.F.; OLIVEIRA, F.C.R.; PILE, E.A.; LOPES, C.W.G. Estabelecimento de foco de fasciolose hepática em propriedade do município de Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.11, n.2, p.53-56, 2002.

LEMMA, B., GABREAB, F.; TEDLA, S. Studies on fasciolosis in four selected sites in Ethiopia. *Veterinary Parasitology*, v.18, n.1, p. 29-37, 1985.

MARTINS, I.V.F.; AVELAR, B.R.; PEREIRA, M.J.S.; FONSECA, A.H. Application of a geographical information system approach for risk analysis of fascioliasis in southern Espírito Santo state, Brazil. *Geospatial Health*, v.6, n.3, p.87-93, 2012.

MAS-COMA, M.S.; ESTEBAN, J.G.; BARGUES, M.D. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bull World Health Organ*, v.77, n.4, p.340-346, 1999.

MAS-COMA, S.; FUNATSU, I. R.; BARGUES, M. D. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology*, v.123, n.5, p.115-127, 2001.

MAS-COMA, S.; VALERO, M.A.; BARGUES, M.D. Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Veterinary Parasitology*, v.163, n.4, p.264-280, 2009.

MÜLLER, G.; BERNE, M.E.A.; RAFFI, L.L.; JESUS, L.P.; PAULSEN, R.M.M.; SINKOC, A.L. Influência da temperatura na longevidade de metacercárias de *Fasciola hepatica*. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.5, n.2, p. 164-165, 1999.

PARAENSE, W.L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. *Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro*, v.55, p.105-128, 1975.

PARAENSE, W.L. *Lymnaea columella* in Northern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.78, n.4, p.477-482, 1983.

PARAENSE, W.L. *Physa marmorata* Guilding, 1828 (Pulmonata: Physidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.91, n.4, p.459-469, 1986.

PREPELITCHI, L.; PIETROKOVSKY, S.; KLEIMAN, F.; RUBEL, D.; ISSIA, L.; MORIENA, R.; RACIOPPI, O.; ÁLVAREZ, J.; WISNIVESKY-COLLI, C. Population Structure and Dynamics of *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Gastropoda: Lymnaeidae) in Wetlands of Northeastern Argentina. *Zoological Studies*, v. 50, n. 2, p. 164-176, 2011.

RANGEL, R.J.L.; IZQUIERDO, M.R.; NOGUEIRA, B.G. Bovine fasciolosis in Tabasco, Mexico. *Veterinary Parasitology*, v.81, n.2, p.119–127, 1999.

SERRA-FREIRE, N.M. Fasciolose no Vale do Paraíba. *Agrotécnica Ciba-Geigy*, v.14, n.1, p. 14-19, 1990.

SERRA-FREIRE, N.M. Fasciolose hepática. *A Hora Veterinária*, v.1, n.1, p.13-18, 1995.

SERRA-FREIRE, N. M. Fasciolose hepática no Brasil: Análise Retrospectiva e Prospectiva. *Caderno Técnico Científico da Escola de Medicina Veterinária*, ano 1, n.1, p.9-70, jul-dez, 1999.

SILVA, A.E.P.; FREITAS, C.C.; DUTRA, L.V.; MOLENTO, M.B. Distribuição da *Fasciola hepatica* bovina em Santa Catarina, Brasil. Anais XV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR, Curitiba, PR, Brasil, 30 de abril a 05 de maio de 2011, INPE, p.8358-8364.

VAN DIJK, J.; SARGISIN, N.D.; KENYON, F.; SKUCE, P.J. Climate change and infectious disease: helminthological challenges to farmed ruminants in temperature regions. *Animal*, v. 4, n.3, p. 377-392, 2010.

YILMA, J.M.; MALONE, J.B. A geographic information system forecast model for strategic control of fasciolosis in Ethiopia. *Veterinary Parasitology*, v.78, n.2, p.103-127, 1998.

## **CAPÍTULO II**

### **TÉCNICA DE SEDIMENTAÇÃO (FOREYT, 2005) PARA DIAGNÓSTICO QUANTITATIVO DE OVOS DE *Fasciola hepatica***

## RESUMO

A infecção por *Fasciola hepatica* acomete diversas espécies animais sendo mais frequentemente diagnosticada em ovinos e bovinos. Por apresentar sinais inespecíficos o diagnóstico laboratorial é necessário, sendo os exames coproparasitológicos os mais utilizados já que apresentam menor custo, são de mais fácil realização e fornecem informações epidemiológicas importantes. O objetivo deste trabalho foi comparar quantitativamente técnica de quatro tamises proposta por Girão; Ueno (1985) e técnica de sedimentação fecal descrita por Foreyt (2005) em amostras de fezes bovinas infectadas artificialmente com ovos de *F. hepatica*. Foram realizadas contaminações fecais nos graus de infecção leve, moderada e pesada com 10, 25 e 50 ovos por grama, respectivamente. Dez repetições de cada grau de infecção para cada técnica foram realizadas totalizando 60 amostras. Os resultados demonstraram que a técnica de sedimentação fecal para diagnóstico quantitativo de *F. hepatica* apresentou resultado superior à técnica de quatro tamises com percentuais de recuperação de ovos de 68%, 59,36% e 65,88% para técnica de sedimentação e 21%, 8,4% e 22,6% para técnica de Girão;Ueno (1985) em infecção leve, moderada e pesada, respectivamente. Além disso, a técnica de sedimentação descrita por Foreyt (2005) possui menor custo para realização e é de mais fácil execução.

Palavras chave: fasciolose, fezes, ovos.

## ABSTRACT

*Fasciola hepatica* infection affects several animal species, being more often diagnosed in sheep and cattle. By presenting nonspecific symptoms, laboratory diagnosis is necessary. The fecal examinations are over used since they have lower costs, are more easily performed and provide important epidemiological information. The objective of this study was to compare quantitatively the four sieves technique, proposed by Girão:Ueno (1985) and the fecal sedimentation technique described by Foreyt (2005 ) in samples of cattle feces artificially infected with eggs of *F. hepatica*. Fecal contaminations were performed in degrees of light, moderate and heavy infection with 10, 25 and 50 eggs per gram, respectively. Ten replicates of each grade of infection for each technique were performed a total of 60 samples. The results showed that the technique of fecal sedimentation for quantitative diagnosis of *F. hepatica* presented superior results comparing with the four sieves technique, with recovery percentage of eggs 68%, 59.36 % and 65.88 % for the sedimentation technique and 21%, 8.4% and 22.6% for the Girão:Ueno (1985) technique in light, moderate and heavy infection, respectively. Furthermore, the sedimentation technique proposed by Foreyt (2005) has lower cost and is easier to perform.

Keywords: fasciolosis, faeces, eggs.

## 1 INTRODUÇÃO

Com relatos em quase todas as regiões do Brasil, a infecção por *Fasciola hepatica* acomete diversas espécies animais sendo mais frequentemente diagnosticada em ovinos e bovinos. A doença causa perdas econômicas relacionadas à diminuição na produção de carne, leite e lã, condenação do fígado ao abate e morte de animais infectados.

Os sinais clínicos da fasciolose nestes ruminantes são bastante inespecíficos como emaciação, anorexia, anemia e perda de peso. Assim, outras enfermidades podem ser caracterizadas com os mesmo sinais dificultando a confirmação pelo diagnóstico clínico e necessitando do diagnóstico laboratorial.

Exames coproparasitológicos são realizados rotineiramente para diagnóstico de helmintoses, porém, alguns profissionais desconhecem técnicas específicas para detecção de ovos de *F. hepatica*, além de alguns animais, principalmente bovinos, não apresentarem sintomatologia clínica levando, algumas vezes, ao diagnóstico por inspeção visual no momento do abate. Há também técnicas sorológicas e as que detectam antígenos nas fezes de hospedeiros infectados sendo aprimoradas para um diagnóstico mais precoce e acurado da fasciolose, mas, normalmente, utilizadas em pesquisas científicas.

Em relação ao custo-benefício e facilidade de realização, na maioria das propriedades brasileiras, rotineiramente, são as técnicas coproparasitológicas as utilizadas para diagnóstico, baseadas na sedimentação ou tamisação. Além de contribuir para o diagnóstico de *F. hepatica*, as técnicas coproparasitológicas são importantes na demonstração de eficácia de drogas e determinam informações epidemiológicas importantes para o ciclo desse parasito que outras técnicas não permitem.

A técnica de quatro tamises (GIRÃO; UENO, 1985) foi, por muitos anos, utilizada como a de eleição para o diagnóstico de *F. hepatica*, porém, a técnica de sedimentação descrita por Foreyt (2005) e validada por Martins et al. (2008) está sendo difundida e utilizada em muitos estudos epidemiológicos de fasciolose sendo de mais fácil execução além de materiais de mais fácil aquisição. Porém, esses últimos autores padronizaram a técnica através de amostras de fezes naturalmente infectadas com identificação de amostras positivas e negativas, sem quantificação de ovos.

É importante que haja um estudo comparativo da técnica de quatro tamises, realizada originalmente com infecção artificial de ovos de *F. hepatica*, com a de

sedimentação descrita por Foreyt (2005), também com infecção artificial, a fim de se padronizar uma técnica com resultados mais satisfatórios no diagnóstico de *F. hepatica*.

O objetivo deste trabalho foi comparar quantitativamente técnica de quatro tamises proposta por Girão; Ueno (1985) e técnica de sedimentação fecal descrita por Foreyt (2005) em amostras de fezes bovinas infectadas artificialmente com ovos de *F. hepatica*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

### 2.1 Obtenção de Ovos de *Fasciola hepatica* e de Amostras de Fezes Negativas

Os ovos foram obtidos da bile de bovinos naturalmente infectados por *F. hepatica* abatidos no matadouro frigorífico de Muniz Freire, município do Espírito Santo, inspecionado pelo Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal (IDAF). Após a coleta, os ovos foram colocados em cálice de sedimentação e conservados em refrigerador a 4°C.

Fezes de bovinos pertencentes ao plantel do Departamento de Medicina Veterinária da UFES e localizados no Hospital Veterinário foram coletadas diretamente da ampola retal e examinadas pela técnica descrita por Foreyt (2005) confirmando negatividade para ovos de *F. hepatica*. Para confirmar negatividade da amostra realizaram-se cinco repetições da técnica.

### 2.2 Determinação da Quantidade de Ovos para Contaminação Fecal

Para determinar a quantidade de ovos para contaminação das fezes de bovinos negativas para *F. hepatica*, em ambas as técnicas, utilizou-se dados descritos no manual de Ueno e Gonçalves (1998) no que diz respeito ao grau de infecção por *F. hepatica*, para bovinos, em ovos por grama (OPG) de fezes que considera: infecção leve - animal com 10 OPG, infecção moderada - animal com 10-25 OPG e infecção pesada - animal com 25-50 OPG.

Tendo em vista estes dados, três graus de infecção foram estabelecidos para cada técnica com dez repetições de cada grau de infecção totalizando 60 amostras, considerando as duas técnicas a serem realizadas. Assim, na infecção leve cada grama de fezes foi contaminado com 10 ovos, na infecção moderada cada grama de fezes foi contaminado com 25 ovos e na infecção pesada cada grama de fezes foi contaminada com 50 ovos.

Para obtenção deste número de ovos do conteúdo da bile, alíquotas da bile, retiradas de micropipetas de precisão, foram analisadas até se obter o valor de 10 ovos em cinco microlitros de bile. Seis repetições de cada alíquota foram realizadas para se obter este valor.

### **2.3 Técnica de Quatro Tamises Proposta por Girão; Ueno (1985)**

Para grau de infecção leve, adicionou-se 10 ovos em um grama de fezes de bovinos. Para grau de infecção moderada, adicionou-se 25 ovos em um grama de fezes de bovinos. E, por fim, para grau de infecção pesada, adicionou-se 50 ovos em um grama de fezes de bovinos. Realizou-se a técnica de quatro tamises para cada amostra. Esta operação foi repetida dez vezes para cada grau de infecção, totalizando 30 amostras.

### **2.4 Técnica de Sedimentação Fecal Descrita por Foreyt (2005)**

Como na técnica descrita por Foreyt (2005) são utilizadas cinco gramas de fezes e o grau de infecção está relacionado ao número de ovos por grama de fezes, proporcionalmente, o número de ovos para contaminação foi multiplicado por cinco em cada grau de infecção em relação à técnica de quatro tamises.

Assim, para grau de infecção leve, adicionou-se 50 ovos em cinco gramas de fezes de bovinos. Para grau de infecção moderada, adicionou-se 125 ovos em cinco gramas de fezes de bovinos. E, por fim, para grau de infecção pesada, adicionou-se 250 ovos em cinco gramas de fezes de bovinos. Realizou-se a técnica descrita por Foreyt (2005) e validada por Martins et al. (2008) para cada amostra. Esta operação foi repetida dez vezes para cada grau de infecção, totalizando 30 amostras.

### **2.5 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann Whitney para amostras independentes utilizando  $p \leq 0,05$  para amostras com diferença significativa.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de ovos recuperados na técnica de quatro tamises proposta por Girão; Ueno (1985) e na técnica de sedimentação fecal descrita por Foreyt (2005) em infecção leve, moderada e pesada pode ser observado nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 1.** Número de ovos recuperados na técnica de quatro tamises proposta por Girão; Ueno (1985) em infecção leve, moderada e pesada.

Repetições	Infecção leve <sup>1</sup>	Infecção Moderada <sup>2</sup>	Infecção Pesada <sup>3</sup>
1	0	4	0
2	5	1	9
3	2	0	18
4	1	0	6
5	1	0	19
6	5	5	4
7	2	3	10
8	1	3	20
9	1	3	18
10	3	2	9
<b>Média</b>	<b>2,1</b>	<b>2,1</b>	<b>11,3</b>
<b>%</b>	<b>21%</b>	<b>8,4%</b>	<b>22,6%</b>

1. Adição de 10 ovos; 2. Adição de 25 ovos; 3. Adição de 50 ovos

**Tabela 2.** Números de ovos recuperados na técnica de sedimentação fecal descrita por Foreyt (2005) em infecção leve, moderada e pesada.

