

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CÍNTIA DAS CHAGAS BERNARDO

Validação de um kit de ELISA comercial para detecção de coproantígenos e anticorpos em soro e leite de bovinos infectados naturalmente por *Fasciola hepatica*

ALEGRE

2012

CÍNTIA DAS CHAGAS BERNARDO

Validação de um kit comercial de ELISA para detecção de coproantígenos e anticorpos em soro e leite de bovinos infectados naturalmente por *Fasciola hepatica*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de **Mestre em Ciências Veterinárias**, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-cirúrgicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Isabella Vilhena Freire Martins

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariana Drummond Costa Ignacchiti

ALEGRE

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

B523v Bernardo, Cíntia das Chagas, 1986-
Validação de um kit comercial de ELISA para detecção de coproantígenos e anticorpos em soro e leite de bovinos infectados naturalmente por *Fasciola hepatica* / Cíntia das Chagas Bernardo. – 2012. 65 f. : il.

Orientadora: Isabella Vilhena Freire Martins.
Coorientadora: Mariana Drummond Costa Ignacchiti.
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. *Fasciola hepatica* – Diagnóstico. 2. Bovino – Doenças. 3. Teste imunoenzimático. 4. Fezes – Exame. 5. Zoonoses. I. Martins, Isabella Vilhena Freire. II. Ignacchiti, Mariana Drummond Costa. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. IV. Título.

CDU: 619

CÍNTIA DAS CHAGAS BERNARDO

Validação de um kit comercial de ELISA para detecção de coproantígenos e anticorpos em soro e leite de bovinos infectados naturalmente por *Fasciola hepatica*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-cirúrgicas.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Isabella Vilhena Freire Martins
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Profa. Dra. Maria Júlia Salim Pereira
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Marcos Santos Zanini
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

Deus, por estar sempre ao meu lado, me encorajando e ajudando a ultrapassar os obstáculos que tive que transpor.

Aos meus pais e irmão, Danilo Bernardo e Marta Horta das Chagas Bernardo, e Bruno das Chagas Bernardo, pelo amor incondicional dedicado a mim nesses anos morando longe, que foram imprescindíveis para meu crescimento pessoal e profissional.

A Jésus Junca Pereira, pelo amor.

Aos amigos, pelos momentos constantes de descontração... cervejas no “Manel” depois das aulas de Seminários, pelos churrascos, encontros no “Marcílio” e de encerramento das disciplinas, e os almoços, cantando a três, “Um dia de domingo”... Amo vocês amigos!

Aos amigos e alunos de graduação que me ajudaram nas coletas e dias de laboratório para que hoje fosse possível minha defesa.

A minha orientadora Isabella Vilhena Freire Martins, pela amizade e ensinamentos dedicados a mim, me proporcionando momentos de lazer e crescimento profissional.

A minha co-orientadora Mariana Drummond Costa Ignacchiti pela orientação e conhecimentos transmitidos.

A Professora Maria Júlia Salim Pereira, pela paciência e ajuda no desenvolvimento de projetos e artigos.

A UFES, CAPES (projeto procad 093/2007) e FAPES, órgãos financiadores das bolsas e dos recursos financeiros para a execução do projeto.

Se encontrases um caminho sem
obstáculos, pensa que talvez não te
leve a nenhum lugar.

(Autor desconhecido)

RESUMO

Métodos de diagnóstico da fasciolose hepática veem sendo estudados a fim de se propor técnicas mais acuradas, de fácil execução e de menor custo, que tenham aplicabilidade a campo. O objetivo do presente estudo foi validar kits comerciais® de ELISA para detecção de coproantígenos e anticorpos em soro e leite de bovinos infectados naturalmente por *Fasciola hepatica*. Numa primeira etapa, foram coletadas amostras de fezes, sangue e leite de bovinos naturalmente infectados por *F. hepatica*. Amostras de fezes de 577 animais foram processadas segundo a técnica coproparasitológica de sedimentação fecal para ovos de *F. hepatica*, e 92 amostras de soro e 43 de leite foram processadas segundo instruções do fabricante de um kit ELISA comercial®. Utilizou-se o Qui-quadrado de McNemar para comparação estatística, e calculou-se a sensibilidade e especificidade, valores preditivos e kappa dos kits®, sendo o exame coproparasitológico usado como padrão. Numa segunda etapa, foram avaliados ao abate 81 fígados bovinos dos quais 45 foram condenados por fasciolose. Foi realizada a contagem dos parasitos nos fígados condenados e coletada as amostras de fezes desses animais, além de 36 amostras fecais provenientes de animais que não tiveram os fígados condenados para nenhuma enfermidade. Das amostras de fezes foram separadas duas alíquotas sendo a primeira parte das amostras processadas pela técnica coproparasitológica de sedimentação e a outra, segundo instruções do fabricante de um kit ELISA comercial® para detecção de coproantígenos. Foram calculados os indicadores de validade e reprodutibilidade, e realizado o teste de correlação de Spearman e Qui-quadrado de McNemar, sendo utilizada como padrão ouro a condenação de fígados ao abate. Com os resultados obtidos nesses estudos, ficou claro que os kits comerciais® de ELISA apresentaram maior sensibilidade em relação ao exame coproparasitológico de sedimentação para o diagnóstico da fasciolose bovina, porém, para o diagnóstico da enfermidade a campo além da eficácia, deve-se levar em consideração também a operacionalização das técnicas, não descartando assim, o uso do exame coproparasitológico, sendo este menos trabalhoso e de menor custo em relação aos kits de ELISA testados.

Palavras chave: Fasciolose bovina. ELISA. Diagnóstico.

ABSTRACT

Methods diagnostics of hepatic fascioliasis are being studied to propose more accurate techniques, easy perform, less costly if they have applicability in the field. The aim of this study was to validate the commercial® ELISA kits for detection of coproantigens and antibodies in serum and milk from cattle naturally infected by *Fasciola hepatica*. At first, sample of feces, blood and milk of cattle naturally infected with *F. hepatica* were collected. Fecal samples from 577 animals were processed according to sedimentation fecal technique, and 92 and 43 serum and milk samples , were processed according to manufacturer's instructions of a commercial® ELISA kit. Were used McNemar chi-square for statistical comparison, and calculated sensitivity, specificity, predictive values and kappa, and the sedimentation fecal technique was used as standard. Second, were evaluated 81 slaughter cattle livers of whom 45 were condemned by fasciolosis. Count was conducted the parasites in the livers condemned and collected fecal samples of these animals, 36 fecal samples were collected from animals without condemnation. The samples were separated in two aliquots and the first part of samples were processed by sedimentation fecal technique, and the other samples according to manufacturer's instructions of commercial® ELISA kit for coproantigens detection. The indicators of validity, reproducibility, Spearman correlation and McNemar chi-square were calculated and used as the gold standard the livers condemnation at slaughterhouse. With the results obtained in these studies, became clear that commercial® ELISA kits showed higher sensitivity to sedimentation fecal technique for diagnosis of bovine fasciolosis, however for the diagnosis of the disease in the field should take into account also the operation of the methods, not ruling out the use of fecal test, which is less labor intensive and less expensive compared to ELISA kits tested.

Keywords: Bovine fasciolosis. ELISA. Diagnostic.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1. Avaliação da validade e da reprodutibilidade do kit Elisa comercial® para detecção de anticorpos no soro utilizando-se como padrão o exame de sedimentação fecal para ovos de *Fasciola hepatica* (FOREYT, 2005)..... 35
- Tabela 2. Avaliação da validade e da reprodutibilidade do kit Elisa comercial® para detecção de anticorpos no leite utilizando-se como padrão o exame de sedimentação fecal para ovos de *Fasciola hepatica* (FOREYT, 2005)..... 36

CAPÍTULO 2

- Tabela 1. Avaliação da validade e da reprodutibilidade do exame de sedimentação fecal para ovos de *Fasciola hepatica* (FOREYT, 2005) frente à condenação de fígados por fasciolose bovina ao abate..... 46
- Tabela 2. Avaliação da validade e da reprodutibilidade do teste ELISA comercial® em relação à condenação de fígados por fasciolose bovina ao abate..... 48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1	AGENTE ETIOLÓGICO DA FASCIIOLOSE.....	13
2.2	CICLO EVOLUTIVO DA <i>Fasciola hepatica</i>	14
2.3	EPIDEMIOLOGIA DA FASCIIOLOSE.....	16
2.4	PATOGÊNESE DA FASCIIOLOSE.....	19
2.5	DIAGNÓSTICO DA FASCIIOLOSE.....	22
2.6	CONTROLE DA FASCIIOLOSE.....	25
2.6.1	Tratamento da fasciolose.....	27
	CAPÍTULO 1.....	29
3	Capitulo 1 – Comparação de kits comerciais de ELISA para anticorpos no soro e leite com um teste coproparasitológico em bovinos naturalmente infectados por <i>Fasciola hepatica</i>.....	30
3.2	RESUMO.....	30
3.3	ABSTRACT.....	31
3.4	INTRODUÇÃO.....	32
3.5	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3.7	CONCLUSÕES.....	38
3.8	REFERÊNCIAS.....	38
	CAPÍTULO 2.....	29

4	Capítulo 2 – Comparação de um kit comercial de ELISA para a detecção de coproantígenos e de um exame coproparasitológico com fígados bovinos condenados por fasciolose ao abate.....	42
4.2	RESUMO.....	42
4.3	ABSTRACT.....	43
4.4	INTRODUÇÃO.....	44
4.5	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.6	CONCLUSÕES.....	50
4.7	REFERÊNCIAS.....	50
5	CONCLUSÕES FINAIS.....	53
6	REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

A fasciolose tem distribuição mundial (CHARLIER et al., 2007) e é uma das helmintoses de maior prevalência e morbidade entre enfermidades hepáticas de ruminantes (MEZO et al., 2010a). O parasito da espécie *Fasciola hepatica*, agente etiológico da fasciolose é economicamente importante, pois pode acometer um grande número de hospedeiros, incluindo bovinos, ovinos e búfalos (MOLLOY et al., 2005) e também é uma zoonose (MEZO et al., 2010a).

Infecções subclínicas por *F. hepatica* são consideradas importantes causas de queda de produtividade (BENNEMA et al., 2009). Segundo Mezo et al. (2010a) as perdas econômicas anuais associadas à fasciolose chegam a mais de dois milhões de dólares. No Brasil, especialmente no sul do Espírito Santo, as perdas ao abate de bovinos, devido ao descarte de fígados, foram estimadas em 132 mil dólares somente no ano de 2009 (BERNARDO et al., 2011).

Em áreas endêmicas para fasciolose bovina sinais clínicos podem não ser aparentes, por isso, produtores frequentemente desconhecem a infecção do rebanho, não sendo implementado um programa de controle do parasito nos animais (MEZO et al., 2010b).

Tradicionalmente, o diagnóstico da fasciolose é realizado por meio do exame coproparasitológico, porém, na fase aguda e no período pré-patente da doença, a presença do parasito não pode ser determinada, pois os ovos ainda não estão sendo eliminados nas fezes (ALMAZÁN et al., 2001).

Para o diagnóstico da fasciolose nas infecções recentes e crônicas, algumas técnicas de ELISA têm sido descritas (SALIMI-BEJESTANI et al., 2005). Aquelas utilizadas para a detecção de antígenos circulantes indicam infecções ativas recentes (SÁNCHEZ-ANDRADE et al., 2000). Mas, em alguns testes sorológicos pode haver reação cruzada com outras infecções parasitárias de ruminantes (CORNELISSEN et al., 1999).

Muitos testes imunológicos têm sido desenvolvidos para detecção de anticorpos específicos de *F. hepatica* em bovinos e ovinos, sendo o ELISA a técnica mais utilizada (MARTÍNEZ et al., 1996). Segundo Cornelissen et al. (2001) a sensibilidade da maioria desses testes é satisfatória. É importante citar que formas adultas e migratórias de *Fasciola* induzem a resposta imune caracterizada por níveis elevados de anticorpos específicos (MEZO et al., 2010a), porém, altos níveis de imunoglobulinas ainda persistem em animais tratados com sucesso (IBARRA et al., 1998).

O objetivo do presente estudo foi de validar kits comerciais® de ELISA para detecção de coproantígenos e anticorpos em soro e leite de bovinos infectados naturalmente por *F. hepatica*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO DA FASCIULOSE

Os agentes etiológicos da fasciolose são *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica* (ACHA;SZYFRES, 2003), porém no Brasil a enfermidade tem como agente causador o trematoda digenético *F. hepatica* (SERRA-FREIRE, 2008). Na Europa, Américas e Oceania somente a *F. hepatica* pode ser encontrada, porém ambas espécies, *F. hepatica* e *F. gigantica*, estão presentes na África e Ásia (MAS-COMA et al., 2009). Estes parasitos podem infectar um grande número de hospedeiros vertebrados, e são encontrados frequentemente em ruminantes domésticos como bovinos, ovinos e caprinos (CORNELISSEN et al., 2001)

O parasito *Fasciola hepatica* é pertencente ao filo Plathelminthes, classe Trematoda, sub-classe Digenea, família Fasciolidae, gênero *Fasciola* (BOSTELMANN et al., 2000). Quando jovem possui comprimento de 1 a 2 mm e formato de lanceta (URQUHART et al., 1996) e sua forma adulta hermafrodita, de aspecto foliáceo e coloração castanha, tem em média 2,5 cm de comprimento, 1 cm de largura e 1 mm de espessura (HATSCHBACH, 1995). Microscopicamente, o parasito *F. hepatica* possui um tegumento recoberto com espinhos projetados para trás (URQUHART et al., 1996).

Os helmintos pertencentes à classe Trematoda são ovíparos podendo ocorrer fertilização cruzada ou autofertilização (URQUHART et al., 1996). Seus ovos são grandes, operculados, castanho-amarelados, medindo cerca de 130 micra de comprimento por 75 micra de largura (HATSCHBACH, 1995).

Fasciola hepatica, quando na sua fase jovem, migra pelo parênquima hepático, já na fase adulta é parasito de ductos biliares (MARTINS et al., 2007) de ruminantes selvagens e domésticos, outros herbívoros e ocasionalmente humanos (ACHA;SZYFRES, 2003).

2.2 CICLO EVOLUTIVO DA *Fasciola hepatica*

Segundo Serra-Freire (2008), o ciclo biológico da *Fasciola hepatica* acontece com a participação de quatro elementos vivos, sendo eles o hospedeiro infectado, o bioagente ou agente etiológico, o hospedeiro intermediário (Gastropoda, da família Lymnaeidae, gênero *Lymnaea*) e a água.

Uma vez presente nos ductos biliares do hospedeiro vertebrado, um adulto de *F. hepatica* pode ovipor até 3000 ovos por dia (ACHA;SZYFRES, 2003) os quais serão carregados pela bile até a vesícula biliar, onde têm seu desenvolvimento inibido pela ação deste líquido (SERRA-FREIRE, 2008).

Durante o processo de digestão, quando a bile é liberada no intestino delgado com a finalidade de saponificação das gorduras, alguns ovos mantidos na vesícula biliar em suspensão são excretados em conjunto (SERRA-FREIRE, 2008). Os ovos são carregados ao ambiente externo juntamente com as fezes, onde necessitam de umidade, oxigenação e temperatura favoráveis para continuar o desenvolvimento do embrião (ACHA;SZYFRES, 2003). Segundo McCann et al. (2010), em climas temperados onde chove o ano todo, a temperatura é o fator limitante ao ciclo.

A temperatura vai influenciar no desenvolvimento das formas larvais dentro do ovo que irão infectar os moluscos, e também na subsequente saída das cercárias do hospedeiro intermediário, pois, durante o inverno os moluscos sofrem hibernação e é só depois, em temperaturas favoráveis, que as cercárias saem dos moluscos (FAIRWEATHER, 2011).

Principalmente quando na presença de hospedeiros definitivos suscetíveis, a temperatura ambiente acima de 10°C e alta umidade são requeridas para que ocorra o desenvolvimento das formas livres do parasito e as formas dentro do molusco, além do desenvolvimento e expansão da população de caramujos (MCCANN et al., 2010).

Acha e Szyfres (2003) citam que os ovos conseguem sobreviver até dois meses dentro do bolo fecal suficientemente compactado para manter a oxigenação, e conseguem suportar temperaturas que variam de 0°C a 37°C, porém desenvolvem-se somente entre 10°C e 30°C. Por ação das chuvas as fezes contaminadas são

carreadas até coleções d'água onde ocorre a continuação do ciclo evolutivo (MARTINS et al., 2007).

No interior dos ovos se desenvolvem os embriões e, quando em meio aquático, ocorre a eclosão do miracídio, isto pode ocorrer em nove dias em condições ótimas de temperatura, que variam de 22°C a 26°C (URQUHART et al., 1996). Em climas mais quentes a umidade e a pluviosidade são frequentemente fatores limitantes ao ciclo evolutivo do parasito (MCCANN et al., 2010). A vegetação e altitude também podem influenciar no desenvolvimento do parasito (FUENTES, 2004).

O miracídio possui forma cônica, mede cerca de 150 µm e possui uma cobertura ciliada que permite que este se locomova em água (VIGNAU et al., 2005). Em uma das extremidades do miracídio está presente o rostro ou espinho que auxilia na penetração no molusco (HATSCHBACH, 1995).

O hospedeiro intermediário de *F. hepatica* são moluscos aquáticos pertencentes a família Lymnaeidae (Gastropoda: Basommatophora) (MCCANN et al., 2010) tendo três espécies mais comumente envolvidas na transmissão da fasciolose no Brasil: *Lymnaea cubensis*, *Lymnaea viatrix* e *Lymnaea columella* (SERRA-FREIRE, 2008). O autor cita ainda que miracídios de *F. hepatica* somente conseguem infectar caramujos que tenham entre 3 e 5 mm de comprimento de concha.

As reservas energéticas do miracídio são limitadas e por isso, este precisa infectar o hospedeiro intermediário em até oito horas (ACHA;SZYFRES, 2003), porém Urquhart et al. (1996) citam que essa infecção deve ocorrer em até três horas para que seja bem sucedida. Favorecido pela ação de substâncias citolíticas e indo se alojar na câmara pulmonar do gastrópodo, onde fica imóvel, perde os cílios e se transforma na segunda fase larvar: o esporocisto (HATSCHBACH, 1995) .

O esporocisto é imóvel, apresenta-se como uma vesícula alongada de aproximadamente 0,7 mm de comprimento contendo de 5 a 6 núcleos de células germinativas, que poderão se transformar em outros esporocistos ou originar a próxima fase larvar: a rédia (HATSCHBACH, 1995).

Após rompimento do saco esporocístico, ocorre a liberação das rédias (possuem de 1 a 3 mm), que formam uma segunda geração, as rédias-filhas, antes de se transformarem em cercárias (HATSCHBACH, 1995). O desenvolvimento das formas

evolutivas de *F. hepatica* dentro do hospedeiro intermediário ocorre por pedogênese, é uma característica da classe Trematoda, como forma compensatória pelo número reduzido de ovos produzido pelos indivíduos adultos (ACHA;SZYFRES, 2003).

Segundo Serra-Freire (2008), *L. viatrix* é a melhor espécie de hospedeiro intermediário já que a infecção por um miracídio pode dar origem a até 500 cercárias, além disso, cita ainda que a espécie *L. columella* não suporta infecções superiores a três miracídios.

As cercárias assemelham-se aos indivíduos adultos, diferindo apenas pelo tamanho, presença de cauda e ausência de órgãos reprodutores ainda embrionários (HATSCHBACH, 1995). Esta forma larvar é móvel e deixa o hospedeiro intermediário e fixam-se em superfícies firmes como talos submersos de capim e se encistam formando as metacercárias (URQUHART et al., 1996). As metacercárias medem cerca de 0,2 mm de diâmetro e se tornam infectantes em aproximadamente dois dias (ACHA;SZYFRES, 2003).

Ao pastorear, o hospedeiro definitivo se infecta ao ingerir as metacercárias aderidas na vegetação, e no tubo digestivo desses animais passam a ser formas jovens (MARTINS et al., 2007). Com o desencistamento da metacercária no intestino delgado, este penetra na mucosa intestinal e vai ao parênquima hepático (SERRA-FREIRE, 2008). Logo após o período de migração no parênquima que pode durar de seis a oitos semanas, os parasitos penetram nos ductos biliares onde se tornam adultos (URQUHART et al., 1996).

2.3 EPIDEMIOLOGIA DA FASCIULOSE

Originalmente a fasciolose era uma doença de animais domésticos europeus e sua distribuição atual foi favorecida pela importação desses animais, pelas colônias, no período colonial (SERRA-FREIRE, 1995).

O parasito *Fasciola hepatica* tem distribuição mundial e é predominantemente encontrada em regiões temperadas (MCCANN et al., 2010). No Brasil a *F. hepatica* já foi diagnosticada em todas as regiões (TOSTES et al., 2004).

O poder de disseminação da fasciolose está na capacidade do parasito de colonizar e se adaptar a novos ambientes muitas vezes com características extremas (altas altitudes), assim como a novos hospedeiros definitivos e intermediários (MAS-COMA et al., 2009). No Espírito Santo os primeiros relatos da fasciolose bovina datam do ano de 2006 (BERNARDO et al., 2006) e atualmente novos estudos comprovam a ocorrência da fasciolose no estado (BERNARDO et al., 2011; VIEIRA et al., 2011), porém muitos outros trabalhos descrevem a ocorrência de casos de fasciolose em outros estados no sul (QUEIROZ et al., 2002; SERRA-FREIRE; NUERNBERG, 1992) e sudeste (LIMA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2002; PILE et al., 2001) do Brasil.

Três fatores são indispensáveis para ocorrência de fasciolose: a disponibilidade de habitats adequado para os caramujos, temperatura e umidade favoráveis (URQUHART et al., 1996). Segundo Fairweather (2011) as principais mudanças no clima necessárias para a ocorrência da doença são a temperatura e a pluviosidade.

No sul da América do Sul os moluscos permanecem em pequenos sítios de sobrevivência (biótopo primário) e ampliam suas áreas de distribuição em correlação com as condições do ambiente (biótopo secundário) (SERRA-FREIRE, 1995). Em locais onde as chuvas são sazonais, a transmissão da doença também será limitada a essas épocas, isso se não houver irrigação ou cursos d'água permanentes (MCCANN et al., 2010). No Brasil se encontra biótopos do tipo linear, com a distribuição dos moluscos acompanhando o sentido da corrente d'água, isso decorrente do relevo (SERRA-FREIRE, 1995).

Os habitats permanentes dos caramujos incluem as margens de córregos e pequenas lagoas; após chuvas pesadas ou inundações os habitats temporários podem ser constituídos por marcas de cascos, sulcos de rodas ou poças d'água (URQUHART et al., 1996).

Para que haja a reprodução do caramujo e o desenvolvimento das fases larvais de *Fasciola*, têm-se uma necessidade de temperatura diurna/noturna média de 10°C ou mais, cessando todo desenvolvimento aos 5°C (URQUHART et al., 1996). A faixa de temperatura de 10°C a 15°C mantém as metacercárias ativas por oito meses (MÜLLER et al., 1999).

A umidade é essencial para os estádios de vida livre como o miracídio e a cercária na facilitação da transmissão, além de ser importante para a sobrevivência dos moluscos, dos ovos e das metacercárias (FAIRWEATHER, 2011).

Não pode ser esquecido que as populações de molusco também sofrem com o parasitismo pela *Fasciola hepatica*, que pode determinar a morte ou alterações como o gigantismo e a diminuição da capacidade reprodutiva (SERRA-FREIRE, 1995).

Os prejuízos acarretados aos hospedeiros intermediários pela infecção da *Fasciola* regulam as infestações com reflexos epidemiológicos (SERRA-FREIRE, 1995), ou seja, quanto maior for a densidade de moluscos mais sucesso haverá na infecção pelos miracídios e também será maior a chance de não ocorrer super-infecção do molusco (SERRA-FREIRE, 2008).

Os principais fatores que determinam a época e a gravidade da fasciolose hepática são os que influenciam no número de metacercárias acumulado na vegetação (RADOSTITS et al., 2000). É possível observar um aumento acentuado no número de metacercárias no pasto durante dois períodos acarretados pela infecção de verão e a infecção de inverno dos caramujos (URQUHART et al., 1996).

A infecção de verão dos caramujos ocorre pela ação de miracídios que eclodiram dos ovos na primavera e início do verão, resultando na contaminação da vegetação cerca de cinco a oito semanas mais tarde (RADOSTITS et al., 2000). Na infecção de inverno dos caramujos a contaminação com miracídios ocorre no outono anterior, e durante o período de hibernação do caramujo o desenvolvimento larval cessa temporariamente (URQUHART et al., 1996).