Repetições	Infecção leve <sup>1</sup>	Infecção Moderada <sup>2</sup>	Infecção Pesada <sup>3</sup>
1	38	86	36
2	35	66	108
3	20	46	164
4	25	53	136
5	34	70	215
6	32	96	205
7	36	100	197
8	40	78	207
9	37	89	162
10	43	58	217
<b>Média</b>	<b>34</b>	<b>74,2</b>	<b>164,7</b>
<b>%</b>	<b>68%</b>	<b>59,36%</b>	<b>65,88%</b>

1. Adição de 50 ovos; 2. Adição de 125 ovos; 3. Adição de 250 ovos

Ao comparar estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney os valores encontrados em infecção leve, moderada e pesada observou-se que, independente do grau de infecção, os testes diferiram entre si, com valor de  $p=0,0002$  ( $p\leq 0,05$ ). Esses resultados demonstram que a técnica de Foreyt (2005) para diagnóstico quantitativo de *F. hepatica* apresentou resultado superior à técnica de quatro tamises descrita por Girão; Ueno (1985) com percentuais de recuperação de ovos de 68%, 59,36% e 65,88% para técnica de sedimentação e 21%, 8,4% e 22,6% para técnica de Girão; Ueno (1985) em infecção leve, moderada e pesada, respectivamente.

A contaminação de ovos baseada nos dados descritos no manual de Ueno; Gonçalves (1998) foi realizada para auxiliar a determinação do grau de infecção do animal, leve, moderado ou pesado, ao quantificar os ovos em cada grama de fezes durante a realização da técnica. Apesar da eliminação de ovos em animais com vesícula biliar não ocorrer de forma contínua, Rapsch et al. (2006) demonstraram que o exame coproparasitológico pode ser muito eficiente com três amostras seriadas do mesmo animal resultando numa sensibilidade de aproximadamente 92%. Além disso, é sempre importante relacionar os achados clínicos com os resultados laboratoriais, assim como histórico da propriedade ou região para casos de fasciolose.

Ao observar o número de ovos recuperados na técnica de Girão; Ueno (1985) do presente estudo nota-se que pelo menos uma amostra apresentou resultado negativo em todos os graus de infecção enquanto na técnica de sedimentação, em todas as amostras, foram detectados ovos de *F. hepatica*, com percentuais de recuperação acima de 50%. Happich; Boray (1969) também relatam resultado semelhante ao comparar quantitativamente técnica de flutuação com sedimentação fecal observando que em todas as amostras processadas pela técnica de sedimentação foram recuperados ovos de *F. hepatica* sendo que o mesmo não ocorreu para técnica de flutuação.

Os autores relatam ainda que a técnica de sedimentação é mais precisa e sensível no diagnóstico com baixa carga parasitária e que, em bovinos, particularmente animais adultos, nos quais usualmente há baixa contagem de ovos devido à resistência à infecção, a técnica de sedimentação é mais confiável para diagnóstico. No presente estudo, o percentual de recuperação de ovos no grau de infecção leve na técnica de sedimentação foi o que apresentou maior resultado, 68%, confirmando a afirmação de Happich; Boray (1969) e demonstrando que animais com carga parasitária baixa podem apresentar resultados positivos satisfatórios no exame coproparasitológico por esta técnica. Além

disso, pela *F. hepatica* apresentar ovos pesados o diagnóstico por técnica de sedimentação pode garantir resultados mais satisfatórios quando comparada com a de Girão; Ueno (1985).

O percentual de recuperação de ovos de *F. hepatica* pela técnica de sedimentação variou de 59,36 a 68%, resultado semelhante ao observado por Parfitt; Banks (1970) que verificaram uma recuperação média de 68,4% também utilizando uma técnica de sedimentação ao analisar 24 alíquotas de uma amostra de fezes de bovinos.

No desenvolvimento da técnica de quatro tamises, Girão; Ueno (1985) obtiveram um percentual de recuperação de ovos de 70 e 64%, com contaminação das fezes com 200 e 400 ovos de *F. hepatica*, respectivamente. Estes resultados diferem dos encontrados no presente estudo que obteve percentual de recuperação inferior, 22,6% em infecção pesada, com contaminação das fezes com 50 ovos. Estes resultados podem estar divergentes devido aos autores terem realizado seis repetições enquanto no presente estudo foram realizadas 10 repetições, o que estatisticamente pode influenciar nos resultados. É importante relatar que Girão; Ueno (1985) ao desenvolverem a técnica relatam que o tamis de 200 malhas/polegada, o penúltimo a ser utilizado na técnica, retém 4,9% dos ovos, que junto com uma baixa contaminação realizada no presente estudo pode justificar os resultados obtidos.

A técnica de Girão; Ueno (1985) foi citada por Abidu et al. (1996) como mais sensível, quando comparada a uma técnica proposta por um *kit* comercial assim como Mattos; Cunha; Marques (2009) que encontraram prevalência de 88,8% na técnica de Girão; Ueno (1985) e de 75,6% na técnica de Dennis; Stone; Swanson (1954), porém, utilizando a técnica de Girão; Ueno (1985), Gomes et al. (2002) encontraram apenas 15,83% de 120 bovinos infectados em uma propriedade de Campos dos Goytacazes, confirmadamente contaminada com os moluscos e metacercárias de *F. hepatica*.

Faria; Cury; Lima (2008) compararam a utilização da técnica de Girão; Ueno (1985) com a técnica de processamento pela filtração sequencial em dois tamises pelo aparelho de Flukefinder e encontraram resultados semelhantes para diagnóstico de infecção por *F. hepatica* em bovinos, mas preconizam o uso da primeira pelo fato do material para a confecção do aparelho de Flukefinder ser importado, o que onera a realização do exame. Para a realização do presente estudo a técnica de sedimentação descrita por Foreyt (2005) mostrou-se menos onerosa que a de Girão; Ueno (1985), além de possuir maior percentual de recuperação de ovos. Além disso, na técnica de sedimentação o tempo de realização é

menor e várias amostras podem ser processadas ao mesmo tempo quando comparada com a técnica de Girão; Ueno (1985), otimizando a rotina de diagnóstico coproparasitológico.

Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Martins et al., (2008) que demonstraram que a técnica descrita por Foreyt (2005) mostrou-se mais sensível, mais simples de ser realizada e de custo mais baixo que a técnica de Girão; Ueno (1985) para diagnóstico qualitativo de infecção por *F. hepatica*. Além disso, os autores afirmam que técnica de Girão; Ueno (1985) utiliza uma série de peneiras com diferentes malhas, tornando o diagnóstico mais caro e trabalhoso.

Com percentuais de recuperação de ovos superiores, além da técnica de sedimentação garantir um diagnóstico mais eficaz da fasciolose, pode também ser utilizada para auxiliar na determinação do sucesso de um tratamento químico como relatado por Fairweather (2011) que afirma que o tratamento é considerado eficaz quando há redução de 95% na contagem de ovos nas fezes 14 dias após o tratamento, contribuindo assim para diagnóstico e controle da doença.

Na escolha da técnica empregada para detecção de ovos de *F. hepatica* a eficiência é fator de extrema importância, devido à necessidade de resultados confiáveis. Entretanto, a operacionalização deve ser levada em consideração, na tentativa de reduzir os custos e o tempo empregado na elaboração dos exames, sem que isto afete a qualidade dos resultados (FARIA; CURY; LIMA, 2008).

#### 4 CONCLUSÃO

Tendo em vista que o diagnóstico coproparasitológico fornece informações importantes sobre a epidemiologia da fasciolose, para diagnóstico quantitativo de animais parasitados por *Fasciola hepatica*, a técnica de sedimentação fecal descrita por Foreyt (2005) e validada por Martins et al. (2008) mostrou ser mais sensível, de menor custo e de mais fácil realização que a técnica de Girão; Ueno (1985), além de poder auxiliar na determinação do grau de infecção por esta parasitose.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIDU, M.; SCHERER, P.O.; SILVA CARNEIRO, V.; BARBOSA, P.S.; LESSA, C.S.S.; FREIRE, N.M.S. Estudo comparativo entre técnicas coproparasitológicas para diagnóstico de *Fasciola hepatica* em bovinos. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.3, n.1, p.1-3, 1996.

DENNIS, W.R.; STONE, W.M. W SWASON, L.E. A new laboratory and Field diagnostic test for fluke ova in feces. *Jornal of American Veterinary Medical Association*, v.124, n.922, p.47-50, 1954.

FAIRWEATHER, I. Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy? *Veterinary Parasitology*, v.180, n.1, p.133-143, 2011.

FARIA, R.N.; CURY, M.C.; LIMA, W.S. Concordância entre duas técnicas coproparasitológicas para diagnóstico de *Fasciola hepatica* em bovinos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.4, p.1023-1025, 2008.

FOREYT, W.J. *Parasitologia Veterinária: manual de referência*.5.ed. São Paulo: Roca, 2005. 240p.

GIRÃO, E.; UENO, H. Técnica dos quatro tamises para o diagnóstico coprológico quantitativo da Fasciolose dos ruminantes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.20, n. 8, p.905-912, 1985.

GOMES, F.F.; OLIVEIRA, F.C.R.; PILE, E.A.; LOPES, C.W.G. Estabelecimento de foco de fasciolose hepática em propriedade do município de Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.11, n.2, p.53-56, 2002.

HAPPICH, F.A.; BORAY, J.C. Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. 1. Comparative studies on quantitative faecal examinations for chronic *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Australian Veterinary Journal*, v. 45, n.7, p.326-328, 1969.

MARTINS, I.V.F.; BERNARDO, C.C.; AVELAR, B.R.; ARAÚJO, I.B.B.A.; DONATELE, D.M.; NUNES, L.C. Sensibilidade e reprodutibilidade da técnica de sedimentação (Foreyt, 2005) para o diagnóstico de *Fasciola hepatica*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.17, n.1, p.110-112, 2008.

MATTOS, M.J.T.; CUNHA, F.O.V.; MARQUES, S.M.T. Comparação de duas técnicas parasitológicas na identificação de ovos de *Fasciola hepatica*. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia, Uruguaiana*, v.16, n.1, p. 105-112. 2009.

PARFITT, J.W.; BANKS, A.W. A method for counting *Fasciola* eggs in cattle faeces in the Field. *Veterinary Record*, v. 87, n.7, p. 180-182, 1970.

PEREIRA, M.G. *Epidemiologia Teoria e prática*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 596 p.

RAPSCH A, C.; SCHWEIZER, G.; GRIMM, F.; KOHLER, L.; BAUER, C.; DEPLAZES, P.; BRAUN, U.; TORGERSON, P.R. Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *International Journal for Parasitology*, v.36, n.10, p.1153–1158, 2006.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. *Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes*. 4.ed. Porto Alegre: JICA, 1998. p.62.

## **CAPÍTULO III**

### **ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DAS CÉLULAS ESPERMATOGÊNICAS DE *Fasciola hepatica* RECUPERADAS DE OVINOS TRATADOS COM ALBENDAZOLE**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar por histopatologia exemplares de *Fasciola hepatica* provenientes de ovinos tratados com albendazole. Três ovinos naturalmente infectados por *Fasciola hepatica* foram tratados com 6 mL de albendazole por via oral. Formas adultas do parasito foram recuperadas do fígado 48, 72 e 96 horas após o tratamento. Um ovino controle também naturalmente infectado foi eutanasiado no tempo de 96 horas. As células espermatogênicas dos parasitos recuperados dos ovinos tratados e do ovino controle foram observadas por histopatologia. Também foram observadas a integridade da superfície tegumentar e o preenchimento intestinal. Alterações nas células dos túbulos seminíferos se iniciaram 48 horas pós-tratamento e se tornaram evidentes no tempo de 72 horas, no qual houve dificuldade em identificar os tipos celulares. As espermatogônias primária e secundária tornaram-se cada vez mais raras e as vacuolizações intercelulares mais evidentes. Sinais de apoptose com núcleos picnóticos e cariorrexe foram notados em todos os tempos avaliados. Restos celulares foram mais facilmente identificados 96 horas após o tratamento. Os resultados indicam que a espermatogênese foi severamente afetada pelo albendazole além de demonstrar a importância da utilização de histopatologia para diagnóstico de eficácia em cepa de campo.

Palavras chave: fasciolose, espermatogênese, tratamento

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate by histopathology specimens of *Fasciola hepatica* from sheep treated with albendazole. Three sheep naturally infected with *Fasciola hepatica* were treated with 6 ml of albendazole orally. Adult forms of the parasite was recovered from the liver 48, 72 and 96 hours after treatment. A control sheep also naturally infected was euthanized in 96 hours. The spermatogenic cells of parasites recovered from treated sheep and control sheep were observed by histopathology. The integrity of the cutaneous surface and gut fill were also observed. Changes in cells of the seminiferous tubules after treatment began 48 hours and became evident in the time of 72 hours, which was difficult to identify the cell types. The primary and secondary spermatogonia become increasingly rare, and the intercellular vacuolization more evident. Signs of apoptosis with pyknotic and showing karyorrhexis nuclei were noted in all moments. Cell debris was easily identified 96 hours after treatment. The results indicate that spermatogenesis was severely affected by albendazole plus demonstrate the importance of using histopathology for diagnostic efficacy in strain field.

Keywords: fasciolosis, spermatogenesis, treatment

## 1 INTRODUÇÃO

Para um controle eficaz da *Fasciola hepatica* é necessária associação entre manejo da propriedade e tratamento de animais infectados. Existem diversos fármacos utilizados em animais no tratamento contra infecção por *F. hepatica*, sendo os benzimidazóis os mais utilizados e acessíveis no mercado brasileiro.