Quanto ao hospedeiro definitivo, os diferentes graus de suscetibilidade à infecção são importantíssimos na epidemiologia da fasciolose, por exemplo, bovinos podem pastejar e sobreviver em áreas infestadas onde ovinos morrem com a parasitose (SERRA-FREIRE, 1995).

Tanto os ovos como as metacercárias de *F. hepatica* podem sobreviver durante o inverno e desempenham papéis epidemiológicos importantes (URQUHART et al., 1996). Na estação seca a concentração de animais nos sítios de sobrevivência do molusco assegura a transmissão do parasito, enquanto que na

estação chuvosa a área total utilizada para disseminação das metacercárias garante maior exposição dos animais (SERRA-FREIRE, 1995).

Em surtos epizoóticos, hospedeiros vertebrados infectados podem morrer devido à sobrecarga de formas imaturas no fígado, e invertebrados conseqüentemente ao elevado número de miracídios por molusco (SERRA-FREIRE, 1995).

2.4 PATOGÊNESE DA FASCIULOSE

A fasciolose apresenta duas formas principais de interação, parasito-hospedeiro, ou seja, uma pela migração do parasito através do parênquima hepático, cronologicamente a primeira delas, e outra enfermidade ducto-biliar que corresponde a uma fase secundária a partir da infecção primária (BORDIN, 1995).

A ação da *Fasciola* em relação ao hospedeiro é evidenciada pelos danos hepatobiliares (BOSTELMANN et al., 2000), porém, em ciclos erráticos, parasitos podem ser encontrados no pulmão, baço, pele e cérebro (SERRA-FREIRE, 1995). A fasciolose é caracterizada por duas fases: aguda (larvas migrantes) e crônica (adultos) (MARCOS et al., 2007).

A severidade da enfermidade está condicionada a quantidade de metacercárias ingeridas, a idade do hospedeiro, a espécie e o estado geral do animal afetado (VIGNAU et al., 2005).

Em pequenos ruminantes, os sinais clínicos podem ser febre, anorexia, aumento de volume do abdome (SERRA-FREIRE, 1995) e dor à palpação (URQUHART et al., 1996). Em bovinos a manifestação clínica da fasciolose normalmente cursa com diarreia em casos extremos, fraqueza e edema especialmente em animais jovens (ACHA;SZYFRES, 2003). Na forma aguda, mais comum em ovinos do que bovinos, o animal pode vir a óbito sem manifestações clínicas (ACHA;SZYFRES, 2003).

A fase aguda da enfermidade é caracterizada pela migração das larvas do duodeno até o parênquima hepático, passando pela parede intestinal, cavidade abdominal e cápsula de Glisson (MARCOS et al., 2007). Por meio da atividade de

fasciolas jovens, pós-desencistamento duodenal das metacercárias ingeridas, ocorre o aparecimento de algum grau de peritonite a qual tende a ser normalmente hemorrágica e por vezes fibrinosa e focal (BORDIN, 1995).

A fasciolose aguda acontece quando há a ingestão de grandes quantidades de metacercárias de uma vez, com conseqüente invasão e migração de parasitos jovens no parênquima hepático (ACHA;SZYFRES, 2003). As lesões migratórias agudas tendem a ser traumáticas, no entanto, apresentam também um componente necrótico coagulativo importante (BOSTELMANN et al., 2000). A migração das formas jovens nos ruminantes é mais intensa entre 40 e 60 dias pós-infecção (SERRA-FREIRE, 1995). Durante a migração das formas jovens pelo fígado, os hepatócitos são destruídos promovendo o aparecimento de tratos hemorrágicos, fibrina e debris celulares (JONES et al., 2000).

Em caso de infecções massivas pode ocorrer ruptura da cápsula hepática acompanhada de hemoperitônio (SERRA-FREIRE, 1995). Caso o parasito encontre um ducto biliar, ele segue sua evolução, caso contrário, torna-se encistado no parênquima, em forma de nódulo caseoso, por vezes proliferativo e calcificado (BORDIN, 1995).

Na evolução crônica da fasciolose há o aparecimento da cirrose biliar progressiva seguida de severa fibrose hepática (SERRA-FREIRE, 1995). A presença do parasito adulto nos ductos biliares promove grande reação tecidual levando a uma colangioepatite (JONES et al., 2000). Isso ocorre pela irritação motivada mecanicamente, no nível da mucosa, pela *Fasciola*, levando inclusive a ulcerações, exsudação fibrinosa e, por vezes, calcificações distróficas (BORDIN, 1995).

Normalmente pacientes na fase crônica da doença não apresentam sinais clínicos, ou demonstram sinais não específicos e alguns distúrbios abdominais (MARCOS et al., 2007). A fasciolose crônica é a forma mais comum da enfermidade e cursa com infertilidade (CHARLIER et al., 2007), anemia, perda de peso, queda na produção e condenação do fígado ao abate (FOREYT, 2005).

É importante citar que a fase biliar do parasito, *Fasciola hepatica*, (adulta e imatura com mais de 8 semanas de idade) afeta muito mais a produtividade do que o parasito com menos de 8 semana de idade (REID;DARGIE, 1995). Segundo Jones

et al. (2000), o epitélio biliar é estimulado a sofrer hiperplasia papilar e glandular em alguns locais e em outros esse tecido sofre erosão.

Quando nos ductos biliares, os parasitos promovem a infiltração de eosinófilos, linfócitos e macrófagos nestes ductos os quais se tornam espessados em decorrência da proliferação fibrosa (JONES et al., 2000). Na fase migratória pode acontecer uma anemia relativamente moderada pela perda de glóbulos vermelhos no trato migratório, porém após a oitava semana pós-infecção essa contagem diminui drasticamente, resultando em anemia severa e morte (REID;DARGIE, 1995).

Acredita-se que a prolina, substância produzida pelo parasito tenha um papel importante na proliferação da mucosa do ducto, além de poder agir à distância suprimindo a medula óssea, desempenhando assim papel importante no processo da anemia (BORDIN, 1995).

A anemia nos casos de fasciolose tem características de anemia ferropriva, e é resultante tanto das hemorragias causadas pela migração dos parasitos jovens, quanto pelo hábito hematófago dos adultos, e pelas lesões causadas por parasitos nos ductos biliares (JONES et al., 2000). Quando os glóbulos vermelhos são destruídos, a maior parte do ferro que estes possuem não pode ser reabsorvido, conseqüentemente o armazenamento desse mineral no hospedeiro encontra-se continuamente esgotado (REID;DARGIE, 1995).

Além da anemia, a perda de albumina e outras proteínas plasmáticas também ocorrem com a chegada dos parasitos nos ductos biliares (REID;DARGIE, 1995). O baixo nível de proteínas plasmáticas é decorrente da transudação do plasma através dos ductos biliares (JONES et al., 2000).

Na fase adulta o parasito pode frequentemente causar oclusão parcial ou total do ducto, a fibrose e a calcificação intensa dos ductos biliares dão origem ao termo “fígado em tubo de cachimbo”, sendo frequentemente observada em bovinos (JONES et al., 2000).

2.5 DIAGNÓSTICO DA FASCIIOLOSE

O diagnóstico da fasciolose é dificultado pelo ciclo biológico do parasito no hospedeiro (VALERO et al., 2009). Tradicionalmente o diagnóstico de *Fasciola hepatica* é feito por meio da detecção de ovos nas fezes ou pela presença do parasito no fígado e ductos biliares no exame *post-mortem* (MOLLOY et al., 2005).

Muitos testes de ELISA para detecção de anticorpos e antígenos de *Fasciola hepatica* têm sido desenvolvidos e avaliados com a finalidade de tornar mais fácil e acurado o diagnóstico da fasciolose (IBARRA et al., 1998; MOLLOY et al., 2005; REICHEL et al., 2005).

Embora a presença do parasito seja confirmada pela observação de ovos nas fezes, novos métodos de detecção de antígenos vêm sendo empregados para o diagnóstico da doença, principalmente na sua fase inicial, porém não determinam informações epidemiológicas importantes para o ciclo desse parasito e nem substituem o diagnóstico por exame de fezes (KLEIMAN et al., 2005).

É importante citar que cada forma de diagnóstico possui fatores positivos e negativos. O exame coproparasitológico é incapaz de detectar infecções recentes porque os ovos dos parasitos não aparecem nas fezes até 70 dias pós-infecção (REICHEL, 2002). Uma vantagem dos testes ELISA é a capacidade de detectar IgG anti-*Fasciola hepatica* a partir da segunda semana pós-infecção (IBARRA et al., 1998).

O exame coproparasitológico e sorológico para detecção de anticorpos possuem significativa limitação, pois o exame de fezes consegue realizar o diagnóstico somente 10 semanas pós-infecção e no segundo caso os anticorpos podem estar presentes se houve uma infecção prévia. Já as técnicas que detectam antígenos de excreção/secreção nas fezes, irão detectar a infecção somente quando os parasitos estiverem nos ductos biliares e não durante o período de migração das fasciolas pelo parênquima hepático (LECLIPTEUX et al., 1998).

Em regiões onde não é possível a realização de técnicas diagnósticas mais avançadas, o exame de rotina é feito por meio da detecção de ovos de *F. hepatica* nas fezes (MATTOS et al., 2009). Para Faria et al. (2008) na escolha da técnica de

diagnóstico para fasciolose hepática deve-se levar em consideração não apenas a eficácia do teste, que é de extrema importância, mas também avaliar a operacionalização, com o objetivo de reduzir tempo e custo.

As técnicas que detectam a presença de ovos nas fezes são importantes para selecionar animais positivos e determinar um padrão de infecção, servindo como ponto de partida para outras análises (REICHEL, 2002). Técnicas como a de quatro tamises metálicos e Flukefinder® são as mais utilizadas para o diagnóstico da fasciolose (FARIA et al., 2008).

Faria et al. (2008) e Kleiman et al. (2005) julgaram como mais adequada a técnica de quatro tamises (GIRAO;UENO, 1985) para o diagnóstico da fasciolose. No entanto, Martins et al. (2008) afirmaram que a técnica de sedimentação fecal para ovos de *F. hepatica* (FOREYT, 2005) se mostrou mais sensível, simples e de menor custo do que a técnica de quatro tamises.

Uma vantagem do exame de fezes em relação ao teste ELISA é que após o tratamento com triclabendazole de animais parasitados por *F. hepatica* haverá uma redução na contagem de ovos do parasito nas fezes do hospedeiro, porém os níveis de anticorpos irão diminuir paulatinamente, podendo ainda ser encontrados mesmo após o tratamento (IBARRA et al., 1998). Em contrapartida uma desvantagem das técnicas coproparasitológicas é que, segundo Fairweather (2011) a contagem de ovos não se relaciona com o número de parasitos. Anderson et al. (1999) tentaram relacionar o número de ovos no exame de sedimentação fecal com o número de parasitos no fígado, porém relataram que a detecção fica prejudicada pela baixa sensibilidade dos testes em estimar o número de ovos no grande volume de fezes de bovinos.

Técnicas imunológicas como as de detecção de anticorpos no soro e leite (MEZO et al., 2010a) e coproantígenos (VALERO et al., 2009) vêm sendo utilizadas para o diagnóstico da fasciolose bovina e ovina. Quando comparado exame de fezes e o teste ELISA, esse último mostrou porcentagens maiores de detecção de animais positivos (IBARRA et al., 1998).

Para a investigação da presença de anticorpos contra antígenos de *F. hepatica*, no leite, pode-se utilizar amostras individuais ou um *pool* de amostras de

leite (DUSCHER et al., 2011; MOLLOY et al. 2005). Segundo Reichel (2002), esse tipo de teste pode ser utilizado com alta sensibilidade (98%) e especificidade (100%) e consegue diagnosticar a fasciolose na segunda semana pós-infecção. É sabido que animais parasitados por *Fasciola* apresentam queda de produção, portanto a detecção de animais positivos em amostras obtidas de tanques de armazenagem de leite depende do curso e grau de infecção individual dos animais (DUSCHER et al., 2011).

O ELISA desenvolvido por Mezo et al. (2007) para detecção de anticorpos no soro e antígenos nas fezes se mostrou específico, sensível e simples no diagnóstico da fasciolose aguda e crônica em bovinos e ovinos. A sensibilidade e especificidade desses testes são determinadas a partir de infecções experimentais (CORNELISSEN et al., 2001) ou em duas populações distintas uma proveniente de áreas enzoóticas e outra de áreas livres da doença (IBARRA et al., 1998; SALIMI-BEJESTANI et al., 2005), porém, a sensibilidade e especificidade de um teste diagnóstico varia de acordo com a população em que é aplicado (GREINER;GARDNER, 2000), portanto nem sempre podem ser extrapolados para o diagnóstico da doença a campo (CHARLIER et al., 2008).

Segundo Mattos et al. (2009) os testes sorológicos ainda não estão disponíveis no Brasil para avaliações populacionais da fasciolose, ficando a utilização desses kits restritos a testes experimentais em universidades e instituições de pesquisa. Uma desvantagem do ELISA indireto é que é necessário uma leitora de absorvância, tornando o teste caro e de difícil execução em laboratórios com recursos limitados (IBARRA et al., 1998).

A principal desvantagem de testes ELISA para detecção de anticorpos é que não diferenciam infecções ativas de antecedentes (MATTOS et al., 2009). Alguns testes imunológicos indicam que os níveis séricos de anticorpos em muitos animais persistem até 12 semanas pós-tratamento contra *F. hepatica* (MOLLOY et al., 2005). Embora coproantígenos não identifiquem infecções tão cedo quanto antígenos no soro, o teste consegue detectar a infecção algumas semanas antes da pré-patência e pode distinguir uma infecção ativa, sendo muito sensível (FLANAGAN et al., 2011).

A reação cruzada entre outras parasitoses pode existir, dificultando a detecção dos animais verdadeiramente infectados por *F. hepatica*, Aronstein et al.

(2009) encontraram reação cruzada de antígenos de *Schistosoma mansoni* com *F. hepatica* e *Trichinella spiralis* utilizando a caracterização molecular. De Almeida et al. (2007), em estudo realizado em humanos parasitados por *Fasciola hepatica*, observaram haver características antigênicas semelhantes entre *Fasciola* e outras parasitoses como a leishmaniose visceral, doença de chagas, strongiloidíases e cisticercose, quando utilizaram Western Blot como forma de diagnóstico. Hassan et al. (1989) utilizando o ELISA para detecção de coproantígenos, encontraram reação cruzada entre *Schistosoma*, *Fasciola* e *Heterophyes*.

2.6 CONTROLE DA FASCIULOSE

Segundo Acha e Szyfres (2003), o controle da fasciolose animal está relacionado com a prevenção da ingestão de metacercárias, administração estratégica de fasciolicidas nos hospedeiros definitivos e a eliminação dos hospedeiros intermediários. Fatores climáticos também influenciam nas fases de vida livre do parasito e comprometem a infectividade dos hospedeiros definitivo e intermediário (LESSA, 1995).

Uma abordagem estratégica integrada é mais econômica e positiva do que a confiança nos tratamentos de rotina, e a probabilidade de se induzir a resistência ao anti-helmintico é menor (RADOSTITS et al., 2000). Segundo Knubben-Schweizer et al. (2010) o benefício de um manejo estratégico de pastagem está na redução da contaminação do pasto por ovos de *F. hepatica*.

O monitoramento da distribuição espacial de infecções parasitárias de importância econômica, utilizando os Sistemas de Informações Geográficas (SIGs), permitirá o estudo da localização das áreas de risco possibilitando a implementação de um sistema de controle adaptado (BENNEMA et al., 2009).

Fatores climáticos promovem condições favoráveis ao desenvolvimento do hospedeiro intermediário (LESSA, 1995), sendo o controle desses, baseado em métodos ecológicos, químicos e biológicos (ACHA;SZYFRES, 2003). Porém, antes de se empreender um controle de caramujos deve-se realizar um levantamento da

área em relação ao habitats desses hospedeiros para determinar se são localizados ou difusos (URQUHART et al., 1996).

O controle ecológico consiste na modificação do ambiente em que o molusco vive, com a finalidade de interromper o ciclo evolutivo do *Lymnaea* (ACHA;SZYFRES, 2003). Onde for factível é importante o emprego da drenagem de áreas alagadas, e fazer a manutenção de valas e bebedouros (RADOSTITS et al., 2000). Acha e Szyfres (2003) citam que a remoção da vegetação marginal de cursos de rios previne a formação de habitats favoráveis ao desenvolvimento dos moluscos.

A aplicação de produtos químicos nos habitats do *Lymnaea* é uma das soluções, mas o emprego de molusquicidas não é generalizado pelo alto custo e seus efeitos tóxicos sobre a fauna e flora aquáticas (XIMENES et al., 1995).

Quanto ao controle biológico, alguns autores defendem o uso de palmípedes (patos e gansos) e moluscos terrestres ou aquáticos que exerçam algum tipo de predação sobre os limineídeos ainda são citados três tipos de moluscos que podem ser usados como controle biológico do *Lymnaea*: *Zonitoides nitidus* e *Oxychilus draparnaudi*, ambos moluscos terrestres, e a terceira espécie, aquática, *Physa acuta* (XIMENES et al., 1995).

A identificação e o mapeamento dos habitats dos caramujos podem subsidiar a elaboração de planos de pastoreio que evitem a utilização das áreas perigosas nos períodos de alto risco (RADOSTITS et al., 2000). Os autores citam também que a retirada do rebanho de fontes de infecção é o método de controle ideal, mas nem sempre é exequível na prática.

A divisão da pastagem de uma propriedade em áreas com e sem moluscos é importante, pois, sabendo-se que o período pré-patente da *F. hepatica* é de pelo menos 8 semanas, deve-se permitir que os animais pastem nas áreas com a presença de moluscos por no máximo o período de pré-patência antes de serem transferidos para pastagens livres de moluscos (KNUBBEN-SCHWEIZER et al., 2010).

A utilização de anti-helmintícos visa reduzir a contaminação do pasto e remover as populações de trematódeos (URQUHART et al., 1996). O momento de aplicação

de fasciolícidias contra trematóides jovens ou contra parasitos adultos depende dos padrões epidemiológicos locais (RADOSTITS et al., 2000).

2.6.1 Tratamento da fasciolose

O conhecimento da distribuição espacial das parasitoses ajuda na implementação de programas de monitoramento e controle, além de contribuir para um uso mais eficiente de antiparasitários, diminuindo o número de tratamento e conseqüentemente a resistência a medicamentos (BENNEMA et al., 2009).

Os fasciolícidias pertencem a quatro famílias químicas: fenóis halogenados (nitroxinil), salicilanilidas (closantel e oxiclozanida), as sulfonamidas (clorsulon) e os benzimidazóis (triclabendazol, albendazol e netobimina) (COSTA, 2010).

A maior parte dos esforços no controle da fasciolose é baseado na quimioprofilaxia, e muitos dos fasciolícidias comerciais são efetivos ou contra ambos estágios da *Fasciola hepática* (triclabendazole) ou formas maduras (albendazol, closantel, netobimina) do parasito (ARIAS et al., 2009).

Embora o triclabendazole (TCBZ) possua alta eficácia contra formas adultas e jovens de *F. hepática*, não é muito utilizado no rebanho leiteiro já que possui alto período residual no leite (SHI et al., 1989). A oxiclozanida é utilizada apenas nos bovinos, apresentando período de carência no leite mais curto que o da maioria dos outros trematoidícidias, porém só é ativo contra as formas adultas do parasita (RADOSTITS et al., 2000).

Mezo et al. (2008) realizaram um estudo na Galicia, Espanha, onde observaram que 66,5% das fazendas investigadas não utilizam nenhum trematoidícidia, 28,4% usam aqueles que atingem apenas formas adultas dos parasitos, 5,1% utilizam o triclabendazole como tratamento de escolha.

Em estudo realizado por Echevarria et al. (1992) foram testados tratamento de bovinos provenientes de propriedades com histórico de fasciolose, com TCBZ 4 (G1) e 2 (G2) vezes no ano, ao final de 3,5 anos o grupo controle obteve 100% dos fígados condenados, G2 8,3% e G1 nenhum fígado condenado à inspeção por

agente federal. Os autores observaram ainda em estudo paralelo que o grupo tratado com TCBZ obteve um ganho de peso significativamente maior do que os grupos tratados com nitroxinil e rafoxanida.

A resistência ao TCBZ tem sido documentada continuamente e por isso novas estratégias no tratamento da fasciolose têm-se feito necessárias (DUTHALER et al., 2010). Porém, segundo Fairweather e Boray (1999) a resistência a fasciolicidas não chega a ser considerado um problema, já que não se aproxima dos altos níveis de resistência encontrado em drogas nematodocidas.

A associação do TCBZ e clorsulon no tratamento da fasciolose hepática diminui em 95% os parasitos, enquanto que as drogas sozinhas promovem redução de aproximadamente 30% (FAIRWEATHER;BORAY, 1999).

De acordo com Duthaler et al. (2010) combinações entre drogas frequentemente são caracterizadas por aumento na atividade e tolerância à droga quando comparadas a monoterapia, além de retardar o aparecimento da resistência. Porém, pelo fato de não estarem sendo desenvolvidos novos compostos fasciolicidas deve-se fazer um manejo mais adequado das drogas existentes a fim de retardar o futuro inevitável da resistência parasitária (FAIRWEATHER;BORAY, 1999).

CAPÍTULO 1

Comparação de kits comerciais de ELISA para anticorpos no soro e leite com um teste coproprásitológico em bovinos naturalmente infectados por *Fasciola hepatica*

Artigo a ser submetido à publicação ao periódico, Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

3 Capítulo 1 – Comparação de kits comerciais de ELISA para anticorpos no soro e leite com um teste coproparasitológico em bovinos naturalmente infectados por *Fasciola hepatica*

BERNARDO, C.C.¹; AVELAR, B.R.¹; IGNACCHITI, M.D.C.²; MARTINS, I.F.V.³; PEREIRA, M.J.S.⁴

¹Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

²Professora visitante do PPGCV – UFES

³Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

⁴Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ

3.2 RESUMO

A fasciolose é uma enfermidade causada por um trematoda que acomete o fígado principalmente de ruminantes domésticos, podendo parasitar o homem e seu diagnóstico é realizado rotineiramente por exames coproparasitológicos. O objetivo do presente estudo foi comparar kits comerciais de ELISA para anticorpos no soro e leite com um teste coproparasitológico em bovinos naturalmente infectados por *Fasciola hepatica*. Foram coletadas amostras de fezes, sangue e leite de bovinos provenientes de propriedades de gado leiteiro do município de Jerônimo Monteiro, sul do estado do Espírito Santo. As amostras de fezes coletadas foram processadas pela técnica de sedimentação fecal para ovos de *F. hepatica*, que foi utilizada como padrão ouro para as análises. Amostras de sangue (92) e de leite (43) foram processadas segundo a orientação do fabricante dos respectivos Kits ELISA comerciais testados. Utilizou-se o χ^2 de McNemar para comparação estatística e calculou-se a sensibilidade e especificidade, valores preditivos e kappa. Os resultados obtidos mostram que a frequência de positividade pelo uso dos kits ELISA comerciais de soro ($\chi^2 = 34,02$) e de leite ($\chi^2 = 19,04$) diferiram significativamente ($p < 0,0001$) em relação ao exame coproparasitológico. A

sensibilidade dos Kits foi de 100%, porém possuíram baixa especificidade, 42,85% e 30% para os kits de soro e leite respectivamente. O coeficiente de Kappa mostrou concordância sofrível para os testes de soro (0,33) e de leite (0,21). Os valores preditivos positivos dos kits para soro e leite, foram respectivamente 44,61% e 38,23% sendo os valores preditivos negativos de 100% para ambos testes. Apesar da maior sensibilidade dos kits ELISA comerciais e, destes apresentarem diferença em relação ao exame coproparasitológico, na detecção dos animais positivos para *F. hepatica*, a escolha de um teste diagnóstico deve considerar o custo benefício e quando se trata da presença de parasitismo em rebanhos o tratamento é aplicado em todos os animais e assim o exame coproparasitológico para o diagnóstico da doença a campo tem maior eficiência, já que é barato e de fácil execução.

Palavras-chave: Fasciolose. Diagnóstico. *In vivo*.