O triclabendazole é o único capaz de eliminar as formas adultas e jovens deste parasito, enquanto albendazole, nitroxinil, clorsulon, closantel e rafoxanida possuem somente ação adulticida, sendo também muito importantes neste controle, uma vez que diminuem ou impedem a eliminação de ovos no ambiente pelos hospedeiros definitivos. Esses fármacos podem ser utilizados de forma isolada, mas é comum a combinação de drogas, principalmente em infecções helmínticas mistas. No Brasil, o albendazole é o composto mais utilizado no controle de infecção por *F. hepatica* e outras helmintoses.

Na avaliação da eficácia ou resistência destes fármacos é importante considerar a cepa de cada região e até mesmo de cada propriedade. Estudos relacionados à produção, desenvolvimento e/ou eliminação de ovos nas fezes, detecção de antígenos nas fezes e alterações morfológicas e funcionais no tegumento e no sistema reprodutor do parasito seja por coleta e análise de fezes, incubação de ovos *in vitro*, microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão ou por histopatologia são essenciais para correta demonstração desses resultados.

É importante que estes estudos sejam realizados de forma controlada, com informações se a cepa é sensível ou resistente, mas é de extrema importância a utilização de animais naturalmente infectados uma vez que os resultados demonstrarão a condição da cepa de determinada região, obtendo, assim, resultados mais satisfatórios a campo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações morfológicas das células espermatogênicas de *F. hepatica* recuperadas de ovinos tratados com albendazole.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Quatro ovinos, comprovadamente infectados por *Fasciola hepatica* pela técnica descrita por Foreyt (2005), foram selecionados para o estudo. Três ovinos foram separados para tratamento e um ovino para controle. Cada um dos três ovinos foi tratado com albendazole (Valbazen Cobalto<sup>1</sup>) na dose de 10mg/Kg de peso vivo por via oral com auxílio de pistola dosificadora, totalizando seis mililitros para cada animal.

Os três ovinos foram eutanasiados em 48, 72 e 96 horas pós-tratamento com recuperação dos parasitos do fígado durante a necropsia. Um ovino controle foi eutanasiado no tempo de 96 horas também com coleta de exemplares de *F. hepatica*. Todos os exemplares foram encaminhados ao Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) para observação macroscópica da integridade da superfície tegumentar e preenchimento intestinal e posterior processamento histológico.

Para processamento histológico, foram selecionados seis exemplares de *F. hepatica* de cada animal sendo três fixados entre lâminas e os outros três não. Cada dois exemplares, um colocado entre lâminas e outro não, foram fixados em três diferentes soluções durante 24 horas: formol a 10%, Bouin e Daivison. Após este período permaneceram por 15 minutos em álcool 70° GL. Depois cada exemplar foi clivado transversalmente, na região que se encontra aparelho reprodutor, englobando metade direita e esquerda e plano mediano e posteriormente foram colocados em cassetes plásticos. Os cassetes com o material foram lavados em álcool 70° GL e passaram por uma sequência de reagentes para desidratação, clarificação e embebição em parafina: álcool absoluto I por uma hora, álcool absoluto II por uma hora, xilol a 37°C por 15 minutos, xilol e parafina numa solução 1:1 a 60°C por 15 minutos e inclusão em parafina a 60°C. O material foi resfriado e os blocos de parafina foram cortados com micrótomo rotativo com três micrômetros de espessura e, em seguida, os cortes foram depositados em lâminas e corados por hematoxilina-eosina conforme Luna (1968). As lâminas foram examinadas e o aparelho reprodutor foi fotografado utilizando microscópio Olympus® com uma câmera Sony® nas objetivas de 10 e 40x, e posteriormente foram analisadas no programa Microimage Analyser®.

---

<sup>1</sup>

Laboratório Pfizer®

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

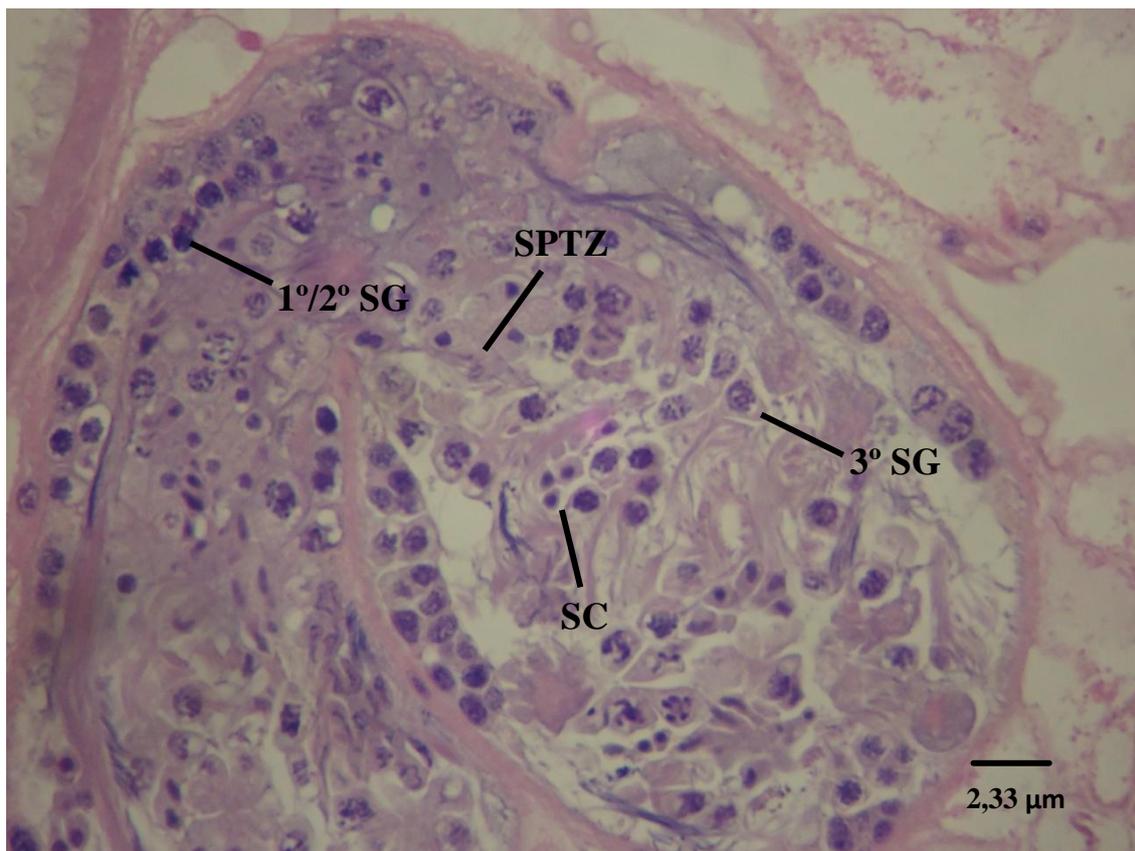
Para avaliação histopatológica notou-se que os parasitos fixados com Bouin apresentaram melhores características para análise morfológica do que os fixados com Formol a 10% e Dauidson. Os exemplares fixados entre lâminas também apresentaram melhores características para esta análise. Portanto, todas as avaliações microscópicas foram realizadas em preparados fixados no Bouin entre lâminas.

Os parasitos recuperados do animal controle apresentavam, macroscopicamente, superfície tegumentar intacta e conteúdo intestinal repleto. Os parasitos dos animais tratados também apresentavam, macroscopicamente, superfície tegumentar intacta, porém, com o decorrer do tempo após o tratamento o conteúdo intestinal apresentava variações quanto à saturação do mesmo.

#### **3.1 Morfologia dos Testículos Normais (Controle)**

Os exemplares recuperados do animal controle mostraram morfologia testicular normal, com células testiculares em todas as fases do processo de espermatogênese. Na periferia nos túbulos testiculares foi possível observar espermatogônias primárias e secundárias. Mais no interior dos túbulos foi possível observar espermatogônias terciárias, espermatócitos e espermatozóides.

As espermatogônias primárias e secundárias se caracterizam por possuir núcleo redondo, pequeno, com cromatina geralmente condensada. Essas células situam-se adjacentes à membrana basal dos túbulos. As espermatogônias terciárias apresentam-se maiores, com núcleo menos denso e citoplasma abundante. Os espermatócitos primários possuem núcleo redondo, grande, com cromatina em diferentes graus de espiralização. Localizam-se próximos às espermatogônias, no interior do túbulo. E por fim, os espermatozóides possuem características bem visíveis de células com cauda (Figura 1).



**Figura 1.** Túbulo testicular de *Fasciola hepatica* recuperada de animal controle. SG: espermatogônia, SC: espermatócito, SPTZ: espermatozoide.

### 3.2 Quarenta e Oito Horas Pós Tratamento

Analisando as lâminas dos parasitos recuperados 48 horas após o tratamento, notou-se rarefação celular dos túbulos testiculares em relação aos túbulos normais, resultando num maior espaço entre as células.

As células observadas concentravam-se mais na periferia dos túbulos e na região central, na qual normalmente se observa espermatogônias terciárias e espermatócitos primários, esses se encontravam em número muito reduzido.

Espermatogônias, normalmente em contato com a parede do túbulo, apresentavam-se em número reduzido e muitas vezes com citoplasma vacuolizado. Essa vacuolização indica presença de degeneração hidrópica nos túbulos. O albendazole afeta diretamente a produção de ATP e, conseqüentemente, há alteração na permeabilidade da membrana permitindo o carreamento de água para o interior da célula.

Alguns núcleos dessas células apresentaram sinais de picnose e cariorrexe,

característicos de morte celular. Espermatócitos primários apresentaram eosinofilia citoplasmática que também indicam morte celular. Notou-se um número reduzido de espermatozóides em relação ao grupo controle (Figura 2).



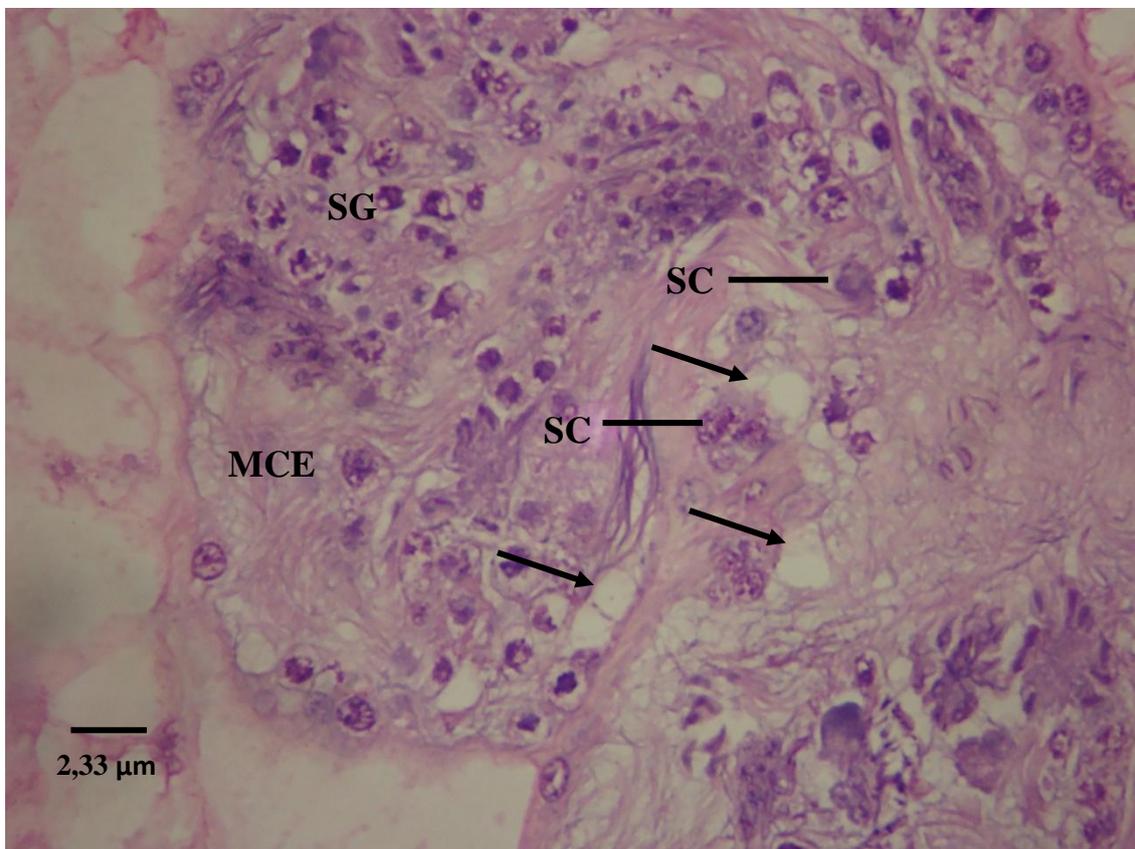
**Figura 2.** Túbulo testicular de *Fasciola hepatica* recuperada de animal tratado com albendazole e eutanasiado 48 horas após o tratamento. SG: espermatogônia, SC: espermatócito.

### 3.3 Setenta e Duas Horas Pós Tratamento

Ao analisar as células testiculares 72 horas após o tratamento notou-se que a rarefação celular dos túbulos testiculares aumentou em relação ao tempo de 48 horas e os mesmos apresentavam intensa vacuolização.

As espermatogônias primárias e secundárias, na periferia dos túbulos apresentavam vacuolização citoplasmática incluindo sinais de morte celular difusa. Estas espermatogônias apresentavam-se indistinguíveis das espermatogônias terciárias. O número de células com degeneração hidrópica se aplainaram para o centro dos túbulos, caracterizando uma desorganização celular com muitos espaços entre as células. Os

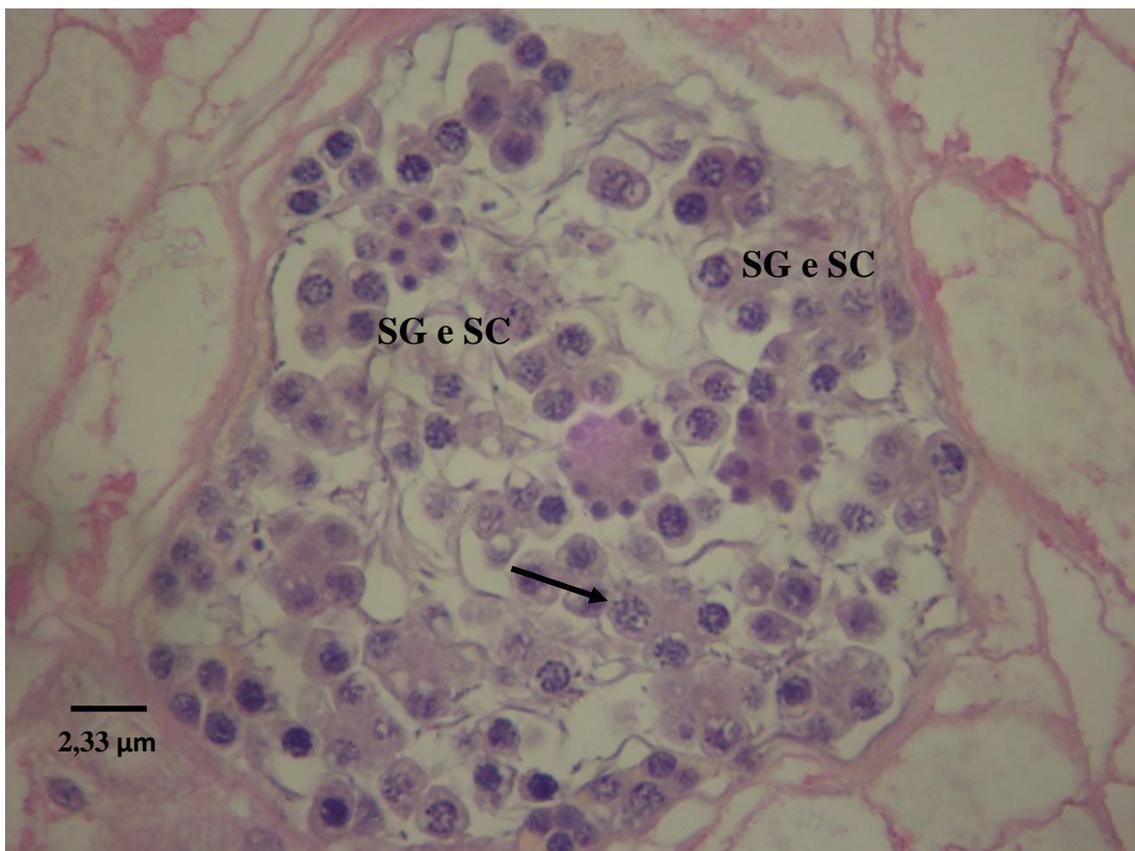
espermatócitos apresentavam sinais de morte celular como a presença de grande quantidade de material celular amorfo eosinofílico dentro dos túbulos (Figura 3).



**Figura 3.** Túbulo testicular de *Fasciola hepatica* recuperada de animal tratado com albendazole e eutanasiado 72 horas após o tratamento. SG: espermatogônia, SC: espermatócito, MCE: material celular eosinofílico. Setas: vacúolos.

#### 3.4 Noventa e Seis Horas Pós Tratamento

No tempo de 96 horas após o tratamento notou-se aumento do espaço entre as células e as que ainda restavam na região apresentavam-se altamente vacuolizadas. Não havia mais presença de novas células germinativas e raramente se observou espermatozoides. Nas células que ainda restavam no centro dos túbulos foram observados sinais de eosinofilia citoplasmática e núcleo picnótico. Foram observados restos celulares entre as células remanescentes (Figura 4).



**Figura 4.** Túbulo testicular de *Fasciola hepatica* recuperada de animal tratado com albendazole e eutanasiado 96 horas após o tratamento. SG: espermatogônia, SC: espermatócito. Seta: picnose nuclear.

Esses achados confirmam que a cepa de campo avaliada no presente estudo se mostrou sensível ao tratamento com albendazole uma vez que alterações morfológicas nas células espermatogênicas foram observadas com o decorrer do tempo. Estes resultados são compatíveis com o estudo realizado por Hanna et al. (2010) que relataram, após tratamento com triclabendazole, que cepas conhecidamente resistentes aos fármacos não apresentaram alterações morfológicas enquanto as conhecidamente sensíveis apresentaram essas alterações. Além disso, os autores demonstraram a importância da utilização de técnicas histológicas em ensaios de campo para validar resistência às drogas ou testar a eficácia de novos medicamentos ou medicamentos sensíveis.

A avaliação do aparelho reprodutor masculino de *F. hepatica* foi realizada no presente estudo para demonstrar ação do albendazole por histopatologia por essa região ser utilizada como modelo de estudo de ação de fármacos uma vez que os testículos possuem uma alta demanda metabólica para produção de um grande número de espermatozoides

necessários para manter a eliminação de grande número de ovos sendo, conseqüentemente, muito sensíveis à ação dos fármacos (HAPPICH; BORAY, 1969).

Os benzimidazóis têm ação na inibição de microtúbulos do parasito e a espermatogênese e a espermiogênese envolvem altas taxas mitóticas e meióticas que estão relacionadas aos microtúbulos, como parte do aparelho de fuso que ajuda a separação do cromossomo, além de envolver mudanças consideráveis na forma da célula durante a diferenciação celular, uma vez que essas mudanças são sustentadas pelos microtúbulos (STITT; FAIRWEATHER, 1990). Isso justifica as alterações observadas no decorrer dos tempos de avaliação no processo de diferenciação celular, confirmando o modo de ação do albendazole, neste estudo.

As características morfológicas observadas no animal controle são compatíveis com as observadas por Hanna et al. (2008, 2010), McConville et al. (2010) e Toner et al. (2011). Observou-se que as espermatogônias e espermátócitos primários ocuparam toda a região do túbulo seminífero garantindo assim a produção de espermatozoides viáveis e, conseqüentemente, de ovos de *F. hepatica*.

No presente trabalho foi possível notar que as alterações na morfologia das células espermatogênicas ocorreram a partir de 48 horas e que nos tempos de 72 e 96 horas após o tratamento essas alterações se tornaram cada vez mais evidentes o que condiz com os achados de Toner et al. (2011). Estes autores relataram as mesmas alterações nos túbulos seminíferos diferindo apenas no medicamento utilizado para teste, triclabendazole, demonstrando que o mecanismo de ação aduíticida do albendazole mostrou-se eficaz nesta cepa de campo, assim como o triclabendazole no estudo de Toner et al. (2011).

De acordo com McConville et al. (2010) as vacuolizações observadas inicialmente na periferia dos túbulos e posteriormente por todo o túbulo podem estar relacionadas a perda de células de sustentação. No presente estudo, essas vacuolizações foram observadas a partir de 48 horas pós-tratamento, mas se tornaram mais evidentes na avaliação de 72 horas, mesmo resultado observado por estes autores.

O material celular eosinofílico, observado principalmente no tempo de 72 horas após o tratamento indica restos celulares decorrentes da morte das células nos túbulos. Além da fragmentação e perda nuclear, o citoplasma se torna mais eosinofílico até ocorrer morte celular completa. Estes achados são semelhantes aos encontrados por Hanna et al. (2008, 2010) e Toner et al. (2011) com utilização de triclabendazole, e McConville et al. (2010) com utilização de composto Alpha que também relacionaram a morte das células à

presença deste tipo de material.

No tempo de 48 horas pós-tratamento foi possível observar as primeiras alterações celulares nos túbulos seminíferos com perda de espermatogônias primárias e secundárias, além das células de sustentação. Isso garante o não desenvolvimento das espermatogônias terciárias e espermatócitos e, conseqüentemente, dos espermatozoides. A morte celular e as alterações nucleares se tornaram mais evidentes no tempo de 72 horas, no qual se observaram muitas células com núcleo em picnose e cariorrexe. Isso demonstra que algumas células ainda permanecem em desenvolvimento antes deste tempo, mas muitas com alteração nucleares e citoplasmáticas.

Hanna et al. (2012) afirmaram que as alterações morfológicas no aparelho reprodutor de *F. hepatica* iniciam-se a partir de 24 horas, o que não pode ser confirmado para o albendazole uma vez que o primeiro tempo de avaliação no presente estudo ocorreu em 48 horas. Um trabalho realizado por Buchanan et al. (2003) com utilização de albendazole no tratamento *in vitro* de exemplares adultos deste parasito mostra que alterações tegumentares interna e externa puderam ser observadas a partir de 24 horas, porém os autores não avaliaram alterações nas células espermatogênicas. McConville et al. (2010) com tratamento *in vivo* com composto Alpha observou alterações tegumentares a partir do primeiro momento de avaliação, 48 horas pós-tratamento.

No presente estudo, as alterações tegumentares foram observadas apenas macroscopicamente o que não demonstra detalhes de vesiculações e deformações na superfície dos parasitos. Porém, o conteúdo intestinal dos parasitos se mostrou repleto no animal controle e com graus variados de saturação do mesmo no decorrer dos tempos de avaliação. Isso pode significar diminuição e parada nas atividades metabólicas do parasito pelo modo de ação dos benzimidazóis, com inibição da formação de microtúbulos que têm como uma das funções a absorção de nutrientes (LACEY, 1988; JASMER et al., 2000), com conseqüente morte do parasito.

Como observado por McConville et al. (2010) ao utilizar o composto Alpha para tratamento dos animais, no presente estudo, na avaliação de 72 horas observaram alterações morfológicas e dificuldade na identificação dos tipos celulares individuais. Este mesmo resultado foi observado por Toner et al. (2011) em estudo com triclabendazole. Esses achados confirmam a sensibilidade dos testículos à ação das drogas com interrupção do desenvolvimento celular em maior extensão que outros órgão reprodutores como ovário, vitelária e útero, conforme afirmado por Hanna et al. (2006).

Quanto à produção de espermatozoides, foi possível notar que houve uma redução na produção dos mesmos no decorrer dos tempos de avaliação devido, principalmente, à perda de células. De acordo com Stitt; Fairweather (1992) os espermatozoides remanescentes podem, inclusive, apresentar-se anormais devido a uma falha na organização dos microtúbulos dos seus axonemas, o que também pode ter ocorrido no presente estudo.

As mudanças observadas nos testículos são consequência da ação direta do fármaco e não efeito colateral de outra ação, causando deterioração do parasito. Este fato tem impacto direto na produção de ovos: menos ovos são produzidos, pode haver uma produção anormal de ovos, alguns podem não embrionar e/ou eclodir no ambiente. De acordo com Alvarez et al. (2009) o albendazole possui excelente ação ovicida contra *F. hepatica*.

Qualquer falha na produção de ovos afeta a cadeia epidemiológica da doença uma vez que, neste caso interrompe ou diminui a contaminação da pastagem. Hanna et al. (2006) relataram ainda que, ao se utilizar medicamento adulticida, como o albendazole utilizado no presente estudo, é importante que se realize o tratamento quando todos os parasitos tiverem atingido a maturidade para que realmente haja interferência na produção de ovos. Além disso, Scarcella et al. (2011) afirmaram que os parasitos que porventura sobreviverem podem estimular o hospedeiro a desenvolver uma resposta imune frente à infecção.

O presente estudo demonstrou a importância do exame histopatológico em exemplares adultos de *F. hepatica* contribuindo para o diagnóstico de resistência ou eficácia utilizando a espermatogênese como sensível indicador de atividade dos fármacos.

#### 4 CONCLUSÃO

Macroscopicamente o albendazole não interferiu na superfície tegumentar de exemplares de *Fasciola hepatica* enquanto o conteúdo intestinal apresenta-se repleto no animal controle e com diminuição do grau de saturação no decorrer dos tempos.

O albendazole interferiu na produção de ATP por *F. hepatica* com consequente perda de integridade da membrana das células dos túbulos seminíferos caracterizando degeneração hidrópica evoluindo até a morte celular.

No decorrer dos tempos de avaliação foi possível notar que essas alterações se tornaram mais evidentes demonstrando a interferência do medicamento na eliminação de células relacionadas à espermatogênese interferindo na produção de espermatozoides e, consequentemente, na produção de ovos do parasito.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, L.; MORENO,G.; MORENO,L.; CEBALLOS, L.; SHAW, L.; FAIRWEATHER, I.; LANUSSE, C. Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on *Fasciola hepatica* eggs. *Veterinary Parasitology*, v. 164, n. 2-4, p. 211–216, 2009.

BUCHANAN, J.F.; FAIRWEATHER, I.; BRENNAN, A.; TRUDGETT, A.; HOEY, E.M. *Fasciola hepatica*: surface and internal tegumental changes induced by treatment *in vitro* with the sulphoxide metabolite of albendazole (“Valbazen”). *Parasitology*, v.126, n.2, p.141-153, 2003.

FOREYT, W.J. *Parasitologia Veterinária: manual de referência*.5.ed. São Paulo: Roca, 2005. 240p.

HANNA, R.E.B; CROMIE, L.; TAYLOR, S.M.; COUPER, A. The effect PF a parenteral ivermectin/closantel injection on the growth and reproductive development of early immature *Fasciola hepatica* in cattle. *Veterinary Parasitology*, v.142, n.1, p. 78-90, 2006.

HANNA, R.E.B.; EDGAR, H.; MOFFETT, D.; McCONNEL, S.; FAIRWEATHER, I.; BRENNAN, G.P.; TRUDGETT, A.; HOEY, E.M.; CROMIE, L.; TAYLOR, S.M.; DANIEL, R. *Fasciola hepatica*: Histology of the testis in egg-producing adults of several laboratory-maintained isolates of flukes grown to maturity in cattle and sheep and in flukes from naturally infected hosts. *Veterinary Parasitology*, v.157, n.3-4, p.222-234, 2008.