3.3 ABSTRACT

The fascioliasis is a disease caused by a trematoda that affects the liver mainly from domestic ruminants and can parasite man and his diagnosis is routinely done by coprological methods. The aim of this study was to compare commercial ELISA kits for antibodies in serum and milk with a coprological test in cattle naturally infected with *Fasciola hepatica*. We collected fecal, blood and milk samples of cattle in the city of Jerônimo Monteiro, southern Espírito Santo state. Fecal samples collected were processed by the sedimentation fecal egg of *F. hepatica*, which is used as a gold standard for analyzes. Blood samples (92) and milk (43), were processed according to the manufacturer's instructions of the respective commercial ELISA kits tested. We used the McNemar chi-square for statistical comparison and calculated the sensitivity and specificity, predictive values and kappa. The results show that the frequency of positivity for the commercial serum ELISA kits ($\chi^2 = 34.02$) and milk ($\chi^2 = 19.04$) differed significantly ($p < 0.0001$) compared to sedimentation fecal egg. The sensitivity of the kits was 100%, but possessed low specificity, 42.85% and 30% serum and kits milk respectively. The kappa showed agreement of sorts for testing sera (0.33) and milk (0.21). The positive predictive value of the kits for serum and milk were respectively 44.61% and 38.23% and negative predictive values of 100% for

both tests. Despite the increased sensitivity of commercial ELISA kits, and these have any difference in relation to sedimentation fecal egg test for detection of positive animals for *F. hepatica*, the choice of a diagnostic test should consider the cost effectiveness and when it is the presence of parasites the treatment is applied to all animals, so the sedimentation fecal egg test for the diagnosis of disease in the field is more efficient since it is cheap and easy to perform.

Keywords: Fasciolosis. Diagnostic. *In vivo*.

3.4 INTRODUÇÃO

A fasciolose é a helmintose de maior prevalência que acomete o fígado de ruminantes e a que possui maior morbidade (MEZO et al., 2010). O conhecimento sobre as populações de parasitos e sobre os fatores de risco de infecção dos rebanhos podem ajudar os produtores na implementação de programas de controle que reduzam esses fatores de risco e subsidiem a recomendação de um uso estratégico de fasciolicidas (FAIRWEATHER, 2011).

Tradicionalmente o diagnóstico da fasciolose é feito por meio da detecção de ovos nas fezes ou pelo exame post-mortem (MOLLOY et al., 2005). Exames coproparasitológicos podem ser aplicados somente após o período de pré-patência, além de que, animais doentes podem não ser detectados pelo teste, sendo fonte de disseminação da doença (SÁNCHEZ-ANDRADE et al., 2000). Por outro lado o teste ELISA pode detectar infecções mais cedo do que o exame de fezes, porém anticorpos podem continuar circulantes mesmo após o sucesso no tratamento, portanto não indicando necessariamente uma infecção ativa (FAIRWEATHER, 2011).

Assim, métodos diagnósticos mais sensíveis e precoces são necessários para a diminuição dos efeitos negativos acarretados pela fasciolose (SÁNCHEZ-ANDRADE et al., 2000).

O objetivo do presente estudo foi de comparar kits comerciais de ELISA para anticorpos no soro e leite com um teste coproparasitológico em bovinos naturalmente infectados por *Fasciola hepatica*.

3.5 MATERIAL E MÉTODOS

3.5.1 Animais e amostras

No período de agosto de 2010 a agosto de 2011 foram realizadas visitas a propriedades leiteiras no município de Jerônimo Monteiro, sul do estado do Espírito Santo. Em cada propriedade visitada foram coletadas amostras de fezes de todo o rebanho em lactação (577 animais). As amostras fecais foram acondicionadas em sacolas plásticas devidamente identificadas com o nome da propriedade e do animal coletado.

Amostras de sangue e leite de 20% do rebanho em lactação foram coletadas. As amostras de sangue foram coletadas em tubos *vacutainer*, sem anticoagulante, onde foram centrifugadas a 3500 rpm por 5 minutos, para separação do soro. Os soros foram acondicionados em tubos *eppendorfs* estéreis identificados de acordo com a origem da amostra. As amostras de leite foram coletadas em tubos *Falcon* estéreis, após o descarte do primeiro jato de leite da teta de cada animal.

Todas as amostras foram encaminhadas em caixas isotérmicas ao laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (HOVET CCA-UFES). No laboratório, as amostras de fezes foram processadas segundo a técnica de sedimentação fecal para ovos de *F. hepatica* e as demais amostras foram congeladas para posterior processamento dos testes ELISA indireto. Foram selecionadas 92 amostras de soro e 43 amostras de leite provenientes de propriedades que obtiveram pelo menos 1 amostra positiva ao exame coproparasitológico, sendo estas processadas pela técnica de ELISA indireto utilizando-se Kits comerciais® BIO K 211 (empresa Bio-X - Bélgica) para detecção de anticorpos no soro e leite. Das amostras utilizadas no kit ELISA comercial, 29 amostras de soro e 13 amostras de leite, foram de animais positivos para fasciolose segundo o exame de sedimentação fecal validado por Martins et al. (2008).

3.5.2 Processamento das amostras

As amostras fecais foram submetidas ao exame coproparasitológico de sedimentação fecal para ovos de *F. hepatica* (FOREYT, 2005) validada por Martins et al. (2008) e aos testes com os kits ELISA comerciais® BIO K 211 (Empresa Bio x – Bélgica) para detecção de anticorpos no soro e no leite. O processamento das amostras analisadas por meio dos kits foi realizado segundo as instruções do fabricante.

3.5.3 Análise Estatística

Para analisar a associação entre a proporção de animais positivos ao exame de fezes e aos kits ELISA comerciais® para amostras de soro e leite, foi aplicado o teste de χ^2 de McNemar, adotando-se o nível de significância de 5%. Os indicadores de validade (sensibilidade, especificidade e valores preditivos) e de reprodutibilidade (coeficiente de kappa) foram calculados utilizando-se como padrão ouro o exame coproparasitológico de sedimentação fecal (FOREYT, 2005). Para os cálculos utilizou-se o programa estatístico BioEstat 5.0.

3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Noventa e duas amostras de soro e fezes bovinas foram processadas para as técnicas de sedimentação fecal para ovos de *F. hepatica* e para o kit ELISA comercial® para amostras de soro. Dos 29 animais positivos ao exame coproparasitológico todos também foram positivos ao ELISA e das 63 amostras negativas ao exame de fezes 27 foram consideradas negativas pelo ELISA (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação da validade e da reprodutibilidade do kit Elisa comercial® para detecção de anticorpos no soro utilizando-se como padrão o exame de sedimentação fecal para ovos de *Fasciola hepatica* (FOREYT, 2005)

ELISA para amostras de soro	Exame coproparasitológico		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	29	36	65
Negativo	0	27	27
Total	29	63	92

*McNemar: 34,02 ($p < 0,0001$); kappa: 0,33

A freqüência de fasciolose hepática é de 70,65% no kit ELISA comercial® e de 31,52% no exame coproparasitológico diferindo significativamente ($p < 0,0001$). O maior número de animais positivos detectados pelo imunoensaio pode ser explicado, pois entre 1 a 4 semanas pós-infecção os anticorpos contra *F. hepatica* podem ser detectados (MEZO et al., 2010) e apenas após 70 dias da infecção é que os ovos do parasito começam a aparecer nas fezes (REICHEL, 2002).

A sensibilidade do kit comercial para amostras de soro bovino foi de 100%, porém a especificidade foi baixa, 42,85%. Explica-se a baixa especificidade por ter sido utilizado como padrão o exame de fezes, considerado uma técnica diagnóstica de baixa sensibilidade. Martins et al. (2008) encontraram sensibilidade de 59,8% para a técnica de sedimentação fecal para ovos de *F. hepatica*.

Sánchez-Andrade et al. (2000) encontraram sensibilidade e especificidade de 92% e 94,4% respectivamente, utilizando ELISA indireto para amostras de soro bovino. Outros autores também encontraram resultados altos de sensibilidade e especificidade quando utilizaram o teste ELISA para detecção de anticorpos no soro de bovinos, como Molloy et al. (2005) (98,2% e 98,3%) e Anderson et al. (1999) (86,1% e 70%). Todos os autores utilizaram como padrão o exame *post-mortem* dos animais em estudo, diferentemente do presente trabalho que utilizou como padrão um exame coproparasitológico (FOREYT, 2005).

O valor preditivo positivo (VPP) do kit ELISA para detecção de anticorpos no soro foi de 44,61% e o valor preditivo negativo (VPN) de 100%. O baixo valor do VPP pode ser explicado pela baixa especificidade do teste como comentado

anteriormente. O valor do Kappa indicou uma concordância sofrível (0,33) entre os testes (PEREIRA, 2008).

Os resultados da utilização da técnica de sedimentação fecal e do kit ELISA comercial® para detecção de anticorpos no leite estão na tabela 2.

Tabela 2. Avaliação da validade e da reprodutibilidade do kit Elisa comercial® para detecção de anticorpos no leite utilizando-se como padrão o exame de sedimentação fecal para ovos de *Fasciola hepatica* (FOREYT, 2005).

ELISA para amostras de leite	Exame coproparasitológico		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	13	21	34
Negativo	0	9	9
Total	13	30	43

*McNemar: 19,04 ($p < 0,0001$); kappa: 0,21

A frequência de fasciolose encontrada pelo kit ELISA comercial ® para amostras de leite foi de 79,07% e pelo exame coproparasitológico foi de 30,23%. Há evidências estatísticas de diferenças significativas ($p < 0,0001$) entre a proporção de indivíduos positivos detectados pelo kit ELISA comercial® e pelo exame de fezes (FOREYT, 2005) o que pode ser justificado pela baixa sensibilidade da técnica de sedimentação fecal para ovos de *F. hepatica*.

A sensibilidade e a especificidade do kit ELISA comercial® para detecção de anticorpos no leite foi de 100% e 30% respectivamente. Reichel et al. (2005) encontraram sensibilidade de 95% e especificidade de 98,2% em kit ELISA comercial® (Instituto Pourquier, França) para amostras individuais de leite bovino, utilizando como padrão os resultados obtidos a partir de teste ELISA para amostras de soro, o que explicaria a diferença de resultados entre os trabalhos.

Utilizando bovinos positivos ao exame coproparasitológico de sedimentação e flutuação e amostras negativas provenientes de animais pertencentes a áreas não endêmicas para fasciolose, Molloy et al. (2005) encontraram valores de sensibilidade e especificidade para um kit ELISA comercial® (Instituto Pourquier, França) para amostras de leite, respectivamente de 97,7% e 99,3%, diferente do presente estudo que utilizaram animais positivos e negativos ao exame coproparasitológico de

sedimentação, provenientes de área endêmica para fasciolose, com a finalidade de avaliar os testes, de fezes e ELISA, em condições de campo.

A partir de amostras obtidas de animais provenientes de área endêmica para fasciolose, Salimi-Bejestani et al. (2007) encontraram sensibilidade e especificidade de 92% e 88% no ELISA para amostras de leite quando considerado o ELISA para detecção de anticorpos no soro como padrão ouro. Também Duscher et al.(2011) avaliaram e testes comerciais (ELISA para amostras de soro e leite) e relacionaram com o exame coproparasitológico, encontrando maior proporção de animais positivos no exame sorológico, resultados que também discordam do presente estudo, que encontraram proporção maior no leite, apesar do número de amostras ter sido diferente. Não há evidência de que o período de lactação do animal influencie na sensibilidade do teste ELISA para detecção de anticorpos no leite (SALIMI-BEJESTANI et al., 2007).

O VPP para esse teste foi de 38,23% e o VPN de 100%. O coeficiente de Kappa (0,21) indicou concordância sofrível entre as técnicas (PEREIRA, 2008). Os valores preditivos são influenciados pela sensibilidade e especificidade das técnicas e também pela prevalência da enfermidade em estudo. No presente estudo o valor preditivo positivo baixo deve-se a baixa especificidade do ELISA.

Apesar da alta sensibilidade do kit Elisa comercial®, deve-se ter em mente que mesmo com o sucesso do tratamento da fasciolose bovina, tais animais ainda persistem com altos níveis de imunoglobulinas circulantes, não diferenciando infecções ativas de precedentes (IBARRA et al.,1998). Tendo em vista tal fato sugere-se que o exame coproparasitológico seja de extrema importância, principalmente do ponto de vista epidemiológico da doença, já que exames imunológicos para detecção de anticorpos não podem diferenciar infecções ativas e passadas.

No Espírito Santo, a prevalência de condenação de fígados por fasciolose bovina ao abate está em torno de 30% (BERNARDO et al., 2011) o que resulta em preocupação dos criadores em diagnosticar os animais positivos precocemente, antes que haja danos ao fígado e principalmente para que seja possível evitar a contaminação ambiental, evitando a infecção de novos animais.

Neste sentido, como no presente estudo o ELISA se mostrou mais sensível que o exame coproparasitológico, tendo o potencial de ser utilizado para diagnosticar e tratar infecções precoces, sendo essa a grande vantagem do ELISA.