HANNA, R.E.B.; EDGAR, H.W.J.; MCCONNELL, S.; TONER, E.; MCCONVILLE, M.; BRENNAN, G.P.; DEVINE, C.; FLANAGAN, A.; HALFERTY, L.; MEANEY, M.; SHAW, L.; MOFFETT, D.; MCCOY, M.; FAIRWEATHER, I. *Fasciola hepatica*: histological changes in the reproductive structures of triclabendazole (TCBZ)-sensitive and TCBZ-resistant flukes collected from experimentally-infected sheep one to four days after treatment with TCBZ and the related benzimidazole derivative. *Veterinary Parasitology*, v.168, n.19, p.240–254, 2010.

HANNA, R.E.B.; CARCELLA, S.S.; SOLANA, H.; MCCONNELL, S.; FAIRWEATHER, I. Early onset of changes to the reproductive system of *Fasciola hepatica* following *in vivo* treatment with triclabendazole. *Veterinary Parasitology*, v. 184, n.2-4, p.341-347, 2012.

HAPPICH, F.A.; BORAY, J.C. Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. 1. Comparative studies on quantitative faecal examinations for chronic *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Australian Veterinary Journal*, v. 45, n.7, p.326-328, 1969.

JASMER, D. P.; YAO, C.; REHMAN, A.; JOHNSON, S. Multiple lethal effects induced by a benzimidazole anthelmintic in the anterior intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. *Molecular Biochemical Parasitology*, v. 105, n. 1, p. 81- 90. 2000.

LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal for Parasitology*, v. 20, n.7, p. 105-111. 1988.

LUNA, L.G. 1968. Manual of Histologic Staining of the Armed Forces institute of Pathology. 3rd ed. McGraw-Hill, New York, p.258.

McCONVILLE, M.; HANNA, R.E.B.; BRENNAN, G.P.; McCOY, M.; EDGAR, H.W.J.; McCONNELL, S.; CASTILLO, R.; HERNÁNDEZ-CAMPOS, A.; FAIRWEATHER, I. *Fasciola hepatica*: disruption of spermatogenesis by the fasciolicide compound alpha. *Parasitology Research*, v.106, n.2, p.311-323, 2010.

SCARCELLA, S.; FIEL, C.; GUZMAN, M.; ALZOLA, R.; FELIPE, A.; HANNA, R.E.B.; FAIRWEATHER, I.; McCONNELL, S.; SOLANA, H. Reproductive disruption in *Fasciola hepatica* associated with incomplete efficacy of a new experimental formulation of triclabendazole. *Veterinary Parasitology*, v.176, n.2-3, p.157–164, 2011.

STITT, A.W.; FAIRWEATHER, I. Spermatogenesis and the fine structure of the mature spermatozoon of the live fluke, *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). *Parasitology*, v.101, n.3, p.395-407, 1990.

STITT, A.W.; FAIRWEATHER, I. Spermatogenesis in *Fasciola hepatica*: an ultrastructural comparison of the effects of the anthelmintic, triclabendazole (“Fasinex”) and the microtubule inhibitor, tubulozole. *Invertebrate, Reproduction and Development*, v. 22, n.2, p.139–150, 1992.

TONER, E.; BRENNAN, G.P.; HANNA, R.E.B.; EDGAR, H.W.J.; FAIRWEATHER, I. *Fasciola hepatica*: time-dependent disruption of spermatogenesis following in vivo treatment with triclabendazole. *Parasitology Research*, v. 109, n.4, p.1035-1043, 2011.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIDU, M.; SCHERER, P.O.; SILVA CARNEIRO, V.; BARBOSA, P.S.; LESSA, C.S.S.; FREIRE, N.M.S. Estudo comparativo entre técnicas coproparasitológicas para diagnóstico de *Fasciola hepatica* em bovinos. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.3, n.1, p.1-3, 1996.

ABÍLIO, F.J.P.; WATANABE, T. Ocorrência de *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae), hospedeiro intermediário da *Fasciola hepatica*, para o Estado da Paraíba, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.32, n.2, p.184-186, 1998.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis, y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 1977. In: AMARAL, A.D.F.; BUSETTI, E.T. Observações preliminares sobre a fasciolose hepática humana em Curitiba. *Acta Biológica Paranaense*, v.8, n.9, p.107-115, 1979/1980.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. Organización Panamericana de La Salud, Washington, D. C., E.U.A., 1986.

ACOSTA, D. Epidemiologia y control de *Fasciola hepatica* en el Uruguay. In NARI, A.; FIEL, C. (ed) *Enfermedades Parasitarias de Importancia em Bovinos*. Montevideo. Hemisfério Sur. 1994.

ALI, H.; AI, L.; SONG, H.Q.; ALI, S.; LIN, R.Q.; SEYNI, B.; ISSA, G.; ZHU, X.Q. Genetic characterisation of *Fasciola* samples from different host and geographical localities revealed the existence of *F. hepatica* and *F. gigantica* in Niger. *Parasitology Research*, v.102, n.5, p.1021–1024, 2008.

ALMEIDA, B.R. *Malacologia dos gêneros Lymnaea e Biomphalaria na mesorregião sul espírito-santense, e a avaliação de extratos de Melia azedarach, Azadirachta indica, e Cymbopogon winterianus como agentes moluscicidas*. 2010. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2010.

ALVAREZ, L.; MORENO, G.; MORENO, L.; CEBALLOS, L.; SHAW, L.; FAIRWEATHER, I.; LANUSSE, C. Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on *Fasciola hepatica* eggs. *Veterinary Parasitology*, v. 164, n. 2-4, p. 211–216, 2009.

ALVES, D.P.; CARNEIRO, M.B.; MARTINS, I.V.F.; BERNARDO, C.C.; DONATELE, D.M.; PEREIRA JÚNIOR, O.S.; ALMEIDA, B.R.; AVELAR, B.R.; LEÃO, A.G.C. Distribution and factors associated with *Fasciola hepatica* infection in cattle in the south of Espírito Santo State, Brazil. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v.17, n.3, p.271-276, 2011.

AMATO NETO, V.; SILVA, L.I. Infecção humana por *Fasciola hepatica*. Relato de um caso e análise da questão. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.19, n.4, p.275-277, 1977.

ANDRADE DE FREITAS, A.; KWIATKOWSKI, A.; COUTINHO NUNES, S.; SIMONELLI, S.; SANGIONI, L. Avaliação parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas em feiras livres e supermercados do município de Campo Mourão, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 26, n.4, 2004.

ANDRADE NETO, J.L.; CARNEIRO FILHO, M.; LUZ, E.; SICILIANO, R.F.; OLIVEIRA FILHO, A.G.; PISANI, J.C. Human fascioliasis in the Metropolitan area of Curitiba, Brasil – The foci of infection and report of nine cases treated with Triclabendazole. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.3, n.6, p.220-225, 1999.

ANSARI-LARI, M.; MOAZZENI, M. A retrospective survey of liver fluke disease in livestock based on abattoir data in Shiraz, south oh Iran. *Preventive Veterinary Medicina*, v.73, n.1, p.93-96, 2006.

ARAÚJO, J.L.B.; GARCIA, C.A.; LINHARES, G.F.C. Ocorrência de *Fasciola hepatica*, (Linnaeus, 1758) (Trematoda, Fasciolidae), no Estado de Goiás. *Revista de Patologia Tropical*, v.24, n. 2, p.283-289, jul/dez, 1995.

ARAÚJO, J.L.B.; LINHARES, G.F.C.; OLIVEIRA, A.P.M.; AMORIL, J.G.; FREITAS, M.R.; COSTA, I.C.; PINHEIRO, V.J.L.; ESSELIN, I.R.R.; REIS, S.A. Infecções autóctones de bovinos por *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda, fasciolidae) no estado de Goiás, Brasil. *Revista de Patologia tropical*, v.36, n.1, p.96-100, jan-abr, 2007.

BAPTISTA, A. T. *Quantificações das condenações em vísceras de bovinos em 2007 nos matadouros-frigoríficos do estado do Espírito Santo registrados no serviço de inspeção estadual*. 2008. 14 f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Universidade Castelo Branco. Disponível em: <<http://www.qualittas.com.br/documentos/Quantificacoes%20das%20Condenacoes%20-%20Anderson%20Teixeira%20Baptista.pdf>> Acesso em: 08 dez. 2012.

BARANSKI, M.C. Novos casos autóctnes de fasciolose hepatica humana em Curitiba, Estado do Paraná, Brasil. *Anais de Medicina da Universidade Federal do Paraná*, p. 20, 1977.

BARGUES, M.D.; MERA, Y.; SIERRA, R.L.; ARTIGAS, P.; MAS-COMA, S. DNA multigene sequencing of topotypic specimens of the fascioliasis vector *Lymnaea diaphana* and phylogenetic analysis of the genus *Pectinidens* (Gastropoda). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.107, n.1, p.111-124, 2012.

BECK, A. A. H. Fasciolose. *A Hora Veterinária*, n.75, p.65-70, 1993.

BELLATO, V.; SOUZA, A.P.; SARTOR, A.A.; VEIGA, L.P.H.N.; CENTENARO, F. Ocorrência de *Fasciola hepatica* na população de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e em bovinos (*Bos taurus*) no município de Timbó, SC. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, Lages, v.8, n.1, p.66-70, 2009.

BENDEZU, B.P.; LANDA, H. Distomatosis hepáticas: epidemiología y control. *Boletín Div University Nacional Mayor San Marcos*, v.14, n.1, p. 1-32, 1973.

BENNEMA, S.C.; DUCHEYNE, E.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOUT, E.; HENDRICKX, G.; CHARLIER, J. Relative importance of management, meteorological and environmental factors in the spatial distribution of *Fasciola hepatica* in dairy cattle in a temperate climate zone. *International Journal for Parasitology*, v.41, n.2, p.225–233, 2011.

BERNARDO, C.C. *Prevalência da fasciolose em bovinos abatidos em matadouro frigorífico no sul do estado do Espírito Santo*. Monografia (Graduação) Universidade Federal do Espírito Santo, 2009.

BERNARDO, C.C.; CARNEIRO, M.B.; AVELAR, B.R.; DONATELE, D.M.; MARTINS, I.V.F.; PEREIRA, M.J.S. Prevalence of liver condemnation due to bovine fasciolosis in Southern Espírito Santo: temporal distribution and economic losses. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v.20, n.1, p.49-53, jan.-mar., 2011.

BERNARDO, C.C.; DEMONER, L.C.; FRAGA, J.C.L.; GONÇALVES, M.F.; DONATELE, D.M.; MARTINS, I.V.F. Avaliação comparativa entre a técnica de sedimentação fecal e achados de *F. hepatica* em fígados bovinos. *Anais da XXXIV Semana Capixaba do Médico Veterinário*. 2007 . Guarapari – ES.

BLOOD, D.C; HENDERSON, J.A.; RADOSTITS, O.M. *Clínica Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1983, p.743 – 748.

BONITA, R.; TAIRA, N. Faecal examination of *Fasciola* eggs fixed with formalin solution using the beads technique. *Veterinary Parasitology*, v. 67, n.4, p.269-273, 1996.

BORAY, J. C. In: Gaafar, S.M.H.W.E.M.R.E. (Ed.). *Flukes of Domestic Animals in parasite, pests and predators*. Elsevier, New York, p. 179-218, 1985.

BORAY, J.; CROWFOOT, P.; STRONG, M.; ALLISON, J.; SCHELLENBAUM, M.; VON ORELLI, M.; SARASIN, G. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Veterinary Record*, v.113, n.14, p.315–317, 1983.

BORAY, J.C. Experimental fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology*, 1969.

BRASIL. Ministério da saúde. *Vigilância de controle de moluscos de importância epidemiológica*, Brasília, Brasil, 2008.

BRAUN, U.; WOLFENSBERGER, R.; HERTZBERG, H. Diagnosis of liver flukes in cows: a comparison of the findings in the liver, in the feces, and in the bile. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, v. 137, n.9, p. 438-444, 1995.

BUCHANAN, J.F.; FAIRWEATHER, I.; BRENNAN, A.; TRUDGETT, A.; HOEY, E.M. *Fasciola hepatica*: surface and internal tegumental changes induced by treatment *in vitro* with the sulphoxide metabolite of albendazole (“Valbazen”). *Parasitology*, v.126, n.2, p.141-153, 2003.

BUSETTI, E.T. Informações adicionais sobre a fasciolose hepática em Curitiba (Estado do Paraná, Brasil). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.24, n.2, p.102-106, março-abril, 1982.

BUSETTI, E.T.; RUIS, M.C.E.; PASKE, A.; THOMAZ, V. Helminhos parasitas de *Bubalus bubalis* no Estado do Paraná, Brasil. *Arquivos de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.35, n.3, p.399-404, 1983.

CALRETAS, S.; LAIZ, M.; SIMÃO, A.; CARVALHO, A.; RODRIGUES, A.; SÁ, A.; SANTOS, A.; SANTOS, R.; DA SILVA, J.A.P.; REIS, C.; ALMIRO, E.; PORTO, A. Seis casos de fasciolíase hepática. *Medicina Interna*, v.10, n.4, 2003.

CARNEIRO, M.B.; ALVES, D.P.; DONATELE, D.M.; PEREIRA JÚNIOR, O.S.; MARTINS, I.V.F. *Fasciola hepatica* em ovinos, caprinos e bubalinos em municípios do sul do Espírito Santo. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.80, n.4, p. 1-5, 2013.

CARPIO, I.S.N.; IWASHITA, A.T. Prevalencia de infección humana por *Fasciola hepática* en pobladores del distrito de Caujul provincia de Oyon, región de Lima, Perú. *Acta Médica Portuguesa*, v. 25, n.2, p.1-5, 2008.

CHARLIER, J.; DUCHATEAU, L.; CLAEREBOU, E.; WILLIAMS, D.; VERCRUYSSSE, J. Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody levels in bulk-tank milk samples and production parameters in dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v.78, n.1, p.57-66, 2007.