3.7 CONCLUSÕES

Apesar da maior detecção de animais positivos pelo kit ELISA comercial®, em condições de campo e em nível de rebanho para o diagnóstico da fasciolose hepática, testes diagnósticos mais específicos são necessários para a correta identificação da enfermidade e implementação adequada de programas de controle. Além disso, na escolha de um teste diagnóstico deve-se avaliar o custo benefício e quando se trata da presença de parasitismo em rebanhos e como o tratamento é aplicado em todos os animais, o exame coproparasitológico para o diagnóstico da doença a campo tem maior eficiência, já que é barato e de fácil execução.

3.8 REFERÊNCIAS

ANDERSON, N.; WONG, T.T.; VO, N.G.; BUI, K.L.; SMOOKER, P.M.; SPITHILL, T.W. The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.83, p.15-24, 1999.

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, 2011.

DUSCHER, R.; DUSCHER, G.; HOFER, J.; TICHY, A.; PROSL, H.; JOACHIM, A. *Fasciola hepatica* – Monitoring the milky way? The use of tank milk for liver fluke monitoring in dairy herds as base for treatment strategies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.178, p.273-278, 2011.

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

FOREYT, W.J. **Parasitologia Veterinária: manual de referência**. São Paulo: Roca, 2005. 5ª edição.

IBARRA, F.; MONTENEGRO, N.; VERA, Y.; BOULARD, C.; QUIROZ, H.; FLORES, J.; OCHOA, P. Comparison of three ELISA tests for seroepidemiology of bovine fasciolosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.77, p.229-236, 1998.

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**, São Paulo, v.17, n.1, p.110-112, 2008.

MEZO, M.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; CARRO, C.; UBEIRA, F.M. Kinetics of anti-*Fasciola* IgG antibodies in serum and milk from dairy cows during lactation, and in serum from calves after feeding colostrum from infected dams. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.168, p.36-44, 2010.

MOLLOY, J.B.; ANDERSON, G.R.; FLETCHER, T.I.; LANDMANN, J.; KNIGHT, B.C. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in cattle, sheep and buffaloes in Australia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.130, p.207-212, 2005.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

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**, Amsterdam, v.1107, p.65-72, 2002.

REICHEL, M.P.; VANHOFF, K.; BAXTER, B. Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay performed in milk for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.129, p.61-66, 2005.

SALIMI-BEJESTANI, M.R.; DANIEL, R.; CRIPPS, P.; FELSTEAD, S.; WILLIAMS, D.J.L. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Fasciola hepatica* in milk. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.149, p.290-293, 2007.

SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ-SILVA, A.; SUÁREZ, J.; PANADERO, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.93, p.39-46, 2000.

CAPÍTULO 2

Comparação de um kit comercial de ELISA para detecção de coproantígenos e de um exame coproparasitológico com fígados bovinos condenados por fasciolose ao abate

2 Capítulo 2 – Comparação de um kit comercial de ELISA para a detecção de coproantígenos e de um exame coproparasitológico com fígados bovinos condenados por fasciolose ao abate

BERNARDO, C.C.¹; AVELAR, B.R.¹; IGNACCHITI, M.D.C.²; MARTINS, I.V.F.³; PEREIRA, M.J.S.⁴

¹Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

²Professora visitante do PPGCV – UFES

³Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

⁴Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ

2.2 RESUMO

A fasciolose hepática é uma enfermidade de caráter zoonótico e de alta morbidade nos animais. Objetivou-se com o presente estudo comparar um kit comercial de ELISA para a detecção de coproantígenos e um exame coproparasitológico de sedimentação utilizando-se como padrão ouro fígados bovinos condenados por fasciolose ao abate. Além disso, avaliou a correlação entre a intensidade parasitária mensurada pela contagem de ovos nas fezes e com a de parasitos ao abate. Foram coletadas as fezes e avaliados macroscopicamente os fígados de 81 bovinos, dos quais 45 tiveram os fígados condenados por fasciolose hepática ao abate, nestes realizou-se a contagem dos parasitos. Duas alíquotas das amostras de fezes coletadas foram separadas e uma delas foi armazenada em *freezer* para posterior realização do ELISA e a outra processada segundo uma técnica de sedimentação fecal para diagnóstico de ovos de *Fasciola hepatica*. Foram calculados os indicadores de validade e de reprodutibilidade. O coeficiente de correlação de Spearman e o qui-quadrado de McNemar foram utilizados, adotando-se o nível de

significância de 5%. Em oito fígados bovinos condenados por apresentarem lesões características de fasciolose, não foram encontrados exemplares do parasito. O exame coproparasitológico e o teste ELISA para detecção de coproantígenos, respectivamente, apresentaram sensibilidade de 51,11% e 75,55%, especificidade de 100% e 91,66%, valor preditivo positivo de 100% e 91,89%, valor preditivo negativo de 62% e 75% e kappa de 0,48 e 0,65. Os resultados obtidos ao abate não diferiram dos encontrados pelo kit ELISA comercial® ($p=0,0574$), mas o exame coproparasitológico diferiu ($p<0,0001$) do abate na detecção de animais positivos. A correlação entre o número de parasitos no fígado e o número de ovos nas fezes é moderada ($\rho=0,5757$, $p<0,0001$). O kit ELISA comercial® foi mais sensível do que o exame coproparasitológico, embora este não deva ser descartado devido a sua eficiência.

Palavras-chave: *Fasciola hepatica*. Bovino. Imunodiagnóstico.

2.3 ABSTRACT

The hepatic fascioliasis is a zoonotic disease of high morbidity in animals. The aim of this study was to compare a commercial ELISA kit for detection on coproantigen examination and fecal sedimentation using as gold standard bovine livers condemned at slaughterhouse for fascioliasis. In addition, we evaluated the correlation between the measured intensity of infection by counting eggs in the feces and the parasites in bovine livers. Feces were collected and evaluated macroscopically of 81 cattle livers, 45 of which had livers condemned by liver flukes and in these livers parasites were counted. Two aliquots of stool samples collected were separated and one stored in freezer for further ELISA and other one processed according to sedimentation technique for diagnosis *Fasciola hepatica*. Were calculated the indicators of validity and reproductibility. The Spearman correlation and McNemar chi-square were used, adopting the significance of 5%. In eight bovine livers condemned by the characteristic lesions of fascioliasis parasite were not found. The stool examinations and ELISA testing for detection coproantigen, respectively, had sensitivity of 51.11% and 75.55%, specificity of 100% and 91,66%, predictive positive value was 100% and 91.89%, predictive negative value 62% and 75% and kappa 0.48 and 0.65. The results obtained at slaughterhouse did not differ from those found

by commercial ELISA kit® ($p=0.06$), but the stool examinations differed ($p<0.0001$) in the detection of the positive animals. The correlation between the number of parasites in the liver and the number of eggs in the feces was moderate ($r_s=0.5757$, $p<0,0001$). The commercial ELISA kit® was more sensitive than the fecal test, although this one should not be discarded because of their efficiency.

Keywords: *Fasciola hepatica*. Bovine. Immunodiagnosis.

2.4 INTRODUÇÃO

Fasciola hepatica é um importante trematoda que pode causar infecções crônicas e agudas nos ruminantes, resultando em doença clínica e queda de produção (LECLIPTEUX et al., 1998).

O exame coproparasitológico é o teste de rotina no diagnóstico da fasciolose em locais onde não se tem acesso à tecnologia avançada (MATTOS et al., 2009). No entanto, técnicas que detectam antígenos nas fezes de hospedeiros infectados vêm sendo estudadas (ALMAZÁN et al., 2001) para um diagnóstico mais precoce e acurado da fasciolose. Flanagan et al. (2011) citam que os exames de detecção de coproantígenos diagnosticam a doença mais precocemente do que os exames coproparasitológicos.

Embora novos métodos de detecção de antígenos venham sendo empregados para o diagnóstico da fasciolose, principalmente em seu estágio inicial, esses não determinam informações epidemiológicas importantes para o ciclo biológico da *F. hepatica* e nem substituem o diagnóstico por exame de fezes (KLEIMAN et al., 2005). Além disso, segundo Anderson et al. (1999), os valores preditivos para os testes de diagnóstico para detectar infecções por *Fasciola* não são conhecidos.

Embora a doença clínica possa ocorrer três semanas pós-infecção o exame de fezes apenas pode confirmar o diagnóstico de fasciolose aproximadamente dez semanas depois da ingestão das metacercárias (LECLIPTEUX et al., 1998). Já o teste ELISA para detecção de coproantígenos pode detectar a doença a partir da quarta semana pós-infecção (ALMAZÁN et al., 2001).

Os objetivos do presente estudo foram avaliar a validade e a reprodutibilidade de um kit comercial de ELISA para detecção de coproantígenos e um exame coproparasitológico de sedimentação fecal para ovos de *F. hepatica* (FOREYT, 2005) utilizando como padrão ouro a condenação de fígados bovinos por fasciolose ao abate. Além disso, avaliou-se a correlação entre as contagens de ovos do parasito nas fezes e a de parasitos no fígado.

2.5 MATERIAL E MÉTODOS

2.5.1 Amostras

Avaliaram-se macroscopicamente 81 fígados bovinos de animais abatidos no matadouro frigorífico do município de Atílio Vivácqua, onde foram coletadas amostras de fezes de todos os animais acompanhados. Desses 81, 45 fígados foram condenados por fasciolose, sendo esses órgãos avaliados quanto ao número de parasitos presentes. Amostras de fezes de 36 bovinos que não tiveram seus fígados condenados para nenhuma enfermidade, também foram coletadas.

Amostras de fezes foram coletadas dos 81 bovinos e encaminhadas ao laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, em caixas isotérmicas e devidamente identificadas quanto ao animal de origem. No laboratório foram separadas duas alíquotas, sendo uma destinada ao exame coproparasitológico para ovos de *F. hepatica* (FOREYT, 2005) e a outra armazenada em *freezer* para posterior processamento pela técnica de ELISA indireto para detecção de coproantígenos.

4.5.2 Processamento das amostras

O exame coproparasitológico de sedimentação fecal para ovos de *F. hepatica* foi realizado segundo a técnica descrita por Foreyt, (2005) e validada por Martins et al. (2008).

O processamento do imunodiagnóstico foi realizado segundo instruções do fabricante do kit ELISA comercial® BIO K 201 (Empresa Bio x – Bélgica) para detecção de coproantígenos, nas amostras de fezes.

4.5.3 Análise estatística

Os indicadores de validade (sensibilidade, especificidade, valores preditivos) e indicador kappa das técnicas de sedimentação fecal e ELISA indireto para coproantígenos foram calculados considerando-se como padrão ouro os fígados condenados por fasciolose ao abate.

O coeficiente de correlação de Spearman foi calculado para avaliar a correlação entre o número de ovos contados ao exame de fezes e o número de parasitos no fígado. O teste de qui-quadrado de McNemar foi empregado para avaliar a associação da freqüência de fasciolose ao exame coproparasitológico e ao kit ELISA comercial® em relação a condenação de fígados bovinos ao abate. O programa estatístico Bioestat 5.0 foi empregado para os cálculos estatísticos.

4.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 são apresentados os resultados do exame coproparasitológico e da condenação de fígados por fasciolose ao abate. Das 81 amostras coletadas (Tabela 1), 45 foram processadas segundo a técnica de sedimentação fecal validada por Martins e colaboradores (2008), sendo que destas 37 apresentavam um (1) ou mais parasitos no fígado.

Tabela 1. Avaliação da validade e da reprodutibilidade do exame de sedimentação fecal para ovos de *Fasciola hepatica* (FOREYT, 2005) frente à condenação de fígados por fasciolose bovina ao abate.

Exame coproparasitológico	Condenação de fígados ao abate		Total
	Sim	Não	
Positivo	23	0	23
Negativo	22	36	58
Total	45	36	81

*McNemar= 20,04 ($p < 0,0001$); kappa= 0,48

Dos 45 fígados condenados 37 apresentavam um (1) ou mais parasitos no fígado. Em oito fígados bovinos com lesões características causadas pela presença de *F. hepatica* não se encontrou ao exame macroscópico nenhum exemplar do

parasito, fato que pode ser explicado por um tratamento químico bem sucedido, porém tardio.

A sensibilidade e especificidade do exame coproparasitológico foi de 51,11% e 100% respectivamente. Esses resultados concordam com os achados de Martins et al. (2008) que utilizando a mesma técnica de sedimentação encontraram sensibilidade de 59,8% e especificidade de 100%. Anderson et al. (1999) utilizaram uma técnica modificada de sedimentação para recuperação de larvas de nematóides no diagnóstico da fasciolose e encontraram 66,7% e 100% de sensibilidade e especificidade usando como padrão ouro a presença de parasitos no fígado. A sensibilidade baixa dos exames de fezes está relacionada com o longo período de pré-patência, já que somente após a decorrência deste é que os ovos do parasito podem ser detectados nas fezes (LECLIPTEUX et al., 1998).

O valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) do exame de sedimentação fecal para ovos de *F. hepatica* foram respectivamente de 100% e 62%. O valor preditivo negativo reflete a baixa sensibilidade do teste assim como o positivo reflete a boa especificidade do exame de sedimentação fecal, além disso, reflete o contexto epidemiológico, pois a prevalência da enfermidade influencia nesses indicadores (PEREIRA, 2008). Anderson et al. (1999) encontraram VPP de 100% e VPN de 46% e atribuíram essa diferença a dificuldade dos testes coproparasitológicos em estimarem o número de ovos de *F. hepatica* no grande volume de fezes de grandes ruminantes. A concordância entre o exame coproparasitológico e a condenação de fígados ao abate ($\kappa=0,48$) é considerada regular (PEREIRA, 2008).

O teste de Qui-quadrado de McNemar (20,04) mostra evidências estatísticas de associação altamente significativa ($p<0,0001$) entre as freqüências de fasciolose obtidas pela condenação de fígados ao abate (56%) e ao exame coproparasitológico (28%) de sedimentação fecal, o que se já era esperado devido a baixa sensibilidade do exame coproparasitológico

A correlação moderada ($\rho=0,5757$, $p<0,001$) observada neste estudo, corrobora os achados de Anderson et al. (1999) e Flanagan et al. (2011) que relataram não haver uma relação entre o número de parasitos e o número de ovos encontrados no exame de sedimentação fecal pela sua liberação ser irregular.

No presente estudo, nas amostras fecais de animais com maior número de parasitos no fígado, a contagem de ovos nas fezes também foi maior, corroborando Anderson et al. (1999), fato que torna mais fácil o diagnóstico da enfermidade.

Na tabela 2 são apresentados os resultados do teste ELISA comercial® BIO K 201 (Empresa BIO x – Bélgica) para detecção de coproantígenos e os resultados da condenação de fígados.

Das 37 amostras positivas ao ELISA, oito (8) (21,62%) foram provenientes de animais cujos fígados foram condenados, porém não se encontrou parasitos no órgão, o que pode ser explicado por um tratamento eficaz, porém tardio.

O fato de 3 (8,1%) animais negativos a linha de inspeção para fasciolose hepática reagirem ao Elisa, sugere uma possível reação cruzada com outras parasitoses. Alguns autores encontraram semelhanças antigênicas entre antígenos de *Schistosoma mansoni* e *F. hepatica* (ARONSTEIN et al., 2009; DE ALMEIDA et al., 2007), mas nenhum deles utilizou o ELISA como forma de diagnóstico. Porém, Hassan et al. (1989) encontraram reação cruzada entre *Schistosoma*, *Fasciola* e *Heterophyes* quando utilizaram o ELISA para detecção de coproantígenos.

Tabela 2. Avaliação da validade e da reprodutibilidade do teste ELISA comercial® em relação à condenação de fígados por fasciolose bovina ao abate.

Teste ELISA	Condenação de fígados ao abate		Total
	Sim	Não	
Positivo	34	3	37
Negativo	11	33	44
Total	45	36	81

*McNemar^{ns}; kappa=0,65.

No presente estudo, a sensibilidade do kit comercial foi de 75,55% e a especificidade de 91,66%. Charlier et al. (2008), utilizando kit ELISA comercial® (Instituto Pourquier – França), encontraram sensibilidade de 94% e a especificidade de 93% para o teste ELISA para detecção de coproantígenos em amostras bovinas. Spino e Finlay (1994), em estudo realizado em humanos, observaram correlação entre os níveis de coproantígenos e o grau de parasitismo do hospedeiro, tal fato pode justificar a baixa sensibilidade encontrada no presente estudo já que 39

(86,7%) dos 45 animais positivos ao abate possuíam 10 ou menos parasitos no fígado.

Almazán e colaboradores (2001) encontraram sensibilidade de 93,3% quando utilizaram amostras fecais de ovinos, e reafirmaram que níveis de antígenos de excreção e secreção de *F. hepatica* podem ser detectados a partir da quarta semana pós-infecção.

Os valores preditivos positivos e negativos do kit Elisa comercial® BIO K 201 foram de 91,89% e de 75%, respectivamente. Estes resultados são em função da sensibilidade e especificidade altas do teste, mas também da alta prevalência da enfermidade. A sensibilidade e a especificidade são características inerentes ao teste, mas os valores preditivos do teste podem ser alterados conforme o contexto epidemiológico. Em baixas prevalências o valor preditivo positivo é baixo, necessitando de um teste mais específico para diminuir o número de falsos positivos, enquanto que o valor preditivo negativo quase não se altera. (PEREIRA, 2008).

Em estudo realizado para avaliação do sucesso do tratamento da fasciolose com o triclabendazole, Flanagan et al. (2011) observaram que apenas após a 14 semana pós-tratamento é que o número de ovos cai 95% e os níveis de coproantígenos não podem mais ser detectados nas fezes do hospedeiro, o que pode justificar o diagnóstico positivo das amostras provenientes dos animais cujos fígados foram condenados, porém, não se encontrou nenhum exemplar de *F. hepatica*.

No presente trabalho, a prevalência estimada da fasciolose hepática foi de 45,68% (37/81) utilizando-se o kit ELISA comercial®, 28,39% (23/81) para o exame copoparasitológico. A prevalência real, que é mensurada utilizando-se o padrão ouro, neste caso o abate, foi de 55,55%. Anderson et al. (1999) estimaram a prevalência da fasciolose bovina utilizando os métodos copoparasitológico e ELISA, e relataram valores semelhantes (78%) entre esses testes sugerindo que num estudo de grupo, seria recomendado o uso do exame de fezes por ser menos oneroso

Neste estudo, não há evidências estatísticas de associação ($p=0,06$) entre as frequências de fasciolose obtidas pela condenação de fígados ao abate e pelo kit ELISA comercial® indicando que produzem resultados similares. O indicador kappa (0,65) também mostra que a concordância é boa (PEREIRA, 2008) entre essas formas de diagnóstico.

Reichel (2002) relata a importância das técnicas que detectam ovos nas fezes não só por selecionar animais positivos e determinar um padrão de infecção, servindo como ponto de partida para outras análises. Mattos et al. (2009) afirmam que em algumas regiões onde não é possível a realização de técnicas diagnósticas mais avançadas, o exame de rotina é o exame de fezes. Faria et al. (2008) deixam claro que na escolha da técnica de diagnóstico para fasciolose hepática deve-se levar em consideração não apenas a eficácia do teste, mas a operacionalização com o objetivo de reduzir tempo e custo, portanto a eficiência do teste deve ser avaliada.

2.6 CONCLUSÕES

Embora o kit ELISA comercial® tenha apresentado sensibilidade maior do que o exame coproparasitológico, os testes são semelhantes para os demais indicadores de validade, apresentando reprodutibilidade boa e regular, respectivamente. Assim, não se exclui o uso do exame de fezes, pois se deve levar em consideração a eficiência do exame traduzida pelo baixo custo e fácil execução.

2.7 REFERÊNCIAS

ALMAZÁN, C.; AVILA, G.; QUIROZ, H.; IBARRA, F.; OCHOA, P. Effect of parasite burden on the detection of *Fasciola hepatica* antigens in sera and feces of experimentally infected sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.97, p.101-112, 2001.

ANDERSON, N.; WONG, T.T.; VO, N.G.; BUI, K.L.; SMOOKER, P.M.; SPITHILL, T.W. The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.83, p.15-24, 1999.

ARONSTEIN, W.S.; LEWIS, S.A.; NORDEN, A.P.; DALTON, J.P.; STAND, M. Molecular identity of a major antigen of *Schistosoma mansoni* which cross-reacts with *Trichinella spiralis* and *Fasciola hepatica*. **Parasitology**, Cambridge, v.92, n.1, p.133-151, 2009.

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

DE ALMEIDA, M.A.; FERREIRA, M.B.; PLANCHART, S.; TERASHIMA, A.; MACO, V.; MARCOS, L.; GUTUZZO, E.; SÁNCHEZ, E.; NÁQUIRA, C.; SCORZA, J.V.; INCANI, R.N. Preliminary antigenic characterisation of na adult worm vomit preparation of *Fasciola hepatica* by infected humam sera. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.49, n.1, p.31-35, 2007.

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

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, p.170-176, 2011.

FOREYT, W.J. **Parasitologia Veterinária: manual de referência**. São Paulo: Roca, 2005. 5ª edição.

HASSAN, M.M.; FARGHALY, A.M.; EL-GAMAL, R.L.; EL-RIDI, A.M. Cross-reactions in immunodiagnosis of patients infected with *Schistosoma*, *Fasciola* and *Heterophyes* using ELISA. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, Cairo, v.19, n.2, p.845-851, 1989.

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

LECLIPTEUX, Th.; TORGERSON, P.R.; DOHERTY, M.L.; MCCOLE, D.; PROTZ, M.; FARNIR, F.; LOSSON, B. Use of excretory/secretory antigens in a competition test to follow the kinetics of infection by *Fasciola hepatica* in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.77, p.103-114, 1998.

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**, São Paulo, 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 FZVA**, Uruguaiana, v.16, n.1, p.105-112, 2009.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, 12ª edição.

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**, Amsterdam, v.1107, p.65-72, 2002.

SPINO, A.M.; FINLAY, C.M. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of excretory secretory antigens in humans with fascioliasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.1, p.190-193, 1994.

5 CONCLUSÕES FINAIS

Com os resultados desse estudo ficou claro que os imunodiagnósticos possuem uma maior sensibilidade do que o exame de sedimentação fecal no diagnóstico da fasciolose bovina. Porém alguns dos testes imunológicos não conseguem diferenciar infecções ativas de passadas, não fornecendo informações epidemiológicas importantes para a implementação de medidas preventivas de controle e para o tratamento da enfermidade.

Técnicas de diagnóstico que possuam maior acurácia, que sejam menos trabalhosas e de menor custo são importantes para que haja um melhor suporte nas estratégias de controle das parasitoses. O alto custo dos imunodiagnósticos é um fator impeditivo para a ampla distribuição deste tipo de diagnóstico, principalmente quando se trata de rebanhos em pequenas propriedades. Em contra partida os exames coproparasitológicos possuem baixo custo, porém a sensibilidade é menor do que as encontradas no ELISA.

Portanto é fundamental que haja um equilíbrio entre a eficácia do teste e a parte operacional deste, para que assim possa haver formas de diagnóstico de mais fácil acesso por parte dos proprietários de animais portadores de fasciolose.

6 REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals: parasitoses**. Washington: Scientific and Technical Publication. 2003.

ALMAZÁN, C.; AVILA, G.; QUIROZ, H.; IBARRA, F.; OCHOA, P. Effect of parasite burden on the detection of *Fasciola hepatica* antigens in sera and feces of experimentally infected sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.97, p.101-112, 2001.

ANDERSON, N.; WONG, T.T.; VO, N.G.; BUI, K.L.; SMOOKER, P.M.; SPITHILL, T.W. The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.83, p.15-24, 1999.

ARIAS, M.S.; SUÁREZ, J.L.; HILLYER, G.V.; FRANCISCO, I.; CALVO, E.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; DÍAZ, P.; FRANCISCO, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P.; PAZ-SILVA, A. A recombinant-based ELISA evaluating the efficacy of netobimim and albendazol in ruminants with naturally acquired fascioliasis. **The Veterinary Journal**, Londres, v.182, p.73-78, 2009.

ARONSTEIN, W.S.; LEWIS, S.A.; NORDEN, A.P.; DALTON, J.P.; STAND, M. Molecular identity of a major antigen of *Schistosoma mansoni* which cross-reacts with *Trichinella spiralis* and *Fasciola hepatica*. **Parasitology**, Cambridge, v.92, n.1, p.133-151, 2009.

BENNEMA, S.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOUT, E.; SCHNIEDER, T.; STRUBE, C.; DUCHEYNE, E.; HENDRICKX, G.; CHARLIER, J. The use of bulk-tank milk ELISAs to assess the spatial distribution of *Fasciola hepatica*, *Ostertagia ostertagi* and *Dictyocaulus viviparus* in dairy cattle in Flanders (Belgium). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.165, p.51-57, 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, 2011.