CHARLIE, J.; DE MEULEMEESTER, L.; CLAEREBOU, E.; WILLIAMS, D.; VERCRUYSSSE, J. Qualitative and quantitative evaluation of coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. *Veterinary Parasitology*, v.153, p.44-51, n.1, 2008.

CLAXTON, J.R.; SUTHERST, J.; ORTIZ, P.; CLARKSON, M.J. The Effect of Cyclic Temperatures on the Growth of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea viatrix*. *The Veterinary Journal*, v. 157, n.2, p.166-171, 1999.

COELHO, L.H.L.; LIMA, W.S. Population dynamics of *Lymnaea columella* and its natural infection by *Fasciola hepatica* in the State of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Helminthology*, v.77, n.1, p.7-10, 2003.

CORAL, R.P.; MASTALIR, E.T.; MASTALIR, F.P. Retirada de *Fasciola hepatica* da via biliar principal por coledocospia. *Revista Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. Brasil, v. 34, n.1, p. 69-71, 2007.

CORRÊA, M.D.A.; FLEURY, G.C. Fasciolose hepática humana: novo caso autóctone. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.5, n.5, p. 267-270, 1971.

COSTA, H.M.A.; GUIMARÃES, M.P.; LEITE, A.C.R.; LIMA, W.S. Distribuição de helmintos parasitos de animais domésticos no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 38, n. 4, p.465-679, 1986.

COSTA, F.L.; ROSA, F.; CRESCO, M.V.; CORREIA, E. Evolução dos biótopos aquáticos de trematódeos/moluscos em Cabo Verde, 1ª Conferência Lusófona sobre o Sistema Terra, Cluster, FC-UL. Lisboa, Portugal, 2006.

CRUZ-MENDOZA, I.; IBARRA-VELARDE, F.; QUINTERO-MARTÍNEZ, M.T.; NARANJO-GARCÍA, E.; LECUMBERRI-LÓPEZ, J.; CORREA, D. Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in cattle and *Lymnaea (Fossaria) humilis* snails in central Mexico. *Parasitology Research*, v.95, n.4, p.283-286, 2005.

CUNHA, F.O.V.; MARQUES, S.M.T.; MATTOS, M.J.T. 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.4, p.188-191, 2007.

DENNIS, W.R.; STONE, W.M. W SWASON, L.E. A new laboratory and Field diagnostic test for fluke ova in feces. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.124, n.922, p.47-50, 1954.

DIAS, A.S.; SOBREIRA, R.R.; AGUIAR, G.B.; MELOTTI, V.D.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; PUPPIN, A.C.; PERBONI, W.R.; BERTONCELI, R.M.; SILVA, R.G.; RAMOS, R.F. Estudo da distribuição de moluscos aquáticos no sul do estado do Espírito Santo. *Acta Veterinária Brasilica*, v.7, n.2, p.154-157, 2013.

DUMENIGO, B.F.; ESPINO, A.M.; FINLAY, C.M. Detection of *F.hepatica* antigen in cattle feces by a monoclonal antibody-based sandwich immunoassay. Resumo. *Veterinary Science*, v.60, n.3, p.278-279, 1996.

DUTRA, L.H.; MOLENTO, M.B.; NAUMANN, C.R.C.; BIONDO, A.W.; FORTES, F.S.; SAVIO, D.; MALONE, J.B. Mapping risk of bovine fasciolosis in the south of Brazil using Geographic Information Systems. *Veterinary Parasitology*, v.169, n.1, p.76-81, 2010.

ECHEVARRIA, F. A. M. Fasciolose: ocorrência, diagnóstico e controle. *Agroquímica Santo Amaro*, v. 27, 1985.

EL-KOUBA, M. M. A. N. *Aspectos gerais da fasciolose e das endoparasitoses em capivaras (Hydrochaeris hydrochaeris- LINNAEUS, 1766) e ratões de banhado (Myocastor coypus – MOLINA, 1782) residentes em três parques do estado do Paraná.* 2005. 89p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

FAIRWEATHER, I.; THREADGOLD, L. T.; HANNA, R. E. B. Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. In: DALTON, J. P. *Fasciolosis*, Ontario: CABI Publishing, 1999, cap.3, p.47 – 111.

FAIRWEATHER, I. Triclabendazole: new skills to unravel an old(ish) enigma. *Journal of Helminthology*, v.79, n.3, p.227–234, 2005.

FAIRWEATHER, I. Triclabendazole progress report 2005-2009: na advancement of learning? *Journal of Helminthology*, v.83, n.2, p.139–150, 2009.

FAIRWEATHER, I. Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy? *Veterinary Parasitology*, v.180, n.1, p.133-143, 2011.

FAIRWEATHER, I.; McSHANE, D.D.; SHAW, L.; ELLISON, S.E.; O'HAGAN, N.T.; YORK, E.A.; TRUDGETT, A.; BRENNAN, G.P. Development of an egg hatch assay for the diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: Proof of concept. *Veterinary Parasitology*, v. 183, n.3, p.249-256, 2012.

FARIA, R.N.; CURY, M.C.; LIMA, W.S. Concordância entre duas técnicas coproparasitológicas para diagnóstico de *Fasciola hepatica* em bovinos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.4, p.1023-1025, 2008.

FERNANDEZ, B.F.; HAMANN, W. Considerações sobre a verminose em bovinos e bubalinos no Litoral Paranaense. *Revista do Setor de Ciências Agrárias da UFPR*, v.7, n.1, p.137-140, 1985.

FILGUEIRA, I.L.; PEREIRA, L.A.; RABELLO, R.S.; PITTIGLIANI, T.M.C.; GITTI, C.B. Prevalência das principais doenças relatadas em matadouros com inspeção estadual no Estado do Rio de Janeiro no período de 2002 a 2005. *Revista da Universidade Rural, Ciências da Vida*, v.26, n.1, p.177-178, 2006.

FLANAGAN, A.M.; EDGAR, H.W.J.; FORSTER, F.; GORDON, A.; HANNA, R.E.B.; McCOY, M.; BRENNAN, G.P.; FAIRWEATHER, I. Standardisation of a coproantigen reduction test (CRT) protocol for the diagnosis of resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, v.176, n.1, p.34-42, 2001a.

FLANAGAN, A.; EDGAR, H.W.J.; GORDON, A.; HANNA, R.E.B.; BRENNAN, G.P.; FAIRWEATHER, I. Comparison of two assays, a faecal egg count reduction test (FECRT) and coproantigen reduction test (CRT), for the diagnosis of resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.176, n.2-3, p.170-176, 2011b.

FOREYT, W.J. *Parasitologia Veterinária: manual de referência*. 5.ed. São Paulo: Roca, 2005. 240p.

FOWLER, M.E. *Zoo and Wild Animal Medicine*. 3 ed. Saunders Company. Denver – Colorado. 1993.

FOX, N.J.; WHITE, P.C.L.; MCCLEAN, C.J.; MARION, G.; EVAN, A. HUTCHINGS, M.R. Predicting Impacts of Climate Change on *Fasciola hepatica* Risk. *PlosOne*, v.6, n.1, p.16-26, 2011.

FUENTES, M.V.; VALERO, M.A.; BARGUES, M.D.; ESTEBAN, J.G.; ANGLÉS, R.; MAS-COMA, S. Analysis of climatic data and forecast indices for human fasciolosis at very high altitude. *Annals of Tropical and Medicine Parasitology*, v.93, n.8, p.835–850, 1999.

FUENTES, M.V.; MALONE, J.B.; MAS-COMA, S. Validation of a mapping and prediction model for human fasciolosis transmission in Andean very high altitude endemic areas using remote sensing data. *Acta Tropica*, v.79, n.1, p.87–95, 2001.

FUJII, T.U.; DELL'PORTO, A.; OLIVEIRA, S.M. *Fasciola hepatica* em búfalos do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 6., 1993, São Paulo, SP. Resumos. São Paulo, 1993. p.12.

FUJII, T.U.; OLIVEIRA, S.M.; FUJII, T.; PALAZZO, J.P.C. Prevalência da fasciolose hepática em búfalos (*Bubalus bubalis* L., 1758) da região do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.65, n.1, p.11-15, 1998.

GASSENBECK, C. P. H.; OVER, H. J.; NOORMAN, N. E.; DeLÉUW, W. A. An epidemiological study of *Fasciola hepatica* in Netherlands. *Veterinary Quarterly*, v.14, n.4, p.140-144, 1992.

GIRÃO, E.; UENO, H. Técnica dos quatro tamises para o diagnóstico coprológico quantitativo da Fasciolose dos ruminantes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.20, n. 8, p.905-912, 1985.

GOMES, F.F.; OLIVEIRA, F.C.R.; PILE, E.A.; LOPES, C.W.G. Estabelecimento de foco de fasciolose hepática em propriedade do município de Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.11, n.2, p.53-56, 2002.

GOMES, F.F.; PAES, R.B.; FIUZA, V.R.S.; OLIVEIRA, F.C.R. Fasciolose bovina diagnosticada em matadouros da Região Norte Fluminense. *Revista da Universidade Rural, Ciências da Vida*, v.26, n.1, p.509-510, 2006.

GOMES, F.F.; FIUZA, V.R.S.; COSENDEY, R.I.J.; OLIVEIRA, F.C.R.; PAES, R.B. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.30, n.1, p.40-45, 2008.

GOMES, C.A.V.C. *Fasciolose em bovinos de engorda*. Dissertação (Mestrado) Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, 2012.

GUIMARÃES, M.P. *Fasciola hepatica*. 2003. In: OLIVEIRA, A.A., et al. Estudo da prevalência e fatores associados à fasciolose no Município de Canutama, Estado do Amazonas, Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v.16, n.4, p.251-259, 2007.

HALFERTY, L.; BRENNAN, G.P.; HANNA, R.E.B.; EDGAR, H.W.; MEANEY, M.M.; MCCONVILLE, M.; TRUDGETT, A.; HOEY, L.; FAIRWEATHER, I. Tegumental surface changes in juvenile *Fasciola hepatica* in response to treatment in vivo with triclabendazole. *Veterinary Parasitology*, v.155, n.1-2, p.49-58, 2008.

HAMMAMI, H.; HAMED, N. AYADI, A. Epidemiological studies on *Fasciola hepatica* in Gafsa Oases (South West of Tunisia). *Parasite*, v.14, n.3, p.261-264, 2007.

HANNA, R.E.B; CROMIE, L.; TAYLOR, S.M.; COUPER, A. The effect of a parenteral ivermectin/closantel injection on the growth and reproductive development of early immature *Fasciola hepatica* in cattle. *Veterinary Parasitology*, v.142, n.1, p. 78-90, 2006.

HANNA, R.E.B.; EDGAR, H.; MOFFETT, D.; McCONNEL, S.; FAIRWEATHER, I.; BRENNAN, G.P.; TRUDGETT, A.; HOEY, E.M.; CROMIE, L.; TAYLOR, S.M.; DANIEL, R. *Fasciola hepatica*: Histology of the testis in egg-producing adults of several laboratory-maintained isolates of flukes grown to maturity in cattle and sheep and in flukes from naturally infected hosts. *Veterinary Parasitology*, v.157, n.3-4, p.222-234, 2008.

HANNA, R.E.B.; EDGAR, H.W.J.; MCCONNELL, S.; TONER, E.; MCCONVILLE, M.; BRENNAN, G.P.; DEVINE, C.; FLANAGAN, A.; HALFERTY, L.; MEANEY, M.; SHAW, L.; MOFFETT, D.; MCCOY, M.; FAIRWEATHER, I. *Fasciola hepatica*: histological changes in the reproductive structures of triclabendazole (TCBZ)-sensitive and TCBZ-resistant flukes collected from experimentally-infected sheep one to four days after treatment with TCBZ and the related benzimidazole derivative. *Veterinary Parasitology*, v.168, n.19, p.240-254, 2010.

HANNA, R.E.B.; CARCELLA, S.S.; SOLANA, H.; McCONNELL, S.; FAIRWEATHER, I. Early onset of changes to the reproductive system of *Fasciola hepatica* following *in vivo* treatment with triclabendazole. *Veterinary Parasitology*, v. 184, n.2-4, p.341-347, 2012.

HAPPICH, F.A.; BORAY, J.C. Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. 1. Comparative studies on quantitative faecal examinations for chronic *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Australian Veterinary Journal*, v. 45, n.7, p.326-328, 1969.

HERNÁNDEZ-CAMPOS, M.A. Síntesis de benzimidazoles com actividade antihelmíntica potencial (tesis de maestría). México (DF) México: Facultad de Química. UNAM, 1990.

HERNÁNDEZ-CAMPOS, A.; IBARRA-VELARDE, F.; VERA-MONTENEGRO, Y.; RIVERA-FERNANDEZ, N.; CASTILLO, R. Synthesis and fasciolicidal activity of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1Hbenzimidazole. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.50, n.5, p.649–652, 2002.

IGREJA, R.P.; BARRETO, M.G.M.; SOARES, M.S. Fasciolíase: relato de dois casos em área rural do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.37, n.5, p.416-417, 2004.

JASMER, D. P.; YAO, C.; REHMAN, A.; JOHNSON, S. Multiple lethal effects induced by a benzimidazole anthelmintic in the anterior intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. *Molecular Biochemical Parasitology*, v. 105, n. 1, p. 81- 90. 2000.

JUNK, W. J.; BAYLEY, P. B.; SPARKS, R. E., The flood pulse concept in river-floodplains systems. In: D. P. Dodge (ed.), Proceedings of the International Large River Symposium. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Science*, Canadá, v.106, n.1, p.110-127, 1989.

KENYON, F.; SARGISON, N.D.; SKUCE, P.J.; JACKSON F. Sheep helminth parasitic disease in south eastern Scotland arising as a possible consequence of climate change. *Veterinary Parasitology*, v.163, n.4, p.293-297, 2009.

KLEIMAN, F.; PIETROKOVSKY, S.; GIL, S.; WISNIVESKY-COLLI, C. Comparison of two coprological methods for the veterinary diagnosis os fasciolosis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.57, n.2, p.181-185, 2005.