BERNARDO, C.C.; FAZIO JUNIOR, P.I.; DEMONER, L.C.; NUNES, L.C.; MARTINS, I.V.F. Estabelecimento de foco de *Fasciola hepatica* em bovinos de uma propriedade de cagdo de corte em Alegre, Espírito Santo. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. 14. 2006. Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: São Paulo. 2006. p.266.

BORDIN, E.L. Revisão da anatomia patológica da fasciolose bovina. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre: edição extra, n.1, p.33-35,1995.

BOSTELMANN, S.C.W.; LUZ, E.; THOMAZ SOCCOL, V.; CIRIO, S.M. Histopatologia comparativa em fígados bovinos, bubalinos e ovinos infectados por *Fasciola hepatica*. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.5, p.95-100, 2000.

CHARLIER, J.; DUCHATEAU, L.; CLAEREBOUT, E.; WILLIANS, D.; VERCRUYSSSE, J. Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody levels in bulk-tank milk samples and production parameters in dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Fort Collins, v.78, p.55-66, 2007.

CHARLIER, J.; MEULEMEESTER, L.D.; CLAEREBOUT, E.; WILLIANS, D.; VERCRUYSSSE, J. Qualitative and quantitative evaluation of coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.153, p.44-51, 2008.

CORNELISSEN, J.B.W.J.; GAASENBEEK, C.P.H.; BOERSMA, W.; BORGSTEEDE, F.H.M.; MILLIGEN, F.J.V. Use of a pre-selected epitope of cathepsin-L1 in a highly specific peptide-based immunoassay for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *International Journal for Parasitology*, New York, v.29, p.685-696, 1999.

CORNELISSEN, J.B.W.J.; GAASENBEEK, C.P.H.; BORGSTEEDE, F.H.M.; HOLLAND, W.G.; HARMSSEN, M.M.; BOERSMA, W.J.A. Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepática* cathepsin L-like protease. **International Journal for Parasitology**, Nova York, v.31, p.728-737, 2001.

COSTA, A.M.C.B. Fasciolose bovina: aspectos clínicos e epidemiológicos no Alentejo. **Universidade Técnica de Lisboa**, Lisboa, 2010. Disponível em: <<http://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/2485>>. Acesso em: 25 ago. 2011.

DE ALMEIDA, M.A.; FERREIRA, M.B.; PLANCHART, S.; TERASHIMA, A.; MACO, V.; MARCOS, L.; GUTUZZO, E.; SÁNCHEZ, E.; NÁQUIRA, C.; SCORZA, J.V.; INCANI, R.N. Preliminary antigenic characterisation of na adult worm vomit preparation of *Fasciola hepatica* by infected humam sera. **Revista do Institutuo de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.49, n.1, p.31-35, 2007.

DUSCHER, R.; DUSCHER, G.; HOFER, J.; TICHY, A.; PROSL, H.; JOACHIM, A. *Fasciola hepatica* – Monitoring the milky way? The use of tank milk for liver fluke monitoring in dairy herds as base for treatment strategies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.178, p.273-278, 2011.

DUTHALER, U.; SMITH, T.A.; KEISER, J. In vivo and in vitro sensitivity of *Fasciola hepatica* to triclabenzole combined with Artesunate. Artemether, or OZ78. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, Washington, v.54, n.11, p.4596-4604, 2010.

ECHEVARRIA, F.M.A.; CORREA, M.B.C.; WEHRLE, R.D.; CORREA, I.F. Experiments on anthelmintic control of *Fasciola hepatica* in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.43, p.211-222, 1992.

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

FAIRWEATHER, I.; BORAY, J.C. Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. **The Veterinary Journal**, Londres, v.158, n.2, p.81-112, 1999.

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

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, p.170-176, 2011.

FOREYT, W.J. **Parasitologia Veterinária: manual de referência**. São Paulo: Roca, 2005. 5ª edição.

FUENTES, M.V. Proposal of a Geographic Information System for modeling zoonotic fasciolosis transmission in the Andes. **Parasitología Latinoamericana**, Santiago, v.59, p.51-55, 2004.

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

GREINER, M.; GARDNER, I.A. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. **Preventive Veterinary Medicine**, Fort Collins, v.45, p.3-22, 2000.

HASSAN, M.M.; FARGHALY, A.M.; EL-GAMAL, R.L.; EL-RIDI, A.M. Cross-reactions in immunodiagnosis of patients infected with *Schistosoma*, *Fasciola* and *Heterophyes* using ELISA. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, Cairo, v.19, n.2, p.845-851, 1989.

HATSCHBACH, P.I. A *Fasciola hepatica* e sua história. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre: edição extra, n.1, p.37-39, 1995.

IBARRA, F.; MONTENEGRO, N.; VERA, Y.; BOULARD, C.; QUIROZ, H.; FLORES, J.; OCHOA, P. Comparison of three ELISA tests for seroepidemiology of bovine fasciolosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.77, p.229-236, 1998.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Manole, 2000. 6ª edição.

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

KNUBBEN-SCHWEIZER, G.; RÜEGG, S.; TORGERSON, P.R.; GRIMM, F.; HÄSSIG, M.; DEPLAZES, P.; BRAUN, U. Control of bovine fasciolosis in dairy cattle in Switzerland with emphasis on pasture management. **The Veterinary Journal**, Londres, v.186, p.188-191, 2010.

LECLIPTEUX, Th.; TORGERSON, P.R.; DOHERTY, M.L.; MCCOLE, D.; PROTZ, M.; FARNIR, F.; LOSSON, B. Use of excretory/secretory antigens in a competition test to follow the kinetics of infection by *Fasciola hepatica* in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.77, p.103-114, 1998.

LESSA, C.S.S. Sugestões para controle estratégico da *Fasciola hepatica* com Ivomec F (ivermectin e clorsulon), considerando outros parasitos regionais importantes. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre: edição extra, n.1, p.37-39, 1995.

LIMA, W.S.; SOARES, L.R.M.; BARÇANTE, T.A.; GUIMARAES, 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.

MARCOS, L.A.; YI, P.; MACHICADO, A.; ANDRADE, R.; SAMALVIDE, S.F.; SÁNCHEZ, J.; TERESHIMA, A. Hepatic fibrosis and *Fasciola hepatica* infection in cattle. **Journal of Helminthology**, Cambridge, v.81, p.381-386, 2007.

MARTÍNEZ, A.; MARTÍNEZ-CRUZ, M.S.; MARTÍNEZ, F.J.; GUTIERREZ, P.N.; HERNÁNDEZ, S. Detection of antibodies to *Fasciola hepatica* excretory-secretory antigens in experimentally infected goats by enzyme immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.62, p.247-252, 1996.

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**, São Paulo, v.17, n.1, p.110-112, 2008.

MARTINS, I.V.F.; PEREIRA, B.J.; LIMA, V.R.; BERNARDO, C.C. **Caderno de Parasitologia Veterinária**. Alegre:EDUFES. 2007.

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

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 FZVA**, Uruguaiana, v.16, n.1, p.105-112, 2009.

MCCANN, C.M.; BAYLIS, M.; WILLIAMS, D.J.L. The development of linear regression models using environmental variables to explain the spatial distribution of *Fasciola hepatica* infection in dairy herds in England and Wales. **International Journal for Parasitology**, Nova York, v.40, p.1021-1028, 2010.

MEZO, M.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; CARRO, C.; UBEIRA, F.M. Kinetics of anti-*Fasciola* IgG antibodies in serum and milk from dairy cows during lactation, and in serum from calves after feeding colostrum from infected dams. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.168, p.36-44, 2010a.

MEZO, M.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; MUIÑO, L.; UBEIRA, F.M. Field evaluation of the MM3-SERO ELISA for detection of anti-*Fasciola* IgG antibodies in milk samples from individual cows and bulk milk tanks. **Parasitology International**, Amsterdam, v.59, p.610-615, 2010b.

MEZO, M.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; UBEIRA, F.M. Evaluation of the flukicide treatment policy for dairy cattle in Galicia (NW Spain). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.157. p.235-243. 2008.

MEZO, M.; GÓNZALEZ-WARLETA, M.; UBEIRA, F.M. The use of MM3 monoclonal antibodies for the early immunodiagnosis of ovine fasciolosis. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.93, n.1., p.65-72, 2007.

MOLLOY, J.B.; ANDERSON, G.R.; FLETCHER, T.I.; LANDMANN, J.; KNIGHT, B.C. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in cattle, sheep and buffaloes in Australia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.130, p.207-212, 2005.

MÜLLER, G.; BERNE, M.E.A.; RAFFI, L.L.; JESUS, L.P.; PAULSEN, R.M.M.; SINKOC, A.L. Influência da temperatura no longevidade infective de metacercárias de *Fasciola hepatica*. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 5, n. 2, p 164-165, 1999.

OLIVEIRA, S.M; FUJII, T.V.; 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**, São Paulo, v.69, n.1, p.29-37, 2002.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, 12^a edição.

PILE, E.; SANTOS, J. A. A.; PASTORELLO, T.; VASCONCELLOS. M. *Fasciola hepatica* em búfalos (*Bubalus bubalis*) no município de Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. **Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.38, n1, 2001.

QUEIROZ, V.S.; LUZ, E.; LEITE, L.C.; CÍRIO, S.M.; *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae): estudo epidemiológico nos municípios de Boicaiúva do Sul e Tunas do Paraná (Braisil). **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, v.31, p.99-111, 2002.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan. 2000.

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**, Amsterdam, v.1107, p.65-72, 2002.

REICHEL, M.P.; VANHOFF, K.; BAXTER, B. Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay performed in milk for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.129, p.61-66, 2005.

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**, Porto Alegre: edição extra, n.1, p.23-26, 1995.

SALIMI-BEJESTANI, M.R.; DANIEL, R.; CRIPPS, P.; FELSTEAD, S.; WILLIAMS, D.J.L. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Fasciola hepatica* in milk. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.149, p.290-293, 2007.

SALIMI-BEJESTANI, M.R.; MCGARRY, J.W.; FELSTEAD, S.; ORTIZ, P.; AKCA, A.; WILLIAMS, D.J.L. Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. **Research in Veterinary Science**, Londres, v.78, p.177-181, 2005.

SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ-SILVA, A.; SUÁREZ, J.; PANADERO, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.93, p.39-46, 2000.

SERRA-FREIRE, N.M. Epizootiologia da fasciolose hepática no Brasil e o avanço da zoonose pouco discutida. In: Semana Capixaba do Médico Veterinário e II Encontro Regional de Saúde Pública em Medicina Veterinária. 35. 2008. Guarapari. **Anais...** Guarapari: SESC. 2008. p.1-10.

SERRA-FREIRE, N.M. Fasciolose hepática. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre: edição extra, n.1, p.13-18,1995.

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

SHI, F.H.; LIN, B.F.; QIAN, C.G.; LI, M.; FANG, M.B.; MA, J.L.; SHEN, W.; WANG, S.W.; JIAN, X.L. The efficacy of triclabendazole (Fasinex) against immature and adult *Fasciola hepatica* in experimentally infected cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.33, p.117–124, 1989.

SPINO, A.M.; FINLAY, C.M. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of excretory secretory antigens in humans with fascioliasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.1, p.190-193, 1994.

TOSTES, R.A.; SANTAREM, V.A.; ALBERTI, H.; SANCHES, O.C. Casos autóctones de *Fasciola hepatica* na região de Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.3, p.961-962, 2004.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996.

VALERO, M.A.; UBEIRA, F.M.; KHOUBBANE, M.; ARTIGAS, P.; MUIÑO, L.; MEZO, M.; PÉREZ-CRESPO, I.; PERIAGO, M.V.; MAS-COMA, S. MM3-ELISA evaluation of coproantigen release and sérum antibody production in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* e *F. gigantica*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.159, p.77-81, 2009.

VIEIRA, N. P.; FARIA, P. B.; MATTOS, M. R.; PEREIRA, A. A. Condenação de fígados bovinos na região sul do estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n.6, p.1605-1608, 2011.

VIGNAU, M.L.; VENTURINI, L.M.; ROMERO, J.R.; EIRAS, D.F.; BASSO, W.U. **Parasitología práctica y modelos de enfermedades parasitarias en los animales domésticos**. La Plata: UNLP. 2005.

XIMENES, T. RONDELAUD, D.; MAGE, C.; CHERMETTE, R. A eliminação da *Lymnaea truncatula* das pastagens: controle biológico e controle integrado contra a fasciolose. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre: edição extra, n.1, p. 40-46, 1995.