KLEIMAN, F.; PIETROKOVSKY, S.; PREPELITCHI, L.; CARBAJO, A.E.; WISNIVESKY-COLLI, C. Dynamics of *Fasciola hepatica* transmission in the Andean Patagonian valleys, Argentina. *Veterinary Parasitology*, v.145, n.3-4, p.274-286, 2007.

KÖHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*, v. 31, n. 4, p. 336-345. 2001.

LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal for Parasitology*, v. 20, n.7, p. 105-111. 1988.

LACHS, M.S.; NACHAMKIN, I.; EDELSTEIN, P.H.; GOLDMAN, J.; FEINSTEIN, A.R.; SCHWARTZ, J.S. Spectrum bias in the evaluation of diagnostic tests: lessons from the rapid dipstick test for urinary tract infection. *Annals of Internal Medicine*, v.117, n.2, p.135–140, 1992.

LANUSSE, C.; PRICHARD, R. Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants. *Drug Metabolism Reviews*, v.25, n.3, p.235–279, 1993.

LANUSSE, C.E. Farmacologia dos compostos anti-helmínticos. In: CHARLES, T.P. (Ed) Controle dos nematódeos gastrintestinais. Juiz de Fora, Minas Gerais, p.1-44. 1996.

LEEFLANG, M.G.; BOSSUYT, P.M.M. Test accuracy is likely to vary depending on the population it is based on. *Veterinary Parasitology*, n.134, p.189, 2005.

LEMMA, B., GABREAB, F.; TEDLA, S. Studies on fasciolosis in four selected sites in Ethiopia. *Veterinary Parasitology*, v.18, n.1, p. 29-37, 1985.

LEITÃO, J.S. *Parasitologia Veterinária*. vol.II, 3º Ed., 1980, p. 18-24.

LESSA, C.S.S.; SERRA-FREIRE, N.M.; MAURE, E.P. Fasciolose – Aspectos relacionados à interação parasito-hospedeiro intermediário. *Tópicos em malacologia. Ecos do XVIII EBRAM*, p.305-313, 2007.

LIMA, W.S.; SOARES, L.R.M.; BARÇANTE, T.L.; GUIMARÃES, M.P.; BARÇANTE, J.M.P. Occurrence of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) infection in Brazilian cattle of Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v.18, n.2, p. 27-30, 2009.

LUNA, L.G. 1968. Manual of Histologic Staining of the Armed Forces institute of Pathology. 3rd ed. McGraw-Hill, New York, p.258.

LUTZ, A. Sobre a ocorrência de *Fasciola hepatica* no estado do Rio de Janeiro. *Boletim do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.1, n.1, p.9-13, 1921.

LUZ, E.; VIANA, A.M.; CEZAR, T.C.P. Aspectos de *Lymnaea columella*, Say, 1817, *Physa cubensis*, Pfeiffer, 1839 e *Physa marmorata*, Guilding, 1928 (Mollusca, Pulmonata) no primeiro planalto e litoral paranaense. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*. Curitiba, v.37, n.3. 1994.

MAIA, M.J. Helmintofauna do veado (*Cervus elaphus* L.) e do gamo (*Dama dama* L.) na Tapada Nacional de Mafra. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.96, n.536, p.81-84. 2001.

MALEK, E.A. Snail-transmitted parasitic diseases. *CRC Press*, Boca Ratón, Florida, v.2, n.1-2, p.224-234, 1980.

MALONE, J.B.; GOMMES, R.; HANSEN, J.; YILMA, J.M.; SLINGENBERG, J.; SNIJDERS, F.; NACHTERGAELE, F.; ATAMAN, E. A geographic information system on the potential distribution and abundance of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in east Africa based on Food and Agriculture Organization databases. *Veterinary Parasitology*, v. 78, n.2, p. 87-101, 1998.

MARCOS, L.A.; YI, P.; MACHICADO, A.; ANDRADE, R.; SAMALVIDES, F.; SÁNCHEZ, J.; TERASHIMA, A. Hepatic fibrosis and *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Journal of Helminthology*, v.81, n.4, p.381–386, 2007.

MARTIN, R. J.; ROBERTSON, A. P.; BJORN, H. Target sites of anthelmintics. *Parasitology*, v. 114, n.5, p. 111-124. 1997.

MARTINS, I.V.F.; BERNARDO, C.C.; AVELAR, B.R.; ARAÚJO, I.B.B.A.; DONATELE, D.M.; NUNES, L.C. Sensibilidade e reprodutibilidade da técnica de sedimentação (Foreyt, 2005) para o diagnóstico de *Fasciola hepatica*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.17, n.1, p.110-112, 2008.

MARTINS, I.V.F.; AVELAR, B.R.; PEREIRA, M.J.S.; FONSECA, A.H. Application of a geographical information system approach for risk analysis of fascioliasis in southern Espírito Santo state, Brazil. *Geospatial Health*, v.6, n.3, p.87-93, 2012.

MAS-COMA, M.S.; ESTEBAN, J.G.; BARGUES, M.D. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bull World Health Organ*, v.77, n.4, p.340-346, 1999.

MAS-COMA, S.; FUNATSU, I. R.; BARGUES, M. D. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology*, v.123, n.5, p.115-127, 2001.

MAS-COMA, S.; BARGUES, M. D.; VALERO, M. A. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology*, v.35, n.11-12, p.1255-1278, 2005.

MAS-COMA, S.; VALERO, M.A.; BARGUES, M.D. Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Veterinary Parasitology*, v.163, n.4, p.264-280, 2009.

MATTOS, M. J. T.; UENO, H.; GONÇALVES, P. C.; ALMEIDA, J. E. M. Ocorrência estacional e bioecologia de *Lymnaea columella* Say, 1817 em habitat natural no Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.19, n.6, p.248-52, 1997.

MATTOS, M.J.T.; CUNHA, F.O.V.; MARQUES, S.M.T. Comparação de duas técnicas parasitológicas na identificação de ovos de *Fasciola hepatica*. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia, Uruguiana*, v.16, n.1, p. 105-112. 2009.

MAURE, E.A.P.; BUSTAMANTE, M.; SERRA-FREIRA, N.M.; GOMES, D.C. Dinâmica de *Lymnaea columella* (Say, 1817), hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Brazil Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v.35, n.4, p.151-155, 1998.

McCONVILLE, M.; BRENNAN, G.P.; FLANAGAN, A.; EDGAR, H.W.J.; MCCOY, M.; CASTILLO, R.; HERNÁNDEZ-CAMPOS, A.; FAIRWEATHER, I. Surface and internal tegumental changes in juvenile *Fasciola hepatica* following treatment *in vivo* with the experimental fasciolicide, compound alpha. *Veterinary Parasitology*, v.153, n.1-2, p.52-64, 2008.

McCONVILLE, M.; HANNA, R.E.B.; BRENNAN, G.P.; MCCOY, M.; EDGAR, H.W.J.; McCONNELL, S.; CASTILLO, R.; HERNÁNDEZ-CAMPOS, A.; FAIRWEATHER, I. *Fasciola hepatica*: disruption of spermatogenesis by the fasciolicide compound alpha. *Parasitology Research*, v.106, n.2, p.311-323, 2010.

- MCKELLAR, Q.; SCOTT, E. The benzimidazole anthelmintic agents—a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.13, n.3, p.223–247, 1990.
- MEKROUD, A.; BENAKHLA, A.; VIGNOLES, P.; RONDELAUD, D.; DREYFUSS, G. Preliminary studies on the prevalences of natural fasciolosis in cattle, sheep, and the host snail (*Galba trunculata*) in north-eastern Algeria. *Parasitology Research*, v. 92, n.6, p. 502-505, 2004.
- MÉNARD, A.; L’HOSTIS, M.; LERAY, G.; MARCHANDEAU, S.; PASCAL, M.; ROUDOT, N.; MICHEL, V.; CHAUVIN, A. Inventory of wild rodentes and lagomorphs as natural hosts of *Fasciola hepatica* on farm located in a humid area in Lorie Atlantique (France). *Parasite*, v.7, n.1, p.77-82, 2000.
- MENTZ, M.B.; WIEST, J.M.; GONÇALVES, P.C. Viabilidade de ovos de *Fasciola hepatica* de bovinos em sistema de biodigestão anaeróbia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, n.4, p.550-553, 2004.
- MEZO, M.; GONZALEZ-WARLETA, M.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; UBEIRA F.M. Evaluation of the flukicide treatment policy for dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, v.157, n.3-4, p.235-243, 2008.
- MITCHELL, G.B.B. Treatment and control of liver fluke in sheep and cattle, Technical Note 557, Nov. 2004.
- MOLLOY, J.; ANDERSON, G.R.; FLETCHER, T.I.; LANDMANN, J.; KNIGHT, B.C. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immuno- sorbent assay for detecting antibodies to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in cattle, sheep and buffaloes in Australia. *Veterinary Parasitology*, v.130, n.3-4, p.207–212, 2005.
- MOLLOY, J.B.; ANDERSON, G.R. The distribution of *Fasciola hepatica* in Queensland, Australia, and the potential impact of introduced snail intermediate hosts. *Veterinary Parasitology*, v.137, n.1-2, p.62-66, 2005.
- MOONEY, L.; GOOD, B.; HANRAHAN, J.P.; MULCAHY, G.; WAAL, T. The comparative efficacy of four anthelmintics against a natural acquired *Fasciola hepatica* infection in hill sheep flock in the west of Ireland. *Veterinary Parasitology*, v.164, n.2-4, p.201–205, 2009.
- MORA, J.A.; ARROYO, R.; MOLINA, S.; TROPER, L.; IRÍAS, E. Nuevos aportes sobre el valor de la fasciolina. Estudio en una área endémica de Costa Rica. *Boletín of Sanit Panama*, 1980.
- MÜLLER, G.; UENO, H. *Lymnaea viatrix* Orb., 1835, naturalmente infectadas com *Fasciola hepatica* Lin., 1758, no município de Santa Vitória do Palmar, RS. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia, Resumos, Porto Alegre, 1982, p.42.

MÜLLER, G. Fasciolose. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÊNDEZ, M.D.C. Doenças de ruminantes e equinos. Pelotas, Universitária, Universidade Federal de Pelotas, 1998, 659p.

MÜLLER, G.; BERNE, M.E.A.; RAFFI, L.L.; JESUS, L.P.; PAULSEN, R.M.M.; SINKOC, A.L. Influência da temperatura na longevidade de metacercárias de *Fasciola hepatica*. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.5, n.2, p. 164-165, 1999.

MUNGUÍA-XÓCHIHUA, J.A., IBARRA-VELARDE, F., DUCOING-WATTY, A., MONTENEGRO-CRISTINO, N., QUIROZ-ROMERO, H. Prevalence of *Fasciola hepatica* (ELISA and fecal analysis) in ruminants from a semi-desert área in the northwest of Mexico. *Parasitology Research*, v.101, n.1, p.127-130, 2007.

NUERNBERG, S.; SERRA-FREIRE, N.M. Registro de fasciolose hepática em equino de Santa Catarina, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.13, n.1, p.41-43, março, 1992.

OAKLEY, G.A.; OWEN, B.; KNAPP, N.H.H. Procution effects of subclinical liver luke infection in growing dairy heifers. 1979. In: CHARLIER, J.; DUCHATEAU, L.; CLAEREBOUT, E.; WILLIAMS, D.; VERCRUYSSSE, J. Qualitative and quantitative evaluation of coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. *Veterinary Parasitology*, v.153, n.1-2, p.44-51, 2008.

OLIVEIRA, S.M.; FUJII, T.U.; FUJII, T.; OLIVEIRA, W.D.E. Fasciolose hepática em búfalos no Município de Pariquera-Açu, Vale do Ribeira, São Paulo. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.15, n.1, p.37, 1994.

OLIVEIRA, S.M.; FUJII, T.U.; SPÓSITO FILHA, E.; MARTINS, A.M.C.R.P.F. Ocorrência de *Lymnaea columella* Say, 1817 infectada naturalmente por *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758), no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.69, n.1, p.29-37, 2002.

OLIVEIRA, A.A.; NASCIMENTO, A.S.; SANTOS, T.A.M.; CARMO, G.M.I.; DIMECH, C.P.N.; ALVES, R.M.S.; MALASPINA, F.G.; GARCIA, M.H.O.; SANTOS, D.A.; AGUIAR, G.P.R.; ALBUQUERQUE, B.C.; CARMO, E.H. Estudo da prevalência e fatores associados à fasciolose no Município de Canutama, Estado do Amazonas, Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, Brasília, v.16, n.4, p.251-259, out-dez, 2007.

OLIVEIRA, D.R.; FERREIRA, D.M.; STIVEL, C.C.; ROMERO, F.; CAVAGNOLLI, F.; KLOSS, A.; ARAÚJO, F.B.; MOLENTO, M.B. Triclabendazole resistance involving *Fasciola hepatica* in sheep and goats during na outbreak in Almirante Tamandaré, Paraná, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.17, n.1, p.149-153, 2008.

ORGANIZACIÓN DE LÃS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. 55p. Enfermedades de los animales domésticos causadas por distomas, Roma, 1994.

PARAENSE, W.L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. *Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro*, v.55, p.105-128, 1975.

PARAENSE, W.L. *Lymnaea rupestris* spn. from Southern Brazil (Pulmonata, Lymnaeidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.77, n.4. 1982.

PARAENSE, W.L. *Lymnaea columella* in Northern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.78, n.4, p.477-482, 1983.

PARAENSE, W.L. *Physa marmorata* Guilding, 1828 (Pulmonata: Physidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.91, n.4, p.459-469, 1986.

PARFITT, J.W.; BANKS, A.W. A method for counting *Fasciola* eggs in cattle faeces in the Field. *Veterinary Record*, v. 87, n.7, p. 180-182, 1970.

PAVANELLI, G.C. Fauna helmíntica de peixes do rio Paraná, região de Porto Rico, PR. In: VAZZOLER, A.E.A.M. Planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos. Maringá, Brasil, capítulo 10, p. 307-329, 1997.

PÊCEGO, O. Fiscalização sanitária de carnes e derivados. Estatística de verificação e apreensões e a sua importância. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária*, São Paulo, v.2, n.8-10, p.375-389, 1925.

PEREIRA, M.G. *Epidemiologia Teoria e prática*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 596 p.

PERERA, A.A.V.; NODA, J.S.; JIMÉNEZ, Y.H. Distribución y preferencia de hábitats de moluscos hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica* en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, v.61, n.3, p.248-53, 2009.

PHIRI, A.M.; PHIRI, I.K.; SIKASUNGE, C.S.; MONRAD, J. Prevalence of fasciolosis in Zambia cattle observed at selected abattoirs with emphasis on age, sex and origin. *Journal of Veterinary Medicine B*, v.52, n.9, p.414-416, 2005.

PILE, E.; GAZETA, G.; SANTOS, J.A.A.; COELHO, B.; SERRA-FREIRE, N.M. Ocorrência de fascioliasis humana no município de Volta Redonda, RJ, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.34, n.4, p.413-414, 2000.

PILE, E.; SANTOS, J. A. A.; PASTORELLO, T.; VASCONCELLOS, M. *Fasciola hepatica* em búfalos (*Bubalus bubalis*) no município de Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.38, n.1, p. 42-43, 2001a.

PILE, E.; SANTOS, J. A. A.; SÃO LUIZ, J. B.; VASCONCELLOS, M. C. Fasciolose bovina: controle com látex da “coroa-de-Cristo” (*Euphorbia splendens* var.*hislopii*). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 288-289, 2001b.

POWER, M.E.; SUN, A.; PARKER, G.; DIETRICH, W.E.; WOOTTON, J.T. Hydraulic food-chain models: an approach to the study of food-web dynamics in larger rivers. *Bioscience*, v.45, n.3, p.159–167, 1995.

PREPELITCHI, L.; PIETROKOVSKY, S.; KLEIMAN, F.; RUBEL, D.; ISSIA, L.; MORIENA, R.; RACIOPPI, O.; ÁLVAREZ, J.; WISNIVESKY-COLLI, C. Population Structure and Dynamics of *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Gastropoda: Lymnaeidae) in Wetlands of Northeastern Argentina. *Zoological Studies*, v.50, n.2, p.164-176, 2011.

PRITCHARD, G.C.; FORBES, A.B.; WILLIAMS, D.J.L.; SALIMI-BEJESTANI, M.R.; DANIEL, R.G. Emergence of fasciolosis in cattle East Anglia. *The Veterinary Record*, v.157, n.5, p.578-582, 2005.

PUENTE, G.L. Acute and subacute fascioliasis of alpacas (*Lama pacos*) and treatment with triclabendazole. *Tropical Animal Health and Production*, v.29, n.1, p.31-32, 1997.

QUEIRÓZ, V.S.; LUZ, E.; LEITE, L.C.; CÍRIO, S.M. *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae): estudo epidemiológico nos municípios de Bocaiúva do Sul e Tunas do Paraná (Brasil). *Acta Biológica Paranaense*. Curitiba, v. 31, n.(1, 2, 3, 4), p. 99-111, 2002.

RABELLO, R.S.; PEREIRA, L.A.; FILGUEIRA, I.L.; PITTIGLIANI, T.M.C. e GITTI, C.B. Ocorrência de doenças a partir de achados de matança, nas regiões do Estado do Rio de Janeiro, no período de 2002 a 2005. *Revista da Universidade Rural, Ciências da Vida*, v.26, n.1, p.179-180, 2006.

RADOSTISTS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. *Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. Editora Guanabara Koogan, 9ª ed., 2000.

RANGEL, R.J.L.; IZQUIERDO, M.R.; NOGUEIRA, B.G. Bovine fasciolosis in Tabasco, Mexico. *Veterinary Parasitology*, v.81, n.2, p.119–127, 1999.

RAPSCH A, C.; SCHWEIZER, G.; GRIMM, F.; KOHLER, L.; BAUER, C.; DEPLAZES, P.; BRAUN, U.; TORGERSON, P.R. Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *International Journal for Parasitology*, v.36, n.10, p.1153–1158, 2006.

REICHEL, M.P. Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in sheep and cattle. *Veterinary Parasitology*, v. 107, n.1-2, p. 65-72, 2002.

REID, J. F. S.; DARGIE, J. D. Como os estágios adultos da *Fasciola hepatica* afetam a saúde e a produtividade do bovino. *A Hora Veterinária*, n.1, p.23-26, 1995.

REY, L. Primeiro encontro de ovos de *Fasciola hepatica* em inquérito helmintológico de populações brasileiras: Campo Grande, Mato Grosso. *Revista Paulista de Medicina*, v. 53, n.1, p. 60, 1958.

REY, L. *Parasitologia*. 3 edição, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2001, p.856.

REZENDE, H.E.B.; ARAUJO, J.L.B.; GOMES, P.A.C.; Nuernberg, S.; PIMENTEL NETO, M.; OLIVEIRA, G.P.; MELLO, R.P. Notas sobre duas espécies de *Lymnaea*, Lamark, 1799, hospedeiros intermediários de *Fasciola hepatica* L. no Estado do Rio de Janeiro (Mollusca, Gastropoda, Basommatophara, Limnaeidae). *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro, v.3, n.1, p.21-23, 1973.

RONDELAUD, D.; DREYFUSS, G.; BOUTEILLE, B.; DARDÉ, M.L. Changes in human fasciolosis in a temperate area: about some observations over a 28-year period in central France. *Parasitology Research*, v.86, n.9, p.753-757, 2000.

ROSS, J.G.; DOW, C.; TODD, J.R. A study of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Veterinary Record*, v.80, n.4, p.543-546, 1997.

SANGSTER, N.C. Managing parasiticide resistance. *Veterinary Parasitology*, v.98, n.1-3, p.89-109, 2001.

SCARCELLA, S.; FIEL, C.; GUZMAN, M.; ALZOLA, R.; FELIPE, A.; HANNA, R.E.B.; FAIRWEATHER, I.; MCCONNELL, S.; SOLANA, H. Reproductive disruption in *Fasciola hepatica* associated with incomplete efficacy of a new experimental formulation of triclabendazole. *Veterinary Parasitology*, v.176, n.2-3, p.157-164, 2011.

SERRA-FREIRE, N.M. Fasciolose no Vale do Paraíba. *Agrotécnica Ciba-Geigy*, v.14, n.1, p. 14-19, 1990.

SERRA-FREIRE, N.M.; NUERNBERG, S. Geopolitical dispersion of the occurrence of *Fasciola hepatica* in the state of Santa Catarina, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 87, n.1, p.263-269, 1992.

SERRA-FREIRE, N.M. Fasciolose hepática. *A Hora Veterinária*, v.1, n.1, p.13-18, 1995.

SERRA-FREIRE, N.M.; BORDINI, E.L. LESSA, C.S.S.; SCHERER, P.O.; FARIAS, M.T.; MALACCO, M.A.; CORRÊA, T.C.; TSCHUMI, J.A. Reinvestigação sobre a distribuição da *Fasciola hepatica* no Brasil. *A Hora Veterinária*, edição extra, n.1, julho, 1995.

SERRA-FREIRE, N. M. Fasciolose hepática no Brasil: Análise Retrospectiva e Prospectiva. *Caderno Técnico Científico da Escola de Medicina Veterinária*, ano 1, n.1, p.9-70, jul-dez, 1999.

SILVA, I. C. C.; MULLER, G.; MATTOS, M. J. T.; CASTRO, A. L. L. D.; ALMEIDA, J. E. M.; UENO, H. Fasciolose: I – incidência e importância na bovino e ovinocultura do RS. *Lavoura Arrozeira*, Porto Alegre, v.323, n.33, p.34-42, 1980.

SILVA, A.E.P.; FREITAS, C.C.; DUTRA, L.V.; MOLENTO, M.B. Distribuição da *Fasciola hepatica* bovina em Santa Catarina, Brasil. Anais XV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR, Curitiba, PR, Brasil, 30 de abril a 05 de maio de 2011, INPE, p.8358-8364.

SINCLAIR, I.J.; WASSALL, D.A. Sero-diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *Veterinary Parasitology*, v.27, n.3-4, p.283-290, 1988.

SOUZA, G.T.R.; MACHADO, M.H.; DIAS, M.L.G.G.; YAMADA, F.H.; PAGOTTOJ,P.A.; PAVANELLI G.C. Composição e sazonalidade dos moluscos do alto rio Paraná, Brasil, e sua potencialidade como hospedeiros intermediários de digenéticos. *Acta scientiarum. Biological sciences*, Maringá, Brasil. v. 30, n. 2, p. 309-314, 2008.

SOUZA, M.A.A.; BARBOSA, V.S.; ALBUQUERQUE, J.O.; BOCANEGRA, S.; SOUZA-SANTOS, R.; PAREDES, H.; BARBOSA, C.S. Aspectos ecológicos e levantamento malacológico para identificação de áreas de risco para transmissão da esquistossomose mansoni no litoral norte de Pernambuco, Brasil. *Iheringia. Série Zoologia*, Porto Alegre, Brasil. v.100, n.1, p.19-24, 2010.

STITT, A.W.; FAIRWEATHER, I. Spermatogenesis and the fine structure of the mature spermatozoon of the live fluke, *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). *Parasitology*, v.101, n.3, p.395-407, 1990.

STITT, A.W.; FAIRWEATHER, I. Spermatogenesis in *Fasciola hepatica*: an ultrastructural comparison of the effects of the anthelmintic, triclabendazole (“Fasinex”) and the microtubule inhibitor, tubulozole. *Invertebrate, Reproduction and Development*, v. 22, p.139–150, n.2, 1992.

SUHARDONO; ROBERTS, J.A.; COPEMAN, D.B. The effect of temperature and humidity on longevity of metacercariae of *Fasciola gigantica*. *Tropical Animal Health and Production*, v.38, n.5, p.371–377, 2006.

SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). Detecção de casos humanos de *Fasciola hepatica* no estado do Amazonas. *Boletim eletrônico epidemiológico*, ano 05, n.5, 2005.

THIENGO, S. C.; FERNANDES, M. A. Moluscos. In: BRASIL. Ministério da Saúde. *Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas*. [S.l.]: Editora do Ministério da Saúde, 2007, p.13-20.

TIETZ MARQUES, S.M.; SCROFERNEKER, M.L.; EDELWEISS, M.I.A. Glomerulonephritis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) naturally infected by *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, v.123, n.1-2, p.83-91, 2004.

TONER, E.; BRENNAN, G.P.; HANNA, R.E.B.; EDGAR, H.W.; FAIRWEATHER, I. Tegumental surface changes in adult *Fasciola hepatica* in response to treatment in vivo with triclabendazole in the sheep host. *Veterinary Parasitology*, v.172, n.3-4, p.238–248, 2010.

- TONER, E.; BRENNAN, G.P.; HANNA, R.E.B.; EDGAR, H.W.J.; FAIRWEATHER, I. *Fasciola hepatica*: time-dependent disruption of spermatogenesis following in vivo treatment with triclabendazole. *Parasitology Research*, v. 109, n.4, p.1035-1043, 2011.
- TOSTES, R.A.; SANTARÉM, V.A.; ALBERTI, H.; SANCHES, O.C. Casos autóctonos de *Fasciola hepatica* na região de Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, n.3, p.961-962, 2004.
- UENO, H.; GONÇALVES, P.C. *Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes*. 4.ed. Porto Alegre: JICA, 1998. p.62.
- UETA, M.T. Infecção experimental de *Lymnaea columella* por *Fasciola hepatica*. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v.14, n.1, p.43-57, 1980.
- URQUART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. *Parasitologia Veterinária*, p.81-97, Guanabara-Kogan ed. Rio de Janeiro, 1996.
- VAN DIJK, J.; SARGISIN, N.D.; KENYON, F.; SKUCE, P.J. Climate change and infectious disease: helminthological challenges to farmed ruminants in temperature regions. *Animal*, v.4, n.3, p. 377-392, 2010.
- VELARDE, F.I.; CRISTINO, N.M.; CRESPO, J.F.; CAMPOS, A.H.; BOCANEGRA, R.C. Evaluación de cuatro vehículos para formular um fasciolicida experimental. *Veterinaria México*, v.31, n.1, p.47-51, 2000.
- VERA, Y.; IBARRA, F.; CANTO, G.J.; SORIA, O.; CASTILLO, R.; HERNÁNDEZ, A. Determination of the maximum tolerated dose and the safety index of an experimental fasciolicide in cattle. *Journal of Veterinary Medicine B*, v.53, n.3, p.145-149, 2006.
- WANG, C.R.; QIU, J.H.; ZHU, X.Q.; HAN, X.H.; NI, H.B.; ZHAO, J.P.; ZHOU, Q.M.; ZHANG, H.W.; LUN, Z.R. Survey of helminths in adult sheep in Heilongjiang Province, People's Republic of China. *Veterinary Parasitology*, v.140, n.3-4, p.378-382, 2006.
- WHITING, P.; RUTJES, A.W.; REITSMA, J.B.; GLAS, A.S.; BOSSUYT, P.M.; KLEIJNEN, J. Sources of variation and bias in studies of diagnostic accuracy: a systematic review. *Annals of Internal Medicine*, v.140, n.3, p.189-202, 2004.
- WOOD, I.B.; AMARAL, N.K.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J.L.; KASSAI, T.; MALONE Jr, J.B.; PANKAVICH, J.A.; REINECKE, R.K.; SLOCOMBE, O.; TAYLOR, S.M.; VERCRUYSSSE, J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*, v.58, n.3, p.181-213, 1995.
- YILMA, J.M.; MALONE, J.B. A geographic information system forecast model for strategic control of fasciolosis in Ethiopia. *Veterinary Parasitology*, v.78, n.2, p.103-127, 1998